



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA - DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Avaliação da expressão de genes de resistência às múltiplas drogas (MDRs) e de metabolização em diferentes linhagens celulares tratadas com complexos metálicos de rutênio.

CESAR AUGUSTO SAM TIAGO VILANOVA COSTA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, para fins de obtenção do Título de Doutor em Biologia, Área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

*Orientadora: Professora Doutora Elisângela de Paula
Silveira Lacerda*

GOIÂNIA – 2013

**Avaliação da expressão de genes de resistência à múltiplas drogas
(MDRs) e de metabolização em diferentes linhagens celulares
tratadas com complexos metálicos de rutênio**

Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova Costa, M.Sc.¹

Prof^a. Dr.^a Elisângela de Paula Silveira Lacerda^{1*}

¹ Laboratório de Genética Molecular e Citogenética. ICB I - sala 200. Campus II.
Universidade Federal de Goiás.

* Correspondência: silveiralacerda@gmail.com

Elisângela de Paula Silveira Lacerda
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral

Dedicatória

***Aos meus pais, Conceição e Lourival (in memoriam),
criação e carinho.***

***Aos meus irmãos, Saulo e Salomão,
amizade e presença.***

O desenvolvimento do presente estudo se realizou no **Laboratório de Genética Molecular e Citogenética** do Instituto de Ciências Biológicas da **Universidade Federal de Goiás (UFG)**, amparado pela **Rede Goiana de Pesquisa em Farmacogenética e Farmacogenômica** da **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG)**. O projeto de doutorado contou ainda com o auxílio, através de financiamento, do **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, da **Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)** e da **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG)**; e de bolsa de estudo da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**.

*Uma coisa aprendi em minha longa vida, que toda a nossa ciência,
estimada através da realidade, é primitiva e infantil –
ainda assim, é a coisa mais preciosa que temos.*

Albert Einstein



Goiânia, Hospital Araújo Jorge, local onde funciona uma unidade de tratamento de câncer, assim como o Registro de Câncer de Base Populacional, ambos da Associação de Combate ao Câncer em Goiás. Quarto andar, setor de pediatria, local permeado de crianças, anjos, recebendo tratamento. Uma arena, onde pequenos guerreiros de corpos delgados e calvos – efeitos do forte tratamento a que são submetidos – lutam contra um mostro, poderoso e ignorante, um Nêmesis, que aproveitando do intenso poder proveniente da juventude de seus pequenos adversários, cresce e se multiplica, de forma avassaladora e nefasta, perante aos olhos de pais, amigos e agentes de saúde perplexos.

Mesmo local, uma tarde calorenta de agosto de 2003, observo um pequeno menino, olhos profundos, brincando, sorrindo, sonhando; por um momento, indiferente a tudo que está acontecendo em seu interior, indiferente àquele gigante, que cresce dentro de si, nutrindo-se, se transformando, tornando-se, talvez, na maior ameaça que ele poderá sofrer em toda a sua vida.

Agora é outubro, dias chuvosos, acompanho, ao longe, a evolução dessa luta, uma batalha cruel e atroz, onde o mocinho tem de chegar ao limiar da autodestruição, para ter a chance de vitória. Sua mãe o chama, descubro seu nome, “Dêivide” (sic), digno da situação, mais uma vez, Davi contra Golias, próprio, um minúsculo contra um gigante, batalha até a morte. Contudo, assim como na passagem bíblica, o herói conta com o apoio do divino e de seus amados, assim como da competente equipe médica e até da torcida de um desconhecido estudante de ciências.

Novembro, a peleja se encontra em seus momentos finais, nosso miúdo parece seguir em direção ao triunfo, o gigante, não é tão forte assim, fraqueja, se ajoelha diante de um corajoso, um leão, apesar de mostrar uma aparência frágil e muito debilitada, é verdade. Final de dezembro, milagrosamente, a criança derrota o bandido ceifador de vidas.

São eventos assim, intensos e inesquecíveis, que nos servem de inspiração para continuar a nossa jornada de pesquisas, permeada decepções e alegrias, a fim de chegar um dia, ao eldorado da descoberta da cura desse mal, o Câncer.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, força maior que rege toda a criação, pela oportunidade de viver, em tão belo lugar e tempo, onde as pessoas, mais que nunca, são respeitadas e entendidas em sua personalidade e características pessoais; onde a realização dos sonhos, mais que nunca, é dependente apenas de seu esforço e dedicação.

