



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE NOVOS COMPLEXOS
DE RUTÊNIO-FOSFINA EM CÉLULAS DE CARCINOMA
HEPATOCELULAR HUMANO HepG2**

SARA PARENTE NEVES

**Salvador – Bahia
2018**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE NOVOS COMPLEXOS
DE RUTÊNIO-FOSFINA EM CÉLULAS DE CARCINOMA
HEPATOCELULAR HUMANO HepG2**

SARA PARENTE NEVES

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa para obtenção do grau
de Mestre.

Salvador – Bahia
2018

" POTENCIAL ANTINEOPLÁSTICO DE NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO-FOSFINA EM CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO HepG2."

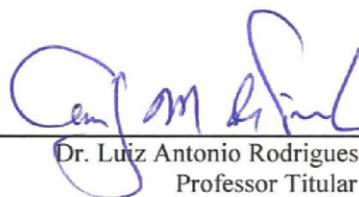
SARA PARENTE NEVES

FOLHA DE APROVAÇÃO

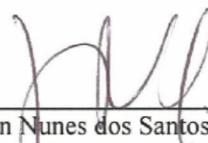
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Cristiane Flora Villarreal
Professor Associada
UFBA



Dr. Luiz Antonio Rodrigues de Freitas
Professor Titular
UFBA



Dr. Jean Nunes dos Santos
Professor Titular
UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001"

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

AGRADECIMENTOS

“O todo é mais do que a soma de suas partes”

Aristóteles

A Deus.

Ao meu filho Yuri por entender a minha ausência e à minha mãe pela paciência.

Às minhas primas-irmãs: Keila, Flávia, Larissa e Safira por estarem presentes em minha vida sempre!

À Ana Carolina e Larissa pelo apoio, força, ajuda, amizade, paciência e pelas resenhas. Sem vocês, os experimentos mais complexos não teriam sido realizados.

O *in vivo* que o diga!

Ao melhor grupo de pesquisa: Nanashara, Valdenízia, Rosane, Rafaela, Luciano, Suellen e Ingrid.

Aos colegas do LETI, que tornaram os dias de trabalho no laboratório mais amenos e divertidos.

Ao Dr. Daniel Pereira Bezerra pela orientação, pelas reflexões, pela paciência e por ter favorecido o meu desenvolvimento profissional.

À Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio, pelo excelente trabalho.

Ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa – IGM, e aos membros do corpo docente e funcionários.

NEVES, Sara Parente. Potencial antineoplásico de novos complexos de rutênio-fosfina em células de carcinoma hepatocelular humano HepG2. 2018. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Complexos de rutênio têm emergido como potenciais agentes anticancerígenos, pois possuem propriedades citotóxicas seletivas e baixa toxicidade sistêmica. **OBJETIVO:** Estudar complexos de rutênio-fosfina como fármacos para o tratamento do câncer. **MATERIAL E MÉTODOS:** Três novos complexos de rutênio-fosfina contendo ligantes nitrogenados **1**, **2** e **3** foram testados contra linhagens de células cancerosas de diferentes tipos histológicos (HepG2, HCT116, SCC-4, HSC-3, MCF-7, K-562, HL-60 e B16-F10) e não cancerosas (MRC-5 e PBMC), através do ensaio do alamar blue em cultura em monocamada (2D) e em um modelo 3D formado a partir de células de carcinoma hepatocelular humano HepG2. Posteriormente, células HepG2 foram incubadas por 24 e 48 horas com diferentes concentrações dos complexos **1** e **2** e o número de células viáveis foi determinado pelo ensaio de exclusão com o azul de tripam. A análise do ciclo celular, marcação para anexina V/iodeto de propídio, quantificação do potencial transmembrânico mitocondrial e quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) foram determinadas por citometria de fluxo. Um ensaio de intercalação com o DNA foi realizado por fluorometria. A eficácia *in vivo* dos complexos **1** e **2** foi avaliada em camundongos C.B.17 SCID inoculados com células HepG2. **RESULTADOS:** Os complexos apresentaram potente efeito citotóxico no painel de linhagens celulares de câncer em culturas em 2D e 3D, sendo os complexos **1** e **2** os mais potentes e seletivos. Células HepG2 tratadas com os complexos **1** e **2** apresentaram uma redução no número de células viáveis, aumento da fragmentação do DNA internucleosomal, perda do potencial transmembrânico mitocondrial e aumento da externalização de fosfatidilserina, sugerindo indução de morte celular apoptótica. Os complexos também induziram fosforilação de ERK 1/2, e a co-incubação com U-126 um inibidor de MEK conhecido por inibir ERK 1/2, indicou indução de morte celular apoptótica através da via de sinalização ERK 1/2 em células HepG2. Não foi observado aumento nos níveis de ERO. Ambos os complexos foram capazes de induzir intercalação com o DNA. No

modelo *in vivo*, os complexos apresentaram taxas de inibição do desenvolvimento tumoral de 45,4 - 67,7%. **CONCLUSÕES:** Os complexos de rutênio testados são citotóxicos para diferentes tipos de células cancerosas, causam intercalação com o DNA, induzem morte celular apoptótica e são capazes de inibir o desenvolvimento *in vivo* de células HepG2 em modelo xenográfico.

Palavras-chave: Complexos de rutênio, HepG2, Citotoxicidade, Apoptose.

NEVES, Sara Parente. Antineoplastic potential of new ruthenium-phosphine compounds in human hepatocellular carcinoma cells HepG2. 2018. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The ruthenium complexes have anticancer properties, which are selective and present low systemic toxicity. **AIM:** The objective of this study was to analyze ruthenium complexes as drugs for the treatment of cancer. **MATERIAL AND METHODS:** Three new ruthenium-phosphine complexes containing nitrogenous ligands **1**, **2** e **3** were tested against cancer cells of different histological types (HepG2, HCT116, SCC-4, HSC-3, MCF-7, K-562, HL-60 and B16-F10) and non-cancer cells (MRC-5 and PBMC), by blue alamar assay after 72 h of incubation in monolayer (2D) cultures and in a 3D model of multicellular cells formed by HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. Subsequently, HepG2 cells were incubated for 24 and 48 h with different compounds **1** and **2** and the number of live cells was subjected to tripan blue analysis. Cell cycle analysis, annexin V staining, quantification of mitochondrial transmembrane potential, and quantification of reactive oxygen species (ROS) were determined by flow cytometry. DNA intercalation assay was performed by fluorimeter. In *in vivo* study, **1** and **2** was injected into C.B.17 SCID mice inoculated with HepG2 cells. **RESULTS:** The complexes presented potent cytotoxic effect in cancer cell in 2D and 3D cultures models, where the complexes **1** and **2** were the most potent and selective. HepG2 cells treated with **1** and **2** reduced the number of viable cells, increased the DNA fragmentation, caused loss of mitochondrial transmembrane potential and increased phosphatidylserine externalization, suggesting induction of apoptotic cell death. Moreover, these complexes also induced the phosphorylation of ERK1/2, and co-incubation with U-0126, an MEK inhibitor known to inhibit the activation of ERK1/2, reduced the complexes-induced apoptosis, indicating induction of apoptotic cell death through ERK1/2 signaling in HepG2 cells. No increase in ROS was observed. Both complexes were able to intercalate with DNA. In *in vivo* model, inhibition rates of tumor development were 45.4-67.7%. **CONCLUSION:** In conclusion, the ruthenium complexes tested are cytotoxic to different types of cancer cells, cause DNA intercalation, induce apoptotic cell death in HepG2 cells and are able to inhibit their development *in vivo* in xenograft model.

Keywords: Ruthenium complex, Hepatocellular carcinoma, Cytotoxicity, Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de transformação maligna. Alterações genéticas e epigenéticas, exposição a carcinógenos ambientais, interações heterotípicas, ciclos de seleção clonal evolutiva e aquisição de características cancerígenas.....	18
Figura 2. Diagrama esquemático simplificado da via de sinalização MAPK.	20
Figura 3. Progressão histopatológica e molecular do HCC.	21
Figura 4. Fármacos quimioterápicos: classificação e tipos. Adaptado: DIAS et al., 2015. ...	24
Figura 5. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina em modelo 3D in vitro de esferoides multicelulares formados por células HepG2.	41
Figura 6. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina sobre a viabilidade de células HepG2 determinadas por exclusão com o corante azul de tripam, após 24 e 48 h de incubação.	42
Figura 7. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina na análise morfológica de células HepG2 após 24 e 48 h de incubação.	43
Figura 8. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina obtido por citometria de fluxo de células HepG2 após 24 e 48 h de incubação.	44
Figura 9. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina na indução de apoptose em células HepG2 após 24 e 48 h de incubação, conforme determinado por citometria de fluxo usando marcação de anexina V-FITC/IP.	45
Figura 10. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina na indução de apoptose em células HepG2 após 24 e 48 horas de incubação, conforme determinado por citometria de fluxo usando marcação de anexina V-FITC/IP.	46
Figura 11. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células HepG2, após 24 h de tratamento..	47
Figura 12. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) de células HepG2 por citometria de fluxo usando marcação por H2-DCF-DA.	48
Figura 13. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina sobre a indução da intercalação com o DNA.	50
Figura 14. Efeito da via MAPK (JNK/SAPK, p38 MAPK e ERK1/2) na apoptose induzida pelos complexos de rutênio em células HepG2.	51
Figura 15. Atividade antitumoral in vivo dos complexos de rutênio em camundongos SCID C.B-17 inoculados com células HepG2.	53
Figura 16. Efeito do tratamento com os complexos de rutênio-fosfina sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2.	54

Figura 17. Análise histológica dos tumores de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2.	56
Figura 18. Mecanismo de ação dos complexos de rutênio-fosfina.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade para determinação de CI_{50}	31
Tabela 2. Delineamento do experimento in vivo em camundongos CB-17 SCID.	36
Tabela 3. Atividade citotóxica dos complexos de rutênio-fosfina.	38
Tabela 4. Índice de seletividade dos complexos de rutênio-fosfina.	39
Tabela 5. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina sobre o ciclo celular.	49
Tabela 6. Média de peso dos animais no início e no fim do experimento.	52
Tabela 7. Efeito do tratamento com os complexos de rutênio-fosfina sobre parâmetros hematológicos do sangue periférico de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CI ₅₀	Concentração inibitória média
ctDNA	<i>Circulating tumor DNA</i> (DNA circulante de tumor)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetra Acetic Acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
E.P.M	Erro padrão da média
ERK 1/2	<i>Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2</i> (proteínas cinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC	Intervalo de confiança
IS	Índice de seletividade
JNK	<i>c-Jun amino-terminal kinases</i> (cinases c-Jun amino-terminal)
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mL	Mililitro
M	Molar
mM	Milimolar
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (proteína cinase ativada por mitógeno)
NAC	N-acetyl-L-cysteine (N-acetil-L-cisteína)
nm	Nanômetro
OXA	Oxaliplatina
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (células mononucleares do sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (salina tamponada com fosfato)
PI	<i>Propidium iodide</i> (Iodeto de propídio)
SBF	Soro fetal bovino
TEM	<i>Transmission electron microscope</i> (microscópio eletrônico de transmissão)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	CÂNCER	15
2.2	CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO	20
2.3	TERAPIAS DO CÂNCER.....	22
2.4	COMPLEXOS METÁLICOS	24
2.5	COMPLEXOS FOSFÍNICOS	27
3	OBJETIVO	29
3.1	GERAL	29
3.2	ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	SÍNTESE DOS COMPLEXOS	30
4.2	CÉLULAS E CULTIVO CELULAR	30
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM MODELO DE CULTURA 2D.....	31
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM MODELO DE CULTURA 3D.....	32
4.5	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	32
4.6	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	33
4.7	ENSAIO DE MARCAÇÃO COM ANEXINA V/IP	33
4.8	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO MITOCONDRIAL.....	34
4.9	AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	34
4.10	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS MAPK FOSFORILADAS.....	35
4.11	ENSAIO DE INTERCALAÇÃO DO DNA	35
4.12	MODELO DE XENOTRANSPLANTE	36
4.13	ANÁLISE TOXICOLÓGICA	36
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5	RESULTADOS	38
5.1	OS COMPLEXOS DE RUTÊNIO-FOSFINA SÃO CITOTÓXICOS FRENTE À DIFERENTES CÉLULAS CANCEROSAS	38

5.2	OS COMPLEXOS DE RUTÊNIO-FOSFINA INDUZEM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CARACTERÍSTICAS DE MORTE CELULAR APOPTÓTICA.....	42
5.3	OS COMPLEXOS DE RUTÊNIO-FOSFINA DESENCADAM APOPTOSE MEDIADA POR AUMENTO DA DESPOLARIZAÇÃO MITOCONDRIAL E NÃO VIA ERO	45
5.4	OS COMPLEXOS DE RUTÊNIO-FOSFINA INDUZEM INTERCALAÇÃO E LEVAM À FRAGMENTAÇÃO DO DNA.....	48
5.5	OS COMPLEXOS DE RUTÊNIO-FOSFINA INDUZEM MORTE CELULAR APOPTÓTICA VIA ERK 1/2.....	50
5.6	OS COMPLEXOS DE RUTÊNIO-FOSFINA REDUZEM O CRESCIMENTO DE CÉLULAS HEPG2 EM MODELO XENOGRÁFICO.....	52
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	61
	REFEFÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

O câncer é, em essência, uma doença multigênica e multicelular que apresenta etiologia multifatorial (BASKAR et al., 2012). É a segunda principal causa de morte em todo o mundo, sendo que 1 em cada 6 mortes é devido a esta doença. O impacto econômico é significativo, e o custo anual total em 2010 foi estimado em aproximadamente US\$ 1,16 trilhão (WHO, 2014).

Existem muitos tipos de tratamento contra o câncer, que incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, terapia alvo, terapia hormonal, e transplante de células-tronco, sendo que o tipo de tratamento dependerá do tipo de câncer e de quão avançado ele se encontra (NIH, 2017). Porém a quimioterapia continua sendo a estratégia de primeira linha para o tratamento de diversos tipos de câncer.

Desde a descoberta da cisplatina, muitos complexos de metais de transição têm sido sintetizados e seu potencial antineoplásico tem sido avaliado. O sucesso da platina como agente anticâncer tem estimulado a pesquisa por outros compostos metálicos com atividade antitumoral, baixa toxicidade e seletividade. Nos últimos anos, complexos de rutênio surgiram como promissores agentes anticancerígenos e antimetastáticos, devido à seletividade conferida pelas propriedades biológicas desta molécula (KÖPF-MAIER, 1994; GALANSKI et al., 2005; ANTONARAKIS e EMADI, 2010).

A fosfina (PH₃), é um composto inorgânico análogo à amina (NH₃) descrita na literatura por apresentar atividade antibacteriana, anti-inflamatória, citotóxica e antitumoral, além de ser utilizada no tratamento de artrite reumatoide (ENDERSON e ALLEY, 2001; RAMOS-LIMA et al., 2003; MARZANO et al., 2009; STAROSTA et al., 2010; KOMARNICKA et al., 2015).

Neste trabalho, complexos de rutênio-fosfina contendo os ligantes nitrogenados 1,3-tiazolidina-2-tiona, mercapto-1-metil-imidazol e 4,6-diamino-2-mercaptopyrimidina foram estudados quanto ao seu potencial antineoplásico. Estes, foram recentemente sintetizados e estudos preliminares mostraram que eles apresentam potencial citotóxico promissor e são capazes de inibir a enzima topoisomerase II humana (SILVA, 2017).

Assim, nossa hipótese é que os novos complexos de rutênio-fosfina apresentam potencial antineoplásico promissor. Aqui, a capacidade dos complexos em intercalar com o DNA, induzir morte celular apoptótica em células de carcinoma hepatocelular humano HepG2 e inibir seu desenvolvimento *in vivo* em modelo xenográfico foram estudados pela primeira vez.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

O câncer é uma doença caracterizada por uma perda dos mecanismos normais de controle que regulam a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação celular. Pode resultar da proliferação anormal de qualquer tipo de célula do corpo e é classificado de acordo com o tecido e o tipo de célula do qual se originou. Com isso, há diferentes tipos celulares de câncer que podem variar substancialmente em seu comportamento e resposta aos tratamentos (KATZUNG *et al.*, 2016; COOPER e HAUSMAN, 2016).

Os tipos de câncer derivados de células epiteliais, incluem aproximadamente 90% dos cânceres humanos, e são denominados carcinomas. Já os derivados do tecido conjuntivo, tais como músculo, osso, cartilagem e tecido fibroso, são denominados sarcomas, e são tumores sólidos raros em humanos. Os tipos de câncer que não se enquadram nestas duas grandes categorias incluem leucemias e linfomas, derivados de células hematopoiéticas, e os cânceres derivados de células do sistema nervoso (ALBERTS, 2017; COOPER e HAUSMAN, 2016). Existem inúmeras outras diferenças, e as distinções moleculares aumentam a evidência citogenética, epidemiológica e médica de que os tumores líquidos e sólidos devem ser considerados separadamente em termos de biologia, comportamento e patogênese (KOMAROVA *et al.*, 2003).

Os tumores são tecidos complexos compostos de múltiplos tipos de células distintas que participam de interações heterotípicas entre si. Um tumor benigno, permanece em seu local de origem, não invade o tecido normal vizinho e não se espalha para outros locais, podendo ser removido cirurgicamente. Somente tumores malignos são chamados de cânceres, já que estes se espalham pelo corpo através dos sistemas linfático ou circulatório provocando metástases e, tornando-os resistentes a tratamentos localizados (HANAHAN e WEINBERG, 2011; COOPER e HAUSMAN, 2016).

Em condições fisiológicas normais, células dentro do microambiente limitam o estabelecimento do tumor primário. No entanto, a progressão tumoral bem-sucedida requer a evasão de funções supressivas. Isso ocorre em conjunto com o aumento da proliferação tumoral, da hipóxia, da inflamação e da angiogênese. Como as células cancerosas adotam fenótipos invasivos e imunossupressores, elas se infiltram no tecido local e interrompem a homeostase liberando fatores pró-tumorigênicos que alteram o meio e afetam o fenótipo das células vizinhas (QUAIL e JOYCE, 2013).

Os tumores também liberam citocinas e fatores de crescimento, que podem não apenas afetar a sobrevivência das células cancerosas no sangue, mas também estimular o nicho pré-metastático antes da chegada das células cancerosas em outros órgãos. Por fim, uma vez que as células cancerosas chegam aos tecidos secundários, o microambiente deve ser permissivo à sua colonização e expansão para que a doença se desenvolva (QUAIL e JOYCE, 2013).

A metástase, ou seja, o espalhamento e crescimento de lesões satélite em outros órgãos, é o estágio final, e é, em última instância, responsável pela grande maioria das mortes causadas por câncer. Alguns dos processos bioquímicos envolvidos nos estágios iniciais da metástase são o aumento da mobilidade celular e a produção de proteases degradantes da matriz. No entanto, as alterações genéticas responsáveis por essas características ainda não foram elucidadas (CHAMBERS *et al.*, 2002; FIDLER, 2002).

À medida que as células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico, elas adquirem características essenciais para o desenvolvimento do câncer. Estas incluem, autossuficiência na produção de fatores de crescimento, insensibilidade a sinais antiproliferativos, resistência à morte programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, indução de angiogênese, invasão tecidual e metástase. Esse processo de múltiplas etapas da patogênese do tumor deve estar relacionado à necessidade das células cancerosas incipientes de adquirir características para se tornarem tumorigênicas, e, finalmente malignas (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Células de mamíferos possuem múltiplos mecanismos para protegê-los contra os efeitos potencialmente letais das mutações genéticas do câncer, e somente quando vários genes estão alterados é que o câncer se desenvolve. Alterações em três tipos de genes são responsáveis pela tumorigênese: oncogenes, genes supressores de tumor e genes de estabilidade (VOGELSTEIN e KINZLER, 2004).

Oncogenes e genes supressores tumorais mutados operam similarmente em nível fisiológico: eles conduzem o processo neoplásico aumentando o número de células cancerosas através da estimulação da proliferação ou da inibição da morte celular e/ou da parada do ciclo celular. O aumento do número de células cancerosas pode ser causado pela ativação de genes que impulsionam o ciclo celular, inibindo processos apoptóticos normais ou facilitando o fornecimento de nutrientes através da angiogênese sustentada (VOGELSTEIN e KINZLER, 2004).

Já os genes de estabilidade promovem a tumorigênese de uma maneira completamente diferente quando mutados. Estes, mantêm as alterações genéticas sob controle, e, portanto, quando estão inativados ocorrem mutações em outros genes à uma taxa mais alta do que a normal. Todos os genes são potencialmente afetados pelo aumento da taxa de mutação resultante, mas apenas mutações em oncogenes e genes supressores de tumores afetam o crescimento celular e podem assim conferir uma vantagem de crescimento seletivo à célula mutante. Mutações nessas três classes de genes podem ocorrer na linhagem germinativa, resultando em predisposições hereditárias ao câncer, ou em células somáticas, resultando em tumores esporádicos (FRIEDBERG, 2003; VOGELSTEIN e KINZLER, 2004).

