



Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia

WANESSA CARVALHO PIRES

**ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E DO
MECANISMO DE MORTE CELULAR DE COMPOSTOS DE RUTÊNIO (II)
EM CÉLULAS DE SARCOMA-180**

Goiânia
2014

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Wanessa Carvalho Pires		
E-mail:	wanessa_carvalho@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Capes /	Sigla:	
País:	Brasil	UF:	Go
		CNPJ:	
Título:	Estudo do potencial citotóxico, genotóxico e do mecanismo de morte celular de complexos de rutênio (II) em células de Sarcoma 180.		
Palavras-chave:	Complexos de rutênio / Sarcoma-180 / Morte celular		
Título em outra língua:	Study of potential cytotoxic, genotoxic and cell death mechanism of ruthenium II compounds in sarcoma-180 cells.		
Palavras-chave em outra língua:	Ruthenium complexes / Sarcoma-180 / Cell death		
Área de concentração:	Fármacos e medicamentos		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	12/03/2014		
Programa de Pós-Graduação:	Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas		
Orientador (a):	Elisângela de Paula Silveira Lacerda		
E-mail:	silveiralacerda@gmail.com		
Co-orientador(a):*			
E-mail:			

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 15/08/2014.

Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

WANESSA CARVALHO PIRES

**ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E DO
MECANISMO DE MORTE CELULAR DE COMPOSTOS DE RUTÊNIO (II)
EM CÉLULAS DE SARCOMA-180**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Goiânia
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

P667e Pires, Wanessa Carvalho.
Estudo do Potencial Citotóxico, Genotóxico e do Mecanismo de Morte Celular de Compostos de Rutênio (II) em Células de Sarcoma-180 [manuscrito] / Wanessa Carvalho Pires. - 2014.
110 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2014.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. Composto de rutênio – Atividade antitumoral. 2. Sarcoma 180 3. Câncer - Prevenção 4. Câncer – Quimioterápicos I. Título.

CDU: 615.28:516-006.6

WANESSA CARVALHO PIRES

**ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, GENOTÓXICO E DO
MECANISMO DE MORTE CELULAR DE COMPOSTOS DE RUTÊNIO (II)
EM CÉLULAS DE SARCOMA-180**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em Goiânia, _____ de _____ de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida Saddi

Prof. Dr. Hugo Delleon Silva

Dedico essa dissertação aos meus primeiros mestres: meu pai Mauro Batista Marcelino Pires e minha mãe Georgeta Rosa de Carvalho Pires, que me ensinaram com todo carinho e dedicação como trilhar os caminhos para realizar meus sonhos e nunca pouparam esforços, mesmo nas dificuldades, para que eu chegasse até aqui. Ao meu irmão Bruno Henrique Carvalho Pires por todo apoio e por acreditar sempre no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que guiou meu caminho me permitindo alcançar meus objetivos e sonhos, iluminando meus passos para superar todas as dificuldades e mandando pessoas que são como anjos na minha vida e que me deram oportunidades, força e apoio durante essa caminhada. Obrigada por todas as graças alcançadas!

Aos meus pais Georgeta Rosa e Mauro Batista pelo amor incondicional e apoio em todas as minhas escolhas mesmo nas dificuldades, por serem meu exemplo, meu porto seguro, meu referencial! Obrigada por me incentivarem nos momentos de dúvida, por terem paciência nos dias difíceis e por nunca terem poupado esforços para me proporcionar o melhor na vida, especialmente na minha formação acadêmica e profissional.

Ao meu irmão Bruno Henrique, meu exemplo de luta! Obrigada por todo apoio, pela paciência e por acreditar no meu potencial! Tenho muito orgulho de você e da família linda que formou. Muito obrigada por ser tão presente na minha vida e nunca desistir de mim! Agradeço ao companheirismo da minha cunhada Janaina Silva que no seu modo silencioso de viver, está sempre acompanhando e dividindo comigo minhas conquistas e decepções.

Às minhas primas-irmãs Renata Pires e Claudia Pires que não cansam de me apoiar e de estarem ao meu lado em todos os momentos. Muito obrigada por sofrerem e comemorarem comigo em tantas decepções e alegrias vividas até aqui. Obrigada por acreditarem em mim e por sempre terem uma palavra de incentivo que me faz acreditar que tudo vai dar certo! Sou grata também ao primo Elton Pereira, que sempre torceu pelas minhas conquistas e por me apoiar em todos os momentos, muito obrigada!

A todos os meus familiares por me incluírem nas suas orações diárias e pelo apoio mútuo que vivemos, em especial as minhas tias Sueli Pires e Maria do Carmo e os tios José Jorge e Marcos Oliveira que acompanharam de perto cada passo caminhado e sempre estiveram presente no meu dia-a-dia.

*“E não sabem dar valor pra essas coisas...
Ter um lar é um tesouro!”*

Obrigada família, vocês são o tesouro que Deus escolheu para me presentear, sem vocês nada disso seria possível!

À minha orientadora Prof^a Dr^a Elisângela de Paula que me acolheu de braços abertos no início da minha graduação e foi me moldando, me ensinando e me formando como a pesquisadora que sou hoje. Você é meu exemplo de profissional e educadora! Muito obrigada por toda a paciência, pela confiança que depositou em mim e pela oportunidade de crescimento na carreira acadêmica. Eu sempre serei grata por tudo que me proporcionou, por todo carinho e dedicação nesses seis anos de convivência e por ter acreditado no meu potencial.

À minha amiga Francielli Mariana que foi minha parceira desde o início da graduação, dividindo cada momento da vida profissional e pessoal entre choros e sorrisos, caminhando juntas durante esses anos de vida acadêmica. E hoje é uma alegria encerrarmos mais um ciclo juntas como sempre! Obrigada pelo apoio, por ser sempre tão prestativa e sempre ter cuidado de mim com tanto carinho.

Às alunas de doutorado Flavia Pereira e Aliny Lima por toda dedicação e paciência em ensinar cada técnica do laboratório. Aprendi muito com vocês e só tenho a agradecer por tudo que me ensinaram desde a iniciação científica. Obrigada pela amizade, companheirismo e por todo o apoio que recebi de vocês.

A toda a equipe do laboratório de genética molecular e citogenética em especial a Lorena Felix, Wanderson Costa, Lucas Carlos, Mariana Pedrosa, Kézia Delmont, Raquel Faria, Thallita Monteiro, Sônia Santos e Hugo Delleon. Obrigada pelo auxílio, incentivo e amizade durante esse período do mestrado, cada um de vocês teve uma contribuição importante no meu caminho e eu agradeço de todo coração por todo apoio que me proporcionaram.

Ao meu amigo Alexandre Barbosa por todo apoio, cuidado e dedicação que sempre teve por mim, mas especialmente nesses últimos meses. Muito obrigada por todo o auxílio, você foi um anjo que Deus mandou ficar próximo de mim para me acalmar nesses dias difíceis. Obrigada pela amizade e parceria de sempre! Serei sempre grata a você!

Aos meus amigos Irla Chiara, Patrick Mesquita, Bruno Cezar, Rogger Teles e Karine Teixeira que tiveram toda paciência com minha ausência e sempre me incentivaram com palavras de apoio! Obrigada por toda amizade e dedicação e por estarem firmes ao meu lado durante cada dia deste percurso!

Obrigada aos meus amigos biólogos que sempre incentivaram, apoiaram e participaram deste mestrado direta ou indiretamente: Rodrigo Santana, Ariane Bitencourt, Maryelle do Carmo, Márcio Fernando e Lorena Mendes. E também ao meu amigo Felipe Franco que compartilhou comigo tantas histórias que vem de uma paixão pelos livros, obrigada pelo apoio!

Obrigada a todos os professores da pós-graduação em ciências farmacêuticas que tanto acrescentaram na minha formação e a cada funcionário que com dedicação facilita nosso trabalho e faz com que tenhamos prazer em desenvolvê-lo. Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de mestrado concedida durante esses dois anos de estudo.

Enfim, não construímos nada sozinhos e eu não teria chegado até aqui sem o apoio de cada um dos que foram citados e tantos outros que não é possível descrever aqui, mas sempre serei grata por cada um que passou na minha vida especialmente nesses dois anos de mestrado, que sem dúvida deixaram marcas eternas na minha história!

Muito Obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

Até 2030 estima-se que ocorrerão 27 milhões de novos casos de câncer no mundo. Em decorrência deste alto número de casos, estudos em busca de novos quimioterápicos que sejam eficientes para o tratamento do câncer têm se intensificado. Os complexos de rutênio têm-se destacado dentre os complexos de metais que têm sido estudados para o tratamento do câncer por demonstrarem características de seletividade para as células tumorais e, conseqüentemente, serem menos tóxicos para as células normais. Diante disso foi avaliado o potencial citotóxico de seis novos complexos de rutênio (II) e dois desses com atividade promissora foram selecionados para avaliar o potencial genotóxico, o mecanismo de morte e a interferência na cinética do ciclo celular. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste do MTT que mostrou que todos os complexos testados apresentaram inibição da viabilidade nas células tumorais de S-180 e K562 em concentrações baixas e uma citotoxicidade em concentrações maiores para células normais de L-929 e linfócitos humanos. Os complexos de rutênio denominados Ru 05 e Ru 08 obtiveram os melhores resultados no teste de MTT e foram selecionados para os testes de mecanismo de morte celular e de genotoxicidade. Os dados indicaram que os Ru 05 e Ru 08 induziram mudanças no ciclo celular através do teste realizado por citometria de fluxo, aumentando a quantidade de células na fase G₀/G₁ e diminuindo na fase de síntese em 24 e 48 horas de tratamento. Para o Ru 05 houve um aumento na quantidade de células na fase Sub-G₁, levando ao indicativo de morte celular por apoptose e dano celular, entretanto, nem o Ru 05 quanto o Ru 08 apresentaram dano significativo ao DNA no teste Cometa em 24 e 48 horas. Ambos os complexos induziram o aumento da quantidade de células positivas para Anexina-V pelo teste de citometria de fluxo, sugestivo de morte celular por necrose ou apoptose, no entanto, o Ru 05 induziu alteração no potencial de membrana mitocondrial, aumentou a expressão dos genes *Bax*, *Caspase 9* e *Tp53* realizado por *PCR* em tempo real e diminuiu a quantidade da proteína anti-apoptótica *Bcl2* ativa nas células de S-180, levando a inferir que o complexo pode estar desencadeando morte celular por apoptose via intrínseca dependente de caspase. Já o Ru 08 não alterou estatisticamente o potencial de

membrana mitocondrial celular, aumentou a expressão dos genes de *Caspase 3*, *8*, *9* e *Tp53*, reduziu a quantidade de proteína anti-apoptótica Bcl2 ativa e aumentou a quantidade da proteína Caspase 3 ativa nas células de S-180 tratadas, permitindo inferir que esse complexo pode estar atuando pela via extrínseca. Porém, outros marcadores específicos são necessários para compreender qual a cascata de eventos da apoptose via extrínseca que está sendo necessária para efetivar esse processo de morte celular, elucidando o mecanismo de ação nas células de S-180 desses novos complexos de rutênio estudados, que se mostraram promissores quimioterápicos no tratamento do câncer.

Palavras-chave: Complexo de Rutênio II, Sarcoma-180, Morte celular.

ABSTRACT

It is estimated that 27 million new cancer cases will occur in the world until 2030. Due to this high number of cases, researches for new chemotherapeutic agents that are efficient for the malignant neoplastic disease treatment have intensified. Ruthenium complexes have been highlighted from those metal complexes that are being contemplated for the cancer treatment, because they exhibit the characteristics of selectivity for tumor cells and thus be less toxic to normal cells. Consequently, we evaluated the cytotoxic potential of six new complexes of ruthenium (II) and two of those with promising activity were selected to assess the genotoxic potential, the mechanism of death and interference on cell cycle dynamics. The cytotoxicity of these complexes was evaluated by MTT assay showing that for all six ruthenium complexes there was a reduction of viability of the tumor cells K562 and S-180 at low concentrations and cytotoxicity at higher concentrations to normal cells L-929 and lymphocyte. The ruthenium II complexes Ru 05 and Ru 08 got the best resolutions in the MTT assay and were selected for testing genotoxicity and mechanism of death. Data indicate that the Ru 05 and 08 induced changes in cell cycle through test performed by flow cytometry, increasing the number of cells in G0/G1 phase and decreasing into the synthesis phase at 24 and 48 hours of exposure. For the complex Ru 05 there was an increase in the number of cells in sub-G1 phase, which is indicative of apoptosis and cell damage, yet, neither the complex Ru 05 nor the Ru 08 showed significant DNA damage in the Comet assay during 24 and 48 hours. Both complexes increased the number of positive cells for Annexin-V, however the complex Ru 05 had induced changes in mitochondrial membrane potential, increased expression of the gene *Bax*, *Tp53* and *Caspase 9* and decreased the amount of active anti-apoptotic Bcl2 protein in the S-180 cells, leading to a reasonable supposes that this complex may cause the triggering of the cell death by apoptosis through intrinsic caspase-dependent manner. On the other hand, the complex Ru 08 did not statistically alter the mitochondrial membrane potential. Ru 08 increased the gene expression of *Caspase 3*, *8*, *9* and *Tp53* and the amount of active Caspase-3 protein in the S-180 treated cells, and decreased the amount of anti-apoptotic Bcl2 protein, which allows inferring that this complex may be acting by the extrinsic pathway. Despite the new ruthenium complexes studied have shown a promising future as

chemotherapy for cancer treatment, other specific markers are needed to understand the cascade of events which the extrinsic apoptosis pathway is being triggered, elucidating the mechanism of action in S-180 cell line.

Key-words: Ruthenium, Sarcoma-180, Cell Death.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, dependendo da fase do ciclo célula.....21
- Figura 2:** Via de sinalização de receptores de morte e receptores dependentes durante a apoptose via extrínseca 35
- Figura 3:** Via apoptose mitocondrial dependente e independente de caspase. 38
- Figura 4:** Complexos de Platina (a) cis-Platina. (b) Carboplatina e (c) cis,trans,cisPtCl₂(O₂CPr)₂(NH₃)(C₆H₁₃N)]. 41
- Figura 5:** Estrutura química dos compostos de rutênio em fase clínica: (a) (H₂im)[trans-RuCl₄(Him)(DMSO)] – NAMI-A e (b) [INDH] trans-[RuCl₄(ind)₂] – KP1019..... 43
- Figura 6:** Esquema do Ensaio de JC-1..... 57
- Figura 7:** Efeitos dos complexos de Ru 05 (a e b) e Ru 08 (c e d) na cinética do ciclo celular sobre a linhagem tumoral de S-180 em 24 (a e c) e 48 (b e d) horas de exposição..... 69
- Figura 8:** Histogramas com o perfil das células do ciclo celular de S-180 tratadas com os complexos de Ru 05 e Ru 08 em 24 e 48 horas. 70
- Figura 9:** Análise por citometria de fluxo dos efeitos dos complexos de Ru 05 e Ru 08 na indução de morte celular através do teste de dupla marcação: Anexina V-FICT/PI em 24 horas de tratamento. 73
- Figura 10:** Análise por citometria de fluxo dos efeitos dos complexos de Ru 05 e Ru 08 na indução de morte celular através do teste de dupla marcação: Anexina V-FICT/PI em 48 horas de tratamento. 74
- Figura 11:** Detecção do potencial de membrana mitocondrial utilizando o corante JC-1 em células de S-180 tratadas com os complexos de Ru 05 e Ru 08 por 24 horas..... 78
- Figura 12:** Análise por citometria de fluxo da população de célula de S-180 para proteína Caspase 3 ativa depois de tratadas com os Ru 05 e Ru 08 por 24 horas.....80
- Figura 13:** Análise da população de célula de S-180 para proteína Bcl2 depois de tratadas com os complexos de Ru 05 e Ru 08 por 24 horas.....82

Figura 14: Atividade de Caspase 8 e 9 sobre linhagem de S-180 depois de tratadas com os complexos de Ru 05 e Ru 08 por 24 horas	83
Figura 15: Avaliação por PCR em Tempo Real da expressão de genes de mRNA de (a) <i>Tp53</i> , (b) <i>Bax</i> , (c) <i>Caspase 8</i> , (d) <i>Caspase 9</i> e (e) <i>Caspase 3</i> frente aos tratamentos dos complexos de Ru 05 e Ru 08 [μ M] em células de S-180 nos períodos de 3, 6 e 12 horas.	83
Figura 16: Hipótese da via de sinalização do complexo de rutênio 05.....	83
Figura 17: Hipótese da via de sinalização do complexo de rutênio 08.....	83
Figura 18: Efeito dos complexos de Ru 05 e Ru 08 na indução de dano ao DNA das células de S-180 após 24 e 48 horas de tratamento em diferentes concentrações analisadas pelo ensaio Cometa.	92
Figura 19: Imagens do teste cometa após tratamentos de células de S-180 com diferentes concentrações (μ M) dos complexos de Ru 05 e Ru 08 durante 24 horas de tratamento.....	93
Figura 20: Gel de agarose, para analisar a integridade das amostras de RNA utilizado.....	108
Figura 21: Curva Padrão dos genes Caspase 9 e <i>TP53</i>	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativas para o ano de 2012/2013 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo sexo e localização primária.	23
Tabela 2: Relações entre ciclo celular e principais classes de agentes antineoplásicos.	28
Tabela 3: Estrutura química dos compostos de rutênio (II) testados.	52
Tabela 4: Sequência de <i>primers</i> utilizados para o ensaio <i>real time</i> RT-PCR.	61
Tabela 5: Valores de IC ₅₀ : Concentração ($\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$) dos complexos de rutênio (II) que inibe 50% da viabilidade celular das células pelo ensaio de redução MTT, tratadas por 48 horas nas concentrações de 0,2 – 200 $\mu\text{M L}^{-1}$. IS = Índice de Seletividade, *IS \geq 2,0.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	Fator Indutor de Apoptose
ATP	Trifosfato de Adenosina
APAF-1	Fator de Ativação de Protease Associada a Apoptose 1
ATCC	American Type Culture Collection
Bad	Agonista de Morte Celular Associado a Bcl2, do inglês: Bcl2-Associated Agonist of Cell Death
Bak	Proteína Destruidora de Antagonistas de Bcl2, do inglês: <i>Bcl2-Antagonist/Killer 1</i>
Bax	Proteína X Associada a Bcl-2, do inglês: <i>Bcl-2 Associated X Protein</i>
Bcl2 2	Proteína Reguladora anti-apoptótica, do inglês: B-cell CLL/lymphoma 2
Bid	Proteína Reguladora pró-apoptótica Antagonista de Bcl2, do inglês: BH3 Interacting Domain Death Agonist
Bik	Proteína Reguladora pró-apoptótica Antagonista de Bcl2, do inglês: Bcl2 Interacting Killer
CCNS	Ciclo Celular Não-Específico
CCS	Ciclo Celular Específico
CDK	Quinase Dependente de Ciclina
CKI	Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina
DISC	Complexo de Sinalizador Indutor de Morte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DR	Receptor de Morte
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético

ENDO G	Endonuclease G
FADD	Proteína com Domínio de Morte Associado ao Fas
FASL	Ligante da proteína FAS
FDA	Administração de Alimentos e Drogas (do inglês: " <i>Food and Drug Administration</i> ")
IAPs	Proteínas inibidoras de apoptose
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% das células
ID	Índice de Dano
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IS	Índice de Seletividade
MOMP	Permeabilização da membrana mitocondrial externa
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino (do inglês: " <i>Phosphate buffered saline</i> ")
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PS	Fosfatidilserina
RNase A	Ribonuclease A
RIP1	Proteína de Interação com Receptor 1
RIP3	Proteína de Interação com Receptor 3
RT PCR	Reação em Cadeia da Polimerase por <i>transcriptase reversa</i>
SPM	Sarcoma de Partes Mole
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alpha
TNFR1	Receptor de TNF- α do Sub-Tipo 1
TRAIL	Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Câncer	21
1.2. Sarcomas	22
1.3. Quimioterapia Antineoplásica	25
1.4. Ciclo Celular e Quimioterápicos	26
1.5. Tipos de Morte Celular	29
1.6. Apoptose	33
1.7. Complexos Metálicos e Atividade Antitumoral	40
1.8. Compostos de Rutênio e Atividade Antitumoral	42
1.9. Complexos de Rutênio (II) e Seus Diferentes Ligantes	46
2. JUSTIFICATIVA	49
3. OBJETIVOS	51
3.1. Objetivo Geral	51
3.2. Objetivos Específicos	51
4. METODOLOGIA	52
4.1. Síntese dos Complexos de Rutênio	52
4.2. Linhagens Celulares Tumorais e Normais	53
4.3. Ensaio de Viabilidade Celular pelo Método Redução do MTT	53
4.4. Índice de Seletividade	54
4.5. Análise da Cinética do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo	55
4.6. Ensaio da exposição de Anexina V-FITC/Iodeto de Propídio	55
4.7. Ensaio do Potencial de Membrana Mitocondrial pela marcação JC-1	56
4.8. Análise da Atividade de Caspase 3 por Citometria de Fluxo	58
4.9. Análise da Atividade de Bcl2 por Citometria de Fluxo	58
4.10. Análise da Atividade de Caspases 8 e 9 pelo Ensaio Colorimétrico	59
4.11. Avaliação da Expressão Gênica	59
4.11.1 Extração RNA	59
4.11.2. Síntese de cDNA	60

4.11.3 <i>Real Time</i> PCR (qPCR)	60
4.12. Avaliação Genotóxica: Teste Cometa	62
4.13. Análise Estatística.....	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1. Efeito da Viabilidade dos Complexos de Rutênio (II) Sobre Linhagens Tumorais e Normais – Valores de IC ₅₀ e IS	64
5.2. Os Complexos de Ru 05 e Ru 08 Desencadeiam Parada na Fase G0/G1 do Ciclo Celular	68
5.4. Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial das Células Tratadas com Complexos de Ru 05 e Ru 08.....	76
5.5. Avaliação da Presença ou Ausência da Proteína Caspase 3 Ativa em Células Tratadas com os Complexos de Ru 05 e Ru 08 por Citometria de Fluxo.....	79
5.6. Avaliação da Presença ou Ausência da Proteína Bcl2 em Células Tratadas com os Complexos de Rutênio 05 e 08 por Citometria de Fluxo.....	81
5.7. Atividade de Caspases 8 e 9 nos Tratamentos com os complexos de Ru 05 e Ru 08.....	83
5.8. Análise da Expressão de Genes Envolvidos na Morte Celular.....	83
5.9. Teste Cometa.....	91
6. CONCLUSÕES	94
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	96
8. REFERÊNCIAS.....	98
APÊNDICE A	108
APÊNDICE B.....	109

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

A palavra câncer possui origem latina (Cancer) que significa “caranguejo”, a qual deve ter sido empregada em analogia ao modo de crescimento infiltrante, que pode ser comparado às pernas do crustáceo, que as introduz na areia ou lama para se fixar e dificultar sua remoção (DE ALMEIDA, 2005).

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. É o resultado de acumulação de mutações genéticas e alterações epigenéticas de genes que regulam a proliferação e morte celular, levando então a um crescimento descontrolado das células. O crescimento excessivo e autônomo das células acarreta a formação de massas anormais de tecido, denominadas de tumores, exercendo um efeito extremamente lesivo sobre a saúde, o que pode acarretar a morte do hospedeiro (PELTOMAKI, 2012; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

O balanço entre a taxa de proliferação e de morte celular programada determina a taxa de crescimento do tumor e a alteração entre esses dois fatores que pode ser o elemento chave para a expansão descontrolada de tumores malignos e posteriormente, sua capacidade de invasão em outros tecidos (MESTER e REDEUILH, 2008).

Metástase corresponde à migração das células tumorais do sítio de origem para outros órgãos e tecidos do corpo. Estudos demonstram que as células troncos tumorais são responsáveis por esse processo, sendo uma subpopulação de células presentes no interior do tumor, que apresentam a capacidade de sofrer ciclos repetidos de divisão, podendo migrar para locais distantes do corpo e colonizar outros órgãos (SAMPIERI e FODDE, 2012; LI *et al.*, 2007)

As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções que as suas correspondentes normais. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções. Segundo Hannahan e Weinbeirg (2011), estudos realizados têm demonstrado que tumores malignos funcionam como órgão, cuja complexidade se aproxima e pode até exceder o tamanho dos tecidos saudáveis normais. Quando visto a partir desta perspectiva, a

biologia de um tumor pode apenas ser entendida através do estudo dos tipos de células especializadas individuais dentro dele, bem como o microambiente estromal que é construído durante o curso das várias etapas da tumorigênese (INCA, 2011).

Existem mais de 100 tipos de cânceres, de acordo com o tipo de célula, tecido ou órgão em que ocorrem. Nos países desenvolvidos predominam os casos de câncer de pulmão, mama, próstata e cólon. Já nos países em desenvolvimento destaca-se a ocorrência do câncer de estômago, fígado, cavidade oral e colo de útero. (INCA, 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que em 2030, pode-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. No Brasil, as estimativas para o ano de 2014, mostram a magnitude do problema de câncer no país, apontando a ocorrência de aproximadamente 576.000 novos casos de câncer. No estado de Goiás a estimativa de 2013 previa 18.400 novos casos de câncer para esse ano (Tabela 1) (INCA 2011;INCA, 2014).

1.2. Sarcomas

Sarcomas constituem um grupo heterogêneo de tumores sólidos raros com origem nas células mesenquimais com características clínicas e patológicas distintas. Os sarcomas podem iniciar em qualquer parte do corpo, tal como nos ossos ou em tecidos moles (incluindo gordura, músculo, nervo, bainha dos nervos, vasos sanguíneos, e outros tecidos conjuntivos). Cerca de 60% dos sarcomas de tecidos moles começam no braço ou na perna, 30% têm início no tronco ou no abdômen e 10 % ocorrem na cabeça ou no pescoço (DEMETRI *et al.*, 2010; Cancer.Net Editorial Board, 2013).

As crianças e os adultos podem desenvolver sarcoma, mas é rara a incidência em adultos, representando cerca de 1% de todos os cânceres em adultos. No entanto, os sarcomas representam cerca de 15% de todos os cânceres em crianças (Cancer.Net Editorial Board, 2013).

Tabela 1: Estimativas para o ano de 2012/2013 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer no Brasil, segundo sexo e localização primária.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	60.180	62,54	15.660	75,26	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	52.680	52,50	18.160	78,02
Colo do Útero	-	-	-	-	17.540	17,49	5.050	21,72
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	17,90	4.520	21,85	10.110	10,08	3.060	13,31
Côlon e Reto	14.180	14,75	4.860	23,24	15.960	15,94	5.850	25,27
Estômago	12.670	13,20	3.200	15,34	7.420	7,42	2.170	9,47
Cavidade Oral	9.990	10,41	2.760	13,34	4.180	4,18	1.130	4,92
Laringe	6.110	6,31	1.540	7,56	-	-	-	-
Bexiga	6.210	6,49	1.900	9,28	2.690	2,71	880	3,72
Esôfago	7.770	8,10	1.500	7,26	2.650	2,67	520	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.190	6,17	2.220	9,53
Linfoma não Hodgkin	5.190	5,40	1.560	7,66	4.450	4,44	1.560	6,85
Glândula Tireoide	-	-	-	-	10.590	10,59	3.490	14,97
Sistema Nervoso Central	4.820	5,02	1.190	5,82	4.450	4,46	1.200	5,23
Leucemias	4.570	4,76	1.180	5,81	3.940	3,94	1.180	5,02
Corpo do Útero	-	-	-	-	4.520	4,53	1.700	7,39
Pele Melanoma	3.170	3,29	810	4,05	3.060	3,09	790	3,46
Outras Localizações	43.120	44,80	11.100	53,33	38.720	38,61	10.320	44,50
Subtotal	195.190	202,85	51.780	248,60	189.150	188,58	59.280	254,86
Todas as Neoplasias	257.870	267,99	66.400	318,79	260.640	259,86	75.180	323,22

Fonte: INCA, (2011)

Os sarcomas têm sua maior incidência entre crianças e adolescentes. É o segundo câncer mais frequente nesse grupo, superado apenas pelos hematológicos (leucemias e linfomas). Como atinge, principalmente, quem está em crescimento, acredita-se que seja causado por falhas no processo de multiplicação das células nessa fase da vida. Os tipos mais comuns em crianças e adolescentes são o osteossarcoma, o sarcoma de Ewing (ambos quase que exclusivos dessa faixa etária) e o condrossarcoma, que atinge tanto crianças quanto adultos (PETRILLI, *et al.*, 2006; HENDERSON, *et al.*, 2012).

Sarcomas de partes moles (SPM) são um grupo de cânceres que começam nos tecidos que suportam e conectam o corpo, como as células de gordura, músculos, nervos, tendões, o revestimento das articulações, vasos sanguíneos e vasos linfáticos. Como resultado, os SPM podem ocorrer em qualquer lugar do corpo. Quando um SPM é pequeno, ele pode passar despercebido, já que ele não costuma causar problemas logo no início. No entanto, quando um SPM cresce, ele pode interferir com as atividades normais do corpo (Cancer.Net Editorial Board, 2013).

No ano de 2013, cerca de 11.410 pessoas (6.290 homens e 5.120 mulheres) foram diagnosticadas com sarcoma de partes moles nos Estados Unidos. Estimou-se que 4.390 adultos e crianças (2.500 homens e 1.890 mulheres) deveriam morrer da doença no ano. (Cancer.Net Editorial Board, 2013).

Na tentativa de evitar que o câncer se espalhe, existem três tipos principais de tratamento: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, porém, outras modalidades como terapia alvo dirigido e hormonoterapia também vem sendo bastante utilizadas na clínica (KUMMAR *et al.* 2008; INCA, 2011). Tem-se utilizado também a terapia combinada, em que várias modalidades terapêuticas são utilizadas em associação, visando à obtenção de melhores resultados. Os objetivos da terapia antineoplásica são: proporcionar a cura, prolongar a vida ativa e melhorar a qualidade de vida dos pacientes portadores da doença (INCA, 2011).