À minha Orientadora Prof. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda, pela confiança e oportunidade a mim proporcionadas, pelas orientações acadêmicas e pessoais, pela amizade e carinho doados.

Aos meus familiares, minha mãe, Conceição, que sempre me foi compreensiva, atenciosa, presente e amiga. Ao meu pai, Lourival, que apesar de ter sido levado em minha tenra infância, me deixou como herança a bondade, o valor e o senso de responsabilidade.

Aos meus irmãos, Saulo e Salomão, que sempre estiveram próximos, me apoiando nos momentos mais difíceis de minha caminhada.

À minha querida Hellen Karine, exemplo de companheira e amiga. Por seu amor, carinho e compreensão.

À equipe do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, em especial aos meus amigos Flávia, Aliny, Alessandra, Lucas, Bruno, Wanderson, Francielli, Wanessa, Mariana, Jordana, Rafael e Afonso, obrigado pela confiança, auxílio durante o doutorado e acima de tudo, pela amizade.

Aos meus professores, amigos e colegas do Programa de doutorado em Biologia da Universidade Federal de Goiás.

Ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás pela estrutura didática e técnica para a realização dos estudos e trabalhos do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa de estudos.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	v
Apoio.....	vi
Epígrafe.....	vii
Frontispício.....	viii
Agradecimentos	ix
LISTA DE TABELAS	xi
SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xii
1.0 Introdução.....	15
1.1. Indivíduo e Tratamento Farmacológico.....	15
1.2. Farmacogenética e Farmacogenômica.....	17
1.3. Farmacogenética e o estudo da estrutura genômica.....	18
1.4. Polimorfismos genéticos que afetam o metabolismo de medicamentos.....	19
1.5. Reguladores do ciclo celular, mutações e o desenvolvimento de câncer.....	21
1.6. Quimioterapia antineoplásica.....	25
1.7. Genes de Resistência a Múltiplas Drogas (MDRs).....	27
1.8. Os Complexos de Rutênio como agentes quimioterápicos antitumorais.....	30
2.0. JUSTIFICATIVA.....	34
3.0. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo Geral	36
3.2. Objetivos Específicos.....	36
4.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1. Delineamento experimental.....	38
4.2. Síntese dos compostos Compostos de Rutênio.....	38
4.3. Linhagens celulares e manutenção do cultivo celular.....	39
4.4. Avaliação da viabilidade por azul de tripano.....	39
4.5. Ensaio de viabilidade celular por Ensaio de MTT.....	39
4.6. Avaliação da toxicidade pelo ensaio de DHL.....	40
4.7. Extração de RNA.....	40
4.8. Transcrição Reversa e PCR quantitativa em tempo real.....	40
4.9. Análise estatística.....	41

5.0. PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	42
ARTIGO 1.....	43
ARTIGO 2.....	64
6.0. CONCLUSÕES.....	84
7.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
9.0. ANEXOS	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos Primers utilizados na PCRs quantitativas em tempo real.....	41
--	-----------

SIGLAS E ABREVIATURAS

Bax – Proteína X associada à BCL2 , do inglês BCL2- associated X protein;

Bcl2 – Proteína reguladora anti-apoptótica, do inglês B-cell CLL/lymphoma 2.

Bcl-w – Proteína reguladora anti-apoptótica, agonista de Bcl2;

Bcl-Xs – Proteína reguladora pró-apoptótica antagonista de Bcl2;

Bid – Proteína reguladora pró-apoptótica antagonista de Bcl2, do inglês BH3 interacting domain death agonist;

cis-Pt (II) – Cisplatina II;

DL₅₀ – Dose Letal 50%;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

Fas – *Sintetase dos Ácidos Graxos*, do inglês *Fatty Acid Synthase*;

Fase M – fase de mitose do ciclo celular;

Fase S – fase de síntese do ciclo celular;

FDA (E.U.A.) – Food and Drug Administration, agência regulatória de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos da América;

FLIPs – Proteína inibitória homóloga a FLICE, do inglês FLICE-like inhibitory protein;

G₀ – Do inglês Gap, intervalo. Fase Gap0 do ciclo celular;

G₁ – Do inglês Gap, intervalo. Fase Gap1 do ciclo celular;

G₂ – Do inglês Gap, intervalo. Fase Gap2 do ciclo celular;

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana;

IAPs – Proteínas inibidoras de apoptose, do inglês *Inhibitor of Apoptosis Proteins*;

IC₅₀ – Inibição de Concentração 50%;

Kbp – quilopares de bases;

KP1019 – Composto Indazolium *trans*-[(tetracloreto)bis(1H- indazol)rutênio(III)];