Alterações hereditárias na expressão gênica que não se devem a qualquer alteração na sequência de DNA, como por exemplo, a metilação do DNA, afetam a transcrição gênica e o reparo do DNA (HOLLIDAY, 1987; JENUWEIN e ALLIS, 2001). A metilação do DNA é influenciada por modificações químicas que ocorrem nas histonas, e estas são comumente desfeitas em células cancerígenas. A hipometilação do DNA, foi uma das primeiras alterações epigenéticas a serem encontradas no câncer humano (FEINBERG e VOGELSTEIN, 1983).

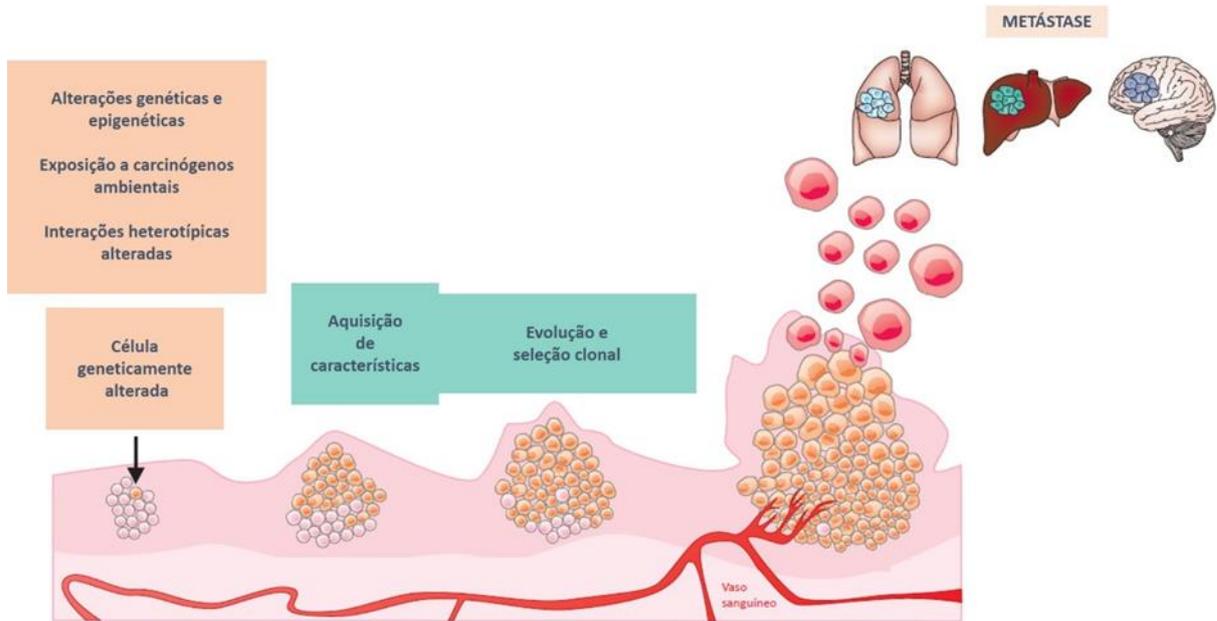


Figura 1. Processo de transformação maligna. Alterações genéticas e epigenéticas, exposição a carcinógenos ambientais, interações heterotípicas, ciclos de seleção clonal evolutiva e aquisição de características cancerígenas. Adaptado: ABC DO CÂNCER – Abordagens para o Controle do Câncer, 2017.

TP53 é um gene supressor tumoral que é alterado em muitos tipos de câncer, aproximadamente 50%, e a depender do tipo de estresse, sua ativação resulta em regulação ou repressão de genes envolvidos em diversos processos celulares. Após sinais de estresse celular, como danos no DNA ou estresse oncogênico, p53 é ativado através de uma cascata de fosforilação e outras modificações pós-traducionais (PTMs), resultando na expressão de genes envolvidos na parada do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose (se o dano for irreparável), além de também desempenhar importante papel na senescência, angiogênese e autofagia (JOERGER e FERSHT, 2008; VOUSDEN e PRIVES, 2009; BIEGING *et al.*, 2014).

A proteína p53 é inativada em quase todos os tumores, seja por mutações no gene TP53 ou pela desregulação de suas vias associadas. Compreender a estrutura da p53 e as bases moleculares das vias de sinalização associadas, e como elas são desreguladas em diferentes linhagens de células cancerígenas, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias anticancerígenas direcionadas (JOERGER e FERSHT, 2016).

A cascata MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) é uma via de sinalização de transdução de sinais intracelulares, que responde a vários estímulos extracelulares (fatores de crescimento, hormônios, citocinas e estresse) e controla

diversos processos celulares fundamentais incluindo crescimento, proliferação, diferenciação, motilidade, resposta ao estresse, sobrevivência e apoptose (SHAUL e SEGER, 2007; RAMAN *et al.*, 2007; PIMIENTA e PASCUAL, 2007). Sob condições normais, é altamente regulada por fosfatases e por comunicação bidirecional com outras vias (BUROTTTO *et al.*, 2014).

MAPK pode atuar de maneira pró-oncogênica (proliferação e invasão) ou supressora tumoral (através da indução de senescência e ubiquitinação/degradação de proteínas necessárias para a atividade do ciclo celular e sobrevivência). Mutações causadas pelo câncer levam à desregulação dessa via com consequente aumento da malignidade tumoral. É, portanto, uma via crítica para a sobrevivência, disseminação e resistência de células cancerosas (HANAHAN e WEINBERG, 2011; DE LUCA *et al.*, 2012; DESCHENES-SIMARD *et al.*, 2013; BUROTTTO *et al.*, 2014).

Existem 4 vias MAPK principais em mamíferos: quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase regulada por sinal extracelular 5 (ERK 5), quinase de junção N-terminal (JNK) e via p38. Cada cascata consiste em 3 quinases (MAP3K, MAPKK e MAPK), onde o sinal é propagado por fosforilação e ativação sequencial de quinases que levam a fosforilação de proteínas alvo regulatórias. Geralmente a via ERK responde a sinais dos fatores de crescimento, enquanto que JNK e p38 respondem a sinais de estresse extracelulares, sendo que a resposta depende da intensidade do sinal e do contexto ou tecido em que o sinal é ativado de forma aberrante (WANG e TOURNIER, 2006; COULOMBE, e MELOCHE, 2007; KRISHNA e NARANG, 2008).

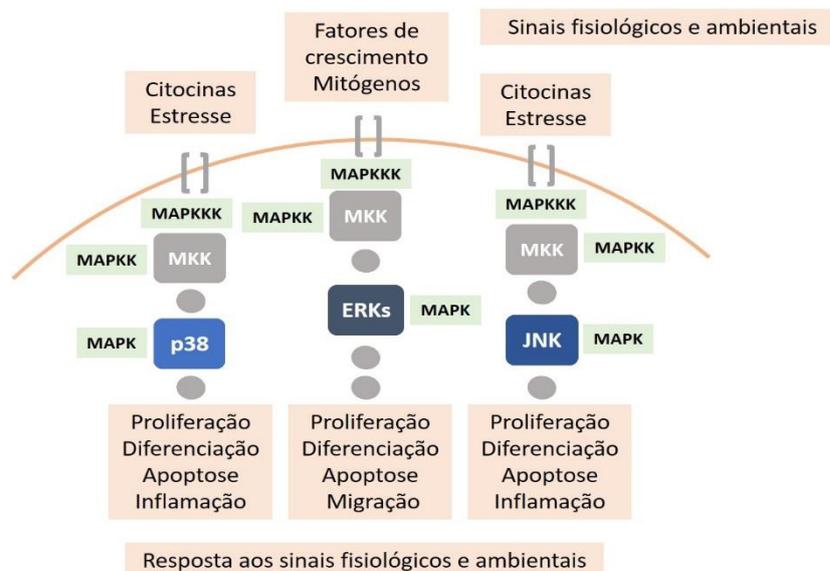


Figura 2. Diagrama esquemático simplificado da via de sinalização MAPK. Adaptado: Assessing developmental roles of MKK4 and MKK7 in vitro (WANG e XIA, 2012).

É inquestionável que o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que nas próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025. No ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes, 17 milhões de mortes por câncer, e 75 milhões de pessoas vivas anualmente com câncer em todo o mundo (IARC, 2014; WHO, 2015).

Estima-se, para o Brasil, no biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil casos novos de câncer. Os cânceres de próstata (68 mil) em homens e mama (60 mil) em mulheres serão os mais frequentes. À exceção do câncer de pele não melanoma, os tipos de câncer mais incidentes em homens serão próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) figurarão entre os principais (INCA, 2018).

2.2 CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO

O carcinoma hepatocelular (HCC) é a neoplasia hepática primária mais comum, 85-90%, sendo uma das principais causas de morte relacionadas ao câncer em todo o mundo (aproximadamente 850.000 novos casos por ano). Apesar de ser apenas o

sexto câncer em incidência, o carcinoma hepatocelular é o terceiro em letalidade (TORRE *et al.*, 2015; BALOGH *et al.*, 2016).

No Brasil, a incidência de HCC é baixa, sendo mais prevalente em estados como o Espírito Santo e Bahia, acometendo 78% de pacientes do sexo masculino. Embora os avanços em técnicas de prevenção, triagem e novas tecnologias tanto no diagnóstico como no tratamento existam, a incidência e a mortalidade continuam aumentando (GOMES *et al.*, 2013).

O desenvolvimento do HCC é um processo complexo, de múltiplas etapas, que geralmente ocorre no contexto da cirrose hepática e está relacionado à diversidade de etiologias da doença hepática subjacente. A transformação maligna em HCC pode se originar de vários tipos de células, incluindo hepatócitos maduros e células-tronco ou progenitoras. Semelhante a outros tumores sólidos epiteliais, o HCC é resultado do acúmulo de alterações genômicas somáticas (cada tumor apresenta uma combinação única de alterações genéticas e modificações epigenéticas). No entanto, alterações genômicas não são acumuladas aleatoriamente, sugerindo que diferentes vias podem cooperar para promover a oncogênese, e que algumas delas podem estar relacionadas aos fatores de risco essenciais para o desenvolvimento da doença (MARQUARDT *et al.*, 2015; SCHULZE *et al.*, 2015).

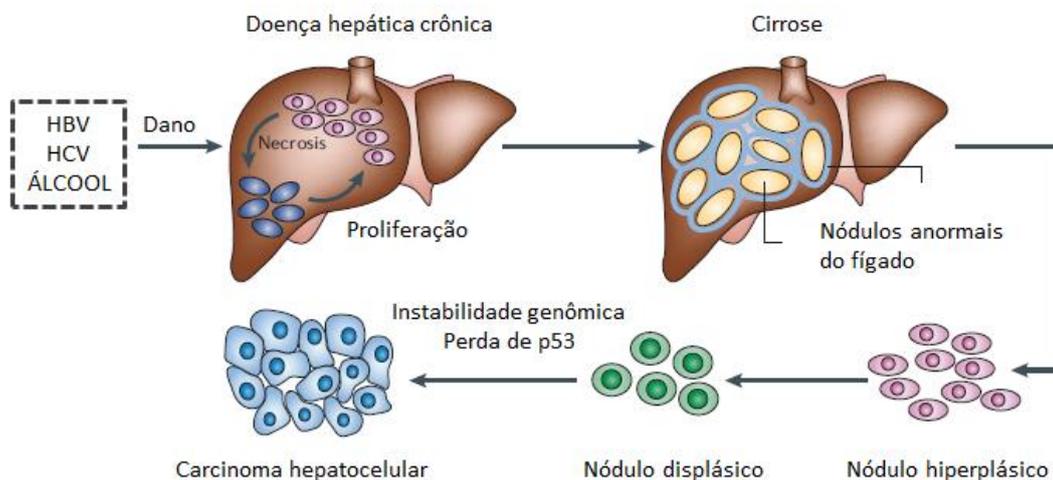


Figura 3. Progressão histopatológica e molecular do HCC. Adaptado: Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment (FARAZI e DEPINHO, 2006).

Os fatores de risco associados ao desenvolvimento do HCC estão bem definidos e incluem a cirrose (lesão hepática crônica causada por inflamação e

fibrose), infecção pelo vírus da hepatite B (HBV), infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), abuso de álcool e síndrome metabólica (EASL–EORTC, 2012).

O tumor pode ser detectado em estágio inicial sendo passível de tratamento curativo - ressecção, transplante de fígado ou ablação local. Em estágio mais avançado, apenas a quimioembolização (para HCC intermediário) e sorafenibe (para HCC avançado) mostraram efeitos benéficos relacionados à sobrevivência do paciente (LLOVET *et al.*, 2016).

Na última década, houve uma evolução da compreensão molecular da patogênese do HCC (ZUCMAN-ROSSI *et al.*, 2015). As mutações relacionadas a este tipo de câncer afetam a manutenção dos telômeros, levam a ativação da via WNT e inativação do antígeno tumoral celular p53 (TP53), alteram a remodelação da cromatina, as vias de sinalização RAS e mTOR, e, levam a ativação da via de estresse oxidativo (LLOVET *et al.*, 2016).

2.3 TERAPIAS DO CÂNCER

A cirurgia oncológica, ou seja, a remoção do tumor do local onde ele se encontra é uma modalidade terapêutica, que remonta há milhares de anos. A escolha desse tipo de procedimento depende de vários fatores, como por exemplo, da localização do tumor, do tipo do câncer, da preservação da qualidade de vida do paciente, dentre outros (WYLD *et al.*, 2015).

Nos últimos 50 anos, avanços tecnológicos e técnicas minimamente invasivas reduziram a necessidade, e/ou os efeitos prejudiciais do procedimento cirúrgico. Os tumores primários geralmente podem ser removidos por meio de cirurgia, mas as lesões amplamente metastáticas não podem ser excisadas e são difíceis ou impossíveis de tratar com terapias adjuvantes (WYLD *et al.*, 2015).

A radioterapia consiste na utilização de radiação ionizante, um agente físico, para destruir células cancerosas. Esta radiação de alta energia danifica o material genético das células (DNA), levando à inibição da divisão celular e proliferação, tanto das células normais como cancerosas. No entanto, células cancerosas em geral, não são tão eficientes quanto às células normais em reparar os danos causados pela radiação, resultando no direcionamento do tratamento radioterápico (JACKSON e BARTEK, 2009; BEGG *et al.*, 2011; BASKAR *et al.*, 2012).

Como a radioterapia contribui para 40% da taxa de cura e representa apenas 5% do custo total, aproximadamente 50% de todos os pacientes com câncer

receberão este tipo de tratamento durante o curso da doença. A radioterapia também pode ser utilizada juntamente com outras modalidades terapêuticas, como a quimioterapia e a imunoterapia (RINGBORG *et al.*, 2003; DELANEY *et al.*, 2005; BARNETT *et al.*, 2009; BEGG *et al.*, 2011).

A imunoterapia promove a estimulação do sistema imunológico, já que tumores possuem antígenos que podem desencadear respostas imunes. A depender da substância utilizada, a imunoterapia pode ser classificada em ativa, quando substâncias estimulantes e restauradoras da função imunológica (vacinas), são administradas com a finalidade de intensificar a resistência ao crescimento tumoral; ou passiva, quando anticorpos anticancerígenos ou células mononucleares exógenas são administradas, com o objetivo de intensificar a resposta do sistema imune no combate à doença (INCA, 2017).

Com o objetivo de inibir o crescimento tumoral, hormônios ou antagonistas hormonais são utilizados no tratamento de alguns tipos de câncer que dependem deste tipo de regulação, como por exemplo, os de mama e próstata. Esta modalidade terapêutica é conhecida como terapia endócrina ou hormonioterapia (BONASSA, 2005).

Estratégias para controlar a proliferação celular através da utilização de substâncias naturais ou sintéticas, individualmente ou como terapias combinadas, emergiram como uma abordagem promissora para o tratamento do câncer (CHATURVEDI *et al.*, 2008). A descoberta de que a mostarda de nitrogênio ou gás mostarda, era capaz de matar células que proliferam rapidamente, e o seu uso no tratamento do câncer de linfoma, além da utilização de fármacos antifolato para o tratamento de leucemias, levou, em 1940, a era da quimioterapia (CHABNER e ROBERTS JR, 2005; SUDHAKAR, 2009).

A quimioterapia consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou em combinação, com o objetivo de tratar as neoplasias malignas. Esta, atua interferindo no processo de crescimento e divisão, contudo sem especificidade, não destruindo seletiva ou exclusivamente as células cancerosas (BONASSA, 1992). Os quimioterápicos são classificados de acordo com a sua estrutura química e função em: agentes alquilantes, antimetabólitos, produtos naturais, antibióticos anticancerígenos, compostos de platina e agentes hormonais (DIAS *et al.*, 2015).

Além dessa classificação, novas classes de antineoplásicos, tais como os inibidores de proteína quinase (erlotinib, imatinib, sorafenib, etc) e anticorpos

monoclonais (bevacizumab, panitumumab, trastuzumab, etc) estão em uso atualmente na clínica (DIAS *et al.*, 2015).

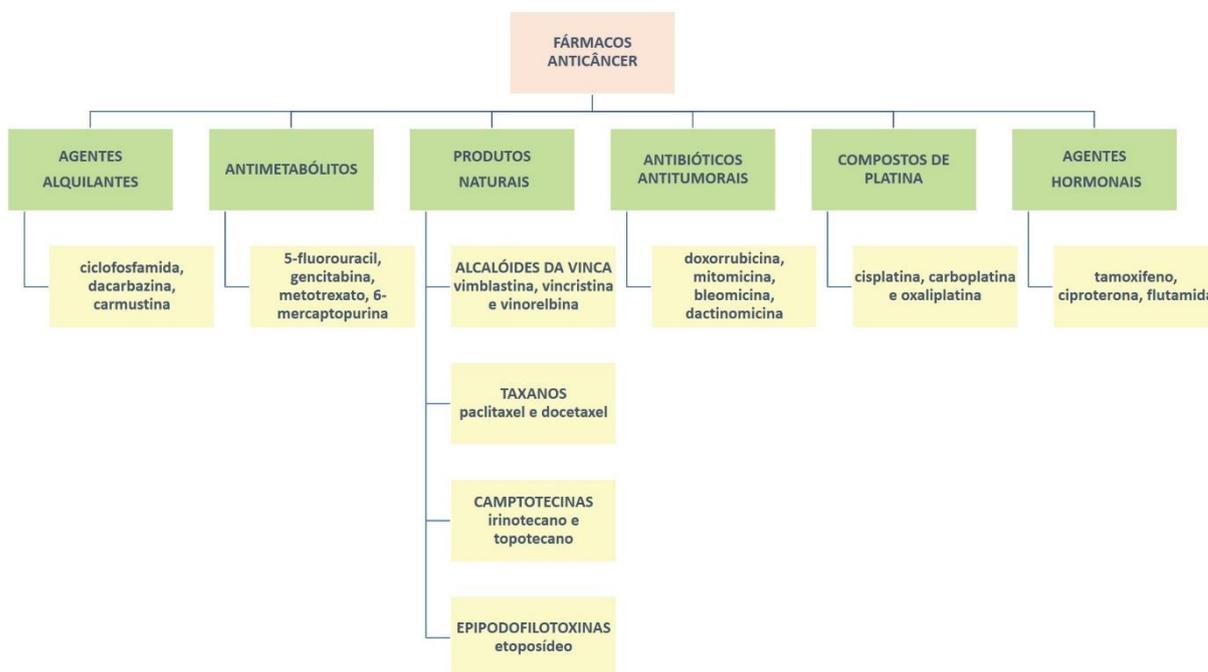


Figura 4. Fármacos quimioterápicos: classificação e tipos. Adaptado: DIAS *et al.*, 2015.

Os quimioterápicos podem ainda ser classificados em ciclo-celular específico, quando atuam em determinada fase do ciclo (geralmente na mitose ou na fase S), e ciclo-celular não específico, quando agem independentemente da fase do ciclo celular em que a célula se encontra, atuando sobre a fração proliferativa e não-proliferativa do tumor. Por essa razão, não é necessária uma alta taxa de crescimento tumoral para que o fármaco seja efetivo, contudo, é necessário que a célula se divida, pois a atuação do fármaco se dá neste processo (BONASSA, 2005).

2.4 COMPLEXOS METÁLICOS

Muitos compostos contendo metais foram utilizados ao longo da história para tratar uma ampla variedade de desordens patológicas. Os metais são componentes celulares essenciais que atuam em diversos processos bioquímicos em organismos vivos. Estes, apresentam características físico-químicas únicas que incluem atividade redox, modos de coordenação variáveis, e reatividade para diferentes substratos orgânicos (ORVIG e ABRAMS, 1999; CHEN *et al.*, 2009). Essas propriedades permitem que os complexos metálicos se liguem seletivamente ao seu alvo

biomolecular, resultando em alterações no mecanismo celular de proliferação das células (FREZZA *et al.*, 2010).