A evolução dos sarcomas de partes moles pode ser predita por alguns fatores prognósticos bem definidos, como o grau, o tipo histológico, o tamanho do tumor, a presença de metástases linfonodais ou a distância para a composição dos estágios. Além destes fatores, a presença de margens cirúrgicas comprometidas estão relacionadas com um pior prognóstico (Cancer.Net Editorial Board, 2013). Se o sarcoma é diagnosticado em um estágio inicial e não se espalhou a partir de onde começou, o tratamento é eficaz e muitas pessoas podem ser curadas. Por outro lado, se o sarcoma se espalhou para outras partes do corpo, o tratamento geralmente pode controlar o tumor, mas não é curável (KELLER *et al.*, 1998; STOJADINOVIC *et al.*, 2002; Cancer.Net Editorial Board, 2013).

A cirurgia é o primeiro tratamento para os sarcomas que são menores e em locais específicos. Se o tumor não pode ser removido por cirurgia, pode ser possível

controlar o seu crescimento com radioterapia. Para um tumor que pode ser removido cirurgicamente, radioterapia e / ou quimioterapia pode ser administrada antes ou após a cirurgia para reduzir o risco de recorrência. A quimioterapia e a terapia de radiação podem também ser usadas para reduzir o tamanho do sarcoma ou aliviar a dor de outros sintomas (Cancer.Net Editorial Board, 2013).

As antraciclina e ifosfamida foram estabelecidos como os fármacos mais ativos, apesar de não serem específicos para o tratamento de pacientes com sarcomas de tecidos moles avançados, na maioria dos subtipos histológicos, com a exceção de tumores estromais gastrintestinais. No entanto, após o fracasso destes fármacos, os pacientes com sarcomas de tecidos moles avançados têm poucas opções de tratamento. Portanto, a limitação de opções terapêuticas atuais para estes tumores tem solicitado o desenvolvimento e avaliação de um grande número de novos agentes quimioterápicos e biológicos para o seu tratamento (MILANO *et al.*, 2006).

1.3. Quimioterapia Antineoplásica

Apesar do objetivo primário da quimioterapia ser a destruição das células neoplásicas, preservando as normais, os agentes quimioterápicos, na maioria das vezes, atuam de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto as normais. Isso explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções. A maioria dos agentes antineoplásicos não possui especificidade, ou seja, não consegue destruir, seletiva e exclusivamente, as células tumorais. Sendo assim, em geral são tóxicos aos tecidos de rápida proliferação, caracterizados por ter uma alta atividade mitótica e curtos ciclos celulares (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

Existe uma classificação para os tipos de quimioterápicos no tratamento do câncer (Figura 1): (1) agentes alquilantes (mostardas nitrogenadas, alquisulfonatos e triazenos), que atuam por meio da formação de ligações covalentes com moléculas orgânicas como o DNA, impedindo sua replicação; (2) antimetabólicos (análogos às purinas, análogos às pirimidinas), que interferem em diversos processos bloqueando as vias metabólicas normais envolvidas na síntese de DNA; (3) medicamentos obtidos por

produção natural ou alcalóides; (4) hormônios, dos quais os mais importantes são os esteróides e fármacos que suprimem a secreção de hormônios ou antagonizam sua ação; (5) terapia alvo dirigido; (6) antibióticos (antraciclinas, mitoxantrona, mitomicina c) atuam através da intercalação entre bases específicas do DNA, bloqueando a síntese de DNA, RNA ou de ambos; (7) inibidores mitóticos, que agem inibindo etapas de divisão do ciclo celular, através de inibição do fuso celular e inibição de topoisomerasas; (8) outros agentes, com mecanismos de ação que não permitem a inclusão nos grupos apresentados, por exemplo, a dacarbazina, indicada no tratamento do melanoma avançado, sarcomas de partes moles e linfomas (CHU e SARTORELLI, 2006; INCA, 2011).

1.4. Ciclo Celular e Quimioterápicos

Existem diversos mecanismos que estão envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna, mas a maior parte deles interferem na divisão celular e, assim, o conhecimento do ciclo celular ou dos seus mecanismos é importante para que haja a compreensão da etiologia do câncer (HAHN e WEINBERG, 2002).

As células eucarióticas são capazes de sofrer ciclos de divisão dando origem as células-filhas idênticas. O conjunto ordenado de eventos que caracterizam o ciclo de divisão celular é dividido em duas fases: a interfase, período no qual as células multiplicam seu material genético e sintetizam produtos necessários para sua divisão e a mitose, que constitui a divisão celular propriamente dita. O mecanismo de divisão celular é um evento precisamente controlado e dividido em quatro fases: intervalo G1, fase S ou de síntese do DNA, intervalo G2, mitose (fase M) (GARRETT, 2001).

Essas fases do ciclo celular se dividem em duas funcionais e duas preparatórias. As fases funcionais são a fase S, com síntese do DNA, e a fase M, ou mitose, com segregação dos cromossomos duplicados. As fases preparatórias são a G1 (gap 1) que prepara a célula bioquimicamente para a fase S, com a produção de fatores de crescimento celular que são essenciais para formação de uma nova célula e G2 (gap 2), onde ocorre a síntese de componentes para a mitose. As células que não se

dividem ativamente podem ser permanentemente removidas do ciclo por diferenciação, ou ficar temporariamente presas em um estado inerte, chamado de fase G₀, em que o DNA apresenta-se super enovelado com atividade nuclear baixa (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

A passagem sequencial de uma fase para outra, ocorre apenas após os rigorosos mecanismos reguladores serem ativados em pontos estratégicos do ciclo, chamados de “pontos de checagem” ou “*checkpoints*”. Esses pontos de checagem ocorrem predominantemente em G₁, na transição G₁/S, na transição G₂/M e na mitose, na transição metáfase/anáfase. Pontos de checagem do ciclo celular podem interromper o ciclo se determinados eventos não se completarem. O avanço através de G₁ e G₂ também pode ser atrasado pelos mecanismos de frenagem se o DNA no cromossomo estiver danificado. O atraso nestes pontos de checagem devido a um dano no DNA fornece tempo para o DNA danificado ser reparado, então a frenagem do mecanismo é liberada e o ciclo celular é retomado, ou se necessário a célula desencadeia o processo de apoptose (GALLORINI *et al.*, 2012).

A regulação nesses pontos de checagem é exercida por diversas moléculas, dentre as quais se destacam as ciclinas, as proteínas quinase dependentes de ciclinas (CDK) e os inibidores das Quinase-Ciclina conhecidas como CKIs (Inibidores de Quinase-Ciclina). A família das CDKs são as principais reguladoras do ciclo, mantendo as células em divisão ou levando-as a morte celular por apoptose, caso as condições não sejam favoráveis (MALUMBRES e BARBACID, 2005). As quinases são enzimas cuja atividade catalítica depende da sua interação com as ciclinas, que são proteínas reguladoras cujos níveis variam de acordo com o estágio do ciclo. Complexos ciclinas - CDKs diferentes atuam em estágios específicos do ciclo celular. As funções das CDK são contrabalanceadas pela atividade dos CKIs, que incluem os inibidores universais P21, P27, e P57 que atuam em vários períodos do ciclo celular, prevenindo ou limitando a fosforilação dos substratos-alvo pelas CDKs. A falha de uma ciclina ou a mutação de alguma das proteínas envolvidas nessa regulação pode levar ao surgimento de tumores (MALUMBRES e BARBACID, 2005; GALLORINI *et al.*, 2012).

Outro componente envolvido no ponto de checagem e no reparo de erros no DNA é o fator de transcrição Tp53. O dano ao DNA induzido nas células em

proliferação resulta na ativação do ponto de checagem de reparo, a partir do qual ocorre a parada do ciclo celular e o recrutamento da maquinaria de reparo, evitando assim que uma informação genética incorreta seja transmitida para as células-filha (NIIDA e NAKANISHI, 2006; MEEK, 2009).

A progressão desregulada do ciclo celular tem sido considerada como a marca da proliferação do câncer e, por isso, é um objetivo para o desenvolvimento de fármacos antineoplásicos que possam atuar no ciclo celular “contornando” essa proliferação desregulada das células (RATHOS *et al.*, 2002).

Importantes classes de quimioterápicos antineoplásicos atuam durante o ciclo celular. Estes apresentam mecanismos de ação variados e exibem especificidade em termos da fase do ciclo em que têm atividade. Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos (CCS) (Tabela 2). Um segundo grupo de agentes, denominados fármacos ciclo-celular não específicos (CCNS), tem a capacidade de exterminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G0 (Tabela 2) (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

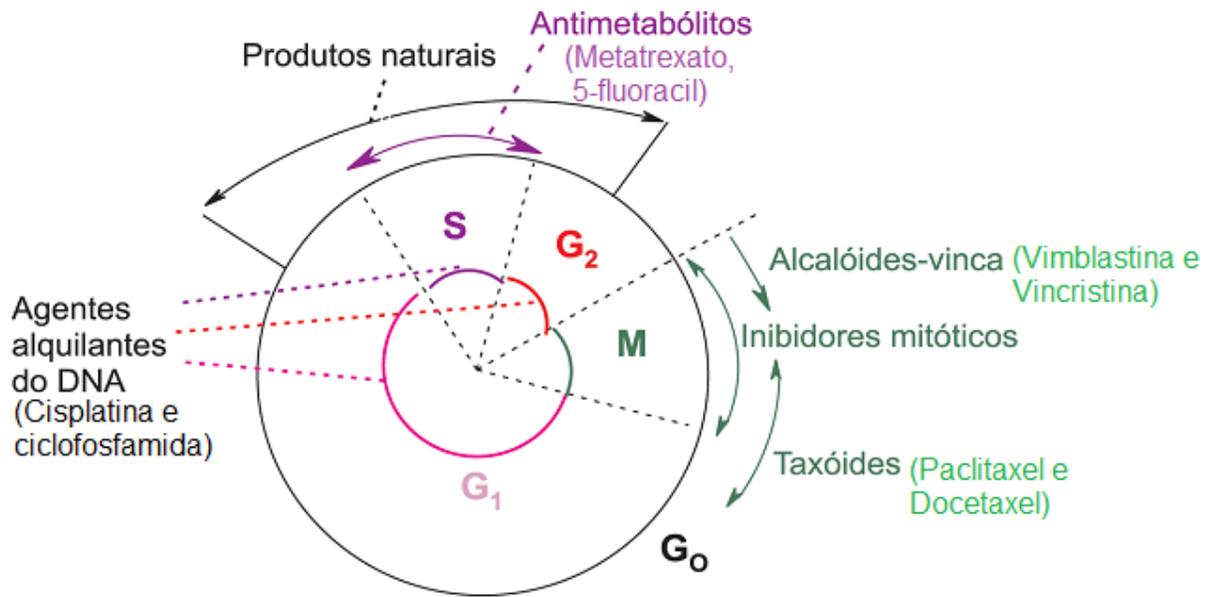
Tabela 2: Relações entre ciclo celular e principais classes de agentes antineoplásicos.

1. Agentes ciclo-celular específico (CCS, “Cell Cycle-Specific”)	2. Agentes ciclo-celular não específicos (CCNS, “Cell Cycle-NonSpecific”)
1.1. Agentes Antimetabólicos	2.1. Produtos Naturais
1.1.a. Análogo do ácido fólico	2.1.a. Antibióticos naturais
1.1.b. Antagonistas das pirimidinas	2.1.a.1. Antraciclinas
1.1.c. Análogos das purinas e inibidores correlatos	2.1.a.2. Mitomicina
1.2. Agentes Hormonais	2.1.a.3. Dactinomicina
1.2.a. Adrenocorticosteróides	2.1.a.4. Plicamicina
1.2.b. Progestinas	2.1.a.5. Bleomicina
1.2.c. Estrogênios	2.1.2.b. Alcaloides Pirrolizidinico
1.2.d. Androgênios	2.2. Complexos de coordenação de Platina
1.2.e. Antiestrogênico	2.2.a. Cisplatina (cis-DDP)
1.2.f. Antiandrogênio	2.2.b. Carboplatina (CBDCA)
1.2.g. Análogo do hormônio liberador de gonadotropina	2.3. Agentes alquilantes diversos
1.2.h. Inibidor de aromatase	2.3.a. Mostardas nitrogenadas
1.2.i. Inibidor do hormônio peptídico	2.3.b. Nitrossuréias
1.3. Produtos Naturais	2.3.c. Triazenos
1.3.a. Alcaloides vegetais	2.3.d. Alquil sulfonatos
1.3.a.1. Alcaloides da Virca	
1.3.a.2. Podofilotoxinas	
1.3.a.3. Paclitaxel (Taxol)	
1.3.b. Enzimas	

Fonte: De Almeida *et al.* (2005).

Na figura 1, observa-se a correlação das classes de quimioterápicos ciclo-específicos mais comuns e a fase do ciclo que atuam. Como já mencionado, em geral, esses quimioterápicos induzem alterações no DNA celular e acabam por determinar a parada do ciclo em momentos pré-determinados, seguida de morte celular por apoptose (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

Figura 1: Atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, dependendo da fase do ciclo célula.



Fonte: Adaptada De Almeida *et al.* (2005).

1.5. Tipos de Morte Celular

O organismo humano possui mais de 10 trilhões de células próprias originadas a partir do zigoto. Para se manter homeostático, milhares de células morrem todos os dias e são eliminadas do organismo, sendo substituídas por células jovens e saudáveis. Para isso, diferentes mecanismos endógenos de controle de proliferação e morte celular estão envolvidos no desenvolvimento embrionário e na manutenção desta

homeostase, sendo controladas de maneira tempo e intensidade específica ao longo da vida (CAMPISI e DI FAGAGNA, 2007).

Diversos tipos de morte celular têm sido descritas. A morte celular pode ser classificada de acordo com a aparência morfológica do processo letal, critérios enzimáticos (envolvendo caspases, nucleases, catepsinas), aspectos funcionais (programada ou acidental, fisiológica ou patológica) ou características imunológicas (imunogênicas ou não imunogênicas). Dentre os tipos mais estudados de morte celular encontram-se a necrose, apoptose, morte celular autofágica, catástrofe mitótica e outras modalidades vem sendo propostas como novas modalidades de morte celular: anóiques, entose e piroptose (DEBNATH *et al.*, 2005; CAMPISI e DI FAGAGNA, 2007; GALLUZZI *et al.*, 2012).

A necrose demonstra comprometimento bioenergético, degradação aleatória do DNA e desencadeia a liberação de fatores envolvidos na estimulação da resposta imune ou ativa o sistema de reparo de feridas e lesões. Todos estes eventos resultam em perda de função homeostática. A necrose, diferentemente da apoptose, impede a reposição celular e a regeneração de tecidos (ZONG e THOMPSON, 2006).

Durante muito tempo, a morte celular por necrose foi considerada como um mecanismo de morte acidental das células e foi definida pela ausência de características morfológicas da apoptose ou autofagia. A morte celular por necrose não era considerada a via desejada pelos medicamentos antitumorais, por não ser um processo específico para as células cancerígenas, havendo ainda a promoção de processo inflamatório intenso (ZONG e THOMPSON, 2006). No entanto, estudos recentes têm demonstrado que a necrose pode ocorrer de maneira regulada através de um mecanismo chamado “necroptose” e que a morte celular necrótica tem um importante papel em processos fisiológicos e patológicos. Vários agentes tais como, agentes alquilantes do DNA, ecotoxinas e a ligação de receptores de morte (em algumas circunstâncias) podem induzir morte necrótica regulada (GALLUZZI *et al.*, 2012).

“Necroptose” é um termo que tem sido utilizado como um sinônimo de necrose regulada. A ativação da necroptose se dá por meio de receptores de morte comuns à apoptose, como TNFR1 (receptor de TNF- α do subtipo 1), e é desencadeada pela

atividade das quinases RIP1 (proteína de interação com o receptor 1) e RIP3 (proteína de interação com o receptor 3). O estudo da necroptose pode proporcionar oportunidade para se destruir tumores resistentes a apoptose. Contudo os eventos que deflagram tais vias de morte ainda precisam ser melhores esclarecidos (GALLUZZI *et al.*, 2012).

A autofagia (*auto*= próprio + *fagia*=comer/alimentar-se) é um processo catabólico conservado evolutivamente que visa a degradação e reciclagem de componentes celulares. Este processo envolve a constituição de vesículas compostas por uma membrana dupla, contendo componentes celulares que se ligam aos lisossomos, formando os autofagolisossomos. Neste local, há degradação dos componentes intravesiculares, resultando em diversos produtos que podem ser reutilizados pelas células (BAEHRECKE, 2005).

Desta maneira, a autofagia atua como um mecanismo pró-sobrevivência, principalmente em condições adversas, como depleção de nutrientes e oxigênio. Entretanto, este processo tem um caráter autolimitante e pode acabar resultando em morte celular autofágica quando altos níveis de intensidade ou duração deste processo ocorrerem (LEVINE e YUAN, 2005).

Embora a expressão “morte celular autofágica” originalmente não implica qualquer consideração funcional, os cientistas atualmente têm utilizado o termo para sugerir que a autofagia seria realmente a execução da célula à morte. Isto aplica-se em duas configurações muito distintas. Primeiro, a autofagia demonstrou mediar morte celular fisiológica *in vivo*, durante o programa de desenvolvimento de *Drosophila melanogaster*. Em segundo, a autofagia parece ser responsável pela morte de algumas células cancerosas (especialmente quando falta moduladores apoptóticos essenciais como Bax, Bak ou Caspases) que respondem a um painel selecionado de agentes quimioterápicos *in vitro*. No entanto, na maioria dos casos conhecidos, a autofagia constitui uma resposta citoprotetora ativada por células que morrem na tentativa de lidar com estresse, e sua inibição acelera, em vez de prevenir a morte celular (GALLUZZI, 2012).

Ocasionalmente empregava-se o termo “catástrofe mitótica” restritivamente para morte celular que ocorre em mitose (VAKIFAHMETOGLU *et al.*, 2008). Mais

frequentemente, refere-se a casos de morte celular desencadeada por mitose anormal e executada durante a mitose ou na interfase subsequente. Pode ser causada por estresse químico ou físico, como radiação ionizante, drogas estabilizadoras de microtúbulos e drogas anticâncer que causam defeito nos pontos de checagem do ciclo celular. Exibe algumas características como: a formação de envelope nuclear ao redor dos grupos de cromossomos mal-agregados, incompleta síntese de DNA, a condensação prematura dos cromossomos e o aumento do tamanho celular (VAKIFAHMETOGLU *et al.*, 2008; GALLUZZI *et al.*, 2012).

A catástrofe mitótica não constituiria uma via executora de morte celular "propriamente dita", mas um mecanismo oncosupressor que: (i) é iniciada por perturbações do aparelho mitótico (por exemplo, cromossomos e da maquinaria complexa, que asseguram a sua segregação exata), (ii) é iniciado durante a fase M do ciclo celular, (iii) é paralelo por algum grau de paralisação da mitose, e (iv), em última análise, um gatilho para morte celular ou senescência (GALLUZZI *et al.*, 2012).

Galluzzi *et al.* (2012) relata outros tipos de morte descritas recentemente:

- Anoiques: modalidade de morte celular descrita para a resposta apoptótica de células aderentes devido à ausência da matriz celular. Deve-se notar que a maioria, se não todos, dos casos de morte celular anoiques, é executado pela maquinaria molecular de via intrínseca de apoptose;
- Entose: mecanismo de morte celular onde há "Célula-em-células" - fenótipo que é frequentemente exibido por células nonofagocítica em amostras clínicas de tumores. Algumas características são observadas neste tipo de morte: em primeiro lugar, as células englobadas nunca devem sair do fagossomo e devem ser degradadas no lisossoma; em segundo lugar, o fenótipo de "célula-em-célula" deve surgir a partir de interações homotípicas e não deve envolver fagócitos; em terceiro lugar, o processo não deve ser sensível às intervenções químicas e genéticas que normalmente bloqueiam a apoptose intrínseca dependente e independente de caspase;
- Piroptose: termo introduzido em 2000 por Brennan e Cookson para descrever um tipo de morte peculiar de macrófagos funcionalmente infectados com *Salmonella typhimurium* (GALLUZZI *et al.*, 2012).

- Parthanatos: esse termo foi introduzido para indicar um modo de morte celular particular envolvendo enzimas sensível ao dano no DNA, a poli (ADP-ribose) polimerases (PARPs), e em particular PARP1, que sozinha é responsável por mais de 90% da atividade celular de PARP. Constitue uma via de morte independente de caspase e possivelmente representa junto com a necroptose um caso particular de necrose regulada.
- Netoses: pode ser definida como um sub-grupo de morte celular que é restrito a células granulocíticas, insensível e talvez dependente de inibição de caspase e dependente da maquinaria autofágica. Esse tipo de morte parece compartilhar características bioquímicas tanto com a morte celular autofágica e necrose regulada.

1.6. Apoptose

Apoptose é um tipo de morte celular que ocorre por um processo coordenado e depende de energia. Envolve uma complexa cascata de eventos que tem início com o estímulo e termina com a morte celular (ELMORE, 2007). Os fatores desencadeadores desse mecanismo envolvem estímulos e condições diversas, tanto fisiológicas quanto patológicas. É considerada crítica para a autodestruição celular e para uma variedade de processos, tais como o desenvolvimento ou a prevenção da transformação oncogênica (GREENWOOD *et al.*, 2011).

A apoptose é um mecanismo essencial para o desenvolvimento embrionário, funcionamento do sistema imunológico e manutenção da homeostase dos tecidos nos organismos multicelulares. No processo apoptótico, ocorre uma sequência de eventos morfológicos e atuação de um programa interno bioquímico de suicídio. Pode ser considerado um mecanismo de autodefesa, destruindo células infectadas com patógenos ou aquelas que sofreram mutações. Neste caso, uma cascata de eventos moleculares detecta e destrói estas células ativando a via apoptótica, prevenindo, portanto, o desenvolvimento do câncer (FANELLI *et al.*, 2012).

Existem algumas características que definem a apoptose: alterações no citoesqueleto que induzem contração celular; fragmentação do DNA; condensação da

cromatina levando a aparência de núcleos picnóticos; formação de bolhas na membrana plasmática seguida por separação de fragmentos de células em corpos apoptóticos ligados à membrana (LIAO *et al.*, 2005). Os corpos apoptóticos são compostos de citoplasma e organelas bem compactadas, com ou sem a presença de fragmentos nucleares e são subseqüentemente fagocitados por macrófagos e degradados nos lisossomos (YASUHARA *et al.*, 2003). As células saudáveis adjacentes migram e proliferam para substituir o espaço da célula apoptótica eliminada, não há essencialmente nenhuma reação inflamatória associada a este processo (LAVIN, 1993; ELMORE, 2007).

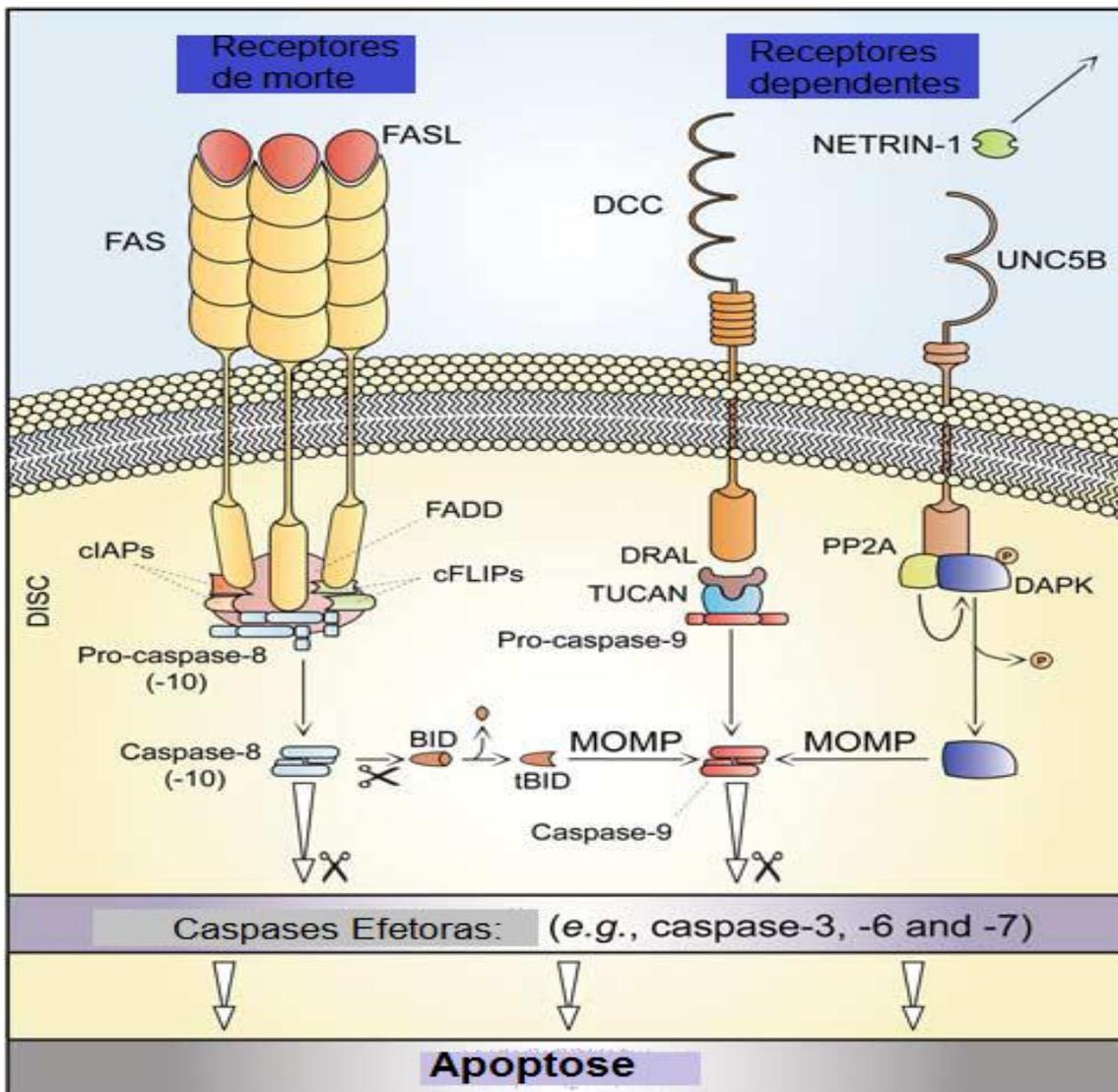
O processo da apoptose divide-se em três fases: a fase de iniciação, a efetora e a de degradação. A fase de iniciação é caracterizada por depender do tipo de estímulo apoptótico recebido pela célula por via intrínseca ou via extrínseca. A primeira fase influencia a eficácia das fases subseqüentes (efetora e de degradação). Na fase efetora, ocorre a ativação da cascata de caspases, constituída da ativação de proteases, nucleases, e de outros intermediários que participam dessa fase. E na fase de degradação, a célula adquire as características bioquímicas e morfológicas características desse processo (GREEN e KROEMER, 1998).

A maior parte desse processo é executada por proteínas caspases (proteases cisteíno-aspárticas) ativadas em uma cascata coordenada de clivagens das formas pré-ativas para formas ativadas, entretanto, o processo de apoptose pode ocorrer de forma independente de caspases. Entre as caspases existem moléculas iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e outras executoras (caspases 3, 6 e 7) do processo, as quais realizam a proteólise de componentes celulares que acabam levando as alterações típicas de apoptose (ELMORE, 2007).

A apoptose pode ser desencadeada por duas vias principais, a via intrínseca (ou mitocondrial) e a via extrínseca ou mediada por receptor de morte (GALLUZZI *et al.*, 2012).

O termo "apoptose extrínseca" tem sido amplamente utilizada para indicar os casos de morte celular por apoptose induzidos pelos sinais de estresse extracelulares, que ativam os receptores de superfície celular e propagam-se através da membrana celular (Figura 2).

Figura 2: Via de sinalização de receptores de morte e receptores dependentes durante a apoptose via extrínseca.



Via apoptose extrínseca apresentada em três grandes cascatas de sinalização letais: (i) a sinalização do receptor de morte e ativação da Caspase-8 (ou -10) – cascata de Caspase-3, (ii) sinalização de receptor de morte e a ativação da Caspase-8 - tBID - MOMP - Caspase-9 - via Caspase-3, ou (iii) receptor dependente induzida por privação do ligante, seguida de sinalização (direta ou dependente de MOMP), ativação de Caspase-9 – cascata de Caspase-3. Fonte: Galluzzi *et al.* (2012).

A apoptose via extrínseca pode ser iniciada pela ligação de ligantes de morte, como o Fas/CD95 (Ligante de Receptor de Morte Celular), o TNF- α (Fator de Necrose Tumoral *alpha*), o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) nos

receptores de morte celular presentes na superfície celular, que pertencem a família dos receptores do TNF, incluindo o FasL/CD95, o TRAILR1 e 2 Ligante Indutor de Apoptose relacionado ao TNF (TRAILR1 e 2) e o TNF-R1 (Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral), todos contém um domínio de morte citoplasmático que desempenham um papel de extrema importância na transmissão do sinal pro-apoptótico (KUMAR, 2007, FULDA, 2009, GALLUZZI *et al.*, 2012). As proteína com domínio de morte associada ao Fas (FADD) liga-se a procaspase 8 e/ou procaspase 10 que resulta na formação do complexo de sinalização de indução de morte denominado (DISC), que culmina na autocatálise das procaspases que se tornam nesse momento em caspases iniciadoras. A ativação proteolítica sequencial dessas caspases iniciadoras, culmina na ativação de caspases efetoras 3, 6 e 7 que estão no citoplasma, induzindo diretamente a próxima fase do processo apoptótico, a execução. (HAJRA e LIU, 2004; KUMMAR, 2008, GALLUZZI *et al.*, 2012).