Mcl-1 – Leucemia mielóide - sequência 1, do inglês *Myeloid Cell Leukemia Sequence 1*;

mg kg⁻¹ – Miligrama por quilograma;

mg mL⁻¹ – Miligrama por mililitro;

NAMI A – Composto *trans*-imidazoldimetilsulfoxidotetraclororutênio;

NCI – Instituto Nacional do Cancer dos Estados Unidos da América, do inglês *National Cancer Institute*;

NGFr – Fator de crescimento de nervos, dos inglês *Nerve Growth Factor*;

pH – potencial hidrogeniônico

RM175 – Composto de Rutênio [(h₆-C₆H₅C₆H₅)Ru(en)Cl]⁺;

Ru (II) – Rutênio em estado de oxidação II;

Ru (III) – Rutênio em estado de oxidação III;

Ru (IV) – Rutênio em estado de oxidação IV

SMAC – Segundo ativador de caspase derivado da mitocôndria, do inglês *Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases*;

Tf – Proteína transferrina;

TNF – Fator de necrose tumoral, do inglês *Tumor Necrosis Factor*;

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. Indivíduo e Tratamento Farmacológico

A variação individual da resposta ao tratamento é um dos maiores problemas apresentados pela prática clínica, assim como no desenvolvimento farmacológico. Essas variações podem levar a falhas no tratamento, a efeitos adversos e colaterais ou, até mesmo, antagônicos em determinados indivíduos ou subpopulações de pacientes. De fato, uma proporção considerável de pacientes tomando uma dose padronizada de determinado medicamento podem não responder, responder apenas parcialmente ou experimentar reações adversas ao medicamento (Hoffmeyer et al., 2000; Blagosklonny, 2005; Metzger et al., 2006).

Uma pesquisa realizada em hospitais nos Estados Unidos mostrou que cerca de 6 a 7% dos pacientes apresentaram reações adversas a determinadas drogas, sendo que parte desses pacientes mostrou reações fatais. Outros estudos mostram que esses efeitos colaterais chegam a causar cerca de 100.000 mortes por ano somente na América do Norte. Ainda, aproximadamente 4% de todos os novos medicamentos lançados são retirados do mercado devido às reações adversas, configurando uma situação desastrosa para a indústria farmacêutica, que gasta milhões de dólares para desenvolver um novo produto (Lazarou et al., 1998; Metzger, 2006).

No Brasil, os medicamentos vêm, desde 1994, segundo as estatísticas divulgadas pelo Sistema Nacional de Informações Toxicológicas (SINITOX), ocupando o primeiro lugar no conjunto dos agentes tóxicos considerados, respondendo por aproximadamente 27% dos casos de intoxicação registrados no país, sendo este valor mantido até 2010 (SINITOX, 2010), conforme Tabela 1.

Considerando todo o universo de intoxicação, das leves às graves, as mais comuns são provocadas por medicamentos, principalmente os ansiolíticos, os antidepressivos, os analgésicos e os anticonvulsivantes. A resposta à exposição a estes agentes é individual, e o médico assistente pode observar manifestações variadas, em pacientes diferentes, mas expostos a mesma substância (SINITOX, 2010).

Na coleta de dados realizada no Centro de Informação Toxicológica de Goiás (CIT-GO) nos anos 2003 a 2009 verificou-se que de todas as notificações de vítimas humanas, 31% foram por medicamentos, seguidas de 13% por intoxicações por agrotóxicos, 11% por produtos químicos industriais, e 8% devido a drogas de abuso. Em 2005, dos casos de tentativa de suicídio por medicamento, em 60,97% dos casos apenas um único medicamento estava envolvido, 21,78% dos pacientes se intoxicaram ingerindo dois medicamentos, 12,41% dos pacientes usaram mais de dois medicamentos. Dos medicamentos mais utilizados os benzodiazepínicos

compreendiam 28% dos casos, só o diazepam foi responsável por 13% do total de medicamentos ingeridos. Os benzodiazepínicos, antigripais, antidepressivos e antiinflamatórios são as classes de medicamentos que mais causam intoxicações em nosso país (Rios et al., 2005).

Tabela 1. Casos de intoxicação humana por agentes no Brasil em 2010.