A descoberta da cisplatina por Barnett Rosenberg em 1960, representou um grande avanço na terapia do câncer. A cisplatina é um complexo metálico inorgânico que interage com o DNA, levando à inibição da sua síntese e função (JUNGWIRTH *et al.*, 2001).

Complexos de platina (II) tais como a carboplatina e a oxaliplatina, são análogos que apresentam menor toxicidade, maior seletividade e um espectro de atividade mais amplo, quando comparados com a cisplatina (FREZZA *et al.*, 2010). A carboplatina possui atividade antitumoral importante contra uma ampla variedade de tumores sólidos. Já a oxaliplatina (análogo da platina de terceira geração), apresenta um espectro de atividade diferente, sendo ativa contra alguns tipos de câncer resistentes ou não tratáveis com a cisplatina, como por exemplo, o câncer colorretal (LIPPERT, 1999; KATZUNG *et al.*, 2014).

Estima-se que 50-70% dos pacientes com câncer sejam tratados com fármacos à base de platina (DYSON e SAVA, 2006). Embora a cisplatina seja amplamente utilizada para tratar diversos tipos de tumores, incluindo carcinoma de pulmão de células não pequenas, tumores cervicais, ovarianos, de cabeça e pescoço e testiculares, a resistência e os efeitos tóxicos correlacionados aos tradicionais fármacos anticancerígenos à base de platina, tem estimulado a pesquisa por outros compostos metálicos com atividade antitumoral e baixa toxicidade (JAMIESON e LIPPERT, 1999; KELLAND, 2007; ANTONARAKIS e EMADI, 2010).

Nesse contexto, diversos compostos metálicos estão sendo sintetizados, e suas propriedades anticancerígenas promissoras já estão em uso na prática clínica para diagnóstico e tratamento, enquanto alguns ainda estão sendo submetidos a ensaios clínicos (NDAGI *et al.*, 2017). Compostos metálicos se ligam a resíduos específicos, a maioria dos quais estão envolvidos na catálise enzimática, resultando na alteração de alguns processos celulares, e, conseqüente morte da célula (apoptose) (DAS e DINDA, 2014).

Além dos análogos da platina, outros complexos metálicos incluindo os de zinco, ouro, prata e cobre, vêm sendo estudados devido às suas propriedades anticancerígenas promissoras (MILACIC *et al.*, 2008; FREZZA *et al.*, 2010).

O zinco é um elemento traço indispensável que desempenha importante papel em muitos processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação e defesa contra

radicais livres (HO, 2004; STEFANIDOU *et al.*, 2006). Em alguns tipos celulares, a exposição a baixos níveis de zinco induz a apoptose, enquanto que a exposição a altos níveis inibe a apoptose. Estes resultados contraditórios têm sido objeto de intensa investigação e atualmente permanecem sem resposta (PROVINCIALI *et al.*, 1995).

O ouro tem sido utilizado na terapia medicinal chinesa e árabe há milhares de anos (SADLER e SUE, 1994). Alguns complexos de ouro (I) entraram em uso clínico (por exemplo, a auranofina foi aprovada pela FDA em 1985) para o tratamento da artrite reumatóide, devido às suas propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias (GABBIANI *et al.*, 2007; ZOU *et al.*, 2015). Entre os agentes anticancerígenos, os complexos de ouro despertam interesse devido ao seu potente efeito antiproliferativo, através de um mecanismo de ação diferente dos fármacos à base de platina, o que pode estar relacionado a seletividade e menor toxicidade destes complexos. Nesse contexto, nos últimos anos, diversos estudos sobre as aplicações terapêuticas dos complexos de ouro como agentes anticancerígenos vem sendo realizados (NARDON *et al.*, 2014).

Os complexos de prata são conhecidos há muito tempo devido às suas atividades antimicrobianas, e, recentemente, foi demonstrado que estes apresentam atividade citotóxica promissora contra diversas linhagens celulares de câncer. Os complexos de prata (I) são mais citotóxicos do que a cisplatina, com toxicidade relativamente baixa e maior seletividade (KALINOWSKA-LIS *et al.*, 2015).

Estudos *in vitro* mostraram que o cobre atua como um efector angiogênico, estimulando a proliferação e migração de células endoteliais. Com base nesses achados, a terapia antiangiogênica utilizando quelantes de cobre na terapia do câncer ganhou considerável interesse (HU, 1998; YOSHII *et al.*, 2001; PAN *et al.*, 2002).

Complexos de rutênio têm emergido como alternativa aos tipos de câncer não responsivos ou resistentes à platina devido às suas propriedades bioquímicas únicas e versáteis. O rutênio é um metal de transição pertencente ao grupo 8, o mesmo grupo químico do ferro, e apresenta dois estados de oxidação principais: Ru (II) e Ru (III) (DUAN *et al.*, 2009). Complexos de Ru (II) possuem atividade anticancerígena altamente promissora em modelos *in vitro* e *in vivo*, pois somente em condições biológicas de hipóxia, pH ácido e altos níveis de glutathione, é que este se torna reativo, resultando na seletividade e citotoxicidade frente as células cancerosas

(MINCHINTON e TANNOCK, 2006; ANTONARAKIS e EMADI, 2010; HARTINGER *et al.*, 2013; ZENG *et al.*, 2017).

Os complexos de Ru (II) entram nas células através de múltiplos mecanismos, como a difusão passiva, o transporte ativo e a endocitose, chegando ao núcleo onde, interagem com ácidos nucleicos e proteínas, via múltiplos modos de ligação (GILL e THOMAS, 2012; LIANG *et al.*, 2014). Embora o núcleo seja relatado como o principal alvo para os complexos de rutênio, muitos demonstraram se acumular em outros compartimentos celulares, tais como a superfície celular, e especialmente as mitocôndrias, que também foram relatados como alvos para a atividade anticancerígena de alguns complexos de Ru (II) (GREEN e REED, 1998; PUCKETT e BARTON, 2007; GROESSL *et al.*, 2011).

O rutênio pode mimetizar o ferro, no que diz respeito à sua ligação às proteínas plasmáticas transferrina e albumina (KRATZ e MESSORI, 1993). Estas, são responsáveis pelo transporte deste mineral no sangue e sua solubilização. Células com alta taxa proliferativa requerem grandes quantidade de ferro, o que resulta na regulação e consequente aumento dos receptores de transferrina na superfície celular, o que leva à acumulação do rutênio em massas neoplásicas (SAVA *et al.*, 1984; ANTONARAKIS e EMADI, 2010). Complexos transferrina-rutênio são ativamente transportados para tecidos cancerígenos e, uma vez ligado ao receptor de transferrina, o complexo libera o rutênio, que é internalizado pela célula tumoral (SAVA e BERGAMO, 2000).

O efeito antimetastático é provavelmente mediado pela inibição do destacamento da célula tumoral, da invasão/migração e da readesão ao novo substrato de crescimento (BERGAMO *et al.*, 2012).

O rutênio pode formar complexos octaédricos, o que permite explorar mais ligantes em comparação com complexos de platina (II) que apenas formam complexos planares (PAGE, 2012). Em geral, o tipo de ligante e a geometria de coordenação entre o rutênio e seus ligantes, determinam a atividade de compostos de rutênio, principalmente em relação à sua reatividade, hidrofobicidade, ligação, absorção celular e distribuição intracelular (ZENG *et al.*, 2017).

2.5 COMPLEXOS FOSFÍNICOS

Os complexos fosfínicos de metais de transição têm despertado grande interesse nos últimos anos devido as importantes propriedades bioquímicas

conferidas a fosfina. As fosfinas são extremamente versáteis na sua capacidade em estabilizar metais em diversos estados de oxidação; possibilitam a formação de complexos facilmente dissociáveis (condição indispensável quando se trata de citotoxicidade); são ligantes neutros; existe a possibilidade de mudança nos substituintes R, o que pode influenciar na atividade, seletividade e estabilidade da molécula; apresentam atividade citotóxica e antitumoral; apresentam alta lipofilicidade, o que facilita a passagem do fármaco pela membrana de natureza lipoproteica, além de apresentar também estabilidade termodinâmica e cinética (STRUCK *et al.*, 1966; JAMES, 1973; PARSHALL, 1980; COTTON, 1980; PIGNOLET, 1983; BERNERS-PRICE *et al.*, 1986; YAMAMOTO, 1986; BERNERS-PRICE e SADLER, 1987; CRABTREE, 1988).

A molécula de fosfina apresenta atividade citotóxica similar aos seus complexos-fosfínicos de ouro, prata e cobre. Quando presente em condições biológicas, a fosfina livre é rapidamente oxidada. Portanto, sua associação com complexos metálicos é imprescindível, já que estudos demonstraram que as fosfinas quando oxidadas não são citotóxicas (BERNERS-PRICE e SADLER, 1987; CRUZ JÚNIOR, 2010).

Foi demonstrado que a auranofina, um complexo metálico de fosfina utilizado para o tratamento de artrite reumatóide, possui atividade antitumoral *in vivo* frente a leucemia murina P388, e potência citotóxica *in vitro* contra as células de melanoma murino B16, além de apresentar atividade como potencial radiofármaco para utilização na medicina nuclear (BERNERS-PRICE *et al.*, 1987; GORDON, 1989). Nesse contexto, complexos fosfínicos de metais de transição incluindo, rutênio, prata, cobre, ouro e platina têm sido avaliados como potenciais agentes antineoplásicos em diversas linhagens de câncer (MARZANO *et al.*, 2009; VON POELHSITZ *et al.*, 2007; BERGAMINI *et al.*, 2007).

3. OBJETIVO

3.1 GERAL

Estudar complexos de rutênio-fosfina contendo os ligantes nitrogenados 1,3-tiazolidina-2-tiona, mercapto-1-metil-imidazol e 4,6-diamino-2-mercaptopyrimidina quanto ao seu potencial antineoplásico.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade dos complexos de rutênio-fosfina frente a diferentes linhagens de células cancerosas e células não cancerosas em modelos 2D e em esferoides 3D multicelulares formadas a partir de células HepG2;
- Qualificar a morfologia celular após o tratamento com os complexos em células HepG2;
- Avaliar o efeito dos complexos sobre a externalização de fosfatidilserina em células HepG2;
- Investigar o efeito dos complexos sobre o potencial transmembrânico mitocondrial em células HepG2;
- Avaliar a capacidade dos complexos em induzir estresse oxidativo em células HepG2;
- Investigar o efeito dos complexos sobre o ciclo celular em células HepG2;
- Quantificar os níveis de phospho-ERK1 (T202/Y204), phospho-JNK2 (T183/Y185), phospho-p38 α (T180/Y182);
- Analisar a capacidade dos complexos em intercalar com o DNA;
- Avaliar o efeito dos complexos in vivo em modelo xenográfico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DOS COMPLEXOS

A síntese e a caracterização química dos complexos metálicos de rutênio-fosfina foram realizadas pelo Laboratório de Química Inorgânica da UFSCAR (Universidade Federal de São Carlos) pelo prof. Dr. Alzir Azevedo Batista e pela Dra. Monize Martins da Silva (SILVA, 2017). Os complexos de rutênio [Ru(mmi)(bipy)(dppb)]PF₆ (1), [Ru(tzdt)(bipy)(dppb)]PF₆ (2), [Ru(dmp)(bipy)(dppb)]PF₆ (3), foram sintetizados conforme previamente reportado (CORREA *et al.*, 2016; SILVA, 2017).

4.2 CÉLULAS E CULTIVO CELULAR

Para os ensaios de citotoxicidade, as linhagens de células cancerosas foram obtidas da *American Type Culture Collection* - ATCC (Rockville, Maryland, U.S.A.) (**Tabela 1**). Os tipos celulares utilizados neste trabalho foram mantidos em garrafas de polipropileno contendo meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF, Cultilab, Campinas, SP, BRA) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, BRA), e acondicionadas em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido e a troca do meio de cultivo ocorreu sempre que o limite de confluência das células fosse alcançado, ou houvesse necessidade de repor nutrientes. Para a manutenção das linhagens aderentes, foi utilizada uma solução de tripsina EDTA a 0,25% (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) para destacar as células das garrafas de cultura. Todos os experimentos foram conduzidos com células em fase exponencial de crescimento. Todas as linhagens celulares foram testadas para micoplasma usando um kit de detecção de micoplasma por coloração com Hoechst (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), a fim de evitar o uso de células contaminadas. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas por protocolo padrão utilizando o Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Helthcare Bio-Sciences AB, Suécia). Após a separação, as PBMC foram lavadas duas vezes com solução salina e ressuspensas (0,3 x 10⁶ células/ mL) em meio RPMI suplementado com 20% de SBF, 2 mM de glutamina e 50 µg/mL de gentamicina. Para induzir a divisão celular de linfócitos T, a concanavalina-

A (ConA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como agente mitógeno.

Tabela 1. Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade para determinação de CI_{50} .

Células	Tipo Histológico
Células cancerosas	
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humano
HCT116	Carcinoma de cólon humano
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano
SCC-4	Carcinoma oral de células escamosas humano
HSC-3	Carcinoma oral de células escamosas humano
HL-60	Leucemia promielocítica humana
K-562	Leucemia mielogênica crônica humana
B16-F10	Melanoma murino
Células não cancerosas	
MRC-5	Fibroblasto de pulmão humano
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
Célula mutante	
BAD KO SV4 MEF	Fibroblasto embrionário imortalizado nocaute para o gene BAD de camundongo
WT SV40 MEF	Fibroblasto embrionário imortalizado do tipo selvagem

Linhagens celulares cancerosas, não cancerosas e mutantes foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). O Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (Salvador, BA, Brasil) aprovou o protocolo experimental (nº 031019/2013), para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM MODELO DE CULTURA 2D

A avaliação da atividade citotóxica dos complexos foi realizada com uso do corante Alamar blue (resazurina, Sigma-Aldrich Co). O alamar blue é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox, sendo que sua redução reflete a proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável) (O'BRIEN *et al.*, 2000). A doxorubicina (Laboratório IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) e a oxaliplatina (Sigma Chemical, Co) foram usadas como controles positivo, e os poços não-tratados receberam apenas o veículo utilizado para solubilizar as substâncias testadas (0,5% de DMSO,

Sigma Chemical, Co). Inicialmente, células de linhagens aderentes foram adicionadas a placas de 96 poços ($0,7 \times 10^5$ células/mL em 100 μ L/ poço) e incubadas por 24 h para aderência. O plaqueamento de células não aderentes (HL-60 e K-562) foi realizado após este período ($0,3 \times 10^6$ células/mL em 100 μ L/ poço). Todas as culturas foram tratadas por um período de 72 h com os compostos (0,19 – 25 μ g/mL) dissolvidos em DMSO. Antes do final do período de incubação (4 h para linhagens celulares e 24 h para o PBMC), 20 μ L da solução estoque (0,312 mg/mL) de Alamar blue foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 600 nm (oxidado) utilizando leitora de placas Spectra Max 190.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM MODELO DE CULTURA 3D

Este ensaio permite o estudo do mecanismo citotóxico de agentes antineoplásicos em um microambiente tumoral semelhante ao *in vivo* (YAMADA *et al.*, 2007). As células HepG2 foram plaqueadas (100 μ L de uma solução de células de $0,5 \times 10^6$ células/mL) em placas de 96 poços com superfície repelente (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) contendo meio completo acrescido de 3% de matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), para formação de esferoides 3D multicelulares. Em seguida, os esferoides formados foram expostos por 72 h a diferentes concentrações dos compostos e a citotoxicidade foi quantificada conforme descrito na metodologia acima.

4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Este método permite avaliar a viabilidade celular através da avaliação da integridade da membrana plasmática. A análise da integridade da membrana plasmática é uma importante ferramenta para estudar o tipo de morte celular, visto que apenas na necrose ela apresenta-se precocemente alterada (MACKLIS e MADISON, 1990). Para avaliar a viabilidade celular, após o tratamento nos tempos de 24 e 48 horas, as células foram tripsinizadas, e, uma alíquota de 90 μ L foi acrescida a 10 μ L do corante azul de tripam. Células não viáveis, por apresentarem danos na membrana, coram-se em azul. A contagem foi realizada levando em consideração a

exclusão do corante por células viáveis, em câmara de Neubauer, por meio de microscópio óptico (Olympus CX41).

4.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Para avaliar alterações na morfologia das células, estas foram cultivadas sob lamínula e coradas com May-Grunwald-Giemsa. As alterações morfológicas foram examinadas por microscopia óptica. Para avaliar parâmetros morfológicos, as características de dispersão da luz foram determinadas por citometria de fluxo. FSC (*forward scatter* – desvio de luz para frente) e SSC (*side scatter* – desvio de luz para o lado) foram usados como parâmetros de tamanho relativo e granulosidade/complexidade interna da célula, respectivamente, já que nos estágios finais da apoptose ocorre redução do volume celular e condensação da cromatina. Para este experimento, as análises foram feitas a partir dos resultados obtidos no ensaio de marcação com Anexina-V/IP nos tempos de 24 e 48 horas.

4.7 ENSAIO DE MARCAÇÃO COM ANEXINA V/IP

O procedimento de detecção de apoptose por Anexina V-FITC/IP consiste na ligação da anexina V-FITC à fosfatidilserina, na membrana das células que estão iniciando o processo de morte celular apoptótica, e na ligação do IP ao DNA das células que não apresentam integridade de membrana, ou seja, células que estão em processo final da apoptose e/ou células necróticas. Portanto, as células HepG2 foram marcadas com anexina V-FITC e IP para determinar a porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial/tardia e células necróticas, de acordo com o protocolo do fabricante (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA). Após 24 e 48 horas de tratamento, as células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes com solução salina e em seguida, ressuspensas numa solução de 100 µL do tampão de ligação, 5 µL de IP e 5 µL de anexina V-FITC. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, na ausência de luminosidade, 400 µL de tampão de ligação foram adicionados a cada amostra. As células foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). A proporção de células em apoptose foi determinada pela porcentagem de anexina quantificada utilizando o programa FlowJo,

versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO MITOCONDRIAL

Este ensaio foi utilizado para a investigação da ativação da via apoptótica intrínseca por parte da substância em estudo através da observação da alteração do potencial transmembrânico mitocondrial. A rodamina 123 é um corante catiônico verde utilizado para avaliar alterações no potencial transmembrânico mitocondrial, já que a intensidade de fluorescência está diretamente relacionada à capacidade de retenção do mesmo. A morte celular geralmente é acompanhada por um aumento transitório na fluorescência da rodamina 123, já que células mortas perdem a capacidade de reter esse corante devido às alterações causadas no potencial transmembrânico mitocondrial que reduzem o influxo deste corante para estas organelas (SUREDA *et al.*, 1997; DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1992). Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas, enquanto que as mitocôndrias despolarizadas terão menor afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência. Após 24 e 48 horas de tratamento com os complexos de rutênio-fosfina, as células foram incubadas com rodamina 123 (5 µg/mL, Sigma-Aldrich Co.), a 37°C durante 15 minutos e lavadas com solução salina. As células foram então reincubadas em solução salina a 37°C, por mais 30 minutos, no escuro e a fluorescência celular foi determinada por citometria de fluxo, como descrito acima.

4.9 AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) foram mensurados de acordo com o procedimento previamente descrito por LeBel (1992). Neste experimento, foi utilizado o reagente diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H₂-DCF-DA) (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA), que é um indicador de ERO intracelular (reativo ao H₂O₂). Este penetra na membrana plasmática e é mantido depois que esterases intracelulares clivam os grupos acetato que são convertidos num produto verde fluorescente na presença de ERO. As células HepG2 foram tratadas com os complexos por 1 h e 3 h. Em seguida, as células foram tripsinizadas, lavadas e incubadas em 1 mL de solução salina e 5 µM de H₂-DCF-DA. Após 30 minutos de

incubação a 37°C, na ausência de luminosidade, as células foram centrifugadas (295 xG/5 minutos), ressuspensas em salina e adquiridas imediatamente em citômetro de fluxo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.10 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS MAPK FOSFORILADAS

A análise das proteínas fosforiladas ERK 1/2 (quinase regulada por sinal extracelular), JNK/ SAPK e p38 MAPK foi realizada por citometria de fluxo (CHOW *et al.*, 2001). Células HepG2 foram tratadas por 15 minutos, 30 minutos e 24 h com 12 µM de CRX. Posteriormente, as células foram recolhidas em tubos de citômetro, ressuspensas em 0,5 – 1 mL de formaldeído a 4% e fixadas durante 10 minutos a 37°C. Em seguida, os tubos foram resfriados em gelo durante 1 minuto. As células foram permeabilizadas por adição de 100% de metanol gelado, enquanto se agitava suavemente, até que uma concentração final de 90% de metanol fosse atingida. As amostras foram incubadas por 30 minutos em gelo e a lavadas com tampão de incubação (0,5% de albumina de soro bovino em PBS). As células foram novamente ressuspensas em solução tampão de incubação contendo anticorpos específicos marcados com o fluorocromo PE: anti-ERK1/2 (pT202/pY204), anti-JNK/SAPK (pT183/pY185), anti-p38 MAPK (pT180/pY182) ou IgG1 (anticorpo κ de controle isotipo), todos da BD Biosciences. As amostras foram incubadas por mais 1 h à temperatura ambiente. Finalmente, as células foram lavadas com PBS e a fluorescência foi determinada por citometria de fluxo, como descrito acima.