Alternativamente, um sinal pró- apoptótico extrínseco pode ser desencadeado pelos chamados "receptores de dependência" (Figura 2), incluindo o netrin 1 (por exemplo, UNC5A -D e deletadores de carcinoma colorctal - DCC) , que apenas exercem funções letais quando a concentração dos seus ligantes específicos se situa em um nível crítico (GALLUZZI *et al.*, 2012).

Uma interação entre as vias extrínseca e mitocondrial ocorre em diferentes níveis. Em alguns tipos de células conhecidas como células de tipo I (linfócitos), a ativação de caspase 8 é suficiente para ativar diretamente as caspases efetoras 3 e 7, para completar a execução da apoptose de uma maneira independente da via mitocondrial. Já em células como hepatócitos e células pancreáticas β (células de tipo II), caspase-8 medeia a clivagem proteolítica de Bid (Domínio de Morte de Interação com BH3) que leva a geração da permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP) e conseqüentemente ativação da via intrínseca ou mitocondrial. Apoptose extrínseca pode ser ativada pelos receptores dependentes, como o DCC ou UNC5B, que transmitem sinais de morte na ausência do seu ligante netrin 1, ativando diretamente a Caspase 9 (GALLUZZI *et al.*, 2012) (Figura 2).

A via intrínseca ou mitocondrial pode ser ativada por vários estímulos incluindo hipóxia, espécies reativas de oxigênio, irradiação ultravioleta ou gama, privação de

nascimento da fatores de crescimento, sinais de estresse e vários compostos citotóxicos capazes de alterar a homeostase da mitocôndria. Múltiplos sensores, incluindo proteínas com domínio BH3 e a proteína Tp53, reagem a esses estímulos causando alterações na membrana interna desta organela, com transição da permeabilidade e abertura de poros, além de perda do potencial transmembrânico e liberação de proteínas apoptogênicas, como: o citocromo c, o AIF (Fator de Indução de Apoptose), a proteína Smac/DIABLO (segundo ativador de caspase derivado de mitocôndria/proteína de ligação-IAP direta com baixo ph) e o Omi/HtrA2 ou endonuclease G (SAELENS *et al.*, 2004; FULDA e DEBATIN, 2006; BELIZÁRIO *et al.*, 2007).

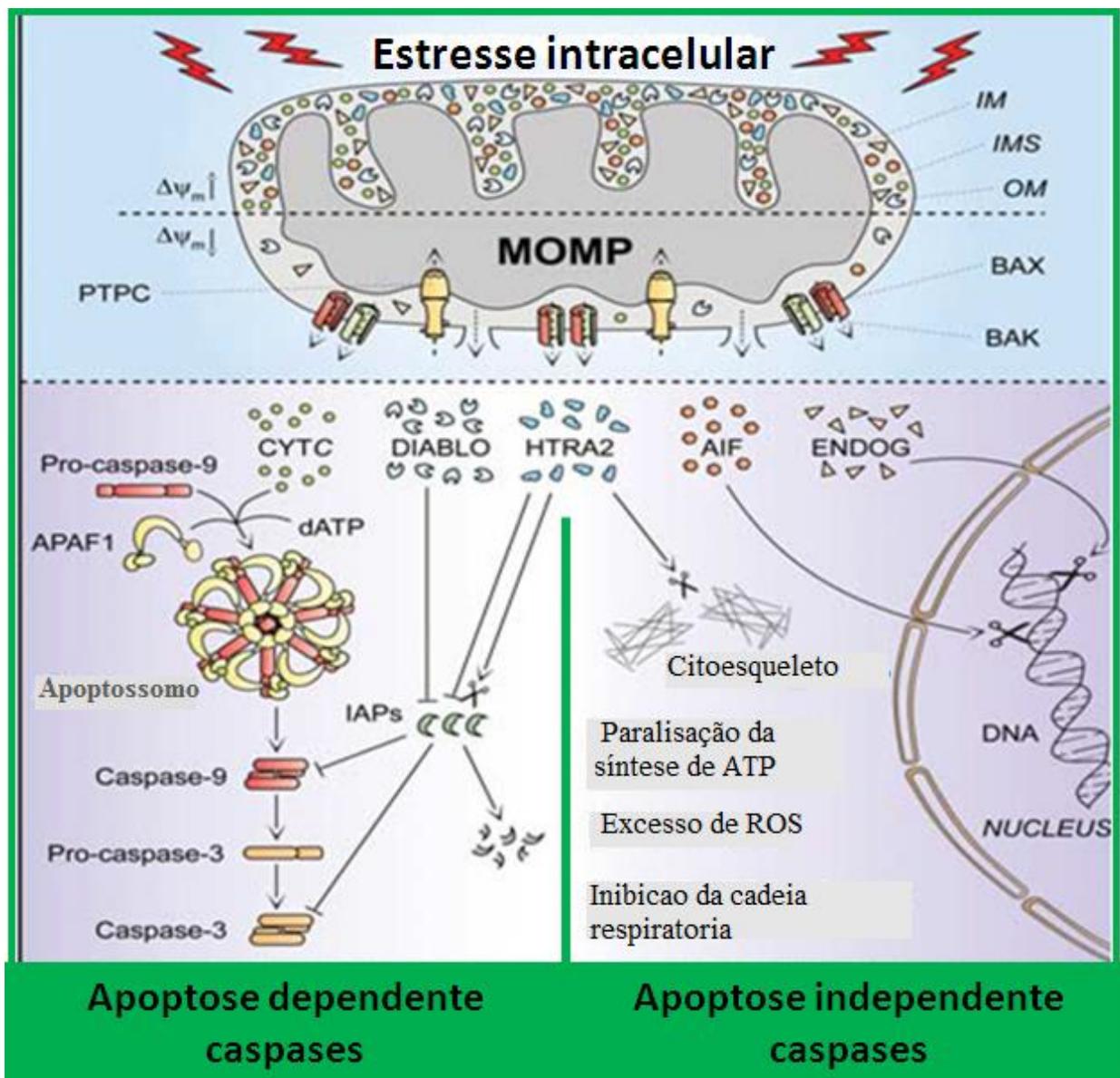
No mecanismo de apoptose via mitocondrial dependente de caspase ocorre a formação de um megaporo contendo proteínas, através deste ocorre a liberação do citocromo c no citosol, em presença de dATP, induzindo a formação do apoptossomo que é o mecanismo mais importante dessa via. O apoptossomo consiste de um heptâmero de moléculas adaptadoras APAF-1 (Fator Ativador de Protease Apoptótica), que promove a clivagem da pró-Caspase 9, liberando a Caspase 9 ativa. Esta caspase atua sequencialmente no processamento e ativação das caspases efetoras 3 e 7 e iniciando a execução da apoptose. O complexo apoptossômico provavelmente serve como um regulador alostérico da Caspase 9 que, em situações onde não haja estímulo apoptótico, encontra-se livre no citosol na forma de monômeros inativos. A integração da Caspase 9 ao apoptossomo induz sua dimerização e ativação (CROCE, 2008).

Desordens na formação do apoptossomo têm relevante importância na patogênese do câncer e na resistência à quimioterapia. No entanto, estudos têm identificado compostos capazes de induzir ou de inibir a formação do apoptossomo, podendo constituir importantes estratégias para o tratamento do câncer, bem como de outras doenças que apresentam prolongamento do processo apoptótico (MAREK, 2013).

Segundo Galluzi *et al* (2012), estudos têm demonstrado que mecanismos envolvendo a participação de proteases como Calpainas, Catepsina B, Gramenzima A e B, Omi/htra2, Endonuclease G e AIF induz morte celular por apoptose intrínseca com mecanismos independentes de caspases. Estas proteases na maioria das vezes

cooperam na via apoptótica dependente de caspases, entretanto dados recentes sugerem que estas podem acionar mudanças morfológicas características de apoptose de maneira independente de caspase. A via independente de caspase, seja ela ativa (por exemplo, AIF e ENDOG), ou passiva (por exemplo, o esgotamento de ATP), tende a prevalecer sobre a inibição das caspases e mata as células, mesmo em casos de apoptose intrínseca que poderiam ter sido naturalmente e rapidamente executada pela cascata de caspase (Figura 3).

Figura 3: Via de apoptose mitocondrial dependente e independente de caspase.



A via intrínseca é regulada por uma família de proteínas, a família Bcl-2, cujos membros apresentam em sua estrutura um ou múltiplos domínios homólogos de Bcl-2 (domínio BH3). A família Bcl-2 é dividida em dois grupos de proteínas, as antiapoptóticas (tendo como principal componente Bcl-2 – o primeiro membro descrito e que deu o nome à família de proteínas, além de Bcl2l1, Bcl2l2, Mcl1 e Bcl2a1a) e as pró-apoptóticas (as quais se dividem em dois subgrupos: proteínas *BH-3 only*, que possuem apenas um domínio BH3, que inclui as proteínas Bik, Blk, Bnip3, Bim-L, Bad, Bid, Bbc3, Pmaip1; e proteínas multidomínio, cujas principais representantes são as proteínas Bax e Bak1). Essas proteínas são determinantes para o início ou a interrupção da morte por apoptose por esta via, uma vez que governam a permeabilidade da membrana mitocondrial. Durante a morte celular por via intrínseca, os membros pró-apoptóticos prevalecem em detrimento dos não-apoptóticos (ELMORE, 2007).

A compreensão dos mecanismos e das alterações nos componentes das vias apoptóticas e sua correlação com a ocorrência do câncer são importantes para o desenvolvimento de novas terapias e métodos de prevenção do câncer (GRIVICICH *et al.*, 2007).

As alterações moleculares nas células advindas de um câncer começam a ser compreendidas e relacionadas aos mecanismos que regulam a divisão celular normal, a proliferação e a morte celular. Mudanças nos genes que regem a apoptose acarretam um maior acúmulo de células neoplásicas por induzir uma elevada taxa de crescimento celular e diminuição nos níveis de destruição das células mutadas (IGNEY e KRAMMER, 2002).

No entanto, a capacidade de interferir nos mecanismos apoptóticos e induzir a morte das células cancerígenas, constitui uma alternativa importante na terapêutica da doença. Assim, a maior parte das estratégias anticâncer utilizadas clinicamente, incluindo a quimioterapia, tem suas ações relacionadas à ativação das vias de sinalização envolvidas na apoptose (FULDA e DEBATIN, 2006).

1.7. Complexos Metálicos e Atividade Antitumoral

A aplicação de complexos metálicos tem grande importância no tratamento de câncer, devido ao aumento da sobrevivência de vários pacientes com o uso de complexos de platina. A pesquisa de complexos metálicos com propriedades antitumorais iniciou-se com a descoberta da ação antitumoral da cisplatina, no fim da década de 60 do século XX, por Barnet Rosenberg (1965) e tem sido estimulada com a descoberta da atividade citotóxica de diversos outros complexos de platina e outros metais, tais como gálio, ouro, cobre e rutênio (ZHANG e LIPPARD, 2003; CHAUDHARY *et al.*, 2006).

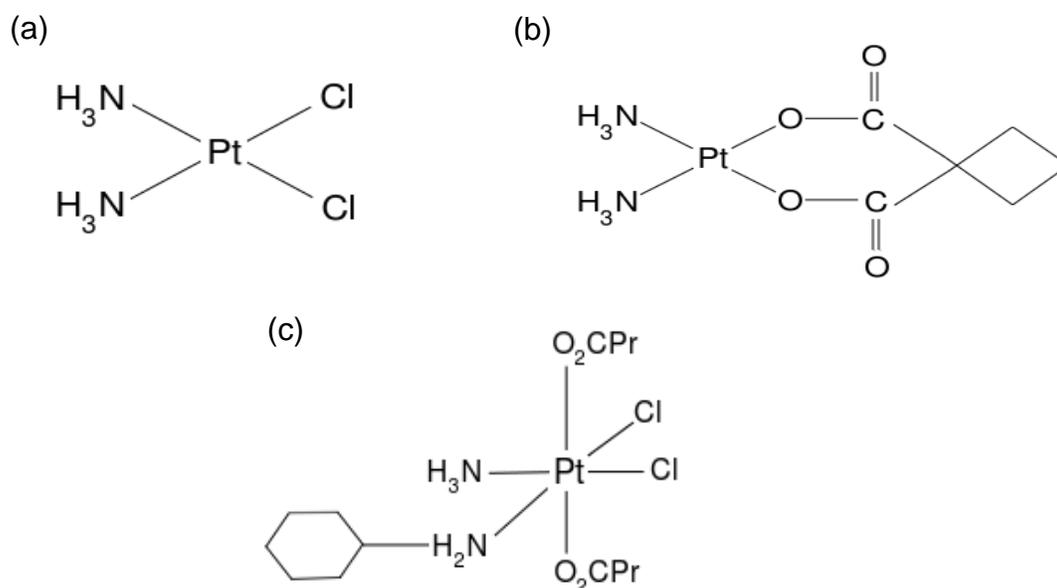
A CIS ou *cis*-diaminodicloroplatina (II) foi sintetizado em 1844 por Michele Peyrone, ficando com a designação de cloreto de Peyrone. Rosenberg *et al.* (1965), num estudo sobre o crescimento das bactérias, observou que a cisplatina inibia a divisão celular. Este efeito alertou para o fato deste agente poder ser usado para inibir o crescimento das células tumorais. A partir desses resultados, Rosenberg administrou cisplatina em camundongos portadores de sarcoma-180, um modelo de tumor usado para ensaios farmacológicos e o resultado foi surpreendente, pois provocou a regressão completa do tumor em 36 dias (CHAUDHARY *et al.*, 2006).

Já no início da década de 1970, a cisplatina (Figura 4a) foi introduzida em testes clínicos, demonstrando eficácia contra diversos tipos de cânceres. Sua utilização como agente quimioterápico foi aprovada pela *Food and Drug Administration (FDA)* em 1978. E nos dias de hoje, é um dos três fármacos mais usados mundialmente na quimioterapia de vários tipos de cânceres, tais como o tumor de testículo, osteossarcoma, leucemia aguda, câncer gástrico, carcinoma de bexiga, carcinoma do ovário e neuroblastomas (CHAUDHARY *et al.*, 2006; TODD e LIPPARD, 2009).

O mecanismo de ação da cisplatina é atribuído à sua ligação ao DNA, com formação de adutos, originando ligações intra e intercadeias que induzem distorções na dupla hélice do DNA e impede sua replicação. O efeito citotóxico da cisplatina é, assim, causado pela inibição da transcrição e replicação, induzindo a morte celular programada por apoptose (WANG e LIPPARD, 2005; GRIVICICH *et al.*, 2007).

Entretanto, a cisplatina caracteriza-se por possuir baixo índice terapêutico e elevado potencial tóxico, sendo que dentre seus efeitos adversos, a nefrotoxicidade constitui a maior causa de morbidade e de mortalidade (CHAUDHARY *et al.*, 2006). Outros efeitos colaterais estão aliados a utilização desse fármaco: náuseas, vômitos, hipomagnesia, supressão da medula óssea e toxicidade no trato intestinal. Tais efeitos colaterais são atribuídos a interações da cisplatina (ou de seus derivados) com outros alvos, tais como proteínas e peptídeos (CVITKOVIC, 1998). A glutathione, como exemplo, ao se complexar à cisplatina reduz a concentração intracelular do fármaco e, assim, menor quantidade do composto ficará disponível para atingir os alvos farmacológicos desejáveis (LEE *et al.*, 2001; TODD e LIPPARD, 2009).

Figura 4: Complexos de Platina (a) cis-Platina. (b) Carboplatina e (c) cis,trans,cisPtCl₂(O₂CPr)₂(NH₃)(C₆H₁₃N)].



Fonte: Davey *et al.* (1998).

A busca por outros complexos de platina com efeitos colaterais menores levou ao uso clínico da segunda geração de agentes antitumorais que é exemplificado pela *carboplatina* (Figura 4b). A descoberta de que certos tumores podem desenvolver resistência aos fármacos com platina (II) impulsionou, então, o desenvolvimento da terceira geração de agentes antitumorais, sendo que alguns deles são complexos

octaédricos de platina (IV), tal como o *cis,trans,cisPtCl₂(O₂CPr)₂(NH₃)(C₆H₁₃N)*] (Figura 4c).

Esses complexos de platina como a carboplatina, apesar de apresentarem basicamente o mesmo espectro de atividade que a cisplatina, possuem menos efeitos colaterais, mas não são eficientes no combate as células tumorais resistentes à cisplatina. Outro complexo denominado oxaloplatina, apresenta menor efeito nefrotóxico, no entanto, também desempenha menor espectro de atividade. Diante dessas características dos complexos de platina em geral, vários outros complexos a base de metal não associados a platina têm sido desenvolvidos, como complexos de cobre, gálio, rutênio, ferro, titânio e ouro, com o propósito de reduzir os efeitos tóxicos, obter compostos mais eficazes, melhorar o perfil farmacológico e a eficácia terapêutica (ALAMA *et al.*, 2009).

Dentre esses complexos a base de metal que vêm sendo estudados, os complexos de rutênio têm se destacado por demonstrarem propriedades antimetastática, baixa toxicidade para células normais e alta seletividade para células tumorais (KOSTOVA, 2006; MENEZES *et al.*, 2007; SILVEIRA-LACERDA *et al.*, 2010).

1.8. Compostos de Rutênio e Atividade Antitumoral

O interesse nos complexos de rutênio como agentes anticancerígenos tem aumentado nos últimos anos, pois tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* tem exibido atividade promissora. Estes complexos mostram evidências de baixa toxicidade em comparação com os agentes tradicionais de cisplatina, mecanismos de ação alternativos e um espectro versátil de atividade entre vários tipos de câncer. Além disso, possuem diferentes modos de ligação ao DNA e têm exibido excelente atividade antitumoral em tipos de câncer resistentes à cisplatina (AIRD *et al.*, 2002; YAN *et al.*, 2005; ALLARDYCE e DYSON, 2001; CHELOPO *et al.*, 2013).

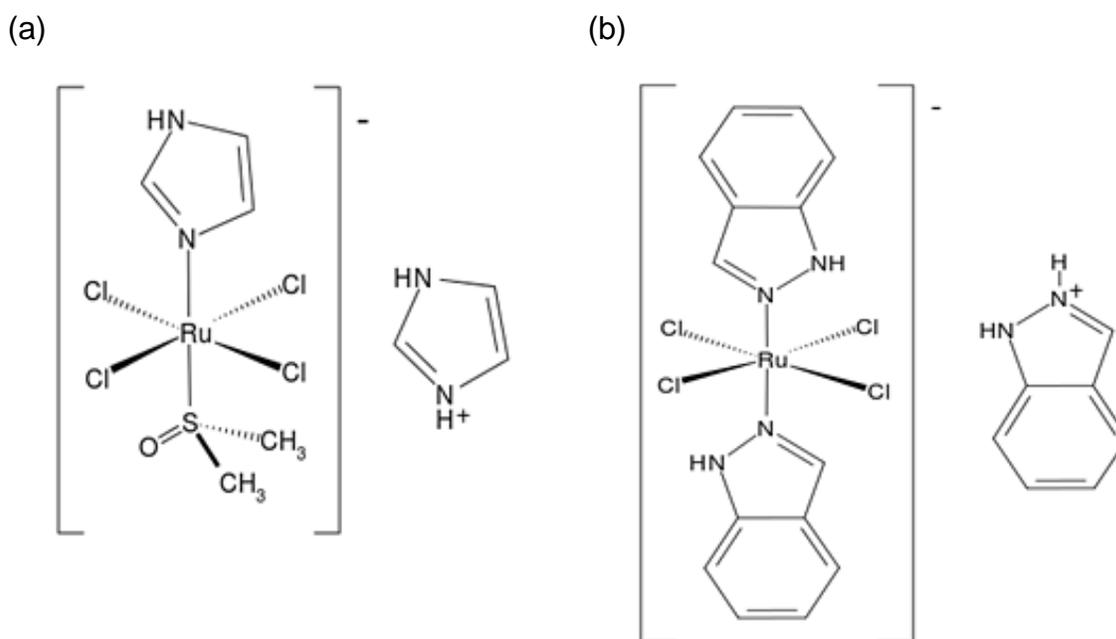
As primeiras investigações sistemáticas de complexos de rutênio e suas propriedades antitumorais foram feitas na década de 1980 com os compostos *fac*-[RuCl₃(NH₃)₃] e *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl. No fim dessa década, ocorreu o primeiro avanço real neste campo dos complexos de rutênio: o grupo de Keppler *et al.* (1990)

demonstrou que dois complexos isoestruturais de rutênio (III) [Him]trans-[RuCl₄(Im)₂] (ICR, Im = imidazol) e [INDH] trans-[RuCl₄(ind)₂] (KP1019, Ind = Indazol), que foram ativos contra uma série de modelos de tumor, mostrou uma atividade excelente contra tumores colorretais resistente à platina (KUNG *et al.*, 2001; RADEMAKER-LAKHAI *et al.*, 2004; BRATSOS *et al.*, 2007).

Este complexo KP1019 e um outro denominado NAMI-A (Figura 5), atualmente estão em triagem clínica e apesar da estrutura e similaridades química, estes dois complexos de rutênio (III) apresentam atividades antitumorais distintas. Em estudos pré-clínicos, NAMI-A apresentou atividade antimetastática em uma variedade de modelos tumorais murino, enquanto KP1019 apresentou atividade antitumoral contra carcinoma de colorretal (PACOR *et al.*, 2004; KAPITZA *et al.*, 2005; ANTONARAKIS e EMADI, 2010).

Figura 5: Estrutura química dos compostos de rutênio em fase clínica:

(a) (H₂im)[trans-RuCl₄(Him)(DMSO)] – NAMI-A e (b) [INDH] trans-[RuCl₄(ind)₂] – KP1019.



Fonte: Bergamo e Sava (2007).

Além de NAMI-A e KP1019, uma grande variedade de complexos de rutênio (II) e (III) com ligantes aminas, imina, polipiridil, DMSO e arenos tem sido testados em

ensaios pré-clínicos para atividade antitumoral. Os estudos com complexos de rutênio têm sido possíveis pela ampla variedade de coordenação, vários estados de oxidação (Ru (II), Ru (III) e Ru (IV) em condições fisiológicas e a taxa de substituição de ligante (LI *et al.*, 2012).

Desde a descoberta do potencial antitumoral dos complexos de rutênio, vários estudos foram realizados a fim de elucidar o seu mecanismo de ação, ou seja, tentar explicar a propensão do complexo de se ligar às células tumorais. Sabe-se que os complexos de rutênio são distribuídos em tecidos tumorais com níveis maiores do que em tecidos normais (aumento de 2 a 12 vezes) (ALLARDYCE e DYSON, 2001). Esta distribuição seletiva poderia ser facilitada pelo transporte através de biomoléculas como a transferrina e albumina, pois as células tumorais possuem uma necessidade maior de ferro e conseqüentemente, apresentam um número maior de receptores sobre a superfície celular, resultando no sequestro de mais transferrinas circulantes. A ligação à transferrina e albumina é favorecida pela similaridade do rutênio ao ferro, que pertencem ao grupo VIII de metais de transição. É então concebível que os complexos de rutênio, uma vez alcançado o nível plasmático, se ligue a essas biomoléculas e seja transportado aos tecidos (SAVA *et al.*, 1990; ALLARDYCE e DYSON, 2001; PEREIRA *et al.*, 2008; ALAMA *et al.*, 2009).

Outra característica dos complexos de rutênio e suas hipóteses sugerem que os complexos de rutênio (III) servem de pró-drogas que são reduzidas para rutênio (II), *in vivo*, pelas condições citoplasmáticas em que as células tumorais se encontram: baixas concentrações de O₂ em decorrência do consumo atípico de nutrientes; pH baixo, devido à produção de ácido láctico na glicólise anaeróbia, compensatória da falta de oxigênio; e à presença de glutatona em níveis tipicamente altos. Essas alterações no ambiente citoplasmático das células tumorais podem favorecer a conversão de rutênio (II) a partir do rutênio (III), intensificando ligações ao DNA, com toxicidade seletiva às células tumorais (CLARKE, 2002; SILVEIRA-LACERDA *et al.*, 2009).

Os complexos de rutênio são os únicos entre o grupo de metais em que os estados de oxidação são acessíveis em condições fisiológicas, permitindo a administração de complexos de Ru no estado de oxidação (III) que poderão ser ativados por redução formando complexos de Ru (II) nos tecidos alvos (ALLARDYCE e

DYSON, 2001). No sistema biológico, a redução de Ru (IV) e Ru (III) é favorecida pela glutathiona, ascorbato e proteínas transportadoras de um único elétron, enquanto que o oxigênio e citocromo oxidase promovem a oxidação do Ru (II). Para os complexos de rutênio (II) que é a forma ativa a qual interage com o DNA, pouco se sabe sobre seu mecanismo de entrada na célula. A maioria dos trabalhos explora a interação deste complexo com o DNA, mas os processos que ocorrem até esta interação ainda não foram esclarecidos. (ALAMA *et al.*, 2009; SILVEIRA-LACERDA *et al.*, 2010)

Vários mecanismos estão sendo propostos para elucidar a atividade anticancerígena dos complexos de rutênio, incluindo a interação com o DNA, o bloqueio do ciclo celular, a inibição das várias quinases e a inibição da topoisomerase. Além disso, a mitocôndria é um alvo importante para complexos de rutênio (MURPHY e SMITH, 2000; WILHELMSSON *et al.*, 2002; KOU *et al.*, 2012). A principal função da mitocôndria em células humanas é de fornecer ATP pela fosforilação oxidativa. Contudo, as mitocôndrias têm muitas outras funções, incluindo a modulação da concentração de cálcio intracelular e a regulação da apoptose na morte celular. É necessário destacar também, que a cadeia respiratória mitocondrial é uma importante fonte de radicais livres. Conseqüentemente, a disfunção mitocondrial contribui para um aumento no número de doenças humanas, que vão desde doenças neurodegenerativa à obesidade e diabetes. Portanto, nos últimos anos, alguns estudos de complexos de rutênio para manipular a função mitocondrial em formas clinicamente úteis têm sido realizados (CHATTERJEE *et al.*, 2008; CHEN, *et al.*, 2013).

Devido a sua estrutura octaédrica, oposta a geometria quadrado planar dos complexos de Pt(II), complexos de Ru(II) e Ru(III) provavelmente funcionam de maneira diferente da cisplatina, que através de quebras de ligações se unem às guaninas adjacentes do DNA, com conseqüente ativação dos mecanismos de reparo que podem levar à morte celular por apoptose (CLARKE, 2002).

Os complexos de rutênio têm sido submetidos a vários estudos sobre o comportamento químico e potenciais aplicações médicas. Ênfase particular é dada à verificação de possíveis propriedades antitumorais de complexos de rutênio com ligantes biologicamente ativos. Vários trabalhos publicados sugerem que o rutênio é um íon metálico dotado de uma alta propensão de ligação com o DNA (SAVA *et al.*, 1991;

SAVA *et al.*, 2003; PACOR *et al.*, 2004; PLUIM *et al.*, 2004): a intercalação com as bases nucleotídicas e interações superficiais com o esqueleto de fosfato do DNA - que dependem, respectivamente, da natureza dos ligantes empregados e da arquitetura tridimensional dos complexos – já foram observados.

Ao contrário desta visão que o principal alvo de complexos de rutênio é o DNA, estudos mostram também que mecanismos independentes do DNA, como inibição de metaloproteases e interferência com processos de adesão e metabolismo do óxido nítrico, são responsáveis pelos efeitos antitumorais de alguns complexos de rutênio. Os mecanismos pelos quais complexos de rutênio exercem sua atividade de maneira independente do DNA, são demonstrados através de estudos com o complexo de rutênio NAMI-A, o qual exerce seu efeito antimetastático possivelmente pela atuação sobre moléculas de adesão e metabolismo do óxido nítrico (SAVA *et al.*, 2003; PACOR *et al.*, 2004). Apesar de alguns estudos demonstrarem que NAMI-A possa interagir com o DNA *in vitro*, a ligação ao DNA não parece contribuir para o seu efeito antimetastático (PLUIM *et al.*, 2004).

1.9. Complexos de Rutênio (II) e Seus Diferentes Ligantes

O interesse de novos desenhos de complexos organometálicos de rutênio (II) como agentes anticancerígenos tem aumentado nos últimos anos, uma vez que eles têm exibido atividade promissora, tanto em estudos *in vivo* como *in vitro*. Estes complexos mostram evidências de baixa citotoxicidade e toxicidade, mecanismos de ação alternativos e um espectro versátil de atividade contra diversos tipos de câncer. (AIRD *et al.*, 2002; YAN *et al.*, 2005; CHELOPO *et al.*, 2013).

Um grande número de complexos de rutênio (II) com diferentes tipos de ligantes tem sido estudado e os resultados destes complexos em relação aos vários tipos de linhagens celulares (seja tumoral ou normal), dependem do tipo de ligante acoplado ao complexo. Os ligantes N-heterocíclicos, por exemplo, têm ganhado destaque. Uma das características destes compostos é a possibilidade de mimetizar moléculas biológicas que possuem propriedades particulares no metabolismo geral: ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, alcalóides, etc. São também muito estudados devido ao seu

envolvimento em catálise redox e reações de transferência eletrônica. Dentre os ligantes N-heterocíclicos pode-se destacar os ligantes piridínicos e bipyridínicos, em especial o ligante 2,2'-bipyridina e seus derivados (KAIM e SCHWEDERSKI, 1995, LI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013).

A bipyridina é derivada do acoplamento de dois anéis piridínicos e pode existir na forma de seis isômeros, um dos quais a 2,2'-bipyridina. Destaca-se por ser um ligante quelante que formam compostos de coordenação relativamente estáveis com a maioria dos íons de metais de transição. Eles estabilizam espécies de alto e baixo estado de oxidação. Por esta razão, estão entre os ligantes mais estudados na química de coordenação resultando em complexos estáveis. Ligantes bipyridínicos são excelentes na construção de complexos metálicos de fórmula geral $[M(\text{bpy})_3]$ e $[M(\text{bpy})_2]$, dependendo da geometria de coordenação preferencial do centro metálico (LE BOZEC e RENOARD, 2000; MORENO *et al.*, 2003).