<i>Agente toxicológico</i>	<i>Nº de casos</i>	<i>Percentual</i>
Medicamentos	24054	27,74
Agrotóxicos/Uso agrícola	4789	5,51
Agrotóxicos/Uso doméstico	2093	2,41
Produtos veterinários	810	0,93
Raticidas	2575	2,97
Domissanitários	10815	12,47
Cosméticos	1120	1,29
Produtos Químicos Industriais	5134	5,92
Metais	314	0,36
Drogas de Abuso	5288	6,10
Plantas	1132	1,31
Alimentos	946	1,09
Animais peç/serpentes	2476	2,86
Animais peç/aranhas	3261	3,76
Animais peç/escorpiões	9317	10,75
Outros Animais peç/venenosos	4649	5,36
Animais não peçonhentos	3605	4,16
Desconhecidos	2108	2,43
Outros	2214	2,55

O que determina o risco individual a um determinado tratamento ou droga? Quanto um determinado fármaco pode ter um efeito benéfico ao paciente ou levá-lo à morte? Atualmente, sabe-se que muitos fatores podem afetar a eficácia ou causar até mesmo a toxicidade de um determinado remédio. Entre estes fatores podemos incluir as interações droga-droga, a idade do paciente, seu estilo de vida e hábitos, seu estado orgânico, principalmente renal e hepático. Estes fatores, muitas vezes podem ser contornáveis ou até mesmo anulados quando se realiza uma avaliação criteriosa a respeito do paciente. Contudo, sabe-se também que características genéticas podem afetar sobre a forma que um paciente responderá ao tratamento. Variações genéticas estão intimamente relacionadas com a cinética e o metabolismo de fármacos, pois são estas variações nos genes que determinam a velocidade de absorção e metabolização da droga. São elas também que determinam a estrutura, funcionamento e eficácia de receptores, transportadores e enzimas que irão atuar sobre o farmoquímico. Desta forma, indivíduos ou grupos de indivíduos com características genéticas diferentes podem responder diferentemente a um determinado remédio (Roses, 2000; Hoffmeyer et al. 2000, Kraag et al., 2012).

1.2. Farmacogenética e Farmacogenômica

É muito comum ouvirmos relatos ou até vivenciado experiências associadas à variação de resposta a determinados remédios. São exemplos frases como “aquele remédio foi bom para mim, mas não fez efeito no meu primo”, ou “ela não pode tomar remédios com aspirina ou penicilina porque tem alergia”. Sabe-se que estas situações decorrem da variabilidade da resposta das pessoas aos medicamentos, e que, em boa parte, se deve a fatores genéticos. É dessa questão que se ocupam a farmacogenética ou a farmacogenômica. Estas ciências se ocupam do estudo de como a genética de um indivíduo e a variabilidade da resposta a remédios afeta os efeitos terapêuticos destes e as reações adversas (indesejadas), de forma que a mesma dose de um mesmo medicamento pode ser benéfica para um paciente, mas ineficaz ou, no pior cenário, tóxica e letal para outro, embora os dois tenham recebido o mesmo diagnóstico clínico (Kraag et al., 2012).

A primeira referência à variabilidade da resposta farmacológica é atribuída ao matemático grego Pitágoras (c.580-c.500 a.C.), que descreveu, em 510 a.C, a intoxicação provocada por determinadas favas em alguns, mas não em todos os indivíduos que as ingeriam. Mas a farmacogenética moderna tem suas origens em meados do século 20, com a demonstração de associações entre alterações genéticas e efeitos dos medicamentos. Essa área de estudos, que evoluiu muito nas últimas cinco décadas, foi recentemente rebatizada como farmacogenômica, e sua maior promessa é contribuir para a individualização da terapêutica, ou seja, a prescrição do medicamento certo e na dose adequada para cada indivíduo, com base no conhecimento dos fatores genéticos que regulam a farmacocinética e a farmacodinâmica dos medicamentos (Suarez-Kurtz, 2004).

De início, a farmacogenética explorou processos farmacocinéticos, principalmente a biotransformação dos medicamentos. Um dos trabalhos mais importantes desse período foi o do farmacólogo alemão Werner Kalow, da Universidade de Toronto (Canadá), sobre a ‘apnéia (interrupção da respiração) prolongada’, provocada pelo composto succinilcolina. Esse medicamento é usado durante a anestesia geral para causar relaxamento da musculatura esquelética, especialmente dos músculos respiratórios. Normalmente, os efeitos da succinilcolina duram apenas alguns minutos, devido à sua rápida destruição pela enzima colinesterase, presente no plasma sanguíneo. Para manter a paralisia muscular é preciso injetar continuamente o composto no sangue. Quando a infusão é interrompida, a grande maioria dos pacientes volta a respirar espontaneamente em poucos minutos. No entanto, em alguns casos, isso só ocorre após muitas horas, ou seja, neles ocorre uma ‘apnéia prolongada’. Kalow demonstrou que isso se

deve a alterações do gene da colinesterase, que se torna incapaz de metabolizar a succinilcolina (Evans & Relling, 1999; Suarez-Kurtz, 2004, Kraag et al., 2012).