4.11 ENSAIO DE INTERCALAÇÃO DO DNA

A intercalação do DNA foi avaliada examinando a capacidade dos compostos em deslocar o brometo de etídio do DNA do timo de bezerro (ctDNA, Sigma-Aldrich). A intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídio (EB) foi quantificada, já que este, é um agente intercalante que ao ser exposto à luz ultravioleta, emite uma luz vermelho-alaranjada (GLASS *et al.*, 2010). O ensaio foi conduzido em placas de 96 poços contendo 15 µg/mL de ctDNA, 1,5 µM de brometo de etídio e 5, 10 ou 20 µM dos complexos **1** e **2**, em 100 µL de solução salina. A fluorescência foi mensurada utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 320 e 600 nm, respectivamente.

4.12 MODELO DE XENOTRANSPLANTE

Um total de 58 camundongos fêmeas mutantes portadores de imunodeficiência combinada severa (SCID) da linhagem CB-17 (20-30 g) foram obtidos e mantidos nas instalações de animais do Instituto Gonçalo Moniz-FIOCRUZ (Salvador, Bahia, Brasil). Os animais foram alojados em gaiolas com acesso livre a alimentos e água. Todos os animais foram mantidos sob um ciclo de claro/ escuro de 12:12 h (luzes acesas às 6:00 da manhã). O Comitê local de ética animal aprovou o protocolo experimental de número 006/2015. Os tratamentos foram iniciados um dia após a inoculação das células HepG2. Os animais foram tratados pela via intraperitoneal (200 µL por animal) uma vez por dia durante 21 dias consecutivos. No 22º dia, os animais foram anestesiados, as amostras de sangue periférico foram coletadas da artéria braquial, e, após eutanásia por overdose anestésica, os órgãos e tumores foram excisados para análises posteriores. O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula abaixo, onde: A = média dos pesos dos tumores no grupo controle e B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados ($IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$).

Tabela 2. Delineamento do experimento in vivo em camundongos CB-17 SCID.

Grupos	Tratamento	Dose(mg/kg)	Nº de animais
G1	DMSO	5%	10
G2	DOX	0,5	8
G3	CBM	0,5	10
G4	CBM	1	10
G5	CBT	0,5	10
G6	CBT	1	10

4.13 ANÁLISE TOXICOLÓGICA

Para avaliar os efeitos toxicológicos, os camundongos foram pesados no início e no final do experimento. Ao longo do período experimental, foram realizadas avaliações diárias comportamentais a fim de qualificar possíveis efeitos tóxicos relacionados ao tratamento. Os parâmetros (motricidade, tremores, tônus musculares, deambulação, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia, irritabilidade e morte) foram observados durante os 21 dias de tratamento. A análise hematológica foi realizada por microscopia óptica. O fígado, rins, pulmões e coração foram removidos, pesados e examinados quanto a sinais de lesões graves, alterações de cor e/ou hemorragia.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % proliferação = $A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$. Onde, A_{LW} e A_{HW} são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R_0 = A_{OLW} / A_{OHW}$. Onde, A_{OLW} e A_{OHW} são as absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. A substância foi testada em diluição seriada, em duplicata ou triplicata. Foi registrada a percentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI_{50} e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

Os dados foram apresentados como média \pm E.P.M. ou CI_{50} e seus intervalos de confiança de 95% (IC 95%) obtidos por regressão não linear. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas por análise de variância (ANOVA) seguida do teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 5.01 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 OS COMPLEXOS DE RUTÊNIO-FOSFINA SÃO CITOTÓXICOS FRENTE À DIFERENTES CÉLULAS CANCEROSAS

Em nosso programa de triagem de descoberta e desenvolvimento de novas moléculas com potencial anticâncer, nós adotamos o critério estabelecido pelo American National Cancer Institute (NCI) onde, compostos puros com valores CI₅₀ de < 4 µg/mL são considerados promissores (SUFFNESS e PEZZUTO, 1991).

A **Tabela 3** apresenta os valores de CI₅₀ encontrados no ensaio de citotoxicidade frente a células cancerosas e não cancerosas em cultura de monocamada (modelo 2D). Os complexos **1** e **2** foram mais potentes quando comparados com o CBD. O complexo **1** apresentou valores de CI₅₀ de 1.4 e 2.6 µM para as linhagens K-562 e HepG2, respectivamente. O complexo **2** apresentou valores de 0.9 e 7.3 µM para as linhagens K-562 e MCF-7, e o complexo **3** apresentou valores de CI₅₀ de 3.9 e 8.7 µM para as linhagens B16-F10 e MCF-7, respectivamente ($p < 0,05$).

Doxorubicina apresentou valores de CI₅₀ que variaram de 0.2 e 4 µM para as linhagens HL-60/B16-F10 e SCC-4, respectivamente, enquanto que a oxaliplatina apresentou valores de CI₅₀ de 0.6 e 7.7 µM para as linhagens HL-60 e SCC-4, respectivamente ($P < 0,05$).

Tabela 3. Atividade citotóxica dos complexos de rutênio-fosfina.

Células	CI ₅₀ em µM			DOX	OXA
	(1)	(2)	(3)		
Células cancerosas					
HepG2	2,6 1,8 – 3,7	1,9 1,4 – 2,7	7,2 6,3 – 8,1	0,3 0,2 – 0,4	2,2 1,3 – 3,8
HL-60	2,0 1,3 – 3,2	1,1 0,6 – 1,9	5,0 3,4 – 7,3	0,2 0,1 – 0,3	0,6 0,1 – 0,8
K-562	1,4 1,1 – 1,8	0,9 0,6 – 1,2	4,6 3,4 – 6,3	0,9 0,8 – 1,2	1,0 0,1 – 1,3
B16-F10	1,8 1,0 – 3,2	1,3 0,8 – 2,3	3,9 2,7 – 5,6	0,2 0,1 – 0,3	2,2 1,2 – 4,1
MCF-7	N.d.	7,3 5,6 – 9,4	8,7 7,8 – 9,7	0,4 0,3 – 0,5	5,9 3,5 – 9,9
HCT116	N.d.	2,7 1,6 – 4,4	5,9 5,0 – 6,8	0,3 0,2 – 0,4	4,1 2,3 – 5,5
HSC-3	N.d.	2,2 1,0 – 4,8	5,2 4,2 – 6,4	0,5 0,4 – 0,7	3,3 1,4 – 7,8

SCC-4	N.d.	3,9 2,5 – 6,1	4,7 2,9 – 7,6	4,0 2,0 – 8,2	7,7 4,6 – 13,0
Células não cancerosas					
PBMC	2,7 2,4 – 3,1	2,6 2,3 – 3,0	12,9 10,6 – 15,8	2,5 2,3 – 2,6	9,4 6,5 – 11,4
MRC-5	2,3 1,6 – 3,4	1,6 1,1 – 2,1	5,3 4,7 – 5,9	0,4 1,2 – 0,4	1,5 0,9 – 2,9

Dados são apresentados como valores de CI_{50} em μM e seus respectivos intervalos de confiança de 95% obtidos por regressão não linear de três experimentos independentes realizados em duplicatas pelo método de Alamar blue, após 72 h de tratamento. A doxorubicina (DOX) e a oxaliplatina (OXA) foram usadas como controles positivo. N.d (não determinado).

O índice de seletividade (IS) indica o quanto um composto é ativo sem causar danos às células saudáveis, e é considerado significativo quando apresenta valores $\geq 2,0$ (SUFFNESS e PEZZUTO, 1990; OSTI et al., 2012). Este, foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $IS = CI_{50} [\text{célula não tumoral}] / CI_{50} [\text{célula tumoral}]$.

Em relação a linhagem de fibroblasto de pulmão humano MRC-5, os complexos de rutênio-fosfina apresentaram IS semelhantes ou superiores aos dos controles positivo utilizados, onde CBD foi o mais seletivo. Já para o PBMC, os complexos foram seletivos apenas para as linhagens SCC-4 e HSC-3, onde o complexo **2** foi o mais seletivo ($p < 0,05$) (**Tabela 4**).

Tabela 4. Índice de seletividade dos complexos de rutênio-fosfina.

Células não cancerosas										
Células cancerosas	PBMC					MRC-5				
	(1)	(2)	(3)	DOX	OXA	(1)	(2)	(3)	DOX	OXA
HepG2	1,0	1,4	1,8	8,3	4,3	0,9	0,8	0,7	1,3	0,7
HL-60	1,4	2,4	2,6	12,5	15,7	1,2	1,5	1,1	2,0	2,5
K-562	1,9	2,9	2,8	2,8	9,4	1,6	1,8	1,2	0,4	1,5
B16-F10	1,5	2,0	3,3	12,5	4,3	1,3	1,2	1,4	2,0	0,7
MCF-7	N.d.	0,4	1,5	6,3	1,6	N.d.	0,2	0,6	1,0	0,3
HCT116	N.d.	1,0	2,2	8,3	2,3	N.d.	0,6	0,9	1,3	0,4
HSC-3	N.d.	1,2	2,5	5,0	2,9	N.d.	0,7	1,0	0,8	0,5
SCC-4	N.d.	0,7	2,8	0,6	1,2	N.d.	0,4	1,1	0,1	0,2

Células cancerosas: HCT116 (carcinoma do cólon humano); MCF7 (adenocarcinoma de mama humano); HepG2 (carcinoma hepatocelular humano); HSC-3 (carcinoma epidermóide oral humano); SCC-4 (carcinoma epidermóide oral humano); HL-60 (leucemia promielocítica humana); K-562 (leucemia mielóide crônica humana); e B16-F10 (melanoma murino). Células não cancerosas: MRC-5 (fibroblasto pulmonar humano) e PBMC (células mononucleares de sangue periférico humano). Doxorubicina (DOX) e oxaliplatina (OXA) foram utilizados como controles positivos. N.d. Não determinado.

O efeito citotóxico dos complexos **1** e **2** foi avaliado *in vitro* no modelo tridimensional (3D) de esferoides multicelulares formados por células HepG2. As mudanças morfológicas dos esferoides tratados com os complexos indicaram permeabilidade dos complexos na cultura 3D. Os valores de CI_{50} foram de 6.5 e 7.3 μM para os complexos **1** e **2**, respectivamente. Doxorubicina apresentou IC_{50} de 10.3 μM ($p < 0,05$) (**Figura 5**).

Também avaliamos a atividade citotóxica dos complexos de rutênio-fosfina em uma linhagem de fibroblasto embrionário de camundongo imortalizado de tipo selvagem (WT SV40 MEF) e em uma linhagem de fibroblasto embrionário de camundongo imortalizado nocaute para BAD (BAD KO SV40 MEF), pelo ensaio do alamar blue. Os valores CI_{50} para os complexos **1**, **2** e **3** foram de 1,0, 1,9 e 10,2 μM para a linhagem WT SV40 MEF, respectivamente. Os valores CI_{50} para os complexos **1**, **2** e **3** foram de 0,6, 2,8 e 8,5 μM para a linhagem BAD KO SV40, respectivamente. Esses resultados sugerem que BAD não é essencial para a citotoxicidade induzida pelos complexos. A doxorubicina apresentou valores de CI_{50} de 0,01 e 0,2 μM para as linhagens WT SV40 MEF e BAD KO SV40 MEF, respectivamente ($p < 0,05$). Uma vez que os complexos **1** e **2** foram os mais potentes nos ensaios de citotoxicidade, estes, foram escolhidos para dar continuidade aos experimentos.

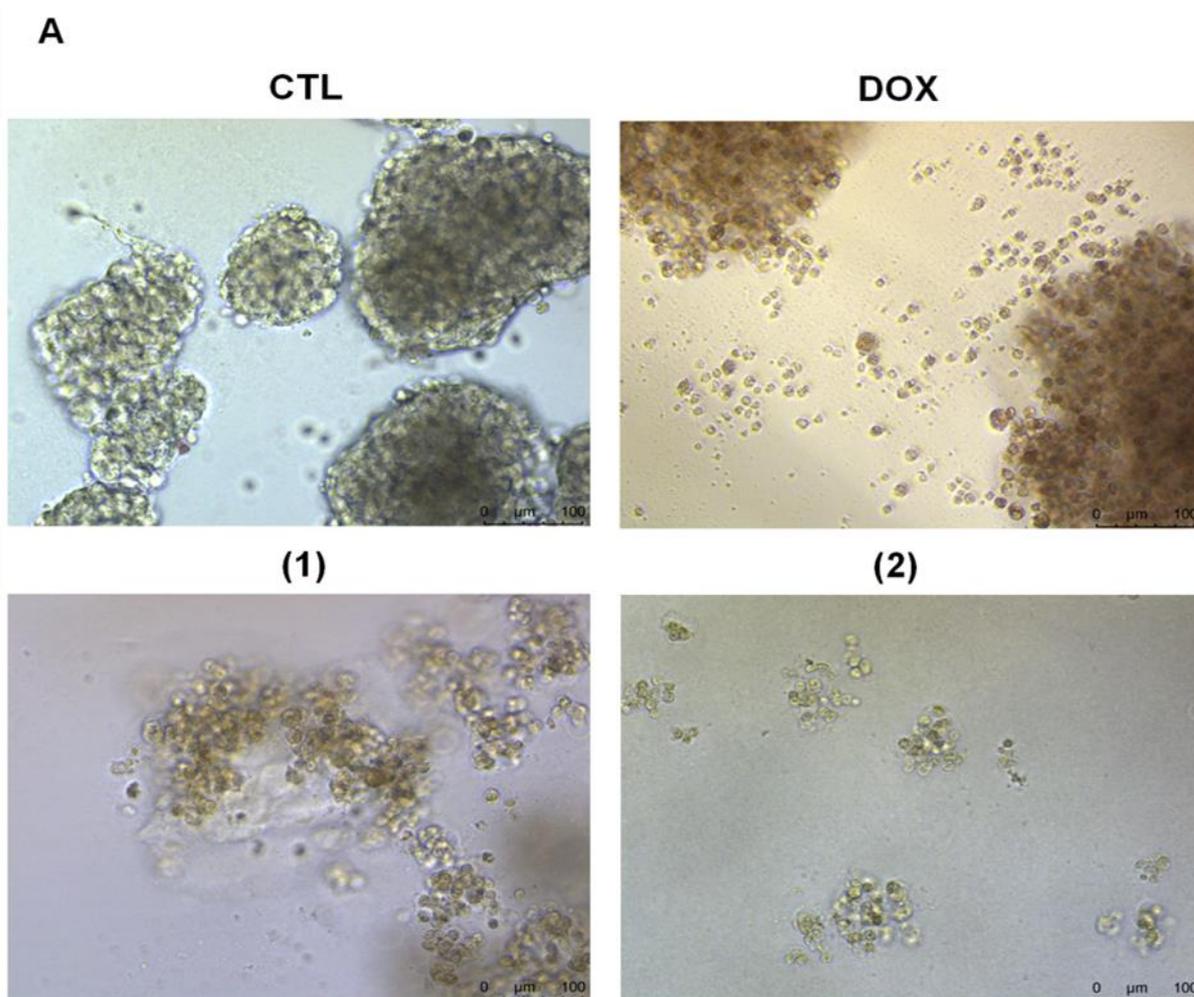


Figura 5. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina em modelo 3D in vitro de esferoides multicelulares formados por células HepG2. (A) Células avaliadas por microscopia de luz (barra = 100 µm). O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) usado para solubilizar os compostos testados. Doxorubicina (DOX) e oxaliplatina (OXA) foram usados como controles positivo.

A viabilidade celular após o tratamento de células HepG2 com os complexos **1** e **2** foi confirmada pelo ensaio de exclusão com o corante azul de tripam após 24 e 48 horas de incubação. Nas concentrações de 5 e 10 µM, o complexo **1** reduziu o número de células viáveis em 47,31% e 81,48% após 24h, e, em 78,84% e 93,25% após 48h, respectivamente. Nas concentrações de 2 e 4 µM, o complexo **2** reduziu o número de células viáveis em 49,01% e 63,62% após 24h, e, em 53,73% e 82,87% após 48h, respectivamente ($p < 0,05$). O tratamento levou a uma redução significativa na viabilidade celular para todas as concentrações testadas e em ambos os tempos avaliados. O mesmo resultado pôde ser observado nas células tratadas com o controle positivo, doxorubicina (**Figura 6**).

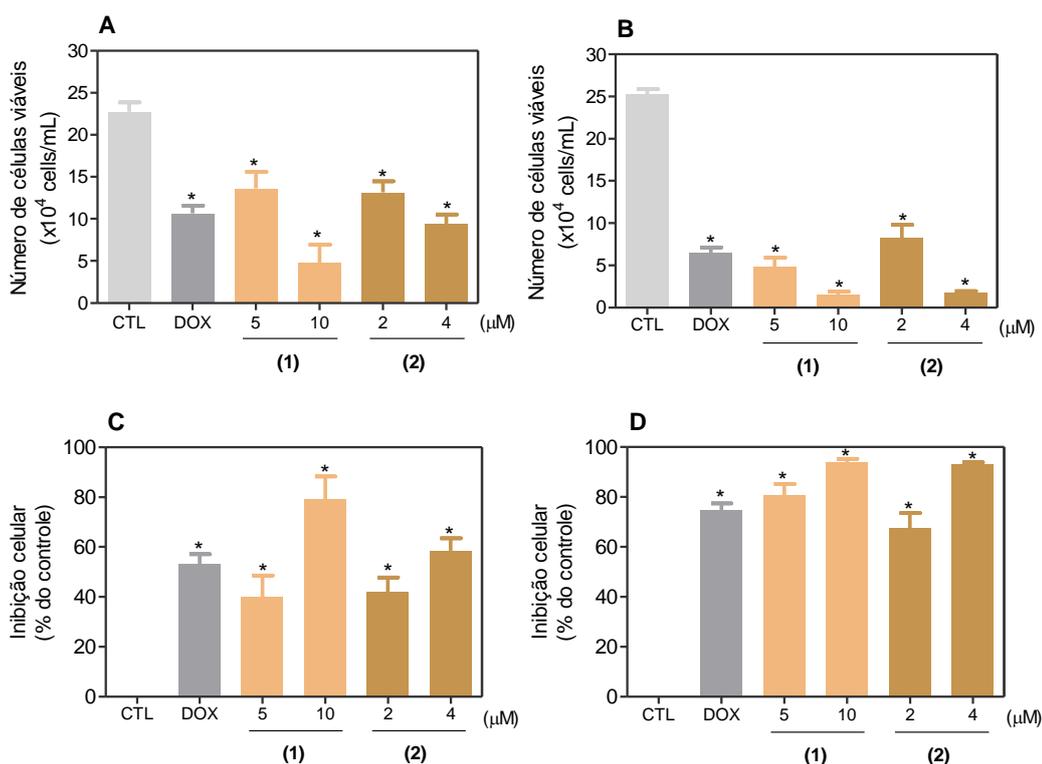


Figura 6. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina sobre a viabilidade de células HepG2 determinadas por exclusão com o corante azul de tripam, após 24 e 48 h de incubação. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2 %) utilizado para solubilizar as substâncias testadas. A doxorrubicina (DOX 2 μM) foi utilizada como controle positivo. Os dados são apresentados como a média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

5.2 OS COMPLEXOS DE RUTÊNIO-FOSFINA INDUZEM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CARACTERÍSTICAS DE MORTE CELULAR APOPTÓTICA

A análise morfológica foi avaliada por microscopia de luz utilizando a coloração de may-grunwald-giemsa, após 24 e 48 horas de incubação (**Figura 7**). Ambos os complexos induziram redução do volume celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Após a análise de parâmetros como tamanho e granulosidade das células, observamos que o tratamento de células HepG2 com os complexos causou encolhimento celular, evidenciado pelo decréscimo da dispersão luminosa para a frente (FSC), e, condensação nuclear observada por um aumento da dispersão luminosa lateral (SSC) (**Figura 8**). A doxorrubicina utilizada como controle positivo também levou a alterações morfológicas condizentes com morte celular apoptótica ($p < 0,05$).