Numerosos complexos metálicos, incluindo os complexos de rutênio com ligantes aromáticos N-doadores, também exibem propriedades anticâncer promissoras. Tais ligantes incluem derivados de fenantrolina, piridina e imidazole. Ligantes apresentando pelo menos uma porção NH em complexos de rutênio (II) facilitam uma interação efetiva com o DNA através de ligações de hidrogênio. Estes complexos têm diferentes modos de ligação ao DNA e exibem uma excelente atividade em câncer resistente a cisplatina em sistemas *in vitro* e *in vivo* (CHEN *et al.*, 2003; ZHAO e LIN, 2005)

A presença de um ligante quelante nos complexos de rutênio (II) oferece estabilidade estrutural. Diferentes elementos doadores tais como o fósforo, azoto e oxigênio, também são estudados em termos de sua atividade anticâncer quando coordenados ao rutênio. Fernandez *et al.* (2004), demonstraram que uma mudança de um ligante doador tem um efeito profundo sobre as propriedades eletrônicas do complexo Ru (II). Por exemplo, a taxa de hidrólise da ligação Ru-Cl é maior com um ligante quelante-O,O aniônico do que com um ligante-N,N neutro. Esta "afinação" do ligante também resulta em uma mudança de preferência das nucleobases alvos. Estudos subsequentes estabelecem que os complexos de rutênio (II) com vários sítios de doadores quelantes, foram realizados em ligantes tais como a N,N-(diaminas e

bipiridina), N,O- (amino acidates) e O,O-(acetilacetato), em que os complexos de estudo com ligantes-N,N possuíam atividade superior à do quelantes O,O e os complexos-N,O foram inativos. Os ligantes N,N tem sido estudados extensivamente na literatura e são doadores quelantes preferidos na combinação com o heteroátomo doador (DOUGAN *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

A incidência de câncer na população aumenta a cada ano, pois essa doença é umas das maiores causas de morte no mundo. Desta forma, estudos têm sido realizados em vários países a fim de desenvolver medicamentos que sejam eficazes e específicos no tratamento dessa doença.

A maioria dos pacientes com algum tipo de câncer passa pelo tratamento da quimioterapia e os quimioterápicos disponíveis para o tratamento de diversos tipos de câncer exercem seu papel destruindo as células cancerígenas, entretanto, afetam também as células normais do paciente, ocasionando assim diversos efeitos colaterais que levam a um desgaste no tratamento e, em muitos casos, o paciente vai a óbito por não resistir a um tratamento tão agressivo.

Dentre os vários tipos de compostos desenvolvidos e testados para o tratamento do câncer, os complexos metálicos ganham destaque já que alguns deles como a cisplatina e carboplatina já são usados para o tratamento do câncer. Entretanto, é necessário encontrar um medicamento que seja específico para as células tumorais, reduzindo os efeitos tóxicos nos pacientes e aumentando a eficácia terapêutica nesses tratamentos.

Os complexos de rutênio têm se destacado dentre esses complexos metálicos, pois apresentam características promissoras diante da problemática enfrentada para o tratamento do câncer. Dentre as características dos complexos de rutênio, pode-se destacar principalmente: o grande potencial antitumoral; baixa citotoxicidade, genotoxicidade para células normais e sua capacidade de coordenação com diferentes ligantes químicos.

Dessa forma, partindo de conhecimentos prévios de que os complexos de rutênio (II) apresentam atividade antitumoral, faz-se necessário explorar novos ligantes acoplados ao rutênio, apresentando novas formulações para investigar as suas atividades biológicas e químicas, tais como o mecanismo de ação, o potencial antitumoral, o mecanismo de morte e assim, entender a ação desses novos complexos

de rutênio em modelos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. E a partir desses resultados, espera-se que sejam desenvolvidos novos agentes anticâncer menos agressivos e mais eficazes para os pacientes, subsidiando estudos clínicos futuros que possam ser realizados por esse composto.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação citotóxica de diferentes complexos de rutênio (II) frente a linhagens celulares tumorais e selecionar dois complexos mais promissores para avaliação do potencial genotóxico, do mecanismo de morte e da interferência na cinética do ciclo celular.

3.2. Objetivos Específicos

- Realizar a triagem citotóxica de seis novos complexos de rutênio (II) coordenados a benzonitrila, bipyridina, ácido picolínico e pirimidina frente às linhagens tumorais de Sarcoma-180 (S-180), Leucemia Mieloide Crônica (K562) e linhagem normal de linfócitos humanos e fibroblastos (L-929) e selecionar dois complexos mais promissores para os ensaios em busca do mecanismo de morte;
- Avaliar os complexos de rutênio (II) selecionados sobre a cinética do ciclo celular e seus efeitos sobre a indução de morte celular apoptótica ou necrótica;
- Avaliar a quantidade de proteínas de Caspase 3 e Bcl2 ativas nas células de S-180;
- Investigar o efeito dos complexos de rutênio (II) sobre a atividade enzimática de Caspase-8 e Caspase-9;
- Avaliar o efeito dos complexos de rutênio (II) sobre o potencial de membrana mitocondrial;
- Investigar o efeito dos complexos de rutênio (II) sobre a expressão dos genes pró-apoptótico *Caspase-3*, *Caspase-8*, *Caspase-9*, *Bax* e *P53*;
- Investigar o efeito genotóxico dos compostos de rutênio (II) através do teste

cometa.

4. METODOLOGIA

4.1. Síntese dos Complexos de Rutênio

Os complexos de rutênio (II) coordenados à benzonitrila, bipyridina, ácido picolínico e pirimidina, foram sintetizados no Laboratório de Química do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos e encaminhados ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da Universidade Federal de Goiás (UFG) para realização dos ensaios de atividade biológica. Na tabela abaixo, encontra-se a estrutura química dos compostos de rutênio testados.

Tabela 3: Estrutura química dos compostos de rutênio (II) testados.

Complexos de rutênio (II)	Código	Peso Molecular
[Ru(pys)(bipy)(dppp)]PF ₆	(Ru 03)	924,83
[Ru(pys)(bipy)(dppb)]PF ₆	(Ru 05)	765,82
[Ru(pic)(bipy)(dppp)]PF ₆	(Ru 08)	936,78
[Ru(prm)(bipy)(dppe)]PF ₆	(Ru 14)	911,79
[Ru(dmpm)(bipy)(dppf)]PF ₆	(Ru 16)	1095,81
[RuCl(bcn)(bipy)(dppe)]PF ₆	(Ru 21)	925,18

Para os ensaios biológicos, os complexos de rutênio foram pesados de acordo com o peso molecular e dissolvidos em um primeiro momento em dimetilsulfóxido (DMSO) (100%) em seguida, foi preparado alíquotas dos compostos em diferentes concentrações (0,2 a 200 µM) diminuindo a concentração de DMSO para 0,1% para realizar o teste de MTT. Após os resultados de IC₅₀ e Índice de Seletividade, os

compostos mais promissores foram selecionados para a realização de outros ensaios biológicos em busca do mecanismo de ação no novo fármaco.

4.2. Linhagens Celulares Tumorais e Não Tumorais

Para os ensaios biológicos foram utilizadas as linhagens tumorais estabelecidas Leucemia Mieloide Crônica (K562) (ATCC[®] CCL-243[™]) e a linhagem tumoral de camundongo Sarcoma-180 (S-180) (ATCC[®]# TIB-66). Como célula normal, foi utilizada a linhagem estabelecida de fibroblasto de pulmão murino (L-929) (ATCC[®]# CCL-1^T) e cultura primária de linfócito humano sob protocolo (043/2007) do Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás.

As células foram mantidas em cultura a 37 °C, 5% de CO₂ utilizando meio de cultura RPMI 1640 (linhagens S-180, K562 e linfócito) e DMEM (linhagem L-929) (SIGMA-ALDRICH Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (GIBCO[®], INVITROGEN, Carlsbad, California, USA), 100IU mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina (SIGMA-ALDRICH Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) segundo protocolo estabelecido pela *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, Maryland, USA).

Para a realização dos ensaios, previamente a linhagem aderente em fase de crescimento logarítmico foi removida dos frascos de cultura celular pela adição de 1 mL de tripsina 0,5% em solução tampão Fosfato 0,01 mol L⁻¹, pH 7,2 em solução salina 0,9% (PBS). Em seguida, foram adicionados meio cultura completo para neutralizar a tripsina e transferidos para tubo falcon para realizar a quantificação celular.

Como controle positivo para o teste de MTT e cometa, utilizou-se o fármaco Cisplatina (5 a 50 µM) liofilizado (SIGMA-ALDRICH Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA).

4.3. Ensaio de Viabilidade Celular pelo Método Redução do MTT

Para avaliar a atividade citotóxica dos complexos de rutênio (II) citados na tabela 3, foi utilizado o método colorimétrico do MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium). O princípio deste método descrito por Mosman (1983)

consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Para o teste do MTT, 1×10^5 células S-180 e K562 e 1×10^4 células L-929 e Linfócito, foram semeadas em microplacas de 96 poços na ausência ou presença dos complexos de rutênio (II) (0,2 a 200 μM) ou cisplatina (0,2 a 200 μM). Após tratamento, as células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO_2 . Ao final do período de incubação, foi adicionado aos poços de cultivo celular 10 μL de MTT na concentração de 5 mg mL^{-1} , e após 3 h de incubação com o MTT, foram acrescentados 50 μL de Sódio Dodecil Sulfato (SDS) a 10% diluído em HCL/0,01N. A quantificação da densidade óptica (DO) foi medida em espectrofotômetro (Awareness Technology INE/ Stat Fax 2100). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{Absorbância do tratamento}}{\text{Absorbância do controle negativo} * 100} \quad (1)$$

O valor de IC_{50} (concentração em μM que inibe 50% da viabilidade celular) foi determinado por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software, San Diego, *California*, USA).

4.4. Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) indica a seletividade dos complexos estudados e o seu potencial uso para os testes pré-clínicos *in vivo* e clínicos. Foi determinado pela relação dos valores obtidos de IC_{50} para uma linhagem celular não tumorigênica e outra tumorigênica, indicando a seletividade dos complexos estudados e o seu potencial uso para os testes pré-clínicos *in vivo* e clínicos.

O IS foi determinado para todos os complexos de rutênio (II) e para a cisplatina a partir da seguinte equação:

$$\text{IS} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ célula não tumorigênica}}{\text{IC}_{50} \text{ célula tumorigênica}} \quad (2)$$

em que, para a célula não tumorigênica foi utilizado os valores de Linfócito para os complexos de rutênio e os valores de L-929 para cisplatina, e para célula tumorigênica foram utilizado os valores de S-180 para ambas. Foi considerado significativo um valor de IS $\geq 2,0$ (SUFFNESS e PEZZUTO, 1991).

A partir dos valores de IC₅₀ e do valor de IS obtidos para as células tumorais e normais, foi selecionado dois complexos de rutênio (II) mais promissores para os demais ensaios de mecanismo de morte e genotoxicidade que foram realizados apenas em células de S-180, devido ao grau de seletividade dos complexos.

4.5. Análise da Cinética do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

As fases do ciclo celular podem ser caracterizadas por variações no seu conteúdo de DNA, que quando analisado por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo, permite quantificar a percentagem de células em cada fase do ciclo celular, conforme descrito por Vindelov et al. (1983).

Para esta análise, 5×10^5 células tumorais foram plaqueadas em microplacas de 12 poços na presença ou ausência dos complexos de rutênio em concentrações próximas a IC₅₀, Ru 05 [0,3; 0,88 e 1,7 μM] e Ru 08 [10; 14 e 28 μM). Após exposição das células aos complexos de rutênio por 24 e 48 horas, estas foram centrifugadas e em seguida lavadas com PBS. Ao final da lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” celular foi incubado com 1 mL de álcool etílico gelado (70%) por 24 h a -20°C . Ao final da incubação, as células foram lavadas novamente com PBS e em seguida, foram incubadas por 15 min em uma solução contendo ribonuclease A (RNase A) 0,05% e iodeto de propídeo ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). A aquisição da população celular para cada fase foi através do DNA medido em intensidade de fluorescência. A análise da percentagem de células em cada fase do ciclo celular foi realizada por meio do citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences), logo após analisado pelo software ModFit. Os resultados foram expressos em percentagem média de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular: G0/G1, S e G2/M, assim como o percentual de DNA fragmentado que foi dado como sub-G1.

4.6. Ensaio da exposição de Anexina V-FITC/Iodeto de Propídeo

A externalização de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática é um dos primeiros eventos que se passa na superfície de uma célula em processo de apoptose ou necrose, sendo que esta perda de assimetria do fosfolípido de membrana contribui para facilitar o reconhecimento por proteínas dependentes de íons de cálcio, como a Anexina V (BOERSMA *et al.*, 2005). O procedimento de detecção de apoptose ou necrose por Anexina V-FITC/Iodeto de Propídio (PI), consiste na ligação da anexina V-FITC à fosfatidilserina na membrana das células que estão iniciando o processo final da apoptose e marcação com PI aquelas em condição de necrose.

Para detecção de apoptose ou necrose, foi utilizado o kit de detecção de apoptose Anexina V/Iodeto de Propídio (PI) (SIGMA-ALDRICH Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para este ensaio, 5×10^5 células foram semeadas em microplacas de 12 poços em triplicatas e incubadas na ausência ou presença dos complexos Ru 05 [0,27; 0,88 e 1,7 μM] e Ru 08 [14 e 28 μM]. Após tratamento de 24 e 48 horas com os complexos de rutênio, as células foram centrifugadas e posteriormente lavadas com PBS. O sobrenadante foi descartado e ao pellet celular foi adicionado 400 μL de tampão anexina e em seguida, acrescentados 2.5 μL de Anexina V-FITC e 2.5 μL de iodeto de propídio. As células foram então incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos e, posteriormente, foi feita aquisição dos dados em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences). Para análise dos dados foi utilizado o software Cell Quest.

Foram classificadas como células em apoptose inicial aquelas com marcação somente para Anexina-V (AN+)/(PI-), e como células em apoptose tardia aquelas com dupla marcação de Anexina V e PI (An+)/(PI+), células em necrose somente com marcação para PI (An-)/(PI+) e células viáveis não apresentaram nenhuma marcação.

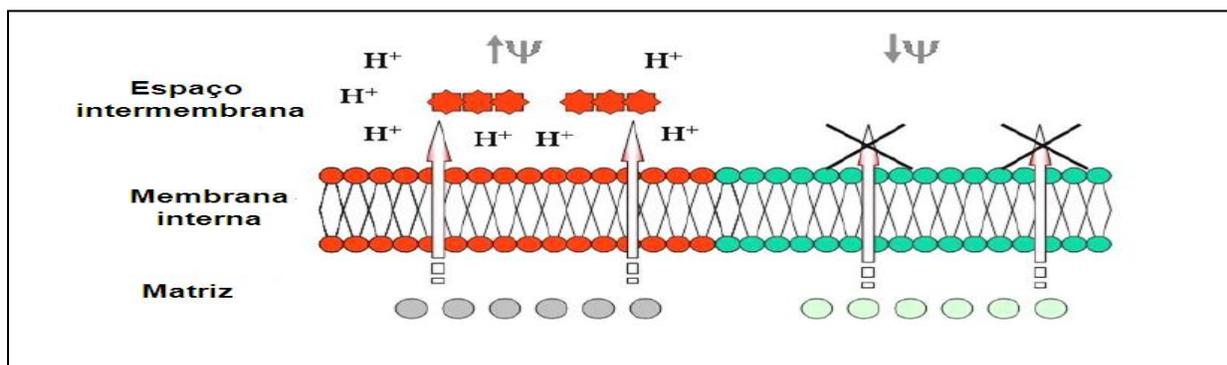
4.7. Ensaio do Potencial de Membrana Mitocondrial pela marcação JC-1

A perda do potencial de membrana mitocondrial é uma característica de apoptose, sendo que este evento precede a externalização da fosfatidilserina e

coincide com a ativação de caspases. JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina) é um marcador fluorescente que mensura o potencial de membrana mitocondrial das células. Este corante penetra na organela e emite fluorescência nos comprimentos de onda de luz vermelha (pico de emissão máxima em 590 nm) ou verde (emissão em 520 nm), de acordo com o potencial de membrana mitocondrial interna. Penetrando em altas concentrações, o corante apresenta-se na forma de j-agregado e emite coloração vermelha, mas em baixas concentrações, encontra-se na forma de monômero e emite coloração verde. Desta forma, em mitocôndrias funcionais, o JC-1 penetra e acumula-se no interior desta organela e emite coloração vermelha, ao passo que em mitocôndrias com baixo a médio potencial de atividade de membrana, fluoresce fora da organela como isolado emitindo coloração verde (Figura 6) (CHAZOTTE, 2011).

O efeito dos complexos Ru 05 [0,27; 0,88 e 1,7 μM] e Ru 08 [14 e 28 μM] sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi mensurado utilizando o corante catiônico JC-1 (BD Bioscience). Para a realização do ensaio, 3×10^5 células foram tratadas com os complexos de rutênio (II) durante 24 h. Após tratamento, as células foram centrifugadas por 10 min a 1500 rpm e lavadas com PBS. Após serem lavadas, as células foram incubadas por 15 minutos a 37°C com o corante JC-1. Em seguida, as células foram lavadas novamente e ressuspensas em tampão de ensaio para análise em citometro de fluxo. Os resultados foram obtidos utilizando o citometro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience) e a análise dos dados foi feita através do software Cell Quest, (BD Biosciences).

Figura 6: Esquema do Ensaio de JC-1.



Quando em alto potencial de membrana mitocondrial (membrana vermelha), o corante JC-1 atravessa a membrana formando agregados que emitem fluorescência vermelha. Na presença de um baixo potencial de membrana mitocondrial (membrana verde), o corante permanece na forma de monômero e emite coloração verde. Fonte: Mesquita, (2005).

4.8. Análise de Caspase 3 ativa por Citometria de Fluxo

A ativação de Caspases desempenha um papel central no processo apoptótico. Para a detecção de ativação da Caspase 3 nas células tratadas com os compostos de rutênio (II), foi utilizado o kit de coloração CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-3, da BD. O ensaio faz uso de anticorpo anti-caspase 3 ativa conjugado individualmente, com o corante PE como marcadores fluorescentes *in situ*. Este marcador é permeável a células, não apresenta características tóxicas e se ligam irreversivelmente à Caspase-3 ativada em células em processo apoptótico. O marcador PE permite a detecção de Caspase-3 ativada em células apoptóticas diretamente por citometria de fluxo.

Para o ensaio, 3×10^5 células foram tratadas com os complexos de Ru 05 [0,27; 0,88 e 1,7 μM] e Ru 08 [14 e 28 μM] durante 24 h. Após tratamento, as células foram centrifugadas por 3 min a 1500 rpm e lavadas com PBS. Após serem lavadas, as células foram incubadas por 30 minutos a 37°C com anticorpo específico para detecção de Caspase 3. Em seguida, as células foram lavadas novamente e ressuspensas em tampão de ensaio para análise em citômetro de fluxo. Os resultados foram obtidos utilizando o citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience) e a análise dos dados foi feita através do software Cell Quest (BD).

4.9. Análise de Bcl2 ativa por Citometria de Fluxo

Após o tratamento das células de S-180 com o complexo de Ru 05 [0,27 e 0,88 μM] e Ru 08 [14 e 28 μM] por 24 horas, as células foram retiradas da cultura e centrifugadas a 1800 rpm por 3 minutos. Descartado o sobrenadante as células foram lavadas com PBS 1X e resuspendidas em 500 μL de tampão de lise por 10 minutos em temperatura ambiente (20° a 30°C). Passado o tempo as células foram centrifugadas e resuspendidas em 500 μL de solução de permeabilização por 10 minutos. Após o

tempo de exposição as células foram lavadas com tampão BSA (PBS 1X, 0.5% de SFB e 0.1% de azida de sódio) e adicionado 20 µL do reagente anti-Bcl-2. O tubo foi mixado e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente (20° a 30°C). Após o período de incubação as células foram lavadas, resuspendidas em 500 µL BSA e levadas para a análise imediatamente no citometro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience), a análise dos dados foi feita através do software Cell Quest,(BD).

4.10. Análise da Atividade de Caspases 8 e 9 pelo Ensaio Colorimétrico

Para investigação da atividade das Caspase 8 e 9, foi utilizado o kit de proteases colorimétrico ApoTarget™(Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O ensaio de atividade das Caspases é baseado na detecção por espectrofotômetro do cromóforo p-nitroanilina (pNA) depois da clivagem do substrato X-pNA, onde X é a sequência de aminoácidos reconhecidos pelas caspases. Neste ensaio, 3×10^6 células foram semeadas em garrafas de cultura 25 cm² e incubadas por período de 24 horas na ausência ou presença dos complexos de Ru 05 [0,88 µM] e Ru 08 [14 µM]. Após incubação, as células foram inicialmente centrifugadas e o pellet de células formado foi incubado com de tampão de lise em banho de gelo por 10 minutos.

A concentração de proteínas foi medida por meio do ensaio BSA (BioRad), 75 µg do extrato de proteína, 50 µL de tampão de reação 2X suplementado com 10 mM de DTT e os substratos IETD-pNA (Caspase-8) e LEHD-pNA (Caspase-9), foram incubados por 2 horas a 37°C. Após incubação por 2 horas, a formação de p-nitroanilide nas amostras foi medida em espectrofotômetro (Awareness Technology INE/ Stat Fax 2100) a 405 nM. O aumento da atividade de Caspase-8 e Caspase-9 foram determinados por meio da comparação dos resultados com o controle.

4.11. Avaliação da Expressão Gênica

4.11.1 Extração RNA

O RNA total de células de S-180 tratadas com complexos Ru 05 [0,27 e 0,88 µM] e Ru 08 [14 µM] foi isolado utilizando-se o reagente Trizol (Sigma-Aldrich) seguindo as

recomendações do fabricante. Para o isolamento, 1 mL de trizol foi adicionado ao pellet celular e homogeneizado até a dissolução completa do pellet. Em seguida foi adicionado 200 µL de clorofórmio, e os tubos foram homogeneizados por inversão e deixados à temperatura ambiente durante 2 minutos seguindo-se de centrifugação durante 15 minutos a 12.000 g a 4°C. Este procedimento resultou em três fases: a fase aquosa onde está o RNA, a interface que contém as proteínas e, por fim, a fase com fenol/clorofórmio. Após a transferência da fase aquosa para um novo tubo, foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico para a precipitação do RNA. Este foi incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. A seguir, os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O RNA foi então lavado com etanol 75% e, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 7500 g a 4°C. Após centrifugação, o álcool foi descartado e os tubos foram colocados em capela para evaporação do álcool restante na amostra. Após evaporação completa do álcool, o RNA foi dissolvido em 50 µL de água ultrapura. A seguir, o material foi tratado com Dnase I (Sigma-Aldrich) seguindo protocolo sugerido pelo próprio fabricante. Após tratamento com Dnase I o material foi estocado em -80°C.

A concentração e o grau de pureza do material foram estimados em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Delaware, USA). O grau de pureza foi avaliado de acordo com a relação 260/280. A qualidade (integridade) do RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2 % (Apêndice 1).

4.11.2. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, utilizou-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. Uma mistura contendo dNTPs, iniciadores randômicos (*random primers*) e transcriptase reversa foi preparada e adicionada a um mesmo volume de RNA (2 µg). A reação de síntese de cDNA foi realizada a 25°C por 10 minutos seguida de 2 horas a 42°C.

4.11.3 Real Time PCR (qPCR)

A avaliação da expressão do mRNA dos genes *Caspase 3*, *Caspase 8*, *Caspase*

9, *TP53*, *Bax* e *Beta-actina* como endógeno, foi realizada por *real time* PCR utilizando o reagente *Sybr Green Master Mix* (LGC Biotecnologia). Para a reação, foram utilizados 10 µL de master mix, 1,6 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse* - 400 nM), 2 µL de cDNA e 4,8 µL de água ultrapura. As amostras foram amplificadas no sistema Line Gene (Bioer Technology) com uma desnaturação inicial de 95°C durante 15 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos e, por último, 72°C durante 30 segundos para os genes de *Caspase-3*, *Caspase-8* e *Bax*. Para o gene de *Tp53*, iniciou-se com uma desnaturação de 50°C por 2 minutos, seguido por um ciclo de 95°C por 15 minutos logo após 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e finalizando com 59°C por 2 minutos. E para o gene *Caspase-9* foi utilizada a seguinte ciclagem: um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos seguido de outro com 95°C por 15 minutos, 40 ciclos com 95°C por 15 segundos, passando por 59°C por 1 minuto e finalizando com 72°C por 30 segundos. Em todas as reações foram realizadas curvas de dissociação (*melting*) para verificar a presença de produtos inespecíficos. Os *primers* foram construídos em junção exón- exón e a sequência dos *primers* utilizados neste ensaio está descrita abaixo.

Tabela 4: Sequência de *primers* utilizados para o ensaio *real time* RT-PCR.

Gene alvo	Sequência dos <i>Primers</i>	Tamanho (pb)
<i>Beta actina</i> <i>Mus musculus</i>	5'CACACCCGCCACCAGTTC3' 5'ATTCCCACCATCACACCCTG3'	161
<i>Bax</i> <i>Mus musculus</i>	5'GCTACAGGGTTTCATCCAGG3' 5'GGAGACACTCGCTCAGCTTC3'	113
<i>Caspase 3</i> <i>Mus musculus</i>	5'GGAGCTTGGAACGCTAAGAA3' 5'GTCCACTGACTTGCTCCCAT3'	112
<i>Caspase 8</i> <i>Mus musculus</i>	5'AGGTACTCGGCCACAGGTTA3' 5'TGGGATGTAGTCCAAGCACA3'	137
<i>Caspase 9</i> <i>Mus musculus</i>	5'TAGCTGGAACACTGGGCATTGAGT3' 5'AACATACCCATCGGTGCATTTGGC3'	139
<i>Tp53</i> <i>Mus musculus</i>	5'-TGGAAGACTCCAGTGGGAAC-3' 5'-TCTTCTGTACGGCGGTCTCT-3'	87

A expressão relativa de cada gene alvo foi normalizada utilizando a expressão dos genes de referência *Beta-actina* para linhagem de camundongo S-180. A expressão relativa foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para análise da eficiência dos *primers* foi realizada a curva padrão, em que foram utilizados os *primers* com valores de eficiências superiores a 90%. A partir da curva padrão (apêndice 2), foram calculados o slope (-3,32) e o coeficiente de correlação (R^2).

4.12. Avaliação Genotóxica: Teste Cometa

Para detecção de danos na fita simples e/ou dupla do DNA, foi utilizada a versão alcalina do ensaio cometa segundo Singh (1988), onde 1×10^5 células de S-180 foram semeadas na ausência ou presença do complexos de Ru 05 [0,27; 0,88 e 1,7 μM] e Ru 08 [10; 14 e 28 μM] ou cisplatina [50 μM] por 24 e 48 horas. Após tratamento, a suspensão de células foram homogeneizadas com 100 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) e, então, colocadas em lâminas que já continham agarose padrão (1,5%). Estas lâminas foram posteriormente colocadas a 4°C por 10 minutos e, em seguida, colocadas em solução de lise (2,4M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris, 10% DMSO e 1% Triton-X, pH 10) por 24 horas. Após etapa de lise, as lâminas foram transferidas para cuba de eletroforese contendo tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH ~13) a 4°C, com uma corrente elétrica de 300 mA e tensão de 25 V. Na etapa seguinte, as lâminas foram retiradas da cuba de eletroforese e posteriormente submetidas a uma solução de neutralização (0,4M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 min. Após a secagem das lâminas, elas foram então fixadas em etanol 100% por 3 min. A coloração das lâminas foi realizada com brometo de etídio (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e analisadas imediatamente após coloração. As lâminas foram preparadas em duplicata e 100 nucleóides foram analisados (50 nucleóides de cada lâmina) utilizando microscópio de fluorescência (Leica, Wetzlar, Alemanha) com interface com um computador. As imagens obtidas foram analisadas em sistema de análise de imagem do *software* CometScore 15 de acordo com a migração dos fragmentos, considerando-se os seguintes parâmetros: comprimento do cometa, diâmetro da cabeça e comprimento da cauda.

A partir destes parâmetros, foi determinada a classe como proposto por Kobayashi *et al.* (1995): classe 0 (nenhum dano), classe 1 (pequeno dano, comprimento da cauda menor do que o diâmetro da cabeça), classe 2 (médio dano, comprimento da cauda uma ou duas vezes o diâmetro da cabeça), classe 3 (dano significativo, comprimento da cauda maior que duas ou três vezes o diâmetro da cabeça), classe 4 (dano significativo, comprimento da cauda maior que três vezes o diâmetro da cabeça). Um valor de índice de dano (ID) foi atribuído a cada um dos nucleóides de acordo com a sua classe, a partir da seguinte equação:

$$ID = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4) \quad (3)$$

onde, n é o número de nucleóides de cada classe analisada. Desta forma, o índice de dano para 100 nucleóides variou de 0 (completamente sem danos: 100×0) a 400 (totalmente danificadas: 100×4) (TICE *et al.*, 2000).

4.13. Análise Estatística

Os resultados, expressos através de Média \pm DP (ou EPM) e Mediana, foram organizados e apresentados na forma de gráficos, tabelas, quadros e figuras. Todas as variáveis sob estudo foram testadas para a hipótese de normalidade.