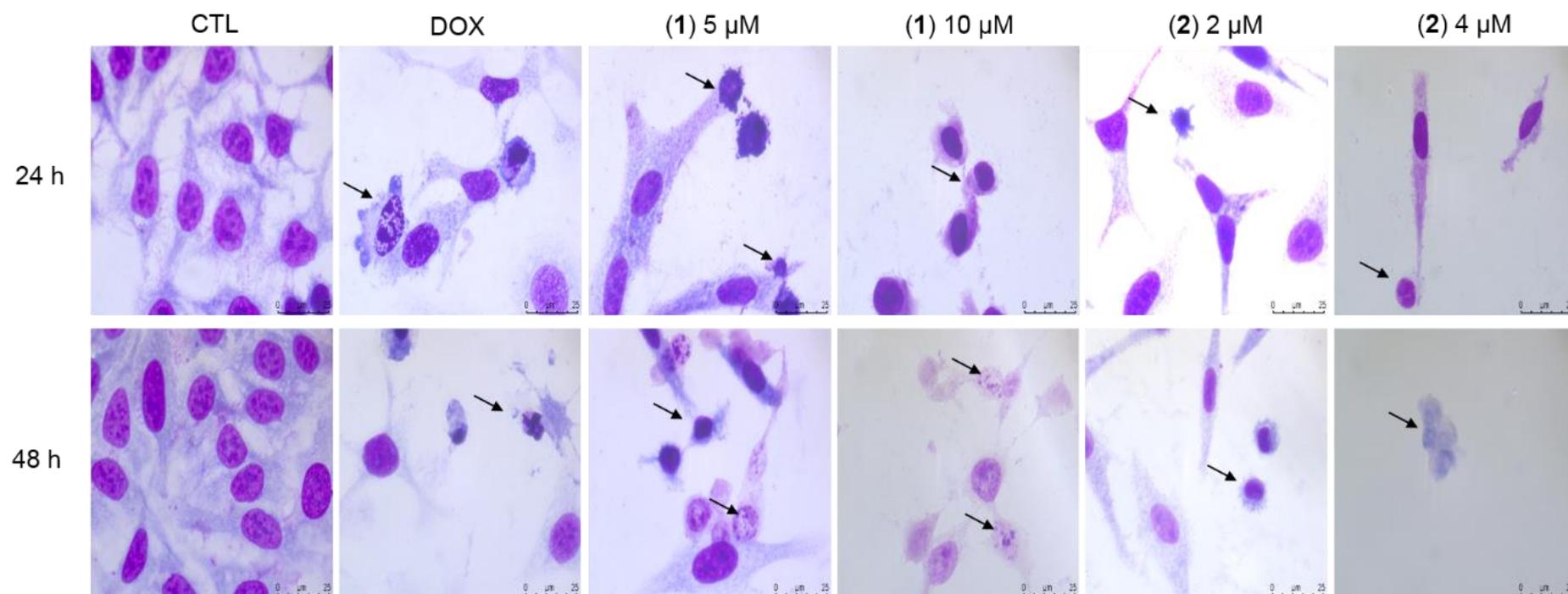


Figura 7. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina na análise morfológica de células HepG2 após 24 e 48 h de incubação. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2 %) usado para solubilizar os compostos testados. A doxorubicina (DOX 2 μM) foi utilizada como controle positivo. Setas indicam encolhimento celular ou DNA fragmentado.

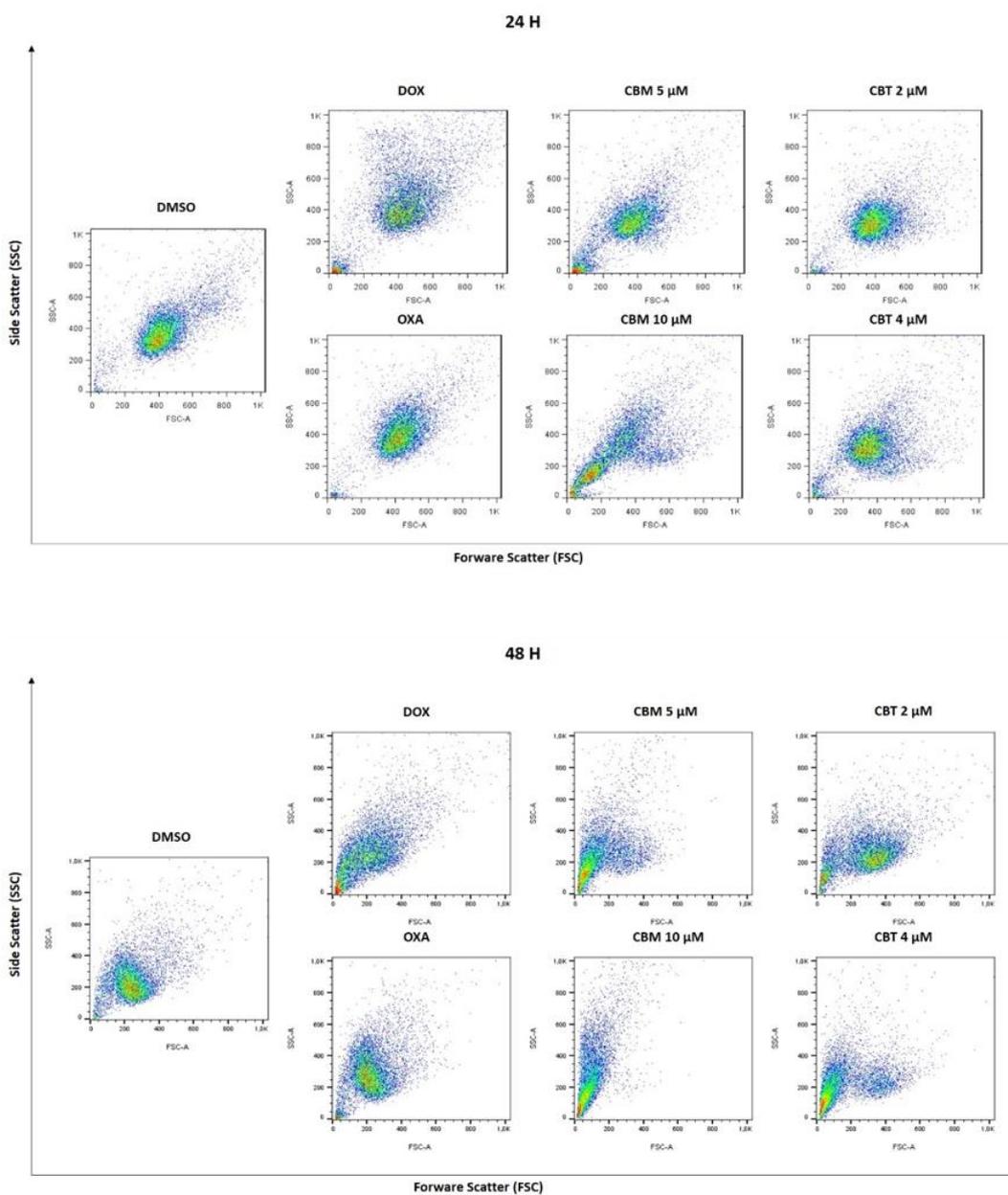


Figura 8. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina obtido por citometria de fluxo de células HepG2 após 24 e 48 h de incubação. As características de dispersão de luz foram determinadas por citometria de fluxo. Dez mil eventos foram avaliados por experimento e detritos celulares foram omitidos da análise. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2 %) usado para solubilizar os compostos testados. A doxorrubicina (DOX 2 μ M) e a oxaliplatina (OXA 10 μ M) foram utilizadas como controles positivo. FSC (forward scatter – desvio de luz para frente) e SSC (side scatter – desvio de luz para o lado) foram usados como parâmetros de tamanho relativo e granulosidade ou complexidade interna da célula.

5.3 OS COMPLEXOS DE RUTÊNIO-FOSFINA DESENCADAEIAM APOPTOSE MEDIADA POR AUMENTO DA DESPOLARIZAÇÃO MITOCONDRIAL E NÃO VIA ERO

A marcação de células HepG2 com anexina V-FITC/IP tratadas com os complexos CBM e CBT por 24 e 48h permitiu avaliar o perfil de morte celular. Nas concentrações de 5 e 10 μM , o tratamento com o complexo **1** levou a um aumento significativo da porcentagem de células apoptóticas de 68,8% e 83,1% após 24 h, e, de 67,3% e 79,5% após 48 h, respectivamente. Nas concentrações de 2 e 4 μM , o complexo **2** levou a um aumento significativo da porcentagem de células apoptóticas 63,1% e 80,1% após 24 h, e, 42,8% e 61,2% após 48 h, respectivamente. A doxorubicina levou a um aumento significativo da porcentagem de células apoptóticas apenas no tempo de 48 h (62,5%) (**Figura 9A**). Além disso, a co-incubação com Z-VAD(OMe)-FMK, um inibidor não seletivo de caspases, reduziu a apoptose induzida por ambos os complexos ($p < 0,05$) (**Figura 9B**).

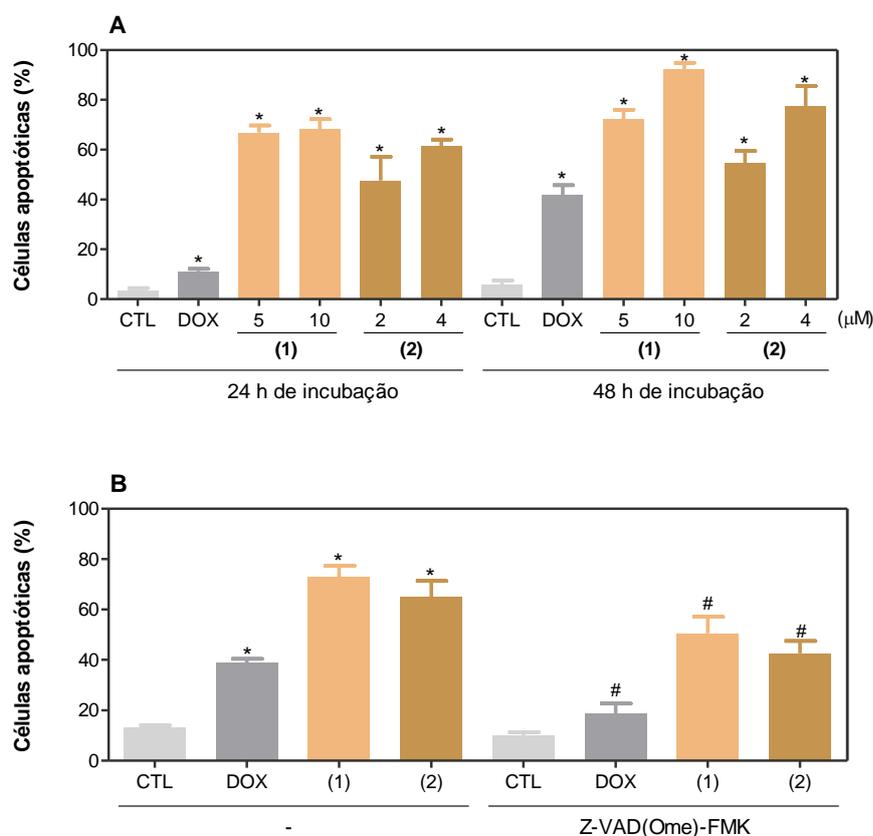


Figura 9. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina na indução de apoptose em células HepG2 após 24 e 48 h de incubação, conforme determinado por citometria de fluxo usando marcação de anexina V-FITC/IP. Gráfico representativo da quantificação de células apoptóticas (**A**). Efeito do inibidor não seletivo de caspases (Z-VAD(OMe)-FMK) (**B**). O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2 %) utilizado para diluir os compostos testados. Doxorubicina (DOX 2 μM) foi utilizada como controle

positivo. * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

A análise dos dotplots mostrou que o tratamento com os complexos **1** (5 e 10 μM) e **2** (2 e 4 μM), em ambos os tempos avaliados, aumentou significativamente a quantidade de células positivas para anexina sem aumentar exclusivamente para o IP, sugerindo morte celular por apoptose. O mesmo resultado não pôde ser observado no tratamento com os controles positivo (**Figura 10**).

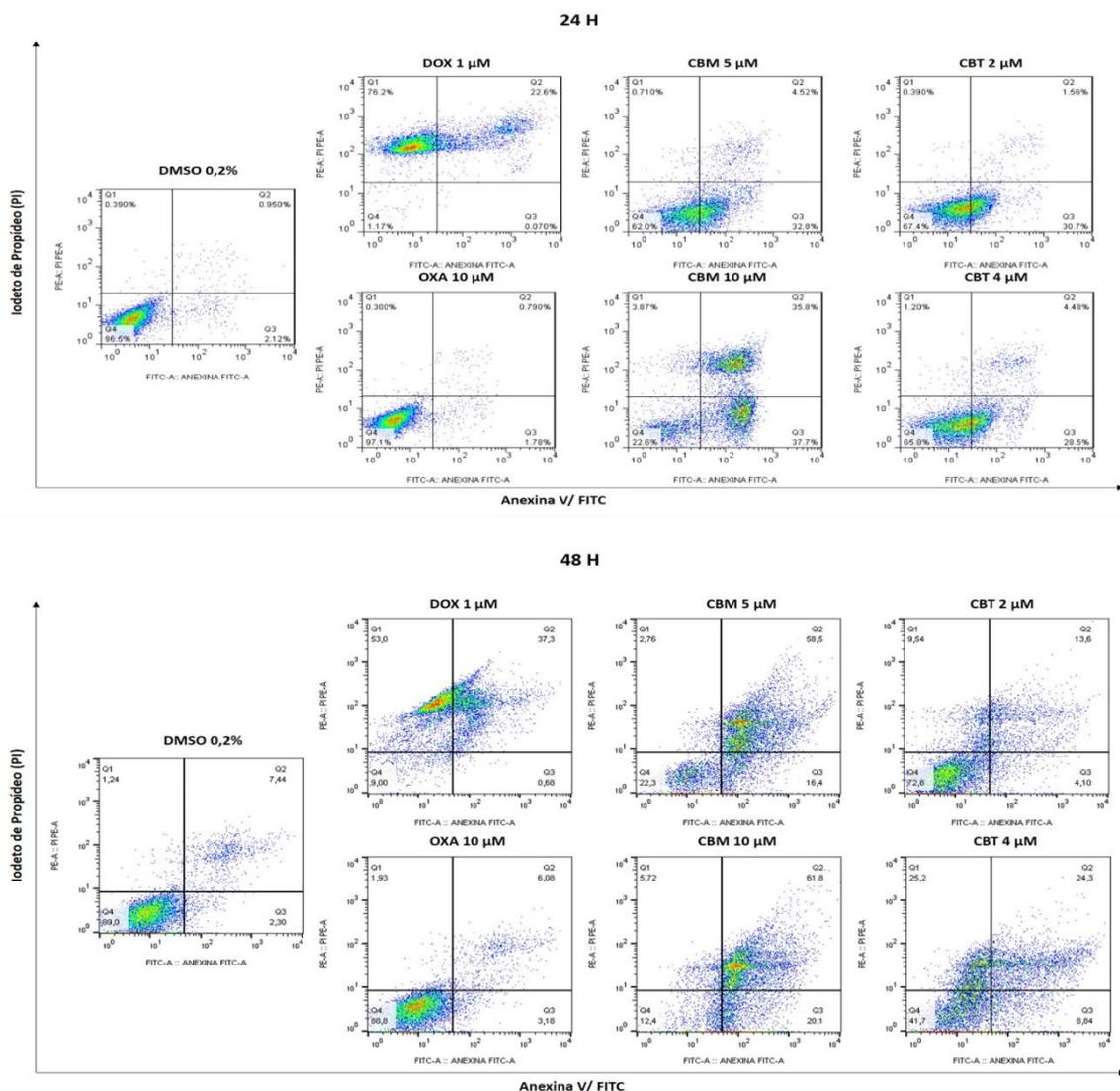


Figura 10. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina na indução de apoptose em células HepG2 após 24 e 48 horas de incubação, conforme determinado por citometria de fluxo usando marcação de anexina V-FITC/IP. Dotplots representativos obtidos por citometria de fluxo mostram o percentual de células viáveis, de células em apoptose inicial, apoptose tardia e de células necróticas.

O potencial transmembrânico mitocondrial foi determinado, por citometria de fluxo, pela capacidade de retenção da rodamina 123 pelas células HepG2 tratadas

com os complexos **1** (5 e 10 μM) e **2** (2 e 4 μM), no tempo de 24 horas. Podemos observar que houve uma redução significativa do potencial transmembrânico mitocondrial, quando comparado com células HepG2 tratadas com o controle negativo. Em células HepG2 tratadas com os controles positivo, somente a doxorrubicina foi capaz de reduzir significativamente o potencial transmembrânico mitocondrial ($p < 0,05$) (**Figura 11**).

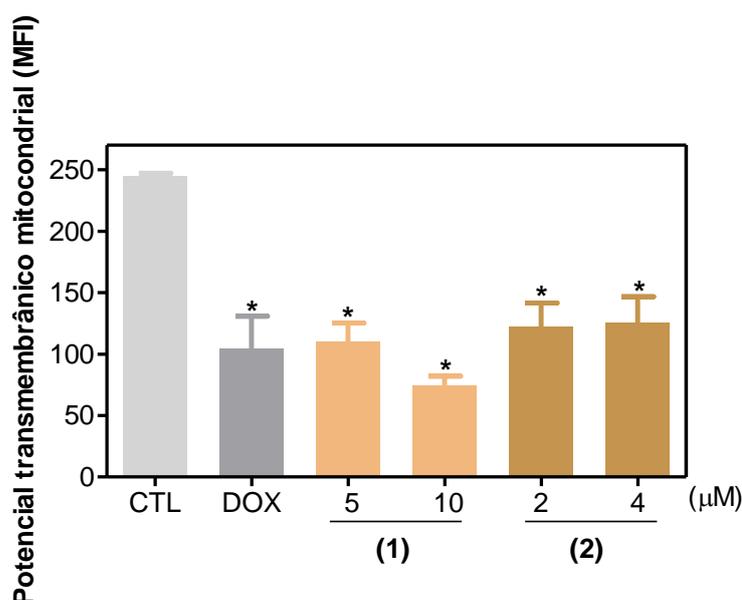


Figura 11. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células HepG2, após 24 h de tratamento. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para diluir as substâncias. A doxorrubicina (DOX 2 μM) foi utilizada como controle positivo. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os detritos celulares foram omitidos na análise. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por pós-teste de Newman-Keuls.

Os níveis intracelulares de ERO foram investigados por citometria de fluxo usando o fluorógeno $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$, após o tratamento de células HepG2 com os complexos **1** (5 e 10 μM) e **2** (2 e 4 μM). O tratamento após 1 ou 3 horas de incubação não induziu um aumento significativo nos níveis de ERO. A oxaliplatina foi capaz de induzir um aumento significativo nos níveis intracelulares de ERO apenas no tempo de 1h. O mesmo não pode ser observado nas células HepG2 tratadas com a doxorrubicina em nenhum dos tempos avaliados ($p < 0,05$) (**Figura 12**).

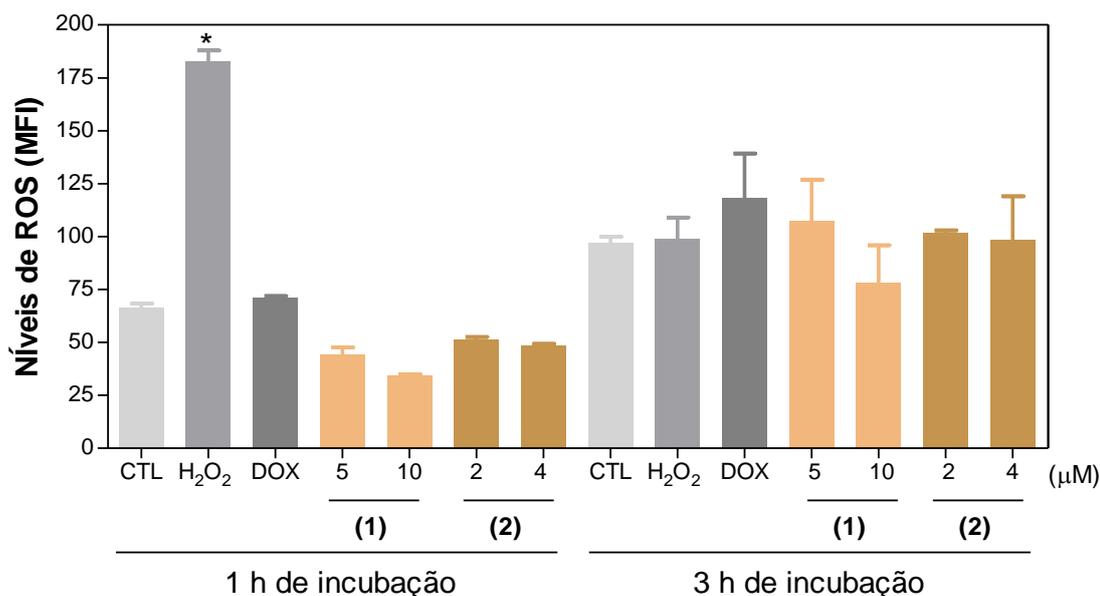


Figura 12. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) de células HepG2 por citometria de fluxo usando marcação por H₂-DCF-DA. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) usado para diluir os compostos testados. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 200 μM), a doxorrubicina (DOX 1 μM) e a oxaliplatina (OXA 10 μM) foram utilizados como controles positivo. Os dados são apresentados como a média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata. Para análise de citometria de fluxo, foram avaliados 10.000 eventos por experimento e os detritos celulares foram omitidos da análise. *p<0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

5.4 OS COMPLEXOS DE RUTÊNIO-FOSFINA INDUZEM INTERCALAÇÃO E LEVAM À FRAGMENTAÇÃO DO DNA

A progressão do ciclo celular de células HepG2 tratadas com os complexos **1** e **2** foi avaliada por citometria de fluxo após 24 e 48 horas de incubação. A **Tabela 5** apresenta o conteúdo de DNA das células HepG2 tratadas com os complexos. Todo conteúdo de DNA em sub-G₀/G₁ foi considerado fragmentado.