Para verificar diferenças significativas entre os grupos estudados, foram utilizados e analisados por meio do *software* GraphPad Prism versão 4.0, os testes de análise de variância (ANOVA). Quando detectada diferença significativa entre os grupos, foi aplicado o teste “t” de *Student* e os testes de contraste de Tukey e Dunnet. Para todos os grupos consideram-se estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito da Viabilidade dos Complexos de Rutênio (II) Sobre Linhagens Tumoriais e Normais – Valores de IC₅₀ e IS

Os complexos de rutênio (II) foram submetidos a uma triagem citotóxica a partir do teste do MTT tendo então a IC₅₀ calculada (concentração que inibe 50% das células). Foi realizado esse ensaio de viabilidade celular em linhagens de células normais e tumorais, submetidas ao tratamento com seis tipos de complexos de rutênio (II) por 48 horas (Tabela 5).

Tabela 5: Valores de IC₅₀: Concentração ($\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$) dos complexos de rutênio (II) que inibe 50% da viabilidade celular das células pelo ensaio de redução MTT, tratadas por 48 horas nas concentrações de 0,2 – 200 $\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$. IS = Índice de Seletividade, *IS \geq 2,0.

Complexos de Rutênio II	L-929	PBMC	K562	S-180	IS
Ru 03	1,71 \pm 0,19	2,61 \pm 0,2	1,57 \pm 0,36	1,10 \pm 0,77	2,37*
Ru 14	-	6,22 \pm 0,41	0,29 \pm 0,1	1,12 \pm 0,08	5,55*
Ru 05	2,50 \pm 0,05	3,05 \pm 0,59	1,56 \pm 0,91	0,27 \pm 0,09	11,29*
Ru 16	1,20 \pm 0,72	2,21 \pm 0,34	0,53 \pm 0,18	0,65 \pm 0,25	3,4*
Ru 08	16,44 \pm 3,31	38,84 \pm 17,39	10,17 \pm 1,61	14,94 \pm 3,1	2,59*
Ru 21	8,18 \pm 0,47	53,73 \pm 5,71	11,60 \pm 5,74	17,02 \pm 8,2	3,15*
Cisplatina	29,05 \pm 1,88	-	-	69,83 \pm 0,17	0,41

É possível observar na tabela 5 que alguns resultados isolados se destacaram dentre os complexos de rutênio: na linhagem de K562, as IC_{50} para os complexos Ru 14 e Ru 16 foram de 0,29 μM e 0,53 μM , respectivamente. Na linhagem de S-180, pode-se destacar os complexos de Ru 16 e Ru 03 com valores de IC_{50} de 0,65 μM e 1,10 μM .

Todos os complexos de rutênio (II) testados mostraram-se promissores, pois a IC_{50} encontrada para as células tumorais apresentou-se em uma concentração bem menor que a da cisplatina (fármaco utilizado para o tratamento de diversos tipos de cânceres). Um exemplo disso é o complexo Ru 21, que obteve uma IC_{50} de 17,02 μM para as células de S-180 e IC_{50} de 69,83 μM para células tratadas com cisplatina.

No que diz respeito às células normais, também se obtiveram resultados interessantes, já que as IC_{50} das células normais foram maiores do que as das células tumorais nos complexos de rutênio (II), destacando-se novamente em relação ao resultado da cisplatina, em que a IC_{50} da célula normal é várias vezes menor em relação à célula tumoral. Um exemplo em que um dos complexos de rutênio se destacou é o complexo de Ru 05, que teve um resultado de IC_{50} de 0,27 e 2,50 μM para as células de S-180 e L-929 respectivamente, sendo muito promissor se comparado a IC_{50} encontrada para cisplatina, que foi de 69,83 e 29,05 μM para as mesmas linhagens de células, mostrando que a cisplatina apresenta um elevado grau de citotoxicidade, já que a IC_{50} da célula normal (L-929) foi várias vezes menor do que a IC_{50} da célula tumoral (S-180), acarretando efeitos colaterais no paciente.

Os complexos de Ru 05 e Ru 08 se destacaram entre os complexos de rutênio (II) quando comparados as linhagens tumorais às normais. Os resultados obtidos de IC_{50} para o complexo de Ru 05 foi o menor dentre as células tumorais, sendo de 1,56 μM para a K562 e de 0,27 μM para o S-180. Além disso, a IC_{50} foi maior para as linhagens normais de L-929 e linfócito, com valores de 2,50 e 3,05 μM , respectivamente.

Já os resultados para o complexo de Ru 08 foram de 10,17 μM para a K562 e de 14,94 μM para as células de S-180. Encontrou-se também IC_{50} de 16,44 e 38,84 μM para L-929 e linfócito, respectivamente. Esse complexo se sobressaiu, por apresentar uma grande diferença de citotoxicidade das células tumorais para as normais. Os

complexos de rutênio (II) testados tiveram destaque, pois foi necessária uma concentração muito baixa para desencadear morte celular em metade das células tratadas. Outro ponto positivo é que a IC₅₀ das células normais estão em concentrações maiores em relação às células tumorais, mostrando então que esses complexos de rutênio (II) são promissores como fármacos antitumorais.

O aumento dos casos de câncer em todo mundo e o efeito colateral significativo da cisplatina e outros quimioterápicos utilizados no tratamento dessa doença têm motivado extensas investigações sobre as terapias alternativas de câncer à base de metal. Neste cenário, os complexos de rutênio são considerados um dos complexos mais promissores, uma vez que um grande número de complexos de rutênio demonstrou exibir alta atividade anticâncer (SCHATZSCHNEIDER *et al.*, 2008).

Muitos complexos de rutênio (II) já foram testados e uma de suas características é a de apresentar baixos valores de IC₅₀, ou seja, serem citotóxicos para as células tumorais (XIE *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013). Entretanto, esses complexos de rutênio (II) estudados obtiveram relativamente maior destaque, pois apresentaram valores de IC₅₀ muito baixos. Chen *et al.* (2013) testaram quatro diferentes complexos de rutênio (II) β-carbonila frente a diversos tipos de células tumorais, as menores IC₅₀ encontradas foram de 28,4 μM e 15,1 μM para o [Ru(tpy)(dip)(Nh)]²⁺ frente às linhagens HCT-116 (câncer colorctal) e A375 (melanoma), respectivamente. Para o [Ru(tpy)(bpy)(Nh)]²⁺, que também possui ligantes bipyridina, as menores IC₅₀ encontradas foram de 34,1 μM e 42,6 μM para as linhagens A375 (melanoma) e Bel-7402 (câncer de fígado), respectivamente.

Xie *et al.* (2013) testaram dois complexos de rutênio (II) frente a algumas linhagens de células tumorais. O composto [Ru(bpy)₂(addppn)](ClO₄)₂ obteve as menores IC₅₀ para Bel-7402 (câncer de fígado) e SKBR-3 (câncer de mama), sendo de 12,8 μM e 12,6 μM, respectivamente. Assim, nota-se que a citotoxicidade desses novos complexos de rutênio (II) com ligantes inéditos testados neste trabalho é maior do que para outros complexos de rutênio (II) encontrados na literatura.

Dentre os seis complexos de rutênio testados, os complexos de Ru 05 e Ru 08 obtiveram destaque em seus resultados, com uma IC₅₀ de 0,27 μM e 14 μM para as

células de S-180, respectivamente. Esse resultado foi muito promissor se comparado a IC_{50} da cisplatina (fármaco utilizado no tratamento de vários tipos de cânceres), que foi de 69 μM . Wang *et al.* (2013) testaram seis complexos de rutênio (II) frente a algumas linhagens celulares cancerígenas. Para a linhagem MG-63, um osteosarcoma, os complexos $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HPIP})(\text{ClO}_4)_2$ ($\Delta\text{-Ru1}$) e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})_2][\text{O},\text{O0-dibenzoyl-D-tartrate}]$ ($\Delta\text{-Ru3}$) apresentaram uma IC_{50} de 12,7 μM e 126,1 μM , respectivamente. Apesar de interessante, estas concentrações foram maiores que a IC_{50} da cisplatina, que foi de 7,5 μM para essa mesma linhagem. Deste modo, a IC_{50} dos dois complexos de Ru 05 e Ru 08 demonstraram ser promissoras, pois além de serem baixas em relação a outros compostos de rutênio (II), foram ainda menores que a IC_{50} de um fármaco já adotado em terapias anticâncer.

Ainda no que diz respeito aos resultados encontrados na triagem citotóxica, a maioria dos complexos de rutênio exibiu maior citotoxicidade nas linhagens tumorais do que nas linhagens não tumorais, enquanto que a cisplatina apresentou uma IC_{50} alta tanto para a linhagem de célula não tumoral como para a linhagem tumoral que foi testada.

O índice de seletividade (IS) indica um valor de seletividade para células tumorais tratadas com determinado complexo e o seu potencial uso para os testes pré-clínicos *in vivo* e clínicos. O IS foi calculado utilizando os valores de IC_{50} para as células de S-180 e Linfócito para todos os complexos de rutênio II e para o fármaco utilizado como controle positivo, a cisplatina, foi utilizada o valor de IC_{50} das células de L-929 juntamente com o valor de IC_{50} das células de S-180.

Os valores do $IS \geq 2$ são considerados estatisticamente significativos, portanto, de acordo com a tabela 5, todos os complexos de rutênio apresentaram seletividade para células tumorais. Dentre esses complexos, o que mais se destacou foi o Ru 05 com um índice de seletividade de 11,29. O Ru 08 apresentou um valor de IS de 2,59, também sendo escolhido para a condução de novos testes para o estudo do mecanismo de morte celular e genotoxicidade por apresentar estrutura muito semelhante ao Ru 05.

O IS foi significativo para todos os complexos de rutênio testados, exceto para cisplatina. Sugerindo que os complexos de rutênio têm seletividade para as células tumorais. Em trabalhos recentes, os valores de IS maiores que três têm sido

considerados extremamente seletivos (MAHAVORASIRIKUL *et al.*, 2010; CHELOPO *et al.*, 2013). Em geral, este grupo de complexos de rutênio (II) apresentam a mesma tendência da atividade com um IS superior a 3, por isso eles parecem ser promissores como agentes anticancerígenos seletivos.

Diante desses resultados de triagem citotóxica e de IS, foram selecionados dois desses complexos, Ru 05 por apresentar melhor resultado de IS e o Ru 08 pela semelhança estrutural em relação ao Ru 05 e por apresentar um valor de seletividade significativo apesar de bem mais baixo em relação ao Ru 05. A partir do valor de IC₅₀ desses dois complexos, foram realizados outros testes para elucidar seu mecanismo de morte na linhagem celular de S-180.

5.2. Os Complexos de Ru 05 e Ru 08 Desencadeiam Parada na Fase G0/G1 do Ciclo Celular

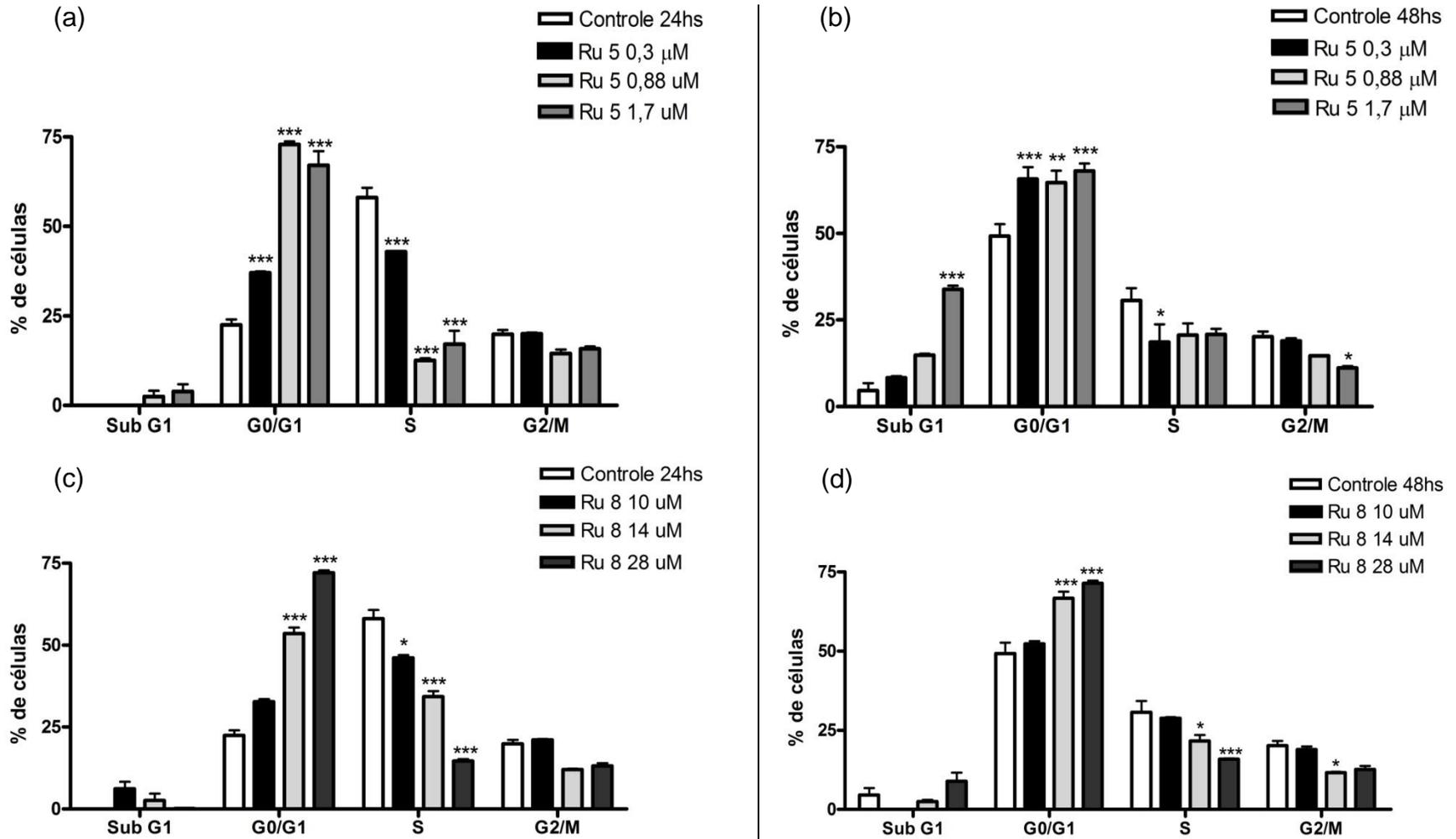
A análise do ciclo celular por citometria de fluxo foi realizada corando as células com PI; o programa Mod Fit estimou a porcentagem de células apresentadas nas diferentes fases do ciclo (sub-G1, G0/G1, S e G2/M). As figuras 7 e 8 demonstram as mudanças na distribuição do ciclo quando comparadas ao controle das células tratadas com os complexos de Ru 05 [0,3; 0,88 e 1,7 µM] e Ru 08 [10; 14 e 28 µM] em 24 e 48 horas.

Nos resultados relacionados ao complexo de Ru 05 (Figura 7a e 7b), todas as concentrações foram estatisticamente significativas, aumentando a quantidade de célula na fase G0/G1 em relação ao controle, tanto em 24 quanto em 48 horas. Entretanto, as concentrações de 0,88 µM e 1,7 µM se destacaram, pois houve um aumento de células nesta fase G0/G1 de 24% no controle para 72% e 67% em 0,88 µM e 1,7 µM, respectivamente.

Conseqüentemente, houve uma redução estatisticamente significativa nos valores de células na fase S (síntese) para o complexo de Ru 05, caindo de 58% no controle para 12% e 17% nas concentrações de 0,88 µM e 1,7 µM em 24 horas. Esse aumento de células após o tratamento na fase de G0/G1 também ocorreu em 48 horas nas concentrações testadas de 0,3 µM, 0,88 µM e 1,7 µM, nas quais se obteve um total

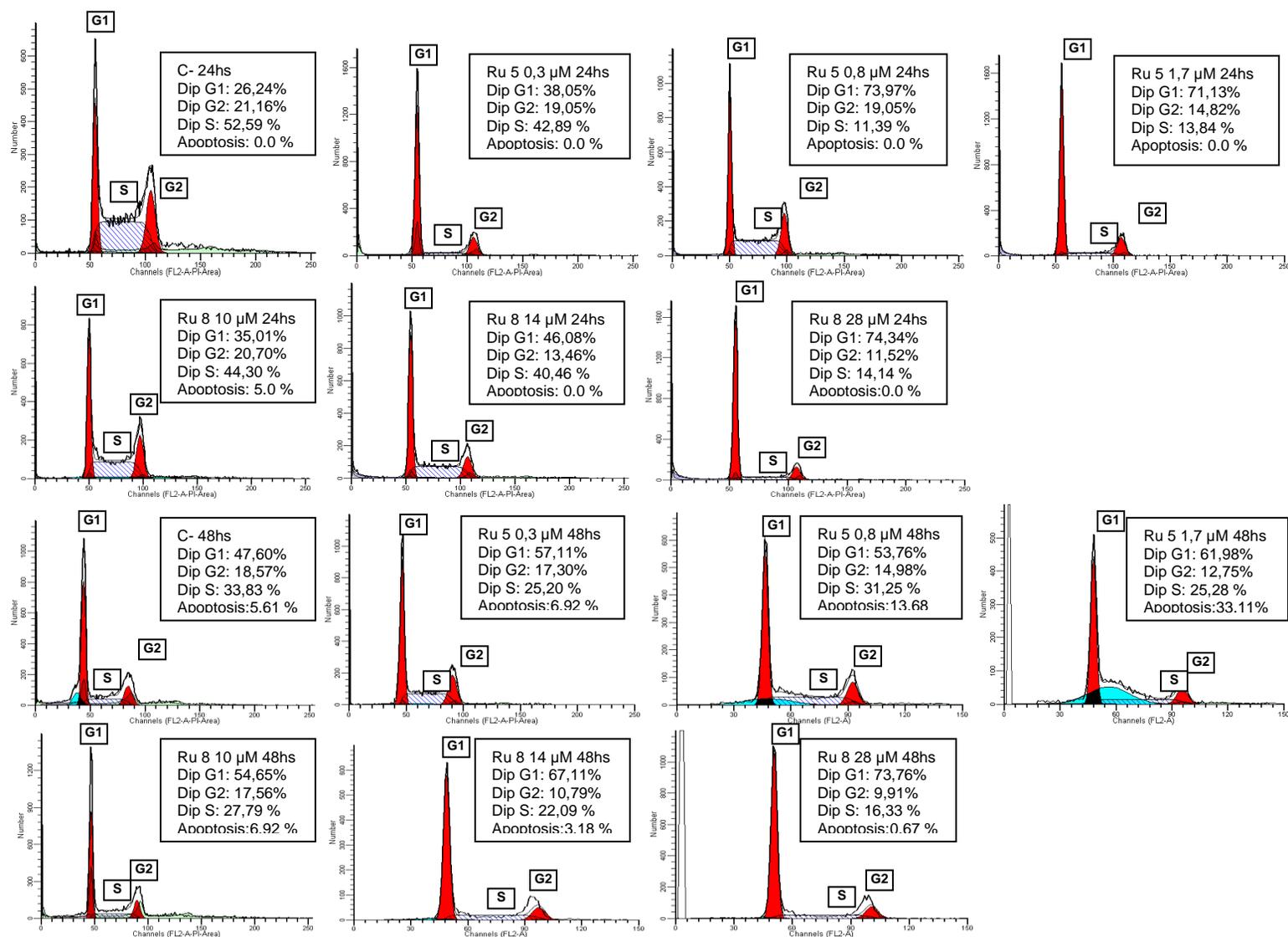
de 65%, 64% e 68% de células, respectivamente, nessas concentrações, o que foi significativo se comparado ao controle com 49% de células nessa fase.

Figura 7: Efeitos dos complexos de Ru 05 (a e b) e Ru 08 (c e d) na cinética do ciclo celular sobre a linhagem tumoral de S-180 em 24 (a e c) e 48 (b e d) horas de exposição.



Cada valor representa a média \pm DP de três experimentos independentes. Diferenças significativas em relação ao grupo controle (sem tratamento) foram indicadas por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 8: Histogramas com o perfil das células do ciclo celular de S-180 tratadas com os complexos de Ru 05 e Ru 08 em 24 e 48 horas.



Fluorescência de PI foi analisada por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience).

Na figura 7b, em 48 horas de tratamento do Ru 05 na concentração de 1,7 μM , houve um aumento de células na fase de sub-G1 com 33% das células permanecendo nessa fase, resultado maior e estatisticamente significativo em relação ao controle, cujas 4% de células somente estavam em sub-G1.

Nos estágios tardios da apoptose, o DNA é clivado por endonucleases em fragmentos de 200 pb ou múltiplos. Durante o processamento para análise do ciclo celular, as células são fixadas em etanol 70% seguidas de lavagem com tampão de extração. Este processo remove o DNA fragmentado e as células com baixo conteúdo de DNA aparecem na região Sub-G1 do histograma (POMPILHO, *et al.*, 2013). As células que aparecem nessa região podem ser consideradas em processo de apoptose, por isso infere-se que o complexo de Ru 05 apresentou indicativo de apoptose, pois aumentou significativamente a quantidade de células na fase sub-G1 na concentração de 1,7 μM após o tratamento de 48 horas.

De acordo com os resultados do Ru 08 (figura 7c e 7d), houve também um aumento significativo de células na fase G0/G1 para as concentrações de 14 μM e 28 μM , apresentando respectivamente 53% e 72% de células nesta fase do ciclo, sendo superior ao controle em que 22% das células estavam nesta etapa do ciclo em 24 horas.

Na fase de síntese, houve também uma redução de células, em relação ao controle, depois de tratadas com as diferentes concentrações do complexo. No controle, 58% das células estavam em síntese, para as concentrações de 14 e 28 μM obteve-se 34% e 14% de células nesta fase, respectivamente.

Em 48 horas, o Ru 08 conservou o comportamento de 24 horas, apresentando um aumento de células na fase G0/G1 nas concentrações de 14 μM e 28 μM , obtendo 66% e 71% de acúmulo de células nessa fase, sendo estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo com 49% de células. E ocorreu também uma redução das células na fase de síntese, indicando que o Ru 08 também desencadeia parada do ciclo celular na fase G0/G1, tentando impedir que as células continuem o processo de divisão tanto em 24 quanto em 48 horas, diferindo do Ru 05 apenas por não apresentar aumento significativo de sub-G1 em nenhum dos tempos estudados.

Xie et. al. (2013) também obtiveram resultados similares para um complexo de rutênio (II) polipiridínico $[\text{Ru}(\text{dmp})_2(\text{AHPIP})](\text{ClO}_4)_2$ em linhagem tumoral de câncer de fígado Bel-7402, em que o complexo induziu parada do ciclo celular e apoptose de forma dose-dependente, entretanto, as concentrações testadas foram maiores que a dos compostos estudados variando de 12 μM a 50 μM . Este complexo também não induziu aumento no pico de sub-G1, assim como o complexo estudado Ru 08.

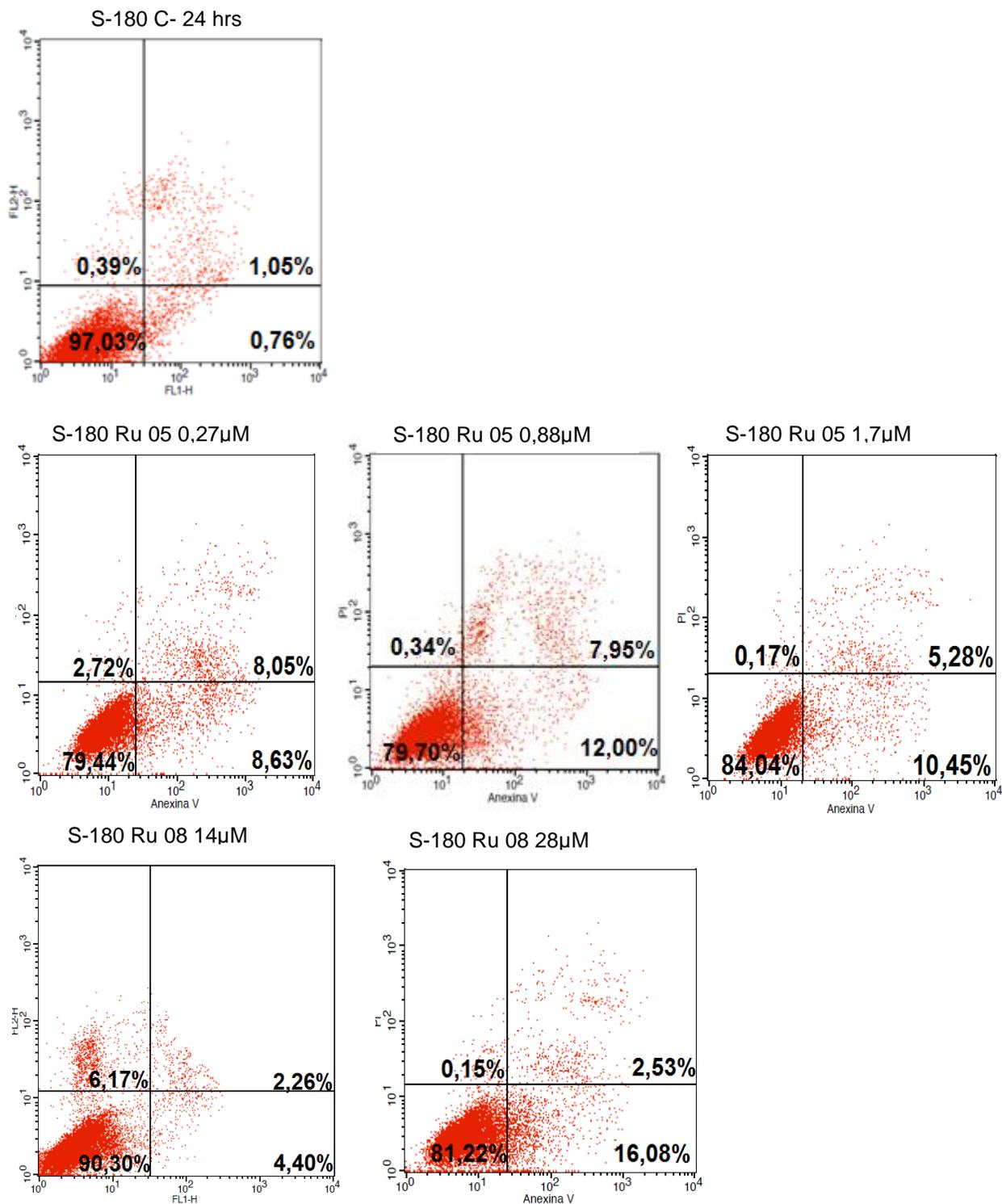
Chen et al. (2013) estudaram a cinética do ciclo celular das células Hela (câncer colón de útero) tratadas com o complexo de rutênio (II) $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{Nh})_3](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ em 24 horas e obtiveram um aumento significativo dependente da dose na proporção de células em apoptose refletida pelo pico de sub-G1, variando de 4,2% na concentração de 1 μM , para 32,5% na concentração de 5 μM . Houve também um moderado aumento na fase G0/G1. Esses resultados são similares aos encontrados para o Ru 05, apresentando um aumento de células no pico de sub-G1, evidenciando um indicativo de morte celular por apoptose em concentrações próximas a 1 μM , observa-se ainda a parada do ciclo celular na fase G0/G1.

Importantes classes de quimioterápicos antineoplásicos atuam durante o ciclo celular. Estes apresentam mecanismos de ação variados e exibem especificidade em termos da fase do ciclo em que têm atividade. Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram em uma fase específica do ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos (CCS) (DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Possivelmente, essa classe de complexos de Ru 05 e Ru 08 apresentam esse perfil, pois ambas parecem exercer seus efeitos na fase G0/G1 do ciclo celular, impedindo a proliferação das células.

5.3. Análise do Mecanismo de Morte Celular por Anexina V

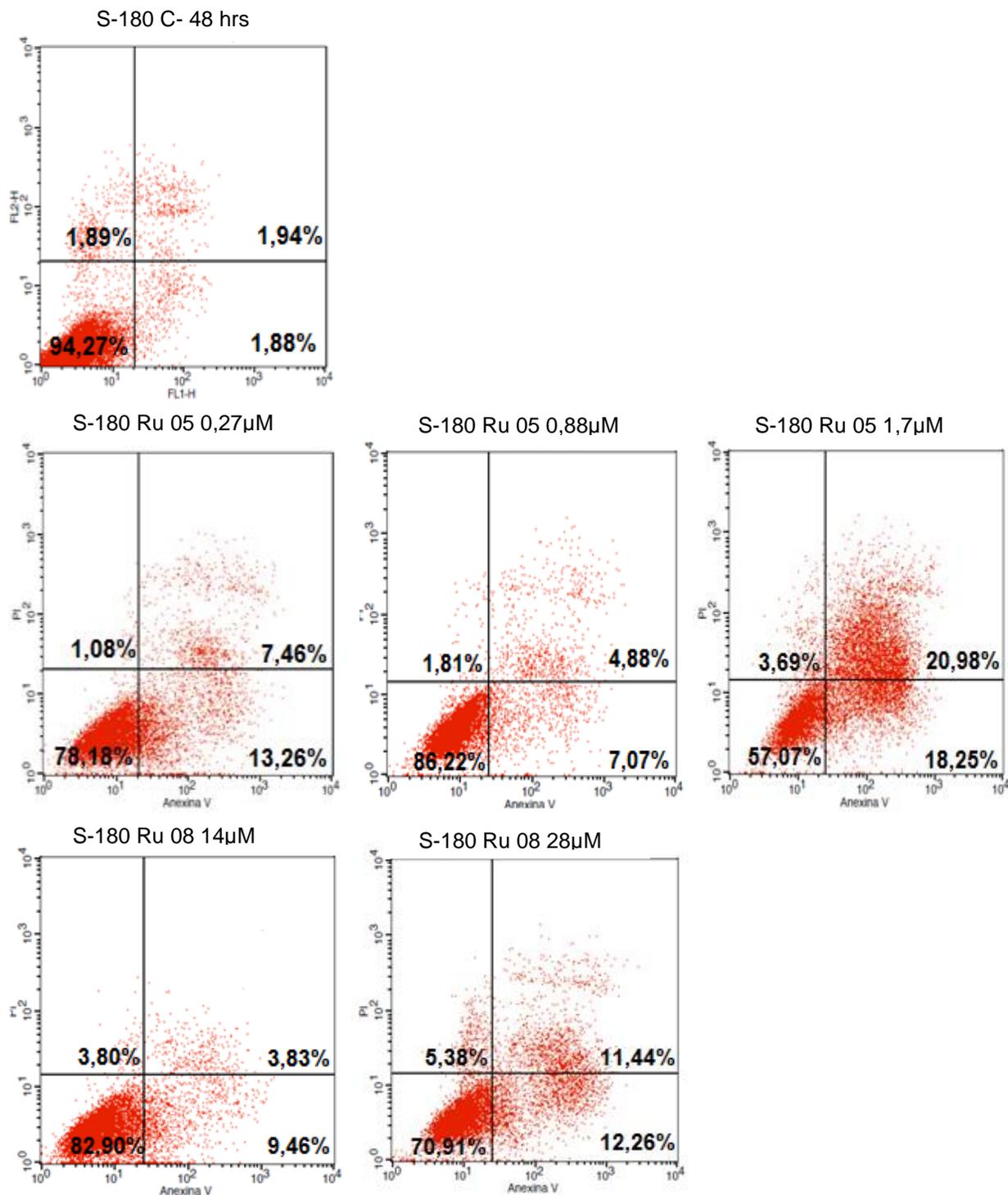
Para determinar a porcentagem de morte celular por apoptose e necrose de S-180, as células foram tratadas com os Ru 05 [0,27; 0,88 e 1,7 μM] e Ru 08 [14 e 28 μM] por 24 e 48 horas, seguindo de análise no citômetro de fluxo. As figuras 9 e 10 mostram a porcentagem de células vivas, células em apoptose inicial, células em apoptose tardia e células necróticas em 24 e 48 horas de tratamento, respectivamente.

Figura 9: Análise por citometria de fluxo dos efeitos dos complexos de Ru 05 e Ru 08 na indução de morte celular através do teste de dupla marcação: Anexina V-FICT/PI em 24 horas de tratamento.



Cada valor representa a média ± DP de três experimentos independentes. Controle negativo composto de células sem tratamento. Os gráficos mostram fluorescência de Anexina V (abscissa, escala logarítmica) versus fluorescência PI (ordenada, escala logarítmica).

Figura 10: Análise por citometria de fluxo dos efeitos dos complexos de Ru 05 e Ru 08 na indução de morte celular através do teste de dupla marcação: Anexina V-FICT/PI em 48 horas de tratamento.



Cada valor representa a média \pm DP de três experimentos independentes. Controle negativo composto de células sem tratamento. Os gráficos mostram fluorescência de Anexina V (abscissa, escala logarítmica) versus fluorescência PI (ordenada, escala logarítmica).

Em 24 horas, tanto as células tratadas com o Ru 05 nas concentrações de 0,27; 0,88 e 1,7 μM , quanto às células tratadas com o Ru 08 nas concentrações de 14 e 28 μM , apresentaram redução da quantidade de células viáveis em relação ao controle negativo (Figura 9). Houve também um aumento significativo de apoptose inicial e tardia nas três concentrações do complexo de Ru 05, com destaque para a concentração de 0,88 μM , que apresentou 12% de apoptose inicial, 7,95% de apoptose tardia e 79,7% de células viáveis quando comparada ao controle com 0,7% de apoptose inicial, 1% de apoptose tardia e 97,83% de células viáveis.

Houve um aumento estatisticamente significativo de células em apoptose inicial em 24 horas para o Ru 08. Para esse complexo, o aumento foi expressivo apenas para apoptose inicial nas concentrações de 14 μM e 28 μM que foi 4,40% e 16,08%, respectivamente. Houve um aumento na quantidade de células em necrose para o tratamento com o Ru 08, tendo sido de 0,39% no controle negativo para 6% na concentração de 14 μM . Entretanto, nenhuma outra concentração aumentou a quantidade de necrose nem mesmo em 48 horas.

Para as células tratadas em 48 horas com os Ru 05 e Ru 08 houve um aumento significativo na porcentagem de células em apoptose inicial e tardia e, conseqüentemente, uma redução das células viáveis na maioria das concentrações. O controle negativo apresentou 94,27% de células viáveis, 1,88% em apoptose inicial e 1,94% em apoptose tardia, havendo uma diferença significativa quando comparada ao Ru 05 na concentração de 1,7 μM , em que se obteve 57,07% de células viáveis, 18,25% de apoptose inicial e 20,98% de apoptose tardia e, em relação ao Ru 08 na concentração de 20 μM , foram encontradas 70,91% de células viáveis, 12,26% de apoptose inicial e 11,44% de apoptose tardia. Os dados sugerem que os dois complexos de rutênio testados (Ru 05 e Ru 08) estejam desencadeando morte celular por apoptose, porém foram necessários a realização de outros testes para confirmar se é nessa via de morte que o complexo atua, já que segundo Galuzzi *et al* (2012), a exposição de fosfadilserina na membrana celular externa, que pode ser detectada pela anexina V, não é prerrogativa de apoptose, podendo estar associada também a outras vias de morte como parthanatos e netoses.

Vários estudos realizados com complexos de rutênio (II) mostram que eles induzem morte celular por apoptose em diferentes linhagens de células (KASPER *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013), alguns trabalhos relatam a capacidade desses complexos de ativar a parada do ciclo celular. A morte celular por apoptose causada por esses complexos de rutênio (II) descritos na literatura pode ocorrer por vias diferentes. Desta forma, observa-se que a via pela qual o processo de morte celular vai ocorrer depende muito dos tipos de ligantes ao qual esses complexos de rutênio são sintetizados. Uma característica marcante dos complexos estudados neste trabalho é a concentração a que foi submetido o tratamento nas células de S-180, pois quando comparado a outros trabalhos da literatura, o valor da concentração utilizada pelo estudo foi bem menor em relação aos complexos já testados, principalmente a concentração do Ru 05, que foi equivalente a 0,27 μM . Mostrando que são necessárias investigações mais precisas em busca de um grande protótipo para o tratamento do câncer.

A inibição da proliferação de células tumorais pode resultar da indução de apoptose ou parada do ciclo celular, ou ainda a sua combinação (YANG *et al.*, 2012). De acordo com os resultados apresentados para o ciclo celular e a anexina V (figuras 07 e 09), sugere-se que os complexos de Ru 05 e Ru 08 induzem parada no ciclo celular na fase G0/G1 e é sugestivo de apoptose pelo teste de anexina V nas células de S-180, portanto previamente, pode-se inferir que possivelmente esses novos complexos induzem inibição celular com uma combinação dos dois mecanismos.

5.4. Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial das Células Tratadas com Complexos de Ru 05 e Ru 08

A detecção da mudança do potencial de membrana mitocondrial fornece uma indicação do início da apoptose. A perda desse potencial de membrana mitocondrial pode ser detectada por um corante catiônico fluorescente conhecido como JC-1. Dependendo do estado do potencial da membrana mitocondrial, esse corante pode se apresentar em duas formas: J-agregados ou monômeros, e suas emissões detectáveis

por citometria de fluxo são de 590 nm (canal FL2) ou 520 nm (canal FL1), respectivamente.

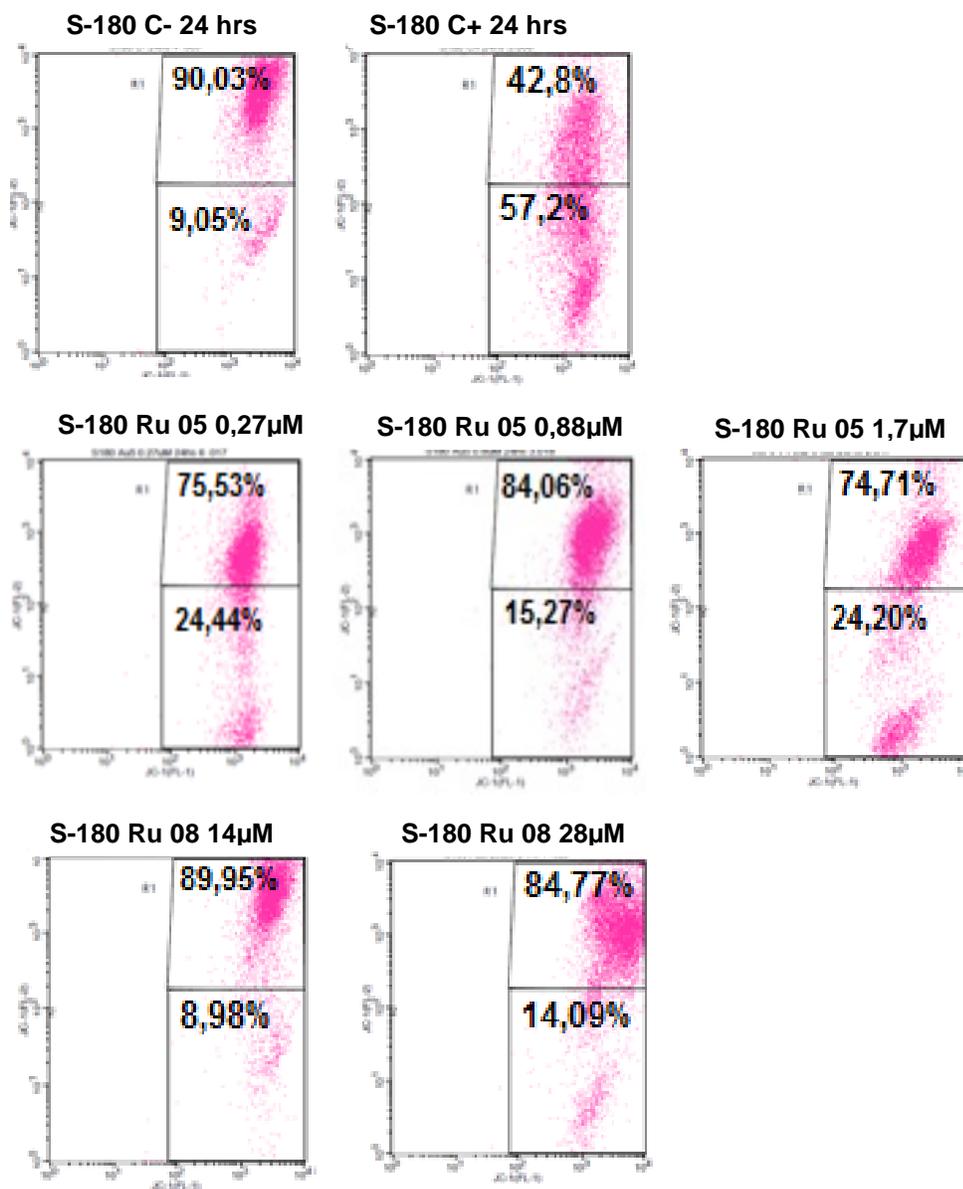
O potencial de membrana mitocondrial de células normais, ou seja, as células que têm mitocôndrias funcionais é elevado, carregados com JC-1 permite a formação de J-agregados. À medida em que o potencial de membrana mitocondrial diminui, eles se dissipam em monômeros e, assim, detecta-se a mudança no potencial de membrana, que é característica de apoptose dependente da mitocôndria. A figura 11 mostra a detecção do potencial de membrana de células tratadas com Ru 05 e Ru 08.

Nas células tratadas com o Ru 05, observou-se uma perda do potencial de membrana mitocondrial em relação ao controle negativo para os tratamentos nas concentrações de 0,27; 0,88 e 1,7 μM . A população de células deslocou-se para FL1, ou seja, o corante se apresentou na forma de monômero dentro da célula, saindo de uma população de apenas 9,05% na forma de monômeros no controle negativo, para 24,44%, 15,27%, 24,20% para as concentrações de 0,27, 0,88 e 1,7 μM respectivamente, alterando assim o potencial de membrana mitocondrial das células em todas as concentrações testadas.

Para o Ru 08 não houve diferença estatística observada entre o tratamento de 14 μM (8,98%) e o controle negativo (9,05%), porém houve uma moderada alteração na concentração de 28 μM , com 14,09% das células na forma em que o corante formava monômeros.

Esses resultados indicam que o complexo de Ru 05 altera o potencial de membrana mitocondrial, que é uma característica da via apoptótica desencadeada pela mitocôndria. Observou-se também que o complexo de Ru 08 causou uma leve alteração, porém não foi significativa para o potencial de membrana mitocondrial, podendo inferir que não ocorrerá participação da mitocôndria no desencadeamento da apoptose no tratamento com o Ru 08.

Figura 11: Detecção do potencial de membrana mitocondrial utilizando o corante JC-1 em células de S-180 tratadas com os complexos de Ru 05 e Ru 08 por 24 horas.



Controle negativo contém apenas meio de cultura e células, controle positivo tratado com peróxido de hidrogênio [0,01%]. Dados representam as médias (n = 9).

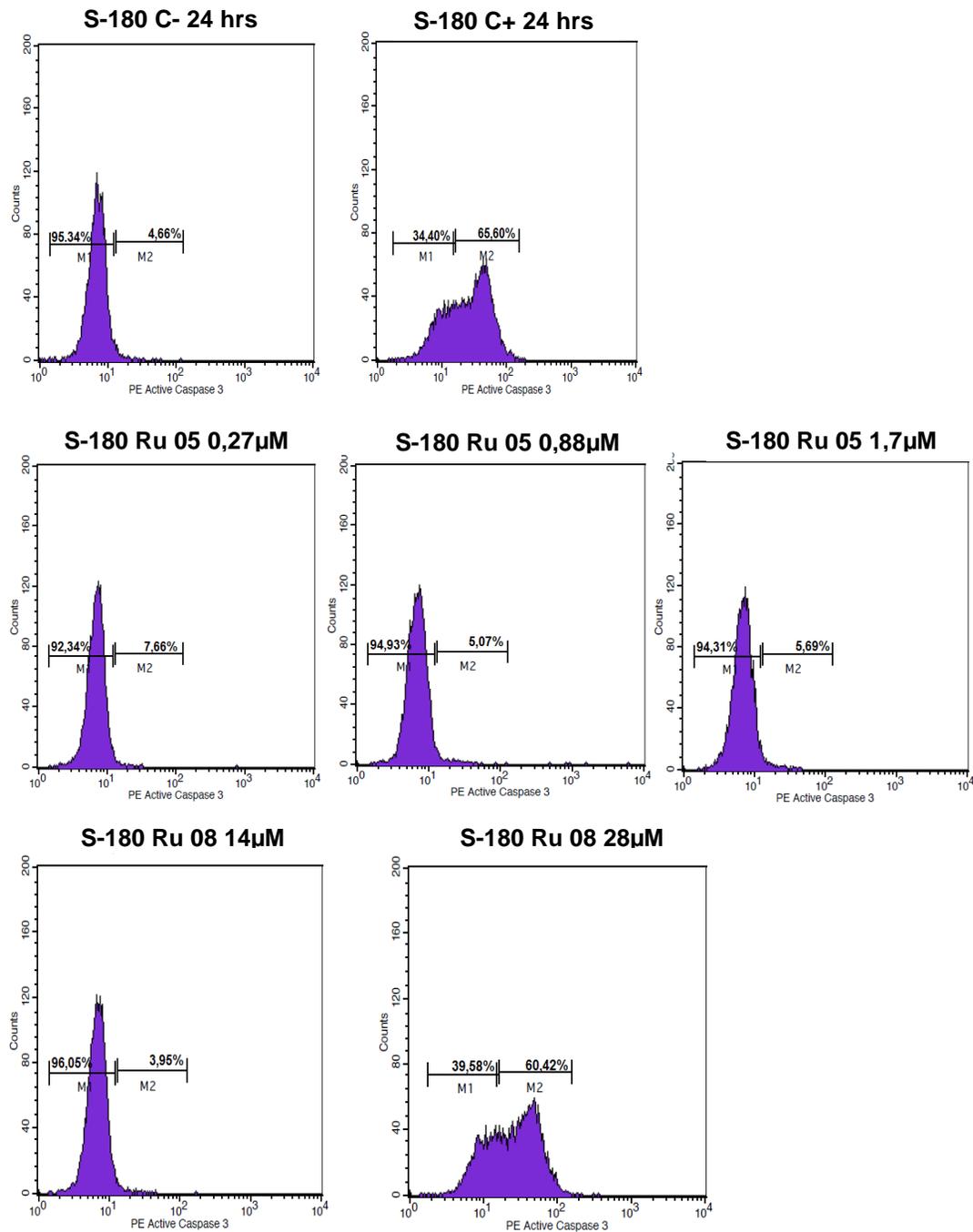
5.5. Avaliação da Presença ou Ausência da Proteína Caspase 3 Ativa em Células Tratadas com os Complexos de Ru 05 e Ru 08 por Citometria de Fluxo

A Caspase 3 é um tipo de caspase efetora que é ativada para efetivar o processo de apoptose. Foi avaliado se há presença da proteína Caspase 3 ativa nas células tratadas com complexos de Ru 05 e Ru 08 a partir de um ensaio por citometria de fluxo no tempo de 24 horas. Neste ensaio o anticorpo anti-caspase 3 ativa conjugado com o corante PE se ligando apenas nas células em que a proteína Caspase 3 está ativa, o que é demonstrado na figura 12 como o pico de células denominado M₂, referindo-se à porcentagem de células que têm a proteína Caspase 3 ativa em determinado tratamento. O pico de células denominado M₁ refere-se às células negativas para a presença da proteína caspase 3 ativa, ou seja, que não têm atuação da caspase 3 ativa.

Todas as concentrações testadas do Ru 05 [0,27; 0,88 e 1,7µM] tiveram o mesmo perfil do controle negativo, não havendo presença de Caspase 3 ativa em quantidade significativa para o tratamento com este complexo. Na concentração de 0,27 µM do Ru 05, 92,34% das células foram negativas para a presença de Caspase 3 ativa, tendo apenas 7,66% de células neste tratamento com presença de Caspase 3 ativa, semelhantemente ao controle negativo, em que 95,34% das células foram negativas para presença de Caspase 3 ativa, e 4,66% das células deste tratamento mostraram ter essa proteína ativa.

Para o Ru 08 as células com tratamento de 14 µM se comportou igualmente ao Ru 05, mas na concentração de 28 µM, houve um aumento para 60,42% de células que apresentam a proteína Caspase 3 ativada atuando no ambiente celular, sendo estatisticamente significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,001$). Esse resultado foi semelhante ao do controle positivo tratado com peróxido de hidrogênio (0,01%), em que foi detectado Caspase 3 ativa atuando em 65,40% das células.

Figura 12: Análise por citometria de fluxo da população de célula de S-180 para proteína Caspase 3 ativa depois de tratadas com os Ru 05 e Ru 08 por 24 horas.



Células negativas para a presença de Caspase 3 ativa foram marcadas em M₁. Células positivas para a presença de Caspase 3 ativa foram marcadas em M₂. Controle negativo contém apenas meio de cultura e células, controle positivo tratado com peróxido de hidrogênio [0,01%]. Dados representam as médias (n = 9).

Portanto, os resultados sugerem que o complexo de Ru 05 parece não ativar a proteína Caspase 3, já que não foi encontrada em nenhuma de suas concentrações uma porcentagem significativa desta proteína ativa. Já o tratamento com complexo de Ru 08 apresentou uma grande quantidade de célula com essa proteína ativa na concentração de 28 μ M.

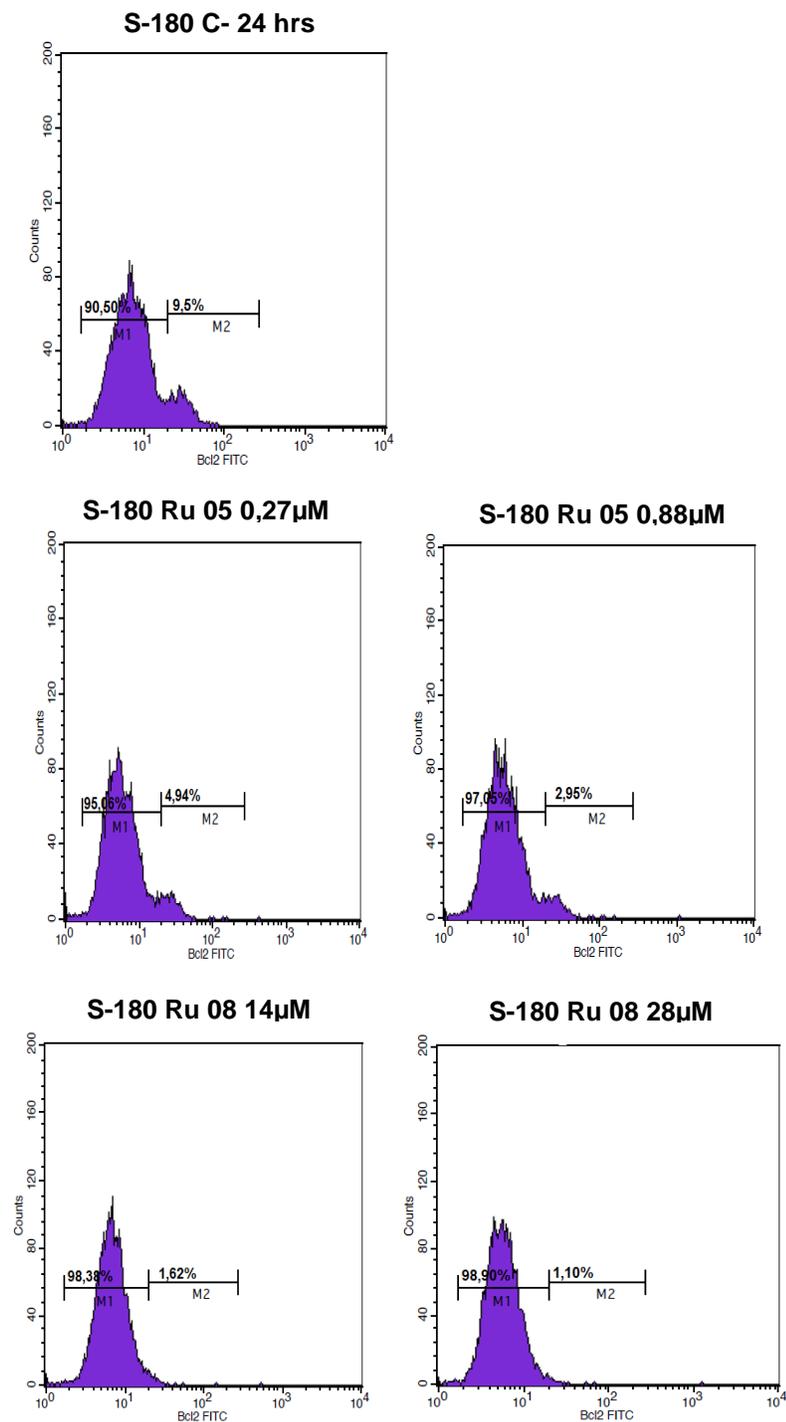
5.6. Avaliação da Presença ou Ausência da Proteína Bcl2 em Células Tratadas com os Complexos de Rutênio 05 e 08 por Citometria de Fluxo

Membros da família Bcl-2 têm sido descritos como reguladores-chave da função mitocondrial durante a apoptose. Membros pró-sobrevida, ou anti-apoptóticos, associam-se à membrana mitocondrial externa e mantêm sua integridade. Em contraste, membros pró-apoptóticos como o Bax, associam-se à membrana mitocondrial externa e causam a liberação de fatores que desencadeiam a apoptose no citosol (LUGLI *et al.*, 2005; MARVETTI *et al.*, 2011; QIAN *et al.* 2013). A Bcl2 é uma proteína anti-apoptótica, sua presença nas células tratadas com os complexos de Ru 05 e Ru 08 foi avaliada por citometria de fluxo no tempo de 24 horas (Figura 13).

Na figura 13, observa-se que o pico denominado M₂ refere-se às células que apresentam Bcl2 ativa, e o pico M₁ à quantidade de células que não têm presença de Bcl2 ativa. Houve uma redução na quantidade de células com Bcl2 ativa do controle para os tratamentos dos complexos de Ru 05 e Ru 08, sendo estatisticamente significativa em todas as concentrações testadas. Para o complexo de Ru 05 na concentração de 0,88 μ M, obteve-se 2,95% de células com a proteína Bcl2 ativa e para o Ru 08 na concentração de 28 μ M, apenas 1,10% das células tinha Bcl2 ativa, sendo menor que o controle negativo em que 9,5% de células obtiveram a proteína ativa.

Portanto, o tratamento com os complexos de Ru 05 e Ru 08 parece diminuir a expressão da proteína Bcl2 na sua forma ativa nas células de S-180.

Figura 13: Análise por citometria de fluxo da população de célula de S-180 para proteína Bcl2 depois de tratadas com os complexos de Ru 05 e Ru 08 por 24 horas.



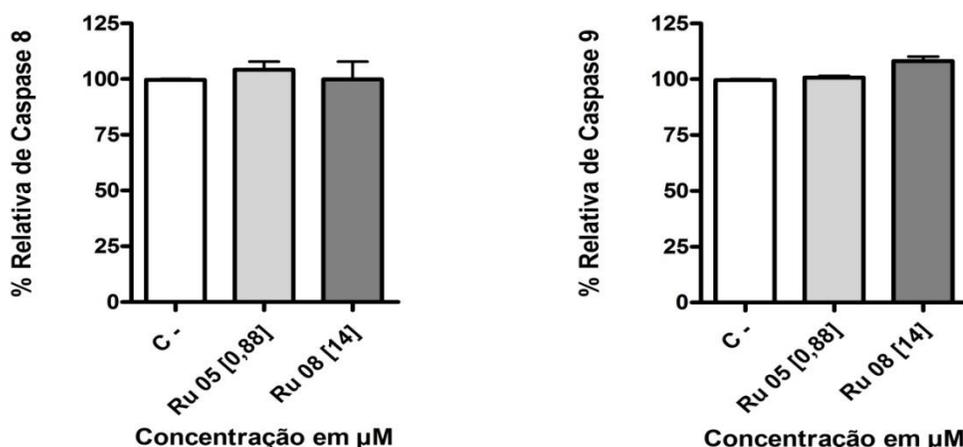
Células negativas para a presença de Bcl2 foram marcadas em M₁. Células positivas para a presença de Bcl2 foram marcadas em M₂. Controle negativo contém apenas meio de cultura e células, controle positivo tratado com peróxido de hidrogênio [0,01%]. Dados representam as médias (n = 9).

5.7. Atividade de Caspases 8 e 9 nos Tratamentos com os complexos de Ru 05 e Ru 08

Os efeitos dos complexos de Ru 05 e Ru 08 sobre a atividade enzimática das proteínas Caspases 8 e 9 foram investigados por meio do ensaio colorimétrico após 24 horas de tratamento.

O teste foi realizado apenas em uma concentração próxima a IC_{50} para cada complexo de rutênio. Os resultados estão apresentados na figura 14. Pode-se observar que a atividade enzimática, tanto da proteína Caspase 8 quanto da proteína Caspase 9 não apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo quando tratadas com os complexos de Ru 05 (0,88 μ M) e Ru 08 (14 μ M). Entretanto, houve um moderado aumento na atividade da proteína Caspase 9 para o complexo de Ru 08 na concentração de 14 μ M.

Figura 14: Atividade de Caspase 8 e 9 sobre linhagem de S-180 depois de tratadas com os complexos de Ru 05 e Ru 08 por 24 horas.



Cada coluna apresenta media \pm DP de dois experimentos (n = 6).

5.8. Análise da Expressão de Genes Envolvidos na Morte Celular

Os efeitos dos complexos de Ru 05 e Ru 08 sobre a expressão do mRNA dos genes de *Caspase-3*, *Caspase-8*, *Caspase-9*, *Bax* e *Tp53* foram analisados por PCR em tempo real quantitativa, em duas concentrações próximas a IC_{50} encontrada, sendo

0,27 e 0,88 μM para o complexo de Ru 05 e 14 μM para o complexo de Ru 08 (figura 15).