Nas concentrações de 5 e 10 μM, o tratamento com o complexo **1** levou a um aumento do conteúdo de DNA em sub-G₀/G₁ de 25,25% e 14,38% após 24 h, e, de 47,98% e 57,10% após 48 h, respectivamente. Nas concentrações de 2 e 4 μM, o complexo **2** levou a um aumento do conteúdo de DNA em sub-G₀/G₁ de 8,15% e 13,10% após 24 h, e, de 15,46 e 34,32% após 48 h, respectivamente ($P < 0,05$).

O tratamento com o complexo **1** nas concentrações de 5 e 10 μM, levou a um aumento significativo do conteúdo de DNA em sub-G₀/G₁, em ambos os tempos avaliados. Já o tratamento com o complexo **2**, levou a um aumento significativo do conteúdo de DNA em sub-G₀/G₁, em ambos os tempos avaliados, apenas na concentração de 4 μM ($p < 0,05$).

A doxorubicina levou a parada do ciclo celular na fase G2/M após 24 e 48 h de tratamento. Não foi observado aumento do conteúdo de DNA em sub-G0/G1 no tratamento com os controles positivo em ambos os tempos avaliados.

Tabela 5. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina sobre o ciclo celular.

Compostos	Concentração (µM)	Conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G ₀ /G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
24 h de incubação					
CTL	-	2,7 ± 0,5	63,1 ± 1,3	11,1 ± 0,5	19,7 ± 0,7
DOX	2	3,8 ± 0,4	15,4 ± 0,7*	16,8 ± 3,8	65,4 ± 3,2*
(1)	5	25,3 ± 4,4*	47,2 ± 5,7*	9,4 ± 1,6	16,9 ± 1,0
	10	14,4 ± 2,5*	38,9 ± 7,5*	10,1 ± 0,7	23,6 ± 1,1
(2)	2	8,2 ± 0,5	56,1 ± 1,6	8,5 ± 1,1	19,1 ± 1,0
	4	13,1 ± 1,3*	47,4 ± 4,6*	9,2 ± 0,7	19,5 ± 2,0
48 h de incubação					
CTL	-	8,0 ± 1,5	58,0 ± 5,3	9,1 ± 2,6	15,8 ± 1,2
DOX	2	19,5 ± 2,8*	18 ± 4,2*	11,2 ± 2,7	31,6 ± 1,4*
(1)	5	48,0 ± 12,0*	33,6 ± 10,0*	6,7 ± 1,2	6,2 ± 1,9*
	10	57,1 ± 2,3*	31,1 ± 3,2*	3,6 ± 0,9*	6,9 ± 0,7*
(2)	2	20,6 ± 1,8*	42,2 ± 7,7*	7,3 ± 1,2	18,8 ± 1,2
	4	46,2 ± 7,6*	38,3 ± 7,7*	7,0 ± 1,7	12,2 ± 1,6

Dados apresentados como a média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) usado para solubilizar as substâncias testadas. A doxorubicina (DOX 2 µM) foi utilizada como controle positivo. Dez mil eventos foram analisados e os detritos celulares foram omitidos da análise. * p<0,05 quando comparado ao controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

A intercalação do DNA foi avaliada em um sistema livre de células usando ctDNA como modelo. Para isso, os complexos de rutênio-fosfina foram adicionados à uma mistura de brometo de etídio e DNA para examinar sua capacidade de deslocar o brometo de etídio do DNA, diminuindo assim a sua intensidade de fluorescência. O tratamento com os complexos de rutênio foi capaz de reduzir de modo significativo a intensidade de fluorescência do brometo de etídio em todas as concentrações testadas (5, 10 e 20 µM), indicando que os complexos foram capazes de intercalar com o DNA. A doxorubicina (10 µM), um intercalador de DNA conhecido, foi usada

como controle positivo e também reduziu significativamente a fluorescência do brometo de etídio ($p < 0,05$) (**Figura 13**).

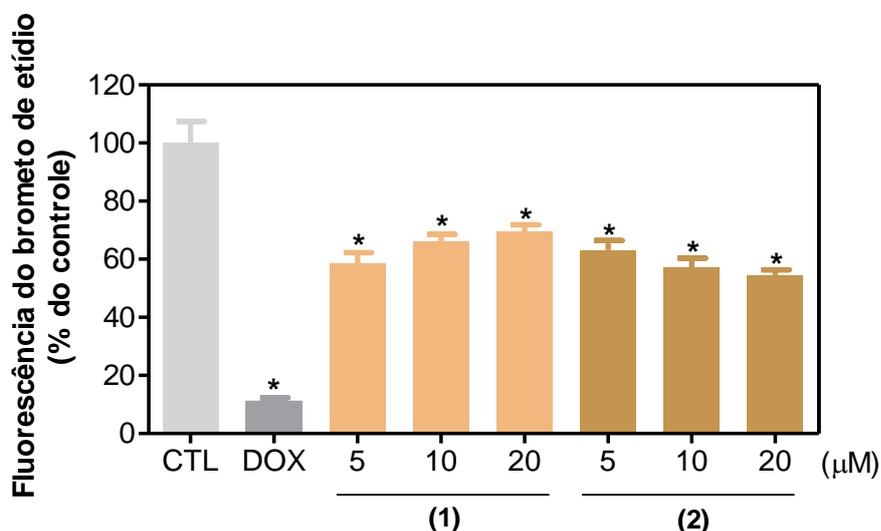


Figura 13. Efeito dos complexos de rutênio-fosfina sobre a indução da intercalação com o DNA. A intercalação com o DNA foi avaliada através da capacidade dos complexos em deslocar o brometo de etídio do DNA de timo de bezerro. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2 %) usado para solubilizar as substâncias testadas. A doxorubicina (DOX 10 μM) foi usada como controle positivo.

5.5 OS COMPLEXOS DE RUTÊNIO-FOSFINA INDUZEM MORTE CELULAR APOPTÓTICA VIA ERK 1/2

A via de sinalização MAPK desempenha um papel crucial na apoptose induzida por agentes intercalantes de DNA. Decidimos então avaliar o papel das proteínas, ERK1/2, JNK/SAPK e p38 MAPK, na apoptose induzida pelos complexos de rutênio em células HepG2. Inicialmente, quantificamos JNK/SAPK (pT183/pY185) (**Figura 14A**), p38 MAPK (pT180/pY182) (**Figura 14B**) e ERK1/2 (pT202/pY204) (**Figura 14C**), em células HepG2 após 15/30 min e 24 h de incubação com os complexos. Em seguida, quantificamos a apoptose induzida pelos complexos em células HepG2 co-incubadas com inibidores de JNK/SAPK (SP600125), p38 MAPK (PD169316) e MEK (U-0126), os quais inibem a ativação de ERK1/2 (**Figura 14D**). O complexo 1 induziu a fosforilação de ERK1/2 após 15 min de incubação, mas nenhum aumento significativo foi observado na fosforilação de JNK/SAPK ou p38 MAPK. A co-incubação com o inibidor MEK reduziu a apoptose induzida pelo tratamento com os complexos. No entanto, a co-incubação com os inibidores de JNK/SAPK e de p38 MAPK não reduziu a apoptose induzida pelos complexos.

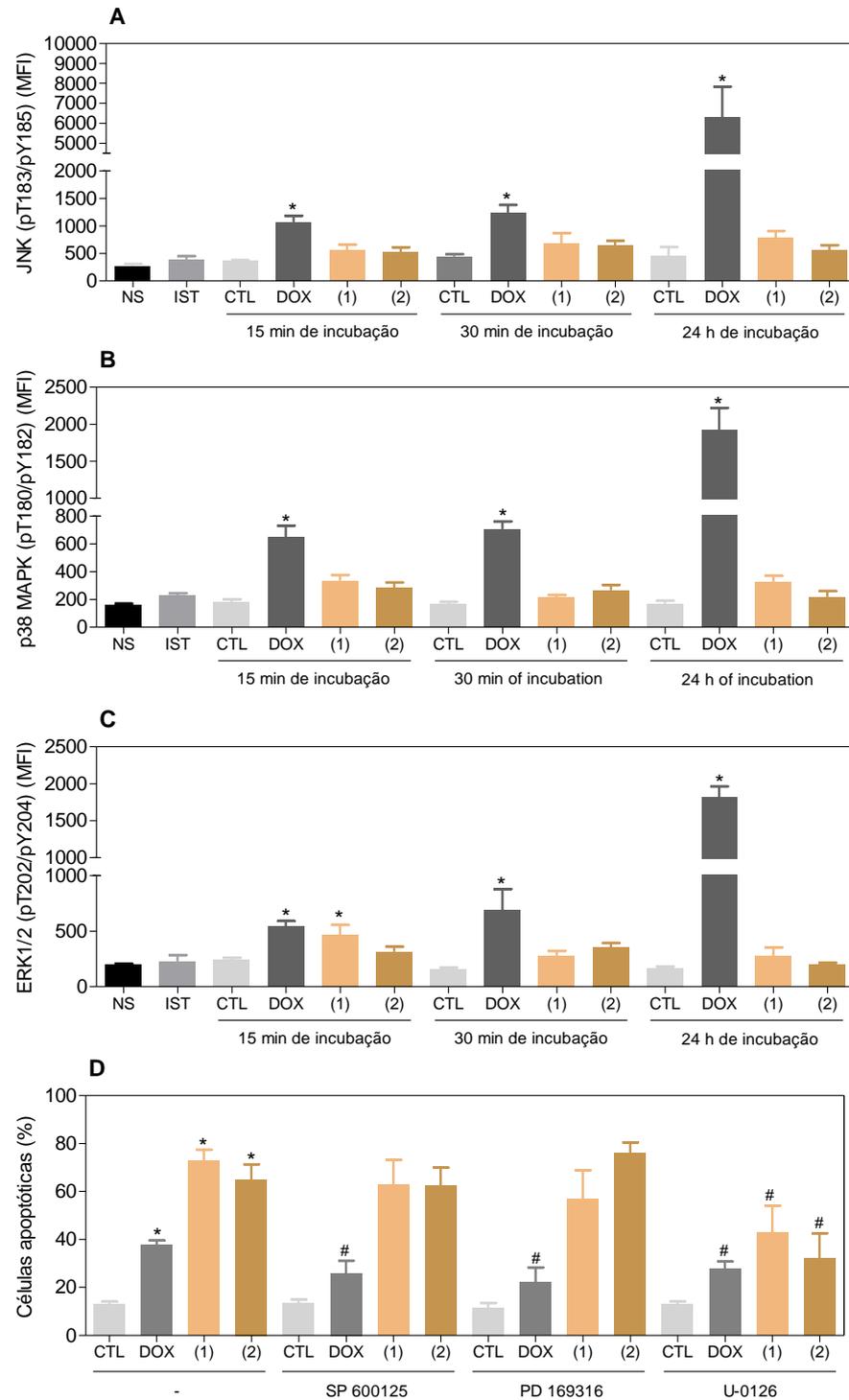


Figura 14. Efeito da via MAPK (JNK/SAPK, p38 MAPK e ERK1/2) na apoptose induzida pelos complexos de rutênio em células HepG2. **(A)** Quantificação dos níveis de JNK/SAPK (pT183/pY185). **(B)** Quantificação dos níveis de p38 MAPK (pT180/pY182). **(C)** Quantificação dos níveis de ERK1/2 (pT202/pY204). **(D)** Quantificação de células apoptóticas após o tratamento com os inibidores de JNK/SAPK (SP600125), p38 MAPK (PD169316) e MEK (U0126). O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2 %) usado para solubilizar as substâncias testadas. A doxorrubicina (DOX 10 μ M) foi usada como controle positivo.

5.6 OS COMPLEXOS DE RUTÊNIO-FOSFINA REDUZEM O CRESCIMENTO DE CÉLULAS HEPG2 EM MODELO XENOGRÁFICO

A atividade antitumoral *in vivo* dos complexos **1** e **2** foi investigada em camundongos CB-17 SCID inoculados com células HepG2. Os animais foram tratados com doses de 0,5 e 1 mg/kg, por via intraperitoneal, uma vez por dia durante 21 dias consecutivos. Não houveram alterações significantes no peso dos animais antes e depois do tratamento (**Tabela 6**). Foram observadas alterações estatisticamente significantes no peso do tumor dos animais tratados com os complexos quando comparados com o grupo que recebeu apenas o veículo utilizado para diluir os compostos (G1). No 22º dia, o peso médio do tumor dos animais do grupo controle (DMSO 5%) foi de $0,6 \pm 0,05$ g. Nos animais tratados com o complexo **1**, o peso médio dos tumores foi de $0,4 \pm 0,06$ e $0,3 \pm 0,09$ g para as doses de 0,5 e 1 mg/kg, respectivamente. Já para os animais tratados com o complexo **2**, o peso médio dos tumores foi de $0,3 \pm 0,08$ e $0,2 \pm 0,03$ g para as doses de 0,5 e 1 mg/kg, respectivamente. O peso médio dos tumores tratados com o controle positivo doxorrubicina (0,5 mg/kg) foi de $0,2 \pm 0,02$ g ($p < 0,05$).

Tabela 6. Média de peso dos animais no início e no fim do experimento.

Grupos (mg/kg)	Tratamento	Média de peso dos animais (g)	
		Início	Fim
G1	DMSO 5%	$20,28 \pm 0,71$	$19,44 \pm 0,63$
G2	DOX 0,5	$19,29 \pm 0,46$	$22,57 \pm 0,57$
G3	(1) 0,5	$21,72 \pm 0,20$	$20,44 \pm 0,29$
G4	(1) 1	$20,28 \pm 0,22$	$20,89 \pm 0,35$
G5	(2) 0,5	$20,39 \pm 0,38$	$20,78 \pm 0,36$
G6	(2) 1	$19,94 \pm 0,45$	$19,44 \pm 0,47$

A porcentagem de inibição tumoral em resposta ao controle positivo foi de 70,78%. O complexo **1** foi significativo apenas na dose de 1 mg/kg, apresentando 45,39% de inibição tumoral, enquanto que o complexo **2** foi significativo nas duas doses testadas (0,5 e 1 mg/kg) com valores de inibição tumoral de 46,88% e 67,65%, respectivamente (**Figura 15**).

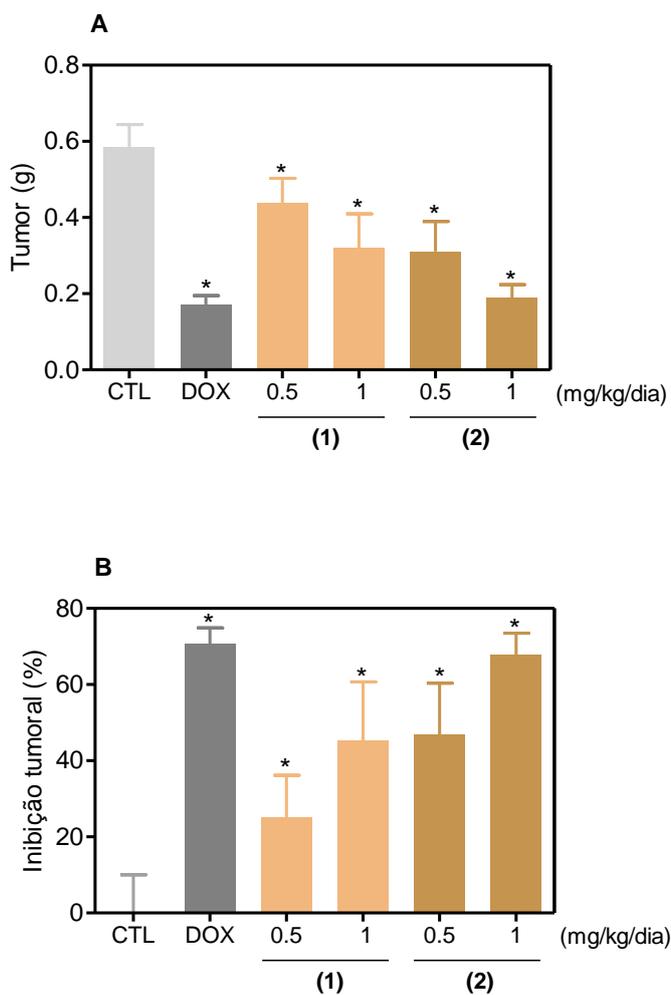


Figura 15. Atividade antitumoral *in vivo* dos complexos de rutênio em camundongos SCID C.B-17 inoculados com células HepG2. Quantificação do peso do tumor e inibição do tumor. As barras cinzentas representam o peso do tumor (g) e as barras rosas representam a inibição do tumor (%). Os dados são apresentados como os médias \pm E.P.M. de 8 a 10 animais. * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Os parâmetros toxicológicos também foram avaliados nos animais tratados com os complexos. Quando comparado com o grupo controle (CTL), não foi observado alteração significativa no peso relativo dos órgãos de nenhum dos grupos avaliados ($p > 0,05$) (**Figura 16**).

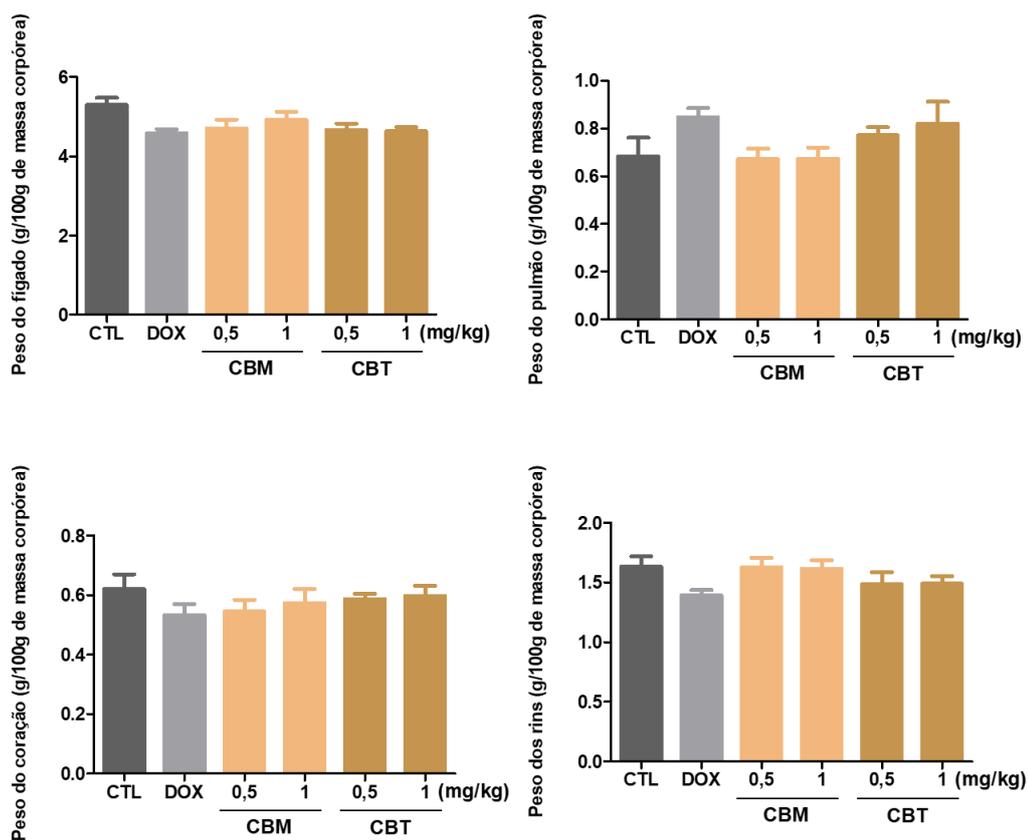


Figura 16. Efeito do tratamento com os complexos de rutênio-fosfina sobre o peso relativo dos órgãos de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) usado para diluir os compostos testados. A doxorubicina (DOX 0,5 mg/kg) foi utilizada como controle positivo. A partir de 1 dia após a implantação do tumor, os animais foram tratados através da via intraperitoneal por 21 dias consecutivos. Os dados são apresentados como a média \pm E.P.M. de 8-10 animais. * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

A contagem total de eritrócitos e leucócitos, assim como a contagem diferencial de leucócitos, tais como neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, foram utilizadas como parâmetro hematológico. Não ocorreram alterações estatisticamente significantes nos parâmetros hematológicos do sangue periférico em nenhum dos grupos avaliados ($p > 0,05$) (**Tabela 7**).