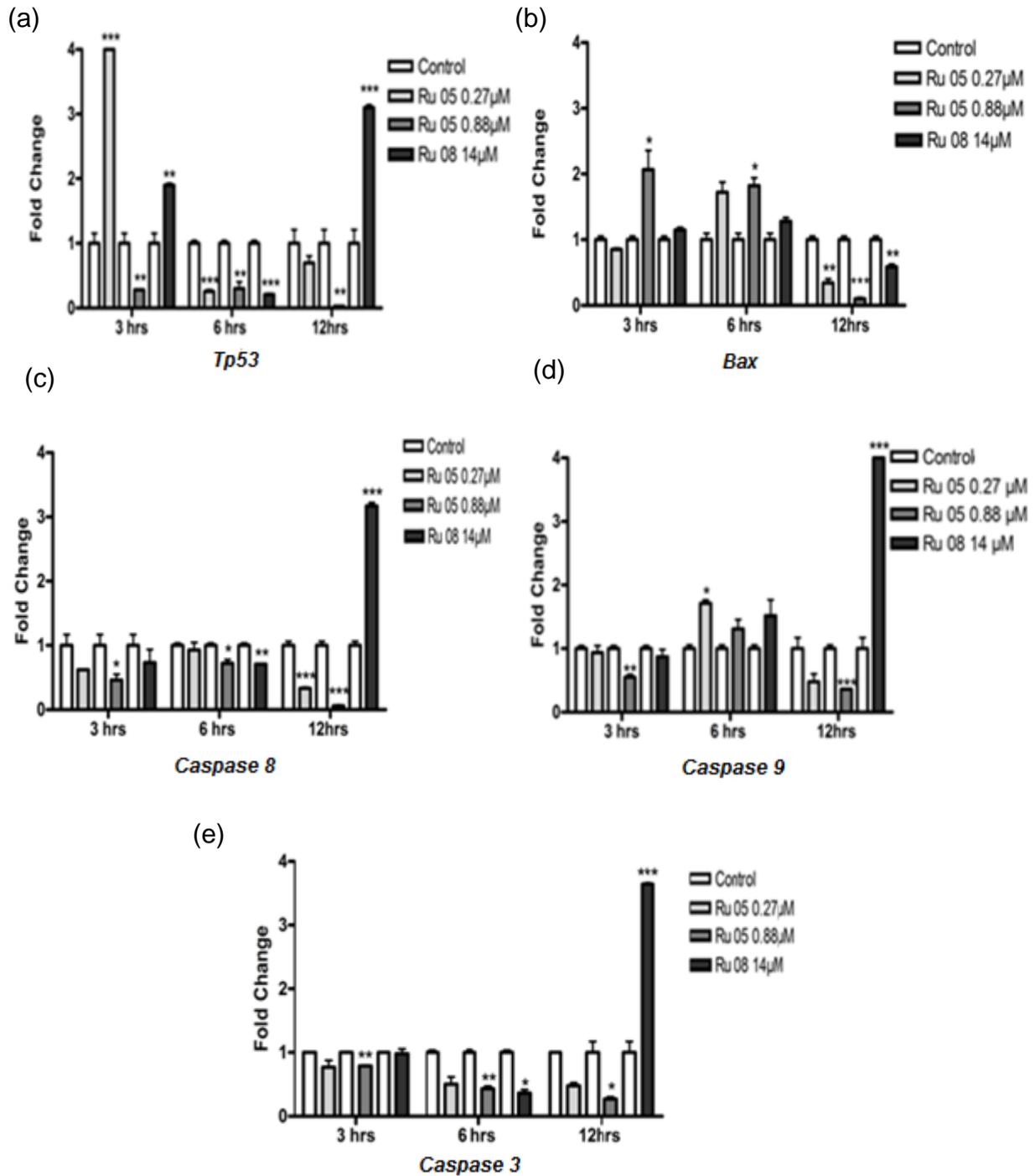
Na análise da expressão do mRNA do gene de *Tp53* (figura 15a) nota-se um aumento da taxa de expressão em 4,05 vezes nas células tratadas com o Ru 05 na concentração de 0,27 μM após 3 horas de tratamento sendo estatisticamente significativo em relação às células controle. Para o Ru 08 também foi verificado um aumento na taxa de expressão de 1,90 e 3,10 na concentração de 14 μM em 3 e 12 horas, respectivamente.

A proteína *Tp53* é uma proteína supressora de tumor que está mutada em 50% dos cânceres humanos e regula o crescimento celular, a sensibilidade à irradiação e múltiplos agentes anticâncer. A proteína *Tp53* funcional pode regular a proteína *Bcl-2* impedindo a sua ação, o que permite que as células sobrevivam a uma variedade de eventos celulares fatais e evita que as células entrem no processo apoptótico. A proteína *Tp53* também pode induzir a *P21*, e, por sua vez, um aumento do nível de *P21* pode diminuir a atividade de quinases dependentes de ciclina (CDKs), resultando em uma parada no ciclo celular (LIEBERMANN *et al.*, 1995; VOUSDEN e LU, 2002).

Com o aumento da expressão do gene de *Tp53* induzido pelos complexos de Ru 05 e Ru 08, provavelmente a proteína *TP53* esteja atuando no ciclo celular promovendo a sua parada na fase *G0/G1* conforme visto nos resultados apresentados na figura 7.

Para o gene *Bax* (figura 15b), observou-se um aumento na expressão das células tratadas com o Ru 05 principalmente na concentração de 0,88 μM no tempo de 3 e 6 horas. No tempo de 12 horas houve uma redução da expressão para ambos os complexos de Ru 05 e Ru 08 em relação ao controle negativo, mostrando que somente para as células tratadas com Ru 05 ocorreu um aumento da expressão desse gene, atuando na indução de morte das células de S-180 tratadas com esse complexo.

Figura 15: Avaliação por PCR em Tempo Real da expressão de genes de mRNA de (a) *Tp53*, (b) *Bax*, (c) *Caspase 8*, (d) *Caspase 9* e (e) *Caspase 3* frente aos tratamentos dos complexos de Ru 05 e Ru 08 [μM] em células de S-180 nos períodos de 3, 6 e 12 horas.



Dados apresentam a média \pm DP dos experimentos realizados em triplicatas. Diferenças significativas em relação ao controle sem tratamento foram indicadas por * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Ocorreu uma diminuição na expressão do gene de *Caspase 8* (figura 15c) no tratamento com o Ru 05, tanto na concentração de 0,27 μM com a taxa de expressão de 0,33 quanto na concentração de 0,88 μM com taxa de expressão de 0,1 em 12 horas. Para o Ru 08 ocorreu um aumento da taxa de expressão para 3,17 sendo estatisticamente significativa, evidenciando assim que não há aumento da expressão do mRNA de *Caspase 8* em células tratadas com o Ru 05, entretanto ocorre aumento da expressão desse mesmo gene em células tratadas com Ru 08.

Em relação à expressão do mRNA de *Caspase 9* (figura 15d), houve um moderado aumento na expressão para as células tratadas com os dois complexos de Ru 05 e Ru 08, sendo estatisticamente significativo para células tratadas com o Ru 05 (0,27 μM), que teve a taxa de expressão no controle aumentada para 1,71 nesse tratamento. O Ru 08 na concentração de 14 μM apresentou uma taxa de expressão de 4,57, mostrando que os dois complexos de rutênio aumentam a expressão de *Caspase 9* nas células tratadas com o Ru 05 no tempo de 6 horas e o Ru 08 no tempo de 12 horas.

É importante ressaltar que o tempo em que o mRNA é expresso em uma célula é diferente do tempo que a proteína é expressa, já que é a partir do mRNA que a proteína é sintetizada. Sendo assim, para a atividade enzimática das proteínas Caspases 8 e 9 pelo teste colorimétrico, não houve aumento significativo em relação ao controle negativo em 24 horas para os complexos de Ru 05 e Ru 08. Para o complexo de Ru 08 na expressão do mRNA de ambos genes, houve um aumento da expressão em 12 horas. Isso pode ocorrer porque a meia vida do RNA é pequena, assim a síntese das proteínas de *Caspase 8* e *9* pode estar ocorrendo antes do tempo de 24 horas, não sendo detectado no experimento realizado, portanto, outros testes devem ser conduzidos para que confirmem se há um aumento da atividade dessas proteínas no tratamento das células com este complexo em tempos menores que 24 horas.

Na análise da expressão gênica de *Caspase 3* (figura 15e), observou-se uma diminuição na expressão nos tratamentos do Ru 05 nos tempos de 3, 6 e 12 horas, sendo estatisticamente significante em relação ao controle, principalmente na concentração de 0,88 μM , em que a taxa de expressão caiu de 1 no controle para 0,27 em 12 horas. Para o complexo de rutênio 08 há um aumento expressivo de *caspase 3*

na concentração de 14 μM , subindo a taxa de expressão para 3,64 para esse tratamento, mostrando assim um aumento na expressão de *Caspase 3* depois do tratamento com o Ru 08, o que não observado quando tratado com o complexo de Ru 05.

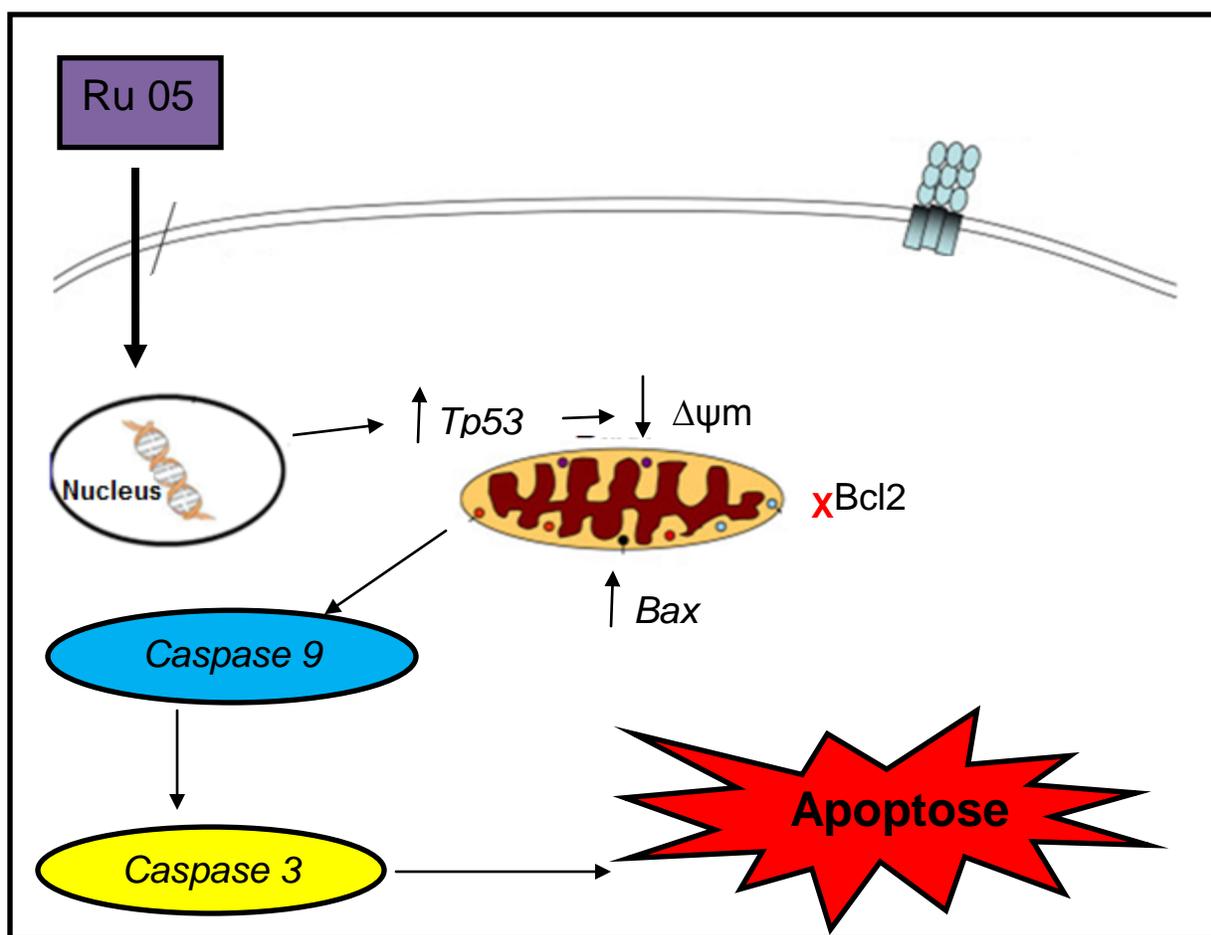
Esse resultado corrobora com a análise da proteína de *Caspase 3* na técnica de citometria de fluxo (Figura 12), pois para o complexo de Ru 05 não foi observado aumento na quantidade de células com essa proteína ativa em relação ao controle em 24 horas, assim como não houve aumento de expressão do mRNA para o gene de *Caspase 3* nas células tratadas com esse complexo em nenhum dos tempos testados, permitindo inferir que não há atuação de *Caspase 3* no tratamento com o complexo de Ru 05 para os tempos testados. Para o Ru 08, foi apresentado aumento de 3,8 vezes em 12 horas na expressão do mRNA do gene de *Caspase 3* nas células tratadas na concentração de 14 μM , mas não houve um aumento da proteína *Caspase 3* ativa na células desta concentração, porém na concentração de 28 μM houve um aumento para 60% de células com a proteína *Caspase 3* ativa, indicando que ocorre a presença do gene e proteína de *Caspase 3* atuando na via de sinalização de morte celular utilizando o tratamento com o Ru 08.

Diante dos testes realizados para elucidar o mecanismo de morte celular do complexo de Ru 05 em relação à célula de S-180, pode-se observar que: houve um acúmulo de células na fase G0/G1 do ciclo celular; um percentual de células foi aumentado na fase sub-G1, indicando a apoptose e dano no DNA; o complexo induziu a exposição de fosfadilserina na membrana celular, o que também é um indicativo de morte celular por apoptose ou necrose e alterou o potencial de membrana mitocondrial. O complexo aumentou a expressão do gene *Tp53* e, subseqüentemente, também aumentou a expressão de *Bax* e *Caspase 9*. Houve diminuição na quantidade de *Bcl2* ativa, que é uma proteína anti-apoptótica, assim como na expressão do gene *Caspase 3*. Mesmo não tendo aumento de expressão do gene de *Caspase 3* em nenhum dos tempos testados, pode-se inferir que o mecanismo de morte celular acionado por este complexo nas células de S-180 seja por apoptose via intrínseca ou via mitocondrial dependente de caspase, já que há participação de *Caspase 9*. Todo esse processo do mecanismo de morte celular está melhor elucidado na figura 16. Há possibilidade de

que o gene da *Caspase 3* esteja tendo expressão em tempo diferente dos estudados neste trabalho e, conseqüentemente, desencadeando a síntese da proteína que efetiva este processo de apoptose. Outra possibilidade existente é que a *Caspase 7* esteja atuando nesse processo final da apoptose, já que a *Caspase 7* também é um tipo de caspase efetora que atua junto com a *Caspase 3* na efetivação deste processo.

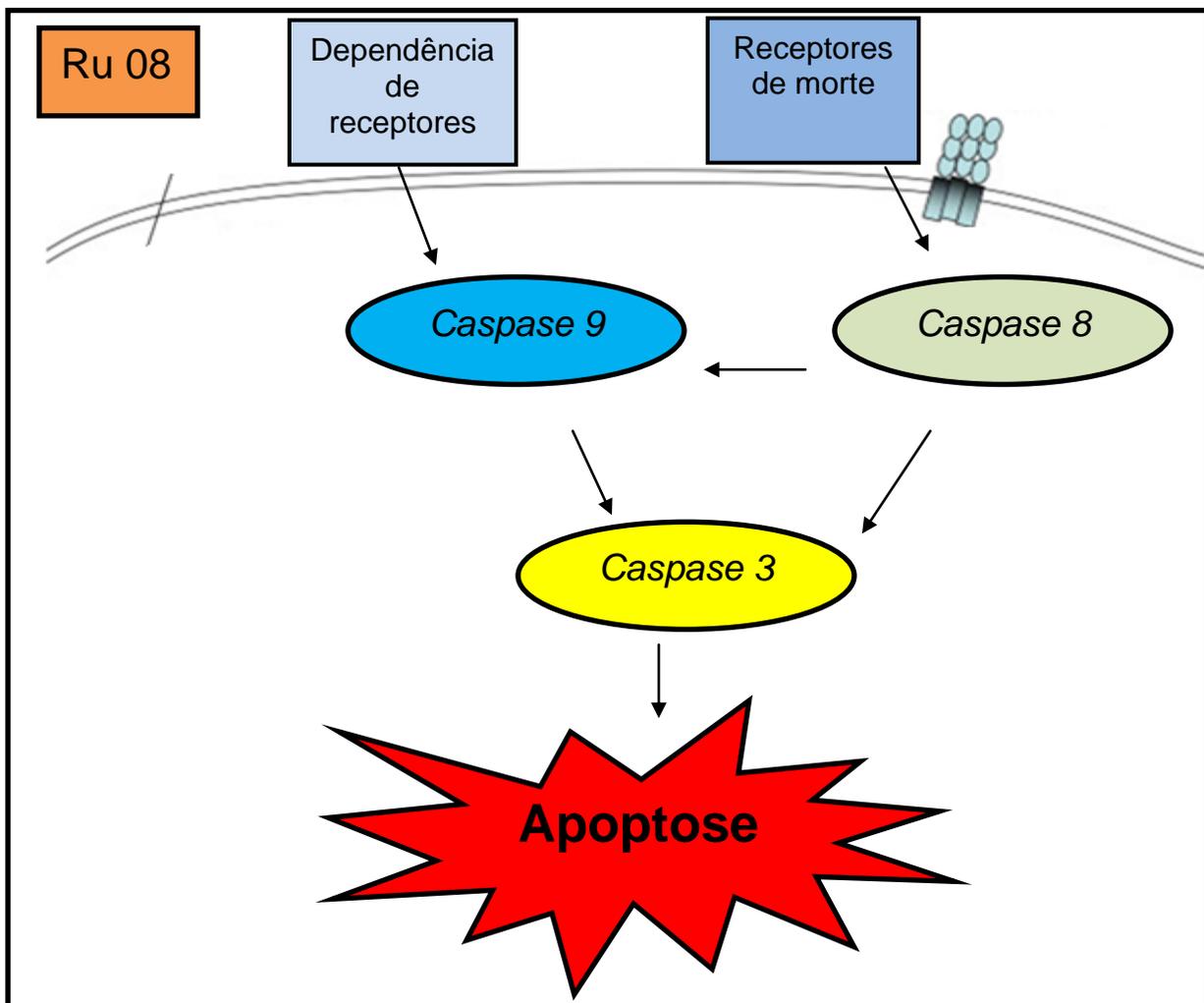
Li et. al. (2012) testaram um complexo de rutênio (II) que apresentou ação similar ao complexo de Ru 05. Esse complexo de rutênio denominado Δ -Ru1, testado na concentração de 15 μ M, mostrou exercer a sua toxicidade através da via apoptótica intrínseca mediada por mitocôndria, que é acompanhada pelo regulamento de membros da família Bcl2, que teve diminuição da expressão da proteína Bcl2 e aumento da proteína Bax, além da ativação de Caspases 9 e 3 que atuam nesse processo.

Figura 16: Hipótese da via de sinalização do complexo de rutênio 05.



O complexo de Ru 08 também parou as células na fase G0/G1 do ciclo celular, induziu a exposição de fosfadilserina, que indicou apoptose tardia no processo de morte celular, e não teve alteração no potencial de membrana mitocondrial nas células de S-180. Esse complexo Ru 08 aumentou a expressão do gene *Tp53* que provavelmente esteja atuando na parada do ciclo celular, e não teve aumento significativo na expressão do gene *Bax*. Observou-se ainda uma diminuição moderada em relação à quantidade de proteína Bcl2 e aumento da expressão dos genes de *Caspase 3, 8 e 9* (Figura 17).

Figura 17: Hipótese da via de sinalização do complexo de rutênio 08.



Diante desses resultados, pode-se inferir que o complexo de Ru 08 esteja induzindo morte celular por apoptose extrínseca, entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para elucidar qual ou quais cascatas de sinalização estão sendo ativadas para desencadear este processo, já que as três cascatas de sinalização propostas por Galuzzi et. al. (2012) podem ocorrer na presença de algumas ou de todas dessas Caspases, nas quais houve um aumento de expressão nas células de S-180 tratadas. Para melhor elucidar qual cascata está sendo ativada, é necessário realizar testes a fim de esclarecer como está se iniciando este processo de apoptose via extrínseca: se por receptores de morte ou por receptores dependentes.

É também necessário elucidar se há participação da via intrínseca atuando em conjunto com a via extrínseca para desencadear o processo de apoptose, já que o complexo de rutênio 08 não alterou o potencial de membrana mitocondrial nas células de S-180 sendo estatisticamente significativo, entretanto, houve um aumento da expressão de *Caspase 9*, sugerindo que as duas vias podem estar atuando juntas, uma das hipóteses das cascatas de ativação da via extrínseca.

Há complexos rutênicos (II) que também mostraram desencadear o processo de apoptose a partir da via extrínseca. Vidimar et. al. (2012) testaram um complexo derivado de rutênio denominado RDC34, com concentrações de 2 e 5 μM e que se mostrou um forte indutor de Tp53 ligada à via apoptótica extrínseca, envolvendo *Caspase 8*, frente às células HCT116 (câncer de colón humano). Li et. al. (2012) testaram o complexo de rutênio (II) denominado RuBmP para a linhagem de células A375 (melanoma humano). Pode-se inferir que este complexo induziu morte celular por apoptose via intrínseca e extrínseca, a partir da atuação da proteína Tp53, *Caspase 3*, 8 e 9, mostrando então que as duas vias podem atuar em conjunto para desencadear morte celular por apoptose.

Ao comparar os dois complexos de rutênio estudados, nota-se que o Ru 05 tem uma IC_{50} menor (0,27 μM) em relação ao Ru 08 (14 μM) para as células de S-180, sendo também mais citotóxico para todas as células tumorais testadas. A partir dos resultados, comprova-se que ambos os rutênios induzem parada na fase G0/G1 do ciclo celular e levam a morte celular por apoptose. Entretanto, alguns genes expressam em apenas um desses rutênios, assim como na atividade das proteínas não é a mesma

apresentada para os dois tipos, levando a inferir que o Ru 05 induz morte celular por apoptose via intrínseca e o Ru 08 parece desencadear morte celular por via extrínseca, ou seja, por caminhos diferentes.

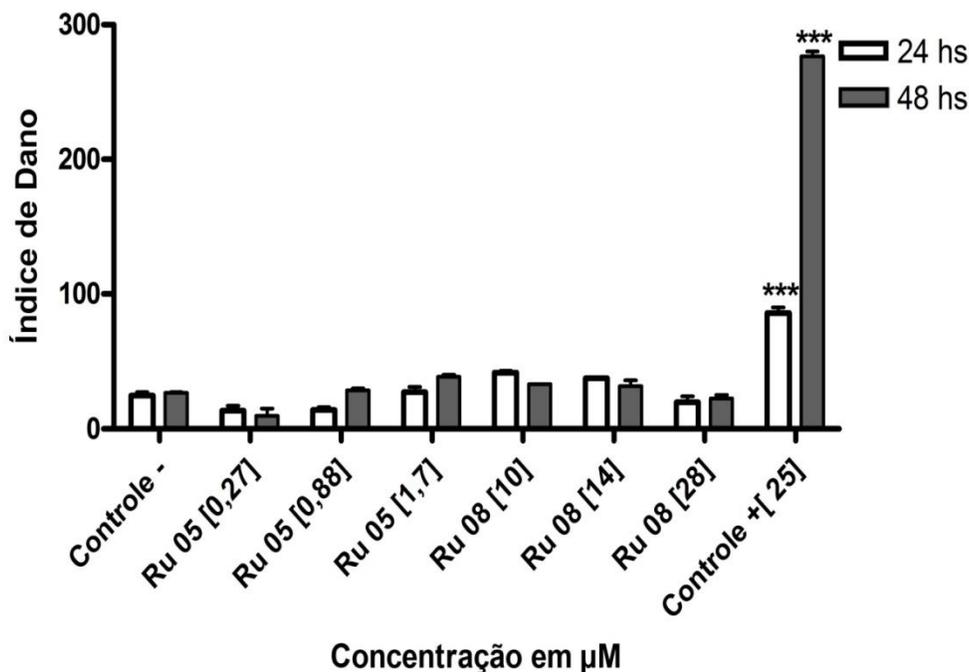
Essa diferença no mecanismo de ação desses dois complexos: Ru 05 e Ru 08 se dá pela diferença de dois ligantes nestes complexos de rutênios (II). Neste trabalho, o Ru 05 [Ru(pys)(bipy)(dppb)]PF₆ difere do Ru 08 [Ru(pic)(bipy)(dppp)]PF₆ em dois ligantes (pys/pic; dppb/dppp) sendo provavelmente essas diferenças nos ligantes que modificam o mecanismo de ação. Há vários trabalhos na literatura com rutênios II com uma variedade de ligantes e percebe-se que mesmo quando ocorre uma mudança pequena em relação a outro complexo já aumenta ou diminui sua citotoxicidade, mostrando assim que um ligante pode alterar todo o mecanismo de ação do complexo de rutênio (CHEN *et al.*, 2013; XIE *et al.*, 2013; SAMPATH *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013).

5.9. Teste Cometa

Para avaliar se os complexos de Ru 05 e Ru 08 testados induzem danos no DNA das células de S-180 tratadas, foi então realizado o ensaio Cometa. Na figura 18, observa-se que não houve aumento no índice de dano ao DNA nas células tratadas com os complexos de Ru 05 e Ru 08 em concentrações próximas a IC₅₀, nem no tempo de 24 ou de 48 horas quando comparadas ao controle negativo. Apenas o controle positivo mostrou dano significativo ao DNA.

O dano ao DNA causado pelos complexos de Ru 05 e Ru 08 não foi significativo em relação ao controle (figura 19), entretanto, houve um moderado aumento no índice de dano para o complexo de Ru 05 na concentração de 1,7 µM, como também para o complexo de Ru 08 nas concentrações de 7 e 14 µM, tanto no tempo de 24 e 48 horas. Pode-se observar esse aumento do dano ao DNA a partir da figura 19 que mostra nitidamente a formação de cauda do cometa nas concentrações descritas acima. Assim, o tratamento com esses complexos induziu um moderado aumento em algumas concentrações, porém não significativo no dano do DNA das células tratadas com esses complexos de rutênio.

Figura 18: Índice de dano ao DNA das células de S-180 após 24 e 48 horas de tratamento com diferentes concentrações dos complexos de Ru 05 e Ru 08, analisados pelo ensaio cometa.



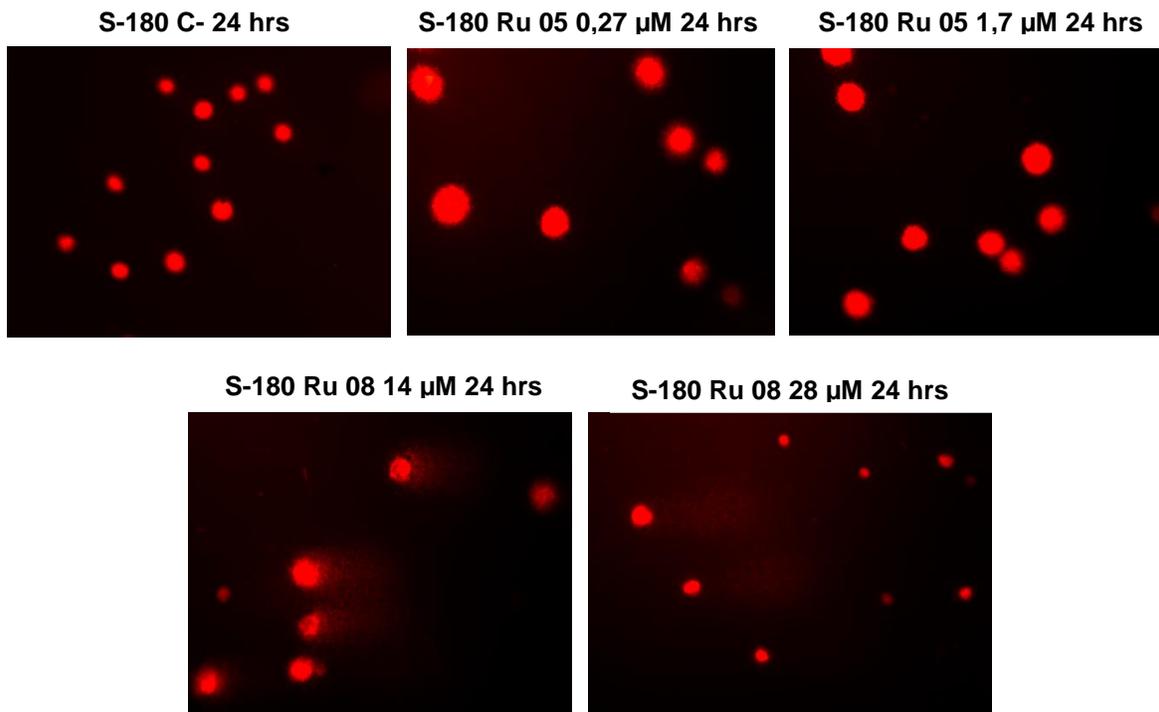
Controle negativo contém apenas meio de cultura e células, controle positivo tratado com Cisplatina (25 μM). A figura mostra a média e o desvio padrão. Diferenças significativas com o controle negativo foram indicadas por $***p < 0,001$.

Vários trabalhos mostram que os complexos de rutênio (II) induzem dano ao DNA das células tumorais. Li et. al. (2012) mostraram que o complexo de rutênio RuBmP induziu dano ao DNA de maneira dose dependente nas concentrações de 10, 20 e 40 μM frente às células A375. Wu et. al. (2012) testaram um complexo de rutênio (II) com ligante areno frente à linhagem celular MG-63 e observaram ainda que o complexo induziu dano ao DNA de maneira dose dependente nas concentrações de 10 e 20 μM .

Os complexos de rutênio testados neste trabalho podem estar causando dano ao DNA em tempos diferentes, já que houve uma expressão do gene de *p53* em 3 e 6 horas sendo que logo ocorreria a síntese da proteína Tp53 próximo a este tempo. A proteína Tp53 é a responsável por atuar no ciclo celular, induzir parada na

progressão desse ciclo e iniciar os sinais para começar o processo de morte celular ou induzir o reparo das células (Fridman e Lowe, 2003).

Figura 19: Imagens do teste cometa após tratamentos de células de S-180 com diferentes concentrações (μM) dos complexos de Ru 05 e Ru 08 durante 24 horas de tratamento.



Pode-se inferir que o dano causado à molécula do DNA, em função do processo de morte que está sendo desencadeado por esses complexos de rutênio, pode ser detectado em um tempo menor e mais próximo da atuação da proteína Tp53. Portanto, estudos adicionais devem ser realizados para que se encontre o tempo de expressão da proteína Tp53 e, assim, realizar os estudos de interação com o DNA e de dano a essa molécula em tempos próximos ao de atuação dessa proteína. Pode-se inferir ainda que no tempo de 24 e 48 horas não houve dano detectado por esse teste cometa, pois os danos existentes na célula podem ter sido reparados e a progressão do ciclo celular continuada normalmente, contudo, mais estudos devem ser realizados para elucidar a atuação destes complexos no DNA da célula.

6. CONCLUSÕES

- Os complexos de rutênio (II) testados são citotóxicos frente às linhagens tumorais de S-180 e K-562, em que se sobressaíram as IC₅₀ encontradas para os complexos de Ru 05 e Ru 08 para a linhagem de S-180;
- Os complexos de Ru 05 e Ru 08 alteram a distribuição do ciclo celular nas células de S-180, desencadeando parada das células na fase G0/G1 e impedindo as células de continuarem o processo de divisão celular normalmente;
- O complexo de Ru 05 induz aumento na quantidade de células na fase sub-G1 do ciclo celular, o que é indicativo de morte celular por apoptose e indução de dano ao DNA;
- Os complexos de Ru 05 e Ru 08 induzem exposição de fosfaldiserina no teste de anexina V, o que é um indicativo de morte celular por apoptose;
- A atividade enzimática de caspase 08 e caspase 09 não aumenta após o tratamento por 24 horas com os complexos de Ru 05 e Ru 08;
- O complexo de Ru 08 [14 µM] proporciona um aumento na quantidade da proteína Caspase 3 ativa em células de S-180 e redução na quantidade da proteína Bcl2 ativa ;
- Em células de S-180 o complexo de Ru 05 induz o aumento da expressão dos genes *Bax*, *Tp53*, *Caspase 9* e altera o potencial de membrana mitocondrial, inferindo morte celular por apoptose via intrínseca;
- Em células de S-180 tratadas com o complexo de Ru 08 ocorre um aumento da expressão dos genes de *Caspase 3*, *8*, *9*, *Tp53* e do gene pró-apoptótico *Bax*. Não há alteração do potencial de membrana mitocondrial, levando a inferir a possibilidade de que o complexo esteja induzindo apoptose por via extrínseca,

entretanto, não se conhecem as cascatas que estão sendo ativadas neste processo;

- Nas condições estabelecidas pelo teste cometa os complexos de Ru 05 e Ru 08 não induzem dano ao DNA nas células de S-180.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Atualmente, vários testes são necessários para que um determinado complexo possa atuar como um fármaco para o tratamento do câncer. Testes iniciais com linhagens de células tumorais e normais (*in vitro*) são indispensáveis para que se conheça a citotoxicidade dos complexos e entender o mecanismo de ação e a via de morte em que os complexos atuam, para que então possam seguir os estudos com animais em experimentos *in vivo* prosseguindo para fase clínica posteriormente.

Os dois complexos de rutênio (II) em destaque neste trabalho foram citotóxicos sobre as linhagens de células tumorais, também foram obtidos resultados interessantes para as células normais, mostrando que tais complexos parecem ser seletivos para as células tumorais. É necessário que sejam realizados estudos de interação desses complexos com o DNA, já que o teste cometa não apresentou dano ao DNA significativo nas células tratadas com estes complexos. É importante que estudos busquem compreender como os complexos de rutênio estão exercendo os seus efeitos citotóxicos sobre as células tumorais, se eles estão se ligando ao DNA e se sua toxicidade está ligada a essa ligação com o DNA.

Em relação ao mecanismo de morte, está claro que ambos os complexos atuam por meio da apoptose, entretanto, estudos adicionais com outros genes se fazem necessários principalmente para o complexo de Ru 08, pois é preciso esclarecer se este atua apenas por via extrínseca ou se há também atuação pela via intrínseca conforme demonstrando que pode acontecer com um aumento da expressão de Caspase 9.

São necessários também estudos futuros *in vivo*, primeiramente em camundongos, pois sabemos que é necessário comprovar a toxicidade desses complexos frente a tumores no organismo vivo, para então descobrir se a ação dos complexos continuará conforme visto em ambiente *in vitro*.

São necessários ainda estudos de segurança *in vivo* para certificação de que os complexos são seletivos apenas para as células tumorais não afetando as células normais, ou com efeitos colaterais menores do que os fármacos que já estão sendo utilizados na quimioterapia cotidiana do paciente com câncer.

Ambos complexos de Ru 05 e Ru 08 mostraram-se interessantes para a continuação de estudos mais aprofundados e detalhados, pois os resultados preliminares foram promissores no uso como futuros fármacos para o tratamento de câncer.

8. REFERÊNCIAS

AIRD, R. E. et al. In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer. **British journal of cancer**, v. 86, n. 10, p. 1652-7, May 2002.

ALAMA, A. et al. Organometallic compound in oncology: implications of novel organotins as antitumor agents. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 9-10, p. 500-508, May 2009.

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, Apr. 2001.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2013**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036845.pdf>>. Acessado: 12 dezembro 2013.

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, May 2010.

BAEHRECKE, E. H. Autophagy: dual roles in life and death? **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 6, p. 505-510, Jun 2005.

BELIZÁRIO, J. E. et al. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 40, n. 8, p. 1011-1024, Aug. 2007.

BERGAMO, A.; SAVA, G. Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy. **Dalton Transactions**, v. 13, n. 7, p. 1267-72, Feb 2007.

BOERSMA, H. H. et al. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. **J Nucl Med**, v. 46, p.2035-2050, Dec 2005.

BRATSOS, I. et al. Ruthenium Anticancer Compounds: Challenges and Expectations. **Chimia International Journal for Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 692-697, Nov. 2007.

CANCER.NET EDITORIAL BOARD, 1/2013. **Oncologist-approved cancer information from the American Society of Clinical Oncology**. Disponível em: <http://www.cancer.net/cancer-types/sarcoma/statistics>, acesso em: novembro de 2013

CAMPISI, J.; DI FAGAGNA, F. D. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 729-740, Sept. 2007.

CHATTERJEE, S. et al. The ruthenium(II)-arene compound RAPTA-C induces apoptosis in EAC cells through mitochondrial and p53-JNK pathways. **Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1149-1155, Sept. 2008.

CHAUDHARY, A.; SINGH, A. K.; SINGH, R. V. Investigations of the Possible Pharmacological Effects of Organotin(II) Complexes. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 100, n. 10, p. 1632-1645, Oct. 2006.

CHAZOTTE, B. Labeling mitochondria with JC-1. **Cold Spring Harbor Protoc.**, v.9, n.2, Sep. 2011.

CHELOPO, M. P. et al. Anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes bearing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline amino alcohol ligands. **European journal of medicinal chemistry**, v. 66, p. 407-14, Aug. 2013.

CHEN, H. et al. Highly selective binding of organometallic ruthenium ethylenediamine complexes to nucleic acids: novel recognition mechanisms. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 1, p. 173-86, Jan. 2003.

CHEN, Y. et al. Synthesis, characterization, and anticancer activity of ruthenium(II)- β -carboline complex. **European journal of medicinal chemistry**, v. 70, p. 120-129, Dec. 2013.

CHU, E.; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do câncer. In: KATZUNG, B. G. Farmacologia: básica e clínica. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.751-829, 2006.

CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemical Reviews**, v. 232, n. 1-2, p. 69-93, Jan. 2002.

CROCE, C. M. Molecular origins of cancer: Oncogenes and Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.358, n. 5, p. 502-511, Jan. 2008.

CVITKOVIC, E. Cumulative toxicities from cisplatin therapy and current cytoprotective measures. **Cancer treatment reviews**, v. 24, n. 4, p. 265-281, Aug. 1998.

DAVEY, J. M. et al. Comparison of the Reactivity of cis-[RuCl₂(DMSO)₄] and trans-[RuCl₂(DMSO)₄] towards Nucleosides. **Inorganica Chimica Acta**, v. 281, n. 1, p. 10-17, Jan. 1998.

DE ALMEIDA, V. L. et al. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents. **Química Nova**, v.28, n.1, p. 118-129, Feb 2005.

DEBNATH, J.; BAEHRECKE, E. H.; KROEMER, G. Does autophagy contribute to cell death, **Autophagy**, v. 1, n. 2, p. 66-74, July 2005.

DEMETRI, G. D. et al Soft Tissue Sarcoma. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 8, n.6, p. 630-674, Jun 2010.

DOUGAN, S. J. et al. Catalytic organometallic anticancer complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 33, p. 11628-33, Aug. 2008.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of Programmed Cell Death. **Toxicology Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, June 2007.

FANELLI, D.; ARCANGELI, A.; PASQUALE, L. A dynamical model of apoptosis and its role in tumor progression. **Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation**, v. 17, n. 4, p. 1795-1804, Apr. 2012.

FERNÁNDEZ, R. et al. Use of chelating ligands to tune the reactive site of half-sandwich ruthenium(II)-arene anticancer complexes. **Chemistry : a European journal**., v. 10, n. 20, p. 5173-5179, Oct. 2004.

FRIDMAN, J. S.; LOWE, S. W. Control of apoptosis by p53. **Oncogene**, v. 22, n. 56, p. 9030–9040, Dec. 2003.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798-4811, Aug. 2006.

FULDA, S. Cell death in hematological tumors. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 14, n. 4, p. 409-423, Apr. 2009.

GALLORINI, M.; CATALDI, A.; DI GIACOMO, V. Cyclin-dependent kinase modulators and cancer therapy. **BioDrugs** v. 26, p. 377-391, 2012.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell death and differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107-20, Jan. 2012.

GARRETT, M. D. Cell cycle control and cancer. **Current Science** v. 81, n. 5, p. 515-522, Sep 2001.

GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. **Trends in cell biology**, v. 8, n. 7, p. 267-271, July 1998.

GREENWOOD, T. M. et al. Anti-apoptosis and cell survival: A review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, n. 1, p. 238-259, Jan. 2011.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, Jan. 2007.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Rules for making human tumor cells. **New Engl. J. Med.**, v. 347, n. 20, p. 1593–1603, May 2002.

HAJRA, K. M.; LIU, J. R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, n. 6, p. 691-704, Nov. 2004.

HANAHAHAN, D.; WEINGERG, R.A. Hallmarks of cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, n. 5, p. 646-674, Mar 2011.

HENDERSON, E. R. et. al. Outcome of lower-limb preservation with an expandable endoprosthesis after tumor resection in children. **Journal of bone and joint surgery**, v. 94, n. 6, p. 537-547, Mar 2012.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, p.26, 2011.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativas 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa>>. Acessado: 10 fevereiro 2014.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature reviews. Cancer.**, v. 2, n. 4, p. 277-88, Apr. 2002.

KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B. Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life - An Introduction and Guide. In: VELLA, F. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 23, p. 401, 1995.

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. 115-21, Aug. 2005.

KASPER, C. et al. Synthesis and cellular impact of diene-ruthenium(II) complexes: a new class of organoruthenium anticancer agents. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 126-33, Jan. 2012.

KELLER, V. S. et. al. Prognostic factors in soft tissue sarcomas: the Aarhus experience. **Eur J Cancer**, v. 34, n. 12, p. 1876-1882, Dec 1998.

KEPPLER, B. K.; BERGER, M. R.; HEIM, M. E. New tumor-inhibiting metal complexes. **Cancer treatment reviews**, v. 17, n. 2-3, p.261-77, Sept. 1990.

KOBAYASHI, H. et al. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gell electrophoresis. **MMS Comm**, v. 3, p. 103-115, 1995.

KOSTOVA, I. Ruthenium complexes as anticancer agents. **Current Medicinal Chesmistry**, v. 13, n. 9, p. 1085-107, 2006.

KOU, J. F. et al. Chiral ruthenium(II) anthraquinone complexes as dual inhibitors of topoisomerases I and II. **Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 81-96, Jan. 2012.

KUMMAR, L. et al. Neoadjuvant chemotherapy in locally advanced cervical cancer: two randomised studies. **Internal Medicine Journal**, v. 28, n. 3, p. 387-390, Mar. 2008.

KUNG, 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. **ournal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 292-9, Mar. 2001.

LAVIN, M. R. Neuroleptic-induced extrapyramidal side effects. **The American Journal of Psychiatry**, v. 150, n. 11, p. 1752-1753, Nov. 1993.

LEVINE, B.; YUAN, J. Autophagy in cell cell death: an innocent convict, **J Clin Invest**, v. 115, n.10, p. 2679-2688, Oct 2005.

LE BOZEC, H.; RENOUARD, T. Dipolar and Non-Dipolar Pyridine and Bipyridine Metal Complexes for Nonlinear Optics. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2000, n. 2, p. 229-239, Feb. 2000.

LEE, R. H. et al. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. **Biochemical pharmacology**, v. 62, n. 8, p. 1013-23, Oct. 2001.

LI, F.; TIEDE, B.; MASSAGUÉ, J.; KANG, Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. **Cell Research**, v. 17, p. 3-14, Feb 2007.

LI, L. et al. Ruthenium complexes containing bis-benzimidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers. **Dalton transactions : an international journal of inorganic chemistry / RSoC**, v. 41, n. 4, p. 1138-41, 28 Jan. 2012.

LIAO, X. et al. Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, n. 4, p. 505-515, Apr. 2005.

LIEBERMANN, D. A.; HOFFMAN, B.; STEINMAN, R. A. Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways. **Oncogene**, v. 11, n. 1, p. 199-210, 1995.

LUGLI, E. et al. Characterization of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis. **Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 68, n. 1, p. 28-35, Nov. 2005.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, n. 11, p. 630-641, May 2005.

MAHAVORASIRIKUL, W. et al. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells *in vitro*. **BMC Complementary e alternative medicine**, v. 10, n. 55, p. 1-8, Set. 2010.

MAREK, L. The role of the apoptosome in the activation of procaspase-9. **Postępy higieny i medycyny doświadczalnej**, v. 67, n. 8, p. 54-64, Feb. 2013.

MARVERTI, G. et al. Characterization of the cell growth inhibitory effects of a novel DNA-intercalating bipyridyl-thiourea-Pt(II) complex in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells. **Investigational new drugs**, v. 29, n. 1, p. 73-86, Feb. 2011.

MEEK, D. W. Tumor suppression by p53: a role for the DNA damage response? **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, n. 4, p. 714-723, Oct. 2009.

MENEZES, C. S. R. et al. Analysis in vivo of antitumor activity, cytotoxicity and Interaction between plasmid DNA and the cis-dichloro-tetra-amine-ruthenium(III) chloride. **Chemico-biological interactions**, v. 167, n. 2, p. 116-24, 25 Apr. 2007.

MESQUITA, L. G. Bloqueio da fosforilação oxidativa no cultivo de embriões bovinos. 2005. 74 f. Dissertação – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. 2005.

MESTER, J.; REDEUILH, G. Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 8, n.8, p.872-885, Dec. 2008.

MILANO, A. et al. New emerging drugs in soft tissue sarcoma. **Crit Rev Oncol Hematol** v.59, n.1, p.74-84, Jul 2006.

MORENO, Y. et al. Structure and bonding in the hydrothermally synthesized copper(I) complex Cu₄(μ₂-Cl)₄(BIPY)₂. **Inorganica Chimica Acta**, v. 350, 651-655, Jul. 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **J. Immunol. Methods**, v.65, n.16, p.55-63, Dec. 1983.

MURPHY, M. P.; SMITH, R. A. Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. **Advanced drug delivery reviews**, v. 41, n. 2, p. 235-50, 30 Mar. 2000.

NIIDA, H.; NAKANISHI, M. "DNA damage checkpoints in mammals." **Mutagenesis**, v. 21, n. 1, p. 3-9, Jan 2006.

PACOR, S. et al. Intratumoral NAMI-A treatment triggers metastasis reduction, which correlates to CD44 regulation and tumor infiltrating lymphocyte recruitment. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 310, n. 2, p. 737-44, Aug. 2004.

PEREIRA, F. C. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of cis tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Biological Trace Element Research**, v. 128 n. 3, p.258–268, Set. 2009.

PELTOMAKI, P. Mutations and epimutations in the origin of cancer, **Exp Cell Res.**, v. 318, n.4, p.299-310, Nov. 2012.

PETRILLI, A. S. et al. Results of the Brazilian Osteosarcoma treatment group studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. **J Clin Oncol.**, v. 24, n.7, p.1161-1167, Mar 2006.

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 Chemother Pharmacol**, v. 54, n.1, p. 71-78, Jul 2004.

POMPILHO, W. M.; BORGES, F. B.; MIGUEL, E. C. Biotechnology and biodiversity: the brazilian forests as source of new drugs with antitumor properties. **Acta Scientiae e Techncae**, v. 1, p. 22-35, Mar. 2013.

QIAN, C. et al. The induction of mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells by ruthenium(II) asymmetric complexes. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 5, n. 7, p. 844-54, 27 Jun. 2013.

RADEMAKER-LAKHAI, J. M. et al. A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 11, p. 3717-27, Jun. 2004.

RATHOS, M.J. et al. Molecular evidence for increased antitumor activity of gemcitabine in combination with a cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00 in pancreatic cancers. **J Transl Med.**, v. 10, p 161-171, Oct 2012.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, n. 4972, p. 698-699, Feb 1965.

SAELENS, X. et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, n. 6, p. 2861-2874, Apr. 2004.

SAMPATH, K. et al. Mixed ligand ruthenium(III) complexes of benzaldehyde 4-methyl-3-thiosemicarbazones with triphenylphosphine/triphenylarsine co-ligands: Synthesis, DNA binding, DNA cleavage, antioxidative and cytotoxicity activity. **J. Mol. Struct.**, v. 105, n.1046, p. 582-592, Mar. 2013.

SAMPIERI, K.; FODDE, R. Cancer stem cell and metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v.22, n. 3, p. 187-193, Jun 2012.

SAVA, G. et al. Metal complexes of ruthenium: antineoplastic properties and perspectives. **Anti-cancer drugs**, v. 1, n. 2, p. 99-108, Dec. 1990.

SAVA, G. et al. Metal complexes of ruthenium: a potential class of selective anticancer drugs. **Anticancer Research**, v. 11, n. 3, p. 1103-1107, May 1991.

SAVA, G. et al. Dual action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: selective targeting of metastatic cells and binding to collagen. **Clin Cancer Res** v. 9, n. 5, p. 1898-1905, May 2003.

SCHATZSCHNEIDER, U. et al. Cellular uptake, cytotoxicity, and metabolic profiling of human cancer cells treated with ruthenium(II) polypyridyl complexes [Ru(bpy)₂(N-N)]Cl₂ with N-N=bpy, phen, dpq, dppz, and dppn. **Chem Med Chem**, v. 3, n. 7, p. 1104-9, Jul. 2008.

SILVEIRA-LACERDA, E. P. et. al. The ruthenium complex cis(Dichloro)Tetraammine ruthenium(III) chloride presents immune stimulatory activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Biological trace element research**, v. 133, n. 3, p. 270-283, Jul. 2009.

SILVEIRA-LACERDA, E. P. et al. The ruthenium complex cis-(dichloro)tetraammineruthenium(III) chloride presents selective cytotoxicity against murine B cell lymphoma (A-20), murine ascitic sarcoma 180 (S-180), human breast adenocarcinoma (SK-BR-3), and human T cell leukemia (Jurkat) tumor cell lines. **Biological trace element research**, v. 135, n. 1-3, p. 98-111, Jun. 2010.

SINGH, N. P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**., v.175, n. 1, p.184-191, Mar. 1988.

STOJADINOVIC, A. et al. Analisis of the prognostic significance of microscopic margins in 2084 localized primary adult soft tissue sarcomas. *Ann Surg*, v. 235, 424-433, Mar. 2002.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO. **Methods in Plant Biochemistry, Assays for Bioactivity**. London: Academic Press; 1991.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, Mar. 2000.

TODD, R. C.; LIPPARD, S. J. Inhibition of Transcription by Platinum Antitumoral Compounds. **RSC Publishing**, v. 1, n. 4, p. 280-291, Jan. 2009.

VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell Death Differ**, v. 15, n. 7, p. 1153-1162, Apr 2008.

VIDIMAR, V. et al. Induction of caspase 8 and reactive oxygen species by ruthenium-derived anticancer compounds with improved water solubility and cytotoxicity. **Biochem Pharmacol.**, v. 84, n. 11, p. 1428–1436, Dec. 2012.

VINDELOV, L.L.; CHRISTENSEN, I. J.; NISSEN, N.I. Standardization of high-resolution flow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and trout red blood cells as internal reference standards. **Cytometry**, v. 3, n.5, p. 328-331. 1983.

VOUSDEN, K. H.; LU, X. Live or let die: the cell's response to p53. **Nat Rev Cancer**, v. 2, p. 594-604, Aug. 2002.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 4, p. 307-320, Apr. 2005.

WANG, J.Q. et al Mitochondria are the primary target in the induction of apoptosis by chiral ruthenium(II) polypyridyl complexes in cancer cells. **Journal of biological inorganic chemistry**, DOI 10.1007/s00775-013-1069-2, Nov.2013.

WILHELMSSON, L. M. et al. DNA-binding of semirigid binuclear ruthenium complex $\delta,\delta\text{-}[\mu\text{-}(11,11'\text{-bidppz})(\text{phen})(4)\text{ru}(2)](4+)$: extremely slow intercalation kinetics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 41, p. 12092-3, Oct. 2002.

WU, S. et al. Synthesis of $\text{ru}(\text{bpy})_3$ -viologen and its complex included by *p*-sulfonatocalix[4]arene in a U-type binding manner. **Dyes and Pigments**, v. 95, n. 2, p. 436-442, Nov. 2012.

XIE, Y.-Y. et al. DNA interaction, cytotoxicity, apoptotic activity, cell cycle arrest, reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential assay induced by ruthenium(II) polypyridyl complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 405, p. 228–234, Aug. 2013.

YAN, Y. K. et al. Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. **Chemical communications : Chem comm / the Royal Society of Chemistry**, v. 38, n. 10, p. 4764-4776, Oct. 2005.

YANG, X. et al. Ruthenium methylimidazole complexes induced apoptosis in lung cancer A549 cells through intrinsic mitochondrial pathway. **Biochimie**, v. 94, n. 2, p. 345-53, Feb. 2012.

YASUHARA, S. et al. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 51, n. 7, p. 873-885, July 2003.

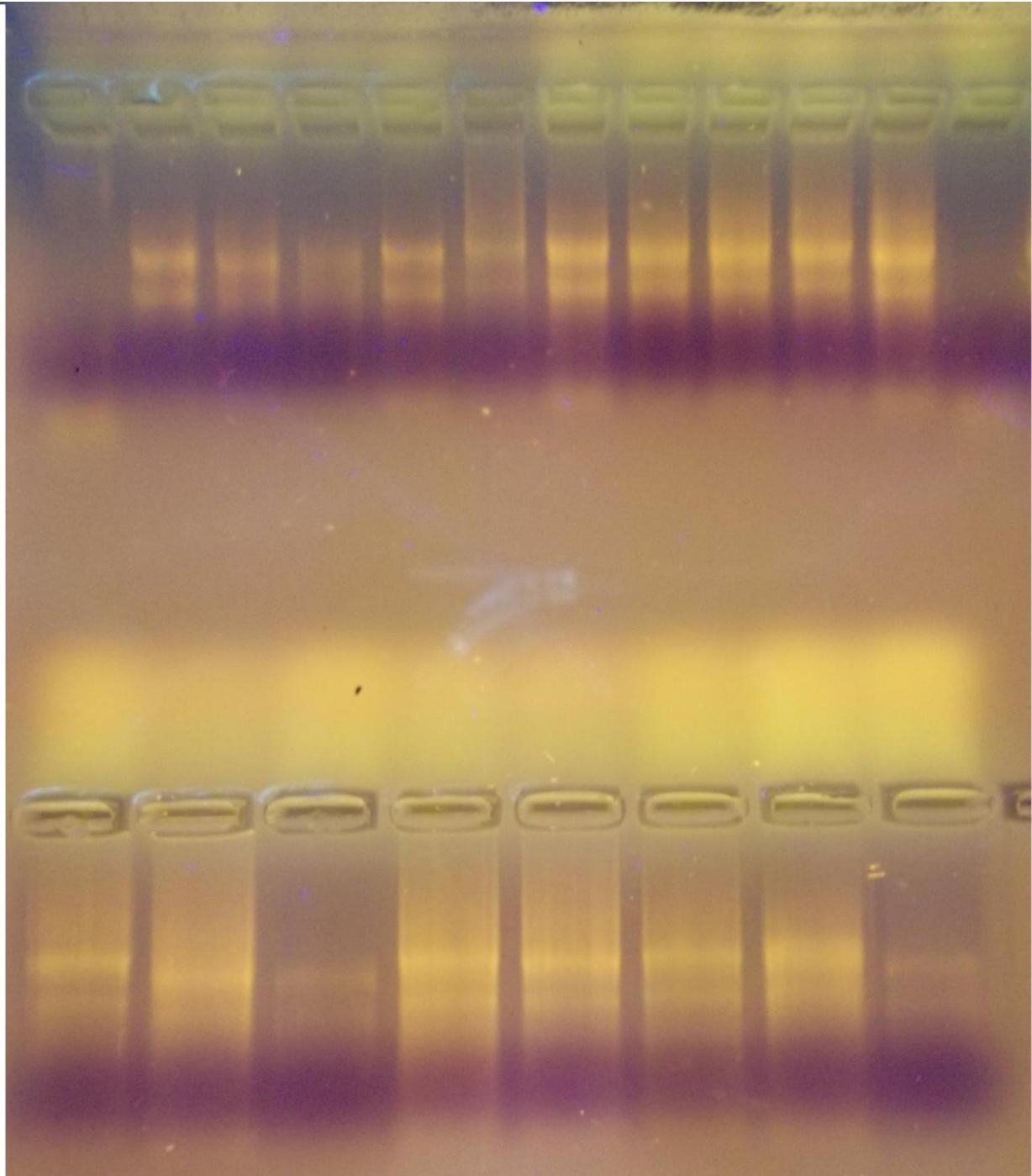
ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New Metal Complexes as Potential Therapeutics. **Current opinion in chemical biology**, v. 7, n. 4, p. 481-489, Aug. 2003.

ZHAO, G.; LIN, H. Metal complexes with aromatic N-containing ligands as potential agents in cancer treatment. **Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents**, v. 5, n. 2, p. 137-47, Mar. 2005.

ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes & Development**, v. 20, n. 1, p. 1-15, 1 Jan. 2006.

APÊNDICE A:

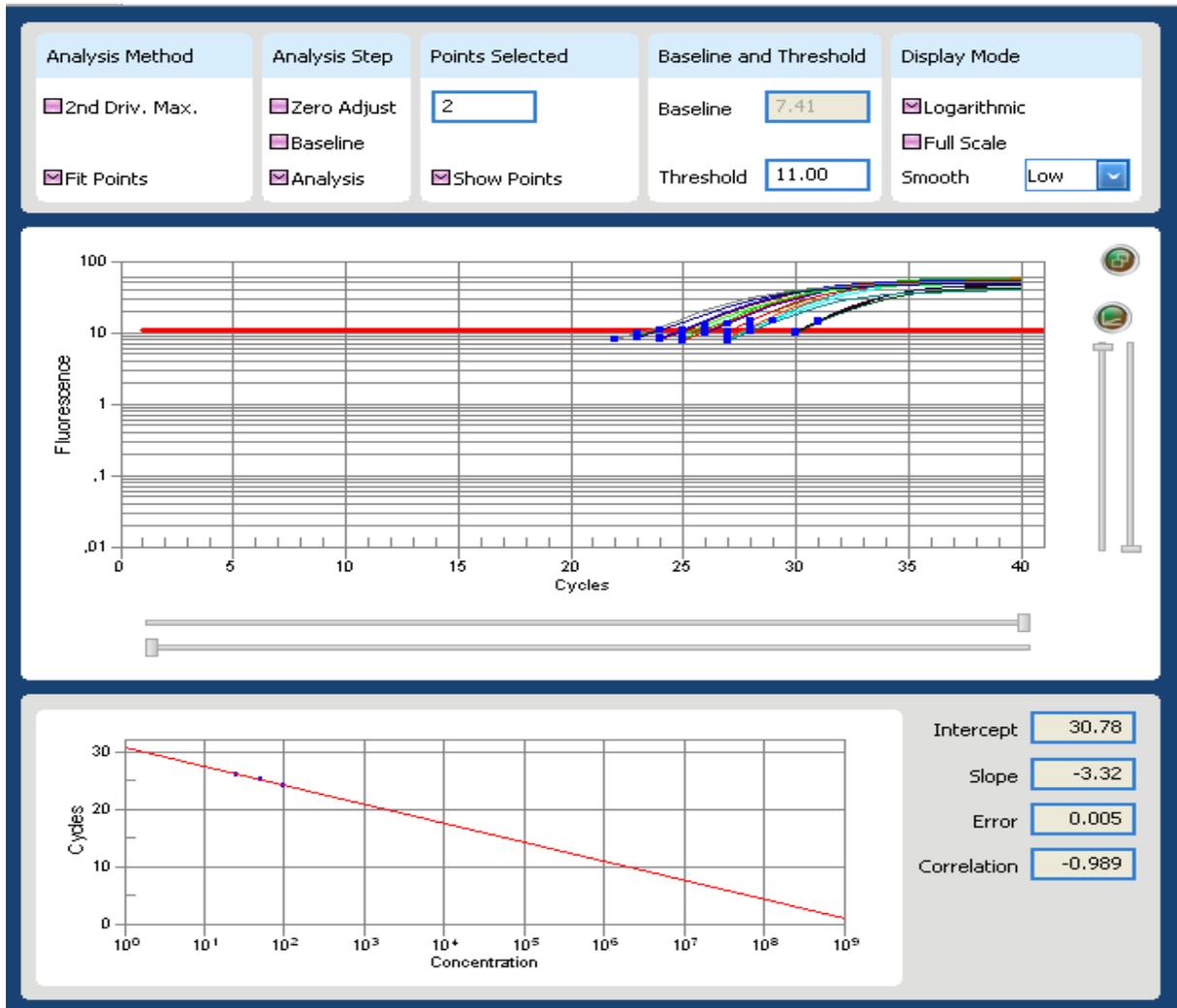
Figura 20: Gel de agarose, para analisar a integridade das amostras de RNA utilizado.



APÊNDICE B:

Figura 21: Curva padrão dos genes *Caspase 9* (a) e *Tp53* (b)

(a)



(b)