Tabela 7. Efeito do tratamento com os complexos de rutênio-fosfina sobre parâmetros hematológicos do sangue periférico de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2.

Parâmetro hematológico	Compostos					
	DMSO	DOX	1		2	
	5%	0,5 (mg/kg)	0,5 (mg/kg)	1 (mg/kg)	0,5 (mg/kg)	1 (mg/kg)
Eritrócitos (10 ⁶ cel/ μ L)	8,96 \pm 0,79	9,03 \pm 0,27	10,54 \pm 0,61	6,68 \pm 0,86	8,54 \pm 1,03	7,81 \pm 0,76
Leucócitos totais (10 ³ cel/ μ L)	3,51 \pm 0,53	1,92 \pm 0,40	2,31 \pm 0,39	3,90 \pm 1,86	2,48 \pm 0,38	2,65 \pm 0,38
Contagem diferencial de leucócitos (%)						
Neutrófilos	14,60	27,53	23,75	24,44	21,05	34,37
Linfócitos	46,95	23,10	36,40	55,50	39,85	32,16
Monócitos	38,53	49,38	39,85	20,06	39,13	32,46
Eosinófilos	0,32	0,72	0,70	1,42	1,25	1,10

O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) usado para diluir os compostos testados. Doxorubicina (DOX 0,5 mg/kg) foi utilizada como controle positivo. A partir de 1 dia após a implantação do tumor, os animais foram tratados pela via intraperitoneal por 21 dias consecutivos. Os dados são apresentados como a média \pm E.P.M. de 4 a 6 animais. * p<0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keu

A análise histológica evidenciou tumores sólidos e hipervascularizados com células apresentando pleomorfismo intenso e nucléolos proeminentes. As áreas necróticas foram observadas em todos os grupos, mas as figuras mitóticas aberrantes foram menos evidentes nos grupos tratados com os complexos rutênio-fosfina (**Figura 17**).

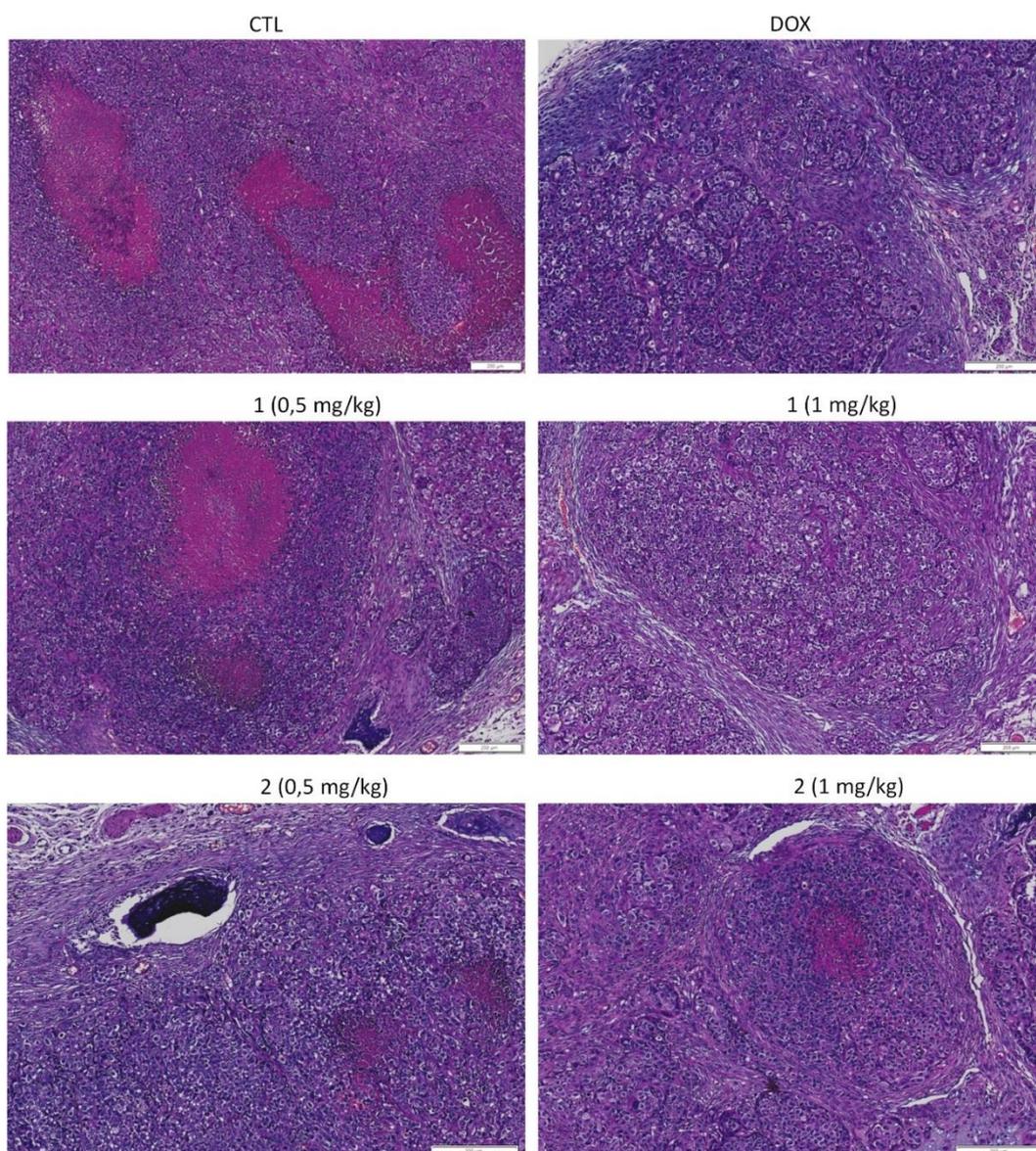


Figura 17. Análise histológica dos tumores de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) usado para diluir os compostos testados. A doxorubicina (DOX 0,5 mg/kg) foi utilizada como controle positivo. A partir de 1 dia após a implantação do tumor, os animais foram tratados através da via intraperitoneal por 21 dias consecutivos.

6. DISCUSSÃO

Como mencionado anteriormente, a quimioterapia continua sendo a principal abordagem terapêutica utilizada para o tratamento do câncer. Segundo Huang (2014) e Filak (2013) a síntese, caracterização e elucidação dos mecanismos de ação de novos complexos de rutênio são necessários, já que os complexos em estudo clínico de fase I, NAMI-A E KP1019, têm apresentado baixa solubilidade aquosa/biodisponibilidade, além de não serem citotóxicos para uma ampla variedade de tipos de câncer. Em estudos anteriores, complexos de rutênio apresentaram potente atividade citotóxica *in vitro* em linhagens de carcinoma de pulmão e de carcinoma cervical (A549 e HeLa, respectivamente), e, em diversas linhagens de carcinoma hepatocelular humano (HepG2, Bel7402 e SMMC7721) (HOWERTON *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2016). Adicionalmente, complexos fosfínicos de rutênio também apresentaram baixos valores de CI50 frente às linhagens K562 e MDA-MB23 (CRUZ JÚNIOR, 2010).

Neste estudo, os complexos de rutênio sintetizados, **1** e **2**, foram avaliados quanto à sua citotoxicidade e seletividade, em diversas linhagens de células cancerosas e não cancerosas, e, quanto ao mecanismo de ação em células de carcinoma hepatocelular humano, HepG2. Os novos complexos de rutênio apresentaram potente citotoxicidade e seletividade, o que corrobora com resultados previamente reportados (LORD *et al.*, 2015; YUAN *et al.*, 2015; CAO *et al.*, 2015; MONTEL *et al.*, 2017).

O modelo de cultura 3D foi utilizado para avaliar a citotoxicidade, já que este modelo permite simular o microambiente tumoral, as interações célula-célula, e célula-matriz extracelular (GAO *et al.*, 2017). Reddy (2018) demonstrou que complexos fosfínicos de ouro (I) foram capazes de inibir o crescimento de esferoides multicelulares formados a partir células de carcinoma cervical (HeLa), em modelo de cultura 3D. As alterações morfológicas evidenciadas nos esferoides multicelulares formados a partir de células HepG2 tratadas com os novos complexos de rutênio, indicaram que estes conseguiram penetrar nos pequenos agregados de células e ser citotóxicos nas concentrações testadas. A citotoxicidade neste modelo foi comprovada pelo significativo valor de CI50 obtido após o tratamento com os complexos. Estudos similares relataram que complexos de rutênio recém-sintetizados também apresentaram citotoxicidade e que esta, levou a alterações morfológicas em células

de carcinoma hepatocelular humano HepG2 e carcinoma de cólon HCT116 em modelo de cultura 3D (SILVA *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2018).

O potencial citotóxico dos complexos de rutênio aqui sintetizados foi corroborado através do ensaio de viabilidade celular. Costa (2017) relatou que o tratamento de células de carcinoma de cólon HCT116 com o complexo piplartina-rutênio reduziu significativamente a viabilidade dessas células. Human-Engelbrecht (2017), relatou redução significativa da viabilidade de células de câncer esofágico (SNO) tratadas com o complexo fosfínico de prata (I). No presente estudo, também foi observado uma diminuição significativa do número de células viáveis. Resultados similares foram encontrados no tratamento de células de carcinoma de cólon (SW480 e HT29) com o complexo heterocíclico de rutênio (III), KP1019, e em células de leucemia mielogênica crônica tratadas com cis-[Ru(C2O4)(NH3)4]2(S2O6) (KAPITZA *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2014).

Diversos estudos da literatura têm relatado que complexos de rutênio induzem morte celular apoptótica. Ude (2016) observou que o complexo de rutênio [Ru(η^6 -p-cym)(CipA-H)Cl] induziu apoptose em células de câncer de pulmão A549. De acordo com Silva (2018) o complexo de rutênio fosfínico/diamínico foi capaz de induzir apoptose de modo concentração-dependente. Resultados similares foram encontrados em outros estudos que avaliavam o mecanismo de indução de morte celular por complexos Ru(II)/fosfínico/diamínico (LIM *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2018). No presente estudo, os complexos de rutênio testados também induziram a morte celular por apoptose, o que condiz com estudos previamente reportados (TAN *et al.*, 2010; ZENG *et al.*, 2016; TADIĆ *et al.*, 2018).

A atividade citotóxica de complexos de rutênio é mediada por diversos mecanismos de ação que culminam em morte celular apoptótica. Alterações no potencial transmembrânico mitocondrial, aumento de espécies reativas de oxigênio, parada do ciclo celular, fragmentação do DNA, ativação da via MAPK e regulação de p53 são alguns dos mecanismos acima citados (KROEMER *et al.*, 2009). Decidimos então, elucidar quais mecanismos de ação estariam envolvidos no processo de morte celular apoptótica induzida pelos complexos de rutênio aqui testados.

Segundo Sinicrope (2008) BAD é uma proteína pró-apoptótica que regula positivamente a apoptose através da inativação de membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, levando a célula à apoptose. Silva *et al.* (2018) relatou que o gene BAD não é essencial para a atividade do complexo de rutênio [Ru(5-FU)(PPh3)2(bipy)]PF6,

a partir da determinação do CI50 pelo ensaio do alamar blue. Em concordância, os valores de CI50 aqui encontrados, também indicaram que o gene BAD não é essencial para a atividade dos complexos testados.

Novos complexos de rutênio foram sintetizados, caracterizados e avaliados quanto ao possível mecanismo de ação por Vuradi (2017). A quantificação do DNA nuclear de células de carcinoma cervical, HeLa, tratadas com os complexos, foi realizada para observar como os efeitos citotóxicos refletem na perturbação da dinâmica do ciclo celular. Todos os complexos induziram aumento da população de células em sub-G0/G1 de modo dependente do tempo. O aumento do conteúdo de DNA em sub-G0/G1 também foi observado nas células HepG2 tratadas com os complexos 1 e 2, sugerindo fragmentação do DNA, e, portanto, que os complexos são efetivos em causar morte celular. Resultados similares foram relatados em estudos previamente reportados (PEREIRA *et al.*, 2014; WAN *et al.*, 2016). Gandin (2010) relatou que complexos fosfínicos de ouro foram capazes de aumentar a população de células em sub-G0/G1 em um painel de diversas linhagens cancerosas incluindo pulmão (A549), cólon (HCT-15), mama (MCF-7), cervical (HeLa), leucêmica (HL60) e de melanoma (A375).

Moléculas capazes de intercalar com o DNA são candidatos promissores à fármacos antineoplásicos. A intercalação leva à distorção da dupla-hélice com consequente inibição das enzimas de replicação, e, segundo a literatura, muitos complexos de rutênio têm exibido essa capacidade (KUNG *et al.*, 2001; NANDHINI *et al.*, 2015). Neste estudo, a redução na intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídio (EB) indicou que ambos os complexos de rutênio foram capazes de intercalar com o DNA. Estes resultados são análogos a outros estudos previamente reportados (PLUIM *et al.*, 2004; ALAGESAN *et al.*, 2014; BAROLLI *et al.*, 2017).

Além do núcleo, a mitocôndria também é relatada como alvo dos complexos de rutênio. Estes, induzem disfunções mitocondriais com subsequente ativação da via intrínseca da apoptose (ALLARDYCE e DYSON, 2001; WANG *et al.*, 2018). Rackham (2007) relatou perda do potencial transmembrânico mitocondrial causada pelo tratamento de células MDA-MB-468 com o complexo fosfínico de ouro, $[\text{Au}(\text{d}2\text{pypp})_2]\text{Cl}$. A perda do potencial transmembrânico mitocondrial causada pelo tratamento com os complexos de rutênio aqui estudados, também foi mencionada em outros trabalhos que avaliavam alterações no potencial transmembrânico mitocondrial causados por diversos complexos de rutênio recém-sintetizados (KAPITZA *et al.*,

2005; LI *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2015; KOCEVA-CHYŁA *et al.*, 2016).

Diversos compostos com atividade anticâncer em uso clínico induzem a apoptose através da geração de ERO. O aumento dos níveis de ERO amplifica os sinais apoptóticos através da ativação de vias de sinalização downstream, como p53 e MAPK, que por sua vez, promovem a morte celular por apoptose (KAWIAK *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2014; CAO *et al.*, 2015). Lu (2016) quantificou os níveis intracelulares de EROs em células HepG2 após o tratamento com o complexo de rutênio, Ru(II) carbonilo. O tratamento desencadeou aumento significativo de ERO de modo dependente do tempo e concentração. Adicionalmente, Koceva-Chyła (2016) demonstrou que o complexo de rutênio, diruthenium-1 (DIRU-1), foi capaz de produzir quantidade significativa de ERO em células de adenocarcinoma de mama MCF-7, de modo dependente do tempo e da concentração. Resultados similares foram encontrados em diversos estudos presentes na literatura (TAN *et al.*, 2010; WAN *et al.*, 2016; TADIĆ *et al.*, 2018). O complexo fosfínico de prata (I) também induziu aumento significativo de ERO em células de câncer esofágico (SNO) (ENGELBRECHT *et al.*, 2018). No presente estudo, não observamos aumento significativo de ERO nas células HepG2 tratadas com os complexos CBM e CBT. Nossos achados demonstraram que a citotoxicidade causada pelos complexos de rutênio não é mediada pelo estresse oxidativo, como citado anteriormente.

Em estudos anteriores do nosso grupo, foi investigada a atividade antitumoral de um inédito complexo de rutênio com a xantoxilina, RCX, em camundongos C.B. 17 SCID inoculados com células HepG2. Este, foi capaz de inibir o crescimento do tumor nas doses testadas. Adicionalmente, não foram observadas alterações significantes no peso corporal/órgãos dos animais tratados, e nem nos parâmetros hematológicos analisados (CARVALHO *et al.*, 2018). Wang (2018) demonstrou que o complexo de rutênio inibiu de maneira dose-dependente o crescimento de células de carcinoma de fígado, BEL-7402 em camundongos xenotransplantados. Em estudo previamente reportado, o complexo fosfínico de ouro (III), inibiu o crescimento do tumor in vivo de células de carcinoma hepatocelular (SUN *et al.*, 2013). Resultados similares foram encontrados em nosso estudo, onde os complexos de rutênio CBM e CBT também foram capazes de inibir o crescimento de células HepG2, além de não ter sido observado toxicidade nas doses testadas.

7. CONCLUSÃO

O nosso estudo revelou que os complexos de rutênio-fosfina exibiram citotoxicidade potente em um painel de diferentes células cancerosas, induziram alterações morfológicas condizentes com morte celular apoptótica e fragmentação do DNA. Observamos também alteração no potencial transmembrânico mitocondrial, intercalação com o DNA e apoptose mediada por ERK 1/2. Além disso, os complexos foram capazes de inibir o desenvolvimento in vivo de células HepG2 em modelo xenográfico, indicando que estes são novos candidatos à fármacos anticancerígenos.

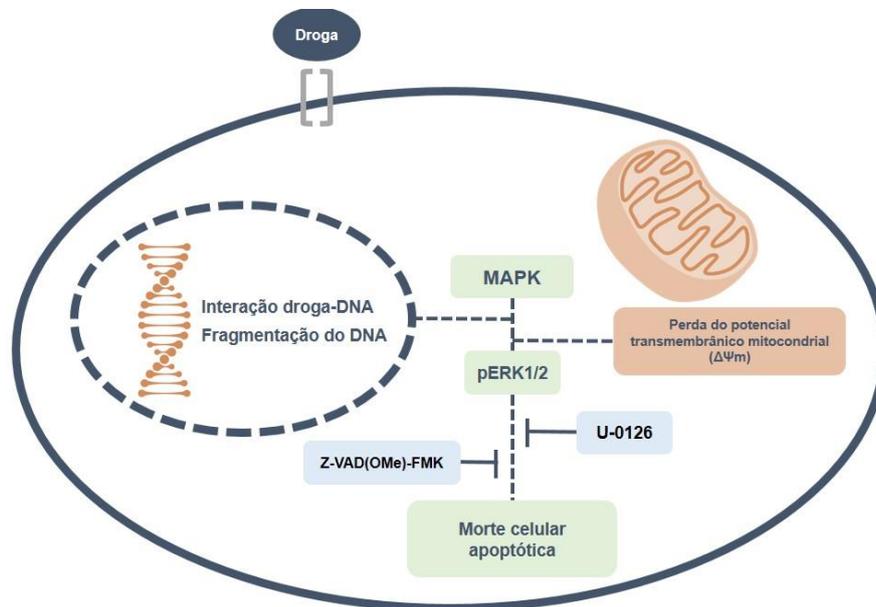


Figura 18. Mecanismo de ação dos complexos de rutênio-fosfina.

REFERÊNCIAS

- ALAGESAN, M. *et al.* DMSO containing ruthenium (II) hydrazone complexes: in vitro evaluation of biomolecular interaction and anticancer activity. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 42, p. 15829-15840, 2014.
- ALBERTS, B. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Science, 2017.
- ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Review**, v. 45, n. 2, p. 62-69, 2001.
- ANTONARAKIS, E. S.; EMADI, A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2010.
- BALOGH, J. *et al.* Hepatocellular carcinoma: a review. **Journal of Hepatocellular Carcinoma**, v. 3, p. 41, 2016.
- BARNETT, G. C. *et al.* Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 2, p. 134, 2009.
- BAROLLI, J. P. *et al.* Polypyridyl Ruthenium Complexes: Novel DNA-Intercalating Agents against Human Breast Tumor. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 10, p. 1879-1889, 2017.
- BASKAR, R. *et al.* Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 193, 2012.
- BEGG, A. C.; STEWART, F. A.; VENS, C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 4, p. 239, 2011.
- BERGAMINI, P. *et al.* Phosphinic platinum complexes with 8-thiotheophylline derivatives: synthesis, characterization, and antiproliferative activity. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4267-4276, 2007.
- BERGAMO, A. *et al.* Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.106, p.90-99, 2012.
- BERNERS-PRICE, S. J. *et al.* Copper (I) complexes with bidentate tertiary phosphine ligands: solution chemistry and antitumor activity. **Inorganic Chemistry**, v. 26, n. 20, p. 3383-3387, 1987.
- BIEGING, K. T.; MELLO, S. S.; ATTARDI, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 5, p. 359, 2014.

BONASSA, E. M. A. Enfermagem em quimioterapia. In: **Enfermagem em quimioterapia**. Atheneu, 1992.

BONASSA, E. M. A.; SANTANA, T. R. Conceitos gerais em quimioterapia antineoplásica. In: **Enfermagem em terapêutica oncológica**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 3-19.

BUROTTO, M. *et al.* The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. **Cancer**, v. 120, n. 22, p. 3446-3456, 2014.

CAO, W.; ZHENG, W.; CHEN, T. Ruthenium polypyridyl complex inhibits growth and metastasis of breast cancer cells by suppressing FAK signaling with enhancement of TRAIL-induced apoptosis. **Scientific Reports**, v. 5, p. 9157, 2015.

CARVALHO, N. C. *et al.* A novel ruthenium complex with xanthoxylin induces S-phase arrest and causes ERK1/2-mediated apoptosis in HepG2 cells through a p53-independent pathway. **Cell Death e Disease**, v. 9, n. 2, p. 79, 2018.

CHABNER, B. A.; ROBERTS JR, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65, 2005.

CHAMBERS, A.F.; GROOM, A.C. e MACDONALD, I.C. Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563, 2002.

CHATURVEDI, P.K.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. Lupeol: connotations for chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 263, p. 1-13, 2008.

CHEN, D. *et al.* Metal complexes, their cellular targets and potential for cancer therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 7, p. 777-791, 2009.

CHEN, L. M. *et al.* The studies on the cytotoxicity in vitro, cellular uptake, cell cycle arrest and apoptosis-inducing properties of ruthenium methylimidazole complex [Ru (Melm) 4 (p-cpip)] 2+. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 156, p. 64-74, 2016.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **A célula: uma abordagem molecular**. Artmed Editora, 2016.

COSTA, C.O.D. *et al.* Novel piplartine-containing ruthenium complexes: synthesis, cell growth inhibition, apoptosis induction and ROS production on HCT116 cells. **Oncotarget**, v. 8, p. 104367-104392, 2017.

COULOMBE, P.; MELOCHE, S. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 8, p. 1376-1387, 2007.

CRUZ JÚNIOR, J. W. DA. **Complexos fosfínicos de rutênio contendo os ligantes nitro, nitrosilo ou piridinas, com atividades antitumorais e antituberculose**. Mestrado (Dissertação) Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de São Carlos, 2010.

DARZYNKIEWICZ, Z. *et al.* Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 13, n. 8, p. 795-808, 1992.

DELANEY, G. *et al.* The role of radiotherapy in cancer treatment. **Cancer**, v. 104, n. 6, p. 1129-1137, 2005.

DE LUCA, A. *et al.* The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 16, n. sup2, p. S17-S27, 2012.

DESCHÊNES-SIMARD, X. *et al.* Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. **Genes e Development**, v. 27, n. 8, p. 900-915, 2013.

DIAS, R. B. *et al.* Principles of Cancer Pathogenesis and Therapies: A Brief Overview. In: **Bioactive Essential Oils and Cancer**. Springer International Publishing, p. 1-17, 2015.

DUAN, L. *et al.* Isolated seven-coordinate Ru (IV) dimer complex with [HOHOH]-bridging ligand as an intermediate for catalytic water oxidation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 30, p. 10397-10399, 2009.

DYSON, P.J.; SAVA, G. Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. **Dalton Transactions**, n. 16, p. 1929-1933, 2006.

ENGELBRECHT, Z.; MEIJBOOM, R.; CRONJÉ, M. J. The ability of silver (I) thiocyanate 4-methoxyphenyl phosphine to induce apoptotic cell death in esophageal cancer cells is correlated to mitochondrial perturbations. **BioMetals**, v. 31, n. 2, p. 189-202, 2018.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER *et al.* EASL–EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 4, p. 908-943, 2012.

FARAZI, P. A.; DEPINHO, R. A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 9, p. 674, 2006.

FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature**, v. 301, n. 5895, p. 89, 1983.

FIDLER, I.J. Critical determinants of metastasis. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, 2002. p. 89-96.

FILAK, L. K. *et al.* Metal–arene complexes with indolo [3, 2-c]-quinolines: effects of ruthenium vs osmium and modifications of the lactam unit on intermolecular interactions, anticancer activity, cell cycle, and cellular accumulation. **Organometallics**, v. 32, n. 3, p. 903-914, 2013.

FREZZA, M. *et al.* Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 16, p. 1813-1825, 2010.

FRIEDBERG, E. C. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 436, 2003.

GABBIANI, C.; CASINI, A.; MESSORI, L. Gold (III) compounds as anticancer drugs. **Gold Bull**, v. 40, n. 1, p. 73-81, 2007.

GALANSKI, M. *et al.* Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 25, p. 2078-2089, 2003.

GANDIN, V. *et al.* Cancer cell death induced by phosphine gold (I) compounds targeting thioredoxin reductase. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 2, p. 90-101, 2010.

GAO, S. *et al.* Three-dimensional (3D) culture in sarcoma research and the clinical significance. **Biofabrication**, v. 9, n. 3, p. 032003, 2017.

GILL, M.R.; THOMAS, J.A. Ruthenium (II) polypyridyl complexes and DNA—from structural probes to cellular imaging and therapeutics. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 8, p. 3179-3192, 2012.

GLASS, L.S. *et al.* Semi-automated high-throughput fluorescent intercalator displacement-based discovery of cytotoxic DNA binding agents from a large compound library. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p.1685-1688, 2010.

GLOBOCAN. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC.: **Liver Cancer – Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2014**. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/liver-new.asp>. Acesso em: 16 mar. 2018.

GOMES, M. A. *et al.* Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 514-524, 2013.

GREEN, D. R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, p. 1309-1312, 1998.

GROESSL, M.; ZAVA, O.; DYSON, P.J. Cellular uptake and subcellular distribution of ruthenium-based metallodrugs under clinical investigation versus cisplatin. **Metallomics**, v. 3, n. 6, p. 591-599, 2011.

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

HARTINGER, C.G. *et al.* Application of mass spectrometric techniques to delineate the modes-of-action of anticancer metallodrugs. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 14, p. 6186-6199, 2013.

HENDERSON, W.; ALLEY, S. R. Platinum (II) complexes containing ferrocene-derived phosphonate ligands; synthesis, structural characterisation and antitumour activity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 322, n. 1, p. 106-112, 2001.

HO, E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, n. 10, p. 572-578, 2004.

HOLLIDAY, R. The inheritance of epigenetic defects. **Science**, v. 238, n. 4824, p. 163-170, 1987.

HOWERTON, B. S.; HEIDARY, D. K.; GLAZER, E. C. Strained ruthenium complexes are potent light-activated anticancer agents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 20, p. 8324-8327, 2012.

HU, G. Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 69, n. 3, p. 326-335, 1998.

HUANG, H. *et al.* Targeting nucleus DNA with a cyclometalated dipyridophenazineruthenium (II) complex. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 8971-8983, 2014.

HUMAN-ENGELBRECHT, Z.; MEIJBOOM, R.; CRONJÉ, M. J. Apoptosis-inducing ability of silver (I) cyanide-phosphines useful for anti-cancer studies. **Cytotechnology**, v. 69, n. 4, p. 591-600, 2017.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acesso em: 23 abr. 2018.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071, 2009.

JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2467-2498, 1999.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1074-1080, 2001.

JOERGER, A. C.; FERSHT, A. R. Structural biology of the tumor suppressor p53. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p. 557-582, 2008.

JOERGER, A. C.; FERSHT, A. R. The p53 pathway: origins, inactivation in cancer, and emerging therapeutic approaches. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, p. 375-404, 2016.

JUNGWIRTH, U. *et al.* Anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes. **Antioxidants e Redox Signaling**, v. 15, n. 4, p. 1085-1127, 2011.

KALINOWSKA-LIS, U. *et al.* Antibacterial activity and cytotoxicity of silver (I) complexes of pyridine and (Benz) imidazole derivatives. X-ray crystal structure of [Ag (2, 6-di (CH₂OH) py) ₂] NO₃. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 87, 2016.

KAWIAK, A. *et al.* Induction of apoptosis in HL-60 cells through the ROS-mediated mitochondrial pathway by ramentaceone from *Drosera aliciae*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 1, p. 9-14, 2012.

KAPITZA, S. *et al.* The heterocyclic ruthenium (III) complex KP1019 (FFC14A) causes DNA damage and oxidative stress in colorectal tumor cells. **Cancer Letters**, v. 226, n. 2, p. 115-121, 2005.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 8, p. 573, 2007.

KOCEVA-CHYŁA, A. *et al.* Insights into the *in vitro* Anticancer Effects of Diruthenium-1. **ChemMedChem**, v. 11, n. 19, p. 2171-2187, 2016.

KOMARNICKA, U. K. *et al.* Phosphine derivatives of sparfloxacin—Synthesis, structures and *in vitro* activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1096, p. 55-63, 2015.

KOMAROVA, N. L.; SENGUPTA, A.; NOWAK, M. A. Mutation–selection networks of cancer initiation: tumor suppressor genes and chromosomal instability. **Journal of Theoretical Biology**, v. 223, n. 4, p. 433-450, 2003.

KÖPF-MAIER, P. Complexes of metals other than platinum as antitumour agents. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 1-16, 1994.

KRATZ, F.; MESSORI, L. Spectral characterization of ruthenium (III) transferrin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 79-82, 1993.

KRISHNA, M.; NARANG, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 22, p. 3525-3544, 2008.

KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3, 2009.

KÜNG, A. *et al.* Hydrolysis of the tumor-inhibiting ruthenium (III) complexes HIm trans-[RuCl₄(im)₂] and HInd trans-[RuCl₄(ind)₂] investigated by means of HPCE and HPLC-MS. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 292-299, 2001.

LI, LINLIN. *et al.* Ruthenium complexes containing bis-benzimidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 4, p. 1138-1141, 2012.

LIANG, R. *et al.* Inorganic nanomaterials for bioimaging, targeted drug delivery and therapeutics. **Chemical Communications**, v. 50, n. 91, p. 14071-14081, 2014.

LIM, E. *et al.* Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. **Nature Medicine**, v. 15, n. 8, p. 907, 2009.

LIMA, A. P. *et al.* Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium (II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PloS One**, v. 9, n. 10, p. e105865, 2014.

LLOVET, J. M. *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 4, p. 378-390, 2008.

LIU, J. *et al.* Ruthenium (II) polypyridyl complexes as mitochondria-targeted two-photon photodynamic anticancer agents. **Biomaterials**, v. 56, p. 140-153, 2015.

LIPPERT, B. (Ed.). **Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug**. John Wiley e Sons, 1999.

LORD, R. M. *et al.* Hypoxia-sensitive metal β -ketoiminato complexes showing induced single-strand DNA breaks and cancer cell death by apoptosis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 4940-4953, 2015.

LU, Y. *et al.* Ruthenium Complexes Induce HepG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cell Apoptosis and Inhibit Cell Migration and Invasion through Regulation of the Nrf2 Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 775, 2016.

MACKLIS, J.D.; MADISON R.D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **Journal of Neuroscience Methods**, v.31, p.43 – 46, 1990.

MARQUARDT, J.U.; ANDERSEN, J. B.; THORGEIRSSON, S.S. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 11, p. 653, 2015.

MARZANO, C. *et al.* Cooper complexes as anticancer agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 185-211, 2009.

MILACIC, V.; FREGONA, D.; DOU, Q. P. Gold complexes as prospective metal-based anticancer drugs. **Histology and Histopathology**, v. 23, n. 1, p. 101-108, 2008.

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallo drugs in medicinal inorganic chemistry. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4540-4563, 2014.

MINCHINTON, A. I.; TANNOCK, I. F. Drug penetration in solid tumours. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 8, p. 583, 2006.

MONTEL, A. M. *et al.* Neutron activation increases activity of ruthenium-based complexes and induces cell death in glioma cells independent of p53 tumor suppressor gene. **BioMetals**, v. 30, n. 2, p. 295-305, 2017.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. NIH. Disponível em: <https://www.nih.gov/>. Acesso em: 13 mar. 2018.

NANDHINI, T. *et al.* Interactions of Ru (II) polypyridyl complexes with DNA mismatches and abasic sites. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 19, p. 9044-9051, 2015.

NDAGI, U.; MHLONGO, N.; SOLIMAN, M.E. Metal complexes in cancer therapy – an update from drug design perspective. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 599-616, 2017.

NARDON, C.; BOSCUCCI, G.; FREGONA, D. Beyond platinum: gold complexes as anticancer agents. **Anticancer Research**, v. 34, n. 1, p. 487-492, 2014.

O'BRIEN, J. *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p. 5421-5426, 2000.

ORVIG, C.; ABRAMS, M. J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2201-2204, 1999.

PAGE, S.; WHEELER, R. Ruthenium compounds as anticancer agents. **Education In Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 26, 2012.

PAN, Q. *et al.* Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. **Cancer Research**, v. 62, n. 17, p. 4854-4859, 2002.

PEREIRA, F.C. *et al.* Cytotoxic effects of the compound cis-tetraammine (oxalato) ruthenium (III) dithionate on K-562 human chronic myelogenous leukemia cells. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 301, 2014.

PFLAUM, J.; SCHLOSSER, S.; MÜLLER, M. p53 family and cellular stress responses in cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 4, p. 285, 2014.

PIMIENTA, G.; PASCUAL, J. Canonical and alternative MAPK signaling. **Cell Cycle**, v. 6, n. 21, p. 2628-2632, 2007.

PROVINCIALI, M.; DI STEFANO, G.; FABRIS, N. Dose-dependent opposite effect of zinc on apoptosis in mouse thymocytes. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 17, n. 9, p. 735-744, 1995.

PLUIM, D. *et al.* Cytotoxicity of the organic ruthenium anticancer drug Nami-A is correlated with DNA binding in four different human tumor cell lines. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 54, n. 1, p. 71-78, 2004.

PUCKETT, C.A.; BARTON, J.K. Methods to explore cellular uptake of ruthenium complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 1, p. 46-47, 2007.

QUAIL, D.F.; JOYCE, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423, 2013.

RACKHAM, O. *et al.* A gold (I) phosphine complex selectively induces apoptosis in breast cancer cells: implications for anticancer therapeutics targeted to mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 7, p. 992-1002, 2007.

RAMAN, M.; CHEN, W.; COBB, M. H. Differential regulation and properties of MAPKs. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3100, 2007.

RAMOS-LIMA, F. J. *et al.* Preparation and characterization of novel trans-[PtCl(2)(amine)(isopropylamine)] compounds: cytotoxic activity and apoptosis induction in ras-transformed cells. **European Journal Inorganic Chemistry**, p. 1591-1598, 2003.

REDDY, T. S. *et al.* Synthesis of gold (I) phosphine complexes containing the 2-BrC₆F₄PPH₂ ligand: Evaluation of anticancer activity in 2D and 3D spheroidal models of HeLa cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017.

RINGBORG, U. *et al.* The Swedish Council on Technology Assessment in Health Care (SBU) systematic overview of radiotherapy for cancer including a prospective survey of radiotherapy practice in Sweden 2001--summary and conclusions. **Acta Oncologica**, v. 42, n. 5-6, p. 357-365, 2003.

SADLER, P. J.; SUE, R. E. The chemistry of gold drugs. **Metal-Based Drugs**, v. 1, n. 2-3, p. 107-144, 1994.

SAVA, Z. *et al.* Antineoplastic activity and toxicity of an organometallic complex of ruthenium(II) in comparison with cis-PDD in mice bearing solid malignant neoplasms. **European Journal of Cancer e Clinical Oncology**, v. 20, p. 841-847, 1984.

SAVA, G.; BERGAMO, A. Ruthenium-based compounds and tumour growth control (review). **International Journal of Oncology**, v. 17, p. 353-365, 2000.

SCHULZE, K. *et al.* Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. **Nature Genetics**, v. 47, n. 5, p. 505, 2015.

SHAPIRO, H.M. **Practical Flow Cytometry**. Alan R. Liss, Inc., New York, 1985.

SHAUL, Y. D.; SEGER, R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 8, p. 1213-1226, 2007.

SILVA, H. V. R. *et al.* Phosphine/diimine ruthenium complexes with Cl⁻, CO, NO⁺, NO²⁻, NO³⁻ and pyridine ligands: pro-apoptotic activity on triple-negative breast cancer cells and DNA/HSA interactions. **Polyhedron**, 2018.

SILVA, M. M. **Busca por complexos de rutênio (II) com propriedades quimioterapêuticas: avaliação da atividade antitumoral, potencial mutagênico e inibição da enzima topoisomerase IB**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, 2017.

SILVA, V.R. *et al.* A ruthenium-based 5-fluorouracil complex with enhanced cytotoxicity and apoptosis induction action in HCT116 cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 288, 2018.

SINICROPE, F. A. *et al.* Proapoptotic Bad and Bid protein expression predict survival in stages II and III colon cancers. **Clinical Cancer Research**, v.14, p.4128-4133, 2008.

STAROSTA, R. *et al.* Copper (i) iodide complexes containing new aliphatic aminophosphine ligands and diimines—luminescent properties and antibacterial activity. **New Journal of Chemistry**, v. 34, n. 7, p. 1441-1449, 2010.

STEFANIDOU, M. *et al.* Zinc: a multipurpose trace element. **Archives of Toxicology**, v. 80, n. 1, p. 1, 2006.

SUDHAKAR, A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. **Journal of Cancer Science e Therapy**, v. 1, n. 2, p. 1, 2009.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays for cytotoxicity and antitumor activity. **Methods in Plant Biochemistry**, v. 6, p. 71-133, 1991.

SUN, R. W. Y. *et al.* A dinuclear cyclometalated gold (III)—phosphine complex targeting thioredoxin reductase inhibits hepatocellular carcinoma *in vivo*. **Chemical Science**, v. 4, n. 5, p. 1979-1988, 2013.

SUREDA, F.X. *et al.* Mitochondrial membrane potential measurement in rat cerebellar neurons by flow cytometry. **Cytometry**, v. 28, p.74-80, 1997

TADIĆ, A. *et al.* Ruthenium-arene complexes with NSAIDs: Synthesis, characterization and bioactivity. **New Journal of Chemistry**, 2018.

TAN, C. *et al.* Nuclear permeable ruthenium (II) β -carboline complexes induce autophagy to antagonize mitochondrial-mediated apoptosis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 7613-7624, 2010.

TORRE, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

UDE, Z. *et al.* A novel dual-functioning ruthenium (II)-arene complex of an anti-microbial ciprofloxacin derivative—Anti-proliferative and anti-microbial activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 160, p. 210-217, 2016.

VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 413-431, 2009.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, v. 10, n. 8, p. 789, 2004.

VURADI, R. KUMAR. *et al.* Studies on the DNA binding and anticancer activity of Ru (ii) polypyridyl complexes by using a (2-(4-(diethoxymethyl)-1 H-imidazo [4, 5-f][1, 10] phenanthroline)) intercalative ligand. **New Journal of Chemistry**, 2018.

WAN, D. *et al.* Synthesis, characterization and anticancer effect of the ruthenium (II) polypyridyl complexes on HepG2 cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 165, p. 246-255, 2016.

WANG, X.; TOURNIER, C. Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. **Cellular Signalling**, v. 18, n. 6, p. 753-760, 2006.

WANG, J. *et al.* The antitumor effect and toxicity of a ruthenium (II) complex in vivo. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 87, p. 49-52, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. CANCER (WHO). Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 9 fev. 2018.

WYLD, L; AUDISIO, R. A.; POSTON, G. J. The evolution of cancer surgery and future perspectives. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 2, p. 115, 2015.

YAMADA, K. M.; CUKIERMAN, E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. **Cell**, v.130, n.4, p.601–610, 2007.

YOSHII, J. *et al.* The copper-chelating agent, trientine, suppresses tumor development and angiogenesis in the murine hepatocellular carcinoma cells. **International Journal of Cancer**, v. 94, n. 6, p. 768-773, 2001.

YUAN, J. *et al.* Ruthenium complex Λ -WH0402 induces hepatocellular carcinoma LM6 (HCCLM6) cell death by triggering the Beclin-1-dependent autophagy pathway. **Metallomics**, v. 7, n. 5, p. 896-907, 2015.

ZHAO, Z. *et al.* Mixed-ligand ruthenium polypyridyl complexes as apoptosis inducers in cancer cells, the cellular translocation and the important role of ROS-mediated signaling. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 45, p. 17017-17028, 2014.

ZENG, C. C. *et al.* The induction of apoptosis in HepG-2 cells by ruthenium (II) complexes through an intrinsic ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 122, p. 118-126, 2016.

ZOU, T. *et al.* Chemical biology of anticancer gold (III) and gold (I) complexes. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 24, p. 8786-8801, 2015.

ZUCMAN-ROSSI, J. *et al.* Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 149, n. 5, p. 1226-1239. e4, 2015.