Em um segundo momento, a farmacogenética passou a incluir a farmacodinâmica. Um exemplo destacado tem, novamente, a succinilcolina como protagonista e a Universidade de Toronto como um dos principais cenários. Foi observado, nos anos 60, que essa droga causava contraturas musculares em alguns pacientes, em cerca de um em cada 30 mil, efeito oposto ao relaxamento muscular esperado. O mais grave é que as contraturas sempre vinham acompanhadas de um aumento intenso da temperatura corporal, a hipertermia, e de arritmias cardíacas, que muitas vezes evoluíam para um quadro fatal. Essa síndrome, à época, foi denominada de hipertermia maligna, sendo sua causa um aumento aberrante da concentração do cálcio no interior das células que compõem as fibras musculares. A ocorrência do problema depende de duas condições: 1) predisposição genética, relacionada a polimorfismos genéticos associados ao receptor de rianodina, proteína que regula a concentração de cálcio dentro das células; 2) exposição a determinados medicamentos, entre os quais a succinilcolina (Suarez-Kurtz, 2004).

As duas síndromes farmacogenéticas descritas anteriormente são monogênicas, ou seja, em cada caso afetado apenas um gene da colinesterase ou do receptor de rianodina. O fato de a succinilcolina poder desencadear as duas síndromes indica que ela atua em mais de um receptor. Na realidade, são muitas as proteínas (receptores, enzimas metabolizadoras, transportadores etc.) que interagem com cada medicamento, e a resposta farmacológica é tipicamente poligênica. Isso aumenta a complexidade da investigação farmacogenética e de sua aplicação na prática médica. Para complicar ainda mais a escolha do medicamento correto para cada paciente, a maioria das doenças também é poligênica. Assim, a variabilidade da resposta aos medicamentos não algo novo, tampouco surpreendente. Segundo Roses (2000), o percentual de resposta pode variar de 25% (para alguns quimioterápicos antitumorais) a até 90% (para analgésicos-antitérmicos, como a aspirina). O desafio a ser vencido pela farmacogenética é o de investigar o componente genético da variabilidade de resposta aos medicamentos e transferir esses conhecimentos aos profissionais da saúde, aos usuários de medicamentos e ao setor produtivo, visando obter, para qualquer remédio, a melhor relação risco/benefício (Roses, 2000, Kalow, 2002; Suarez-Kurtz, 2004, Herbst et al. 2006, Kraag et al., 2012).

1.3. Farmacogenética e o estudo da estrutura genômica

Duas estratégias distintas, mas complementares, são usadas nas pesquisas na área da farmacogenética. A primeira tem seu ponto de partida nos efeitos farmacológicos, de onde se

investiga a resposta do organismo ao tratamento e à droga. A segunda estratégia, que somente se tornou viável com o desenvolvimento tecnológico da genética molecular, permite identificar os polimorfismos e assim, realiza estudos laboratoriais e clínicos visando avaliar seus efeitos (variações fenotípicas) em relação aos medicamentos (Suarez-Kurtz, 2004).

Os genes são constituídos basicamente de DNA, que é uma enorme molécula, composta de seqüências complexas de nucleotídeos. Variações nessas seqüências – que ocorrem na população geral de forma estável, sendo encontradas com frequência de 1% ou superior – são denominadas polimorfismos genéticos. As formas mais comuns de polimorfismos genéticos são deleções, mutações, substituições de base única (em inglês: *Single Nucleotide Polymorphisms*, ou SNPs), ou variações no número de seqüências repetidas (VNTR), micro e minisatélites (Griffith *et al.* 2002). O genoma humano possui cerca de 30.000 genes, com um total de 3,12 bilhões de nucleotídeos, os quais apresentam mais de dois milhões de polimorfismos ocorrendo com frequência de 1 a cada 1.250 pares de bases (Venter *et al.* 2001).

As diferenças quanto às respostas terapêuticas entre os indivíduos geralmente estão associadas com polimorfismos genéticos presentes em genes que afetam a farmacocinética ou a farmacodinâmica. Tais polimorfismos podem alterar a expressão e/ou a atividade de sítios de ligação de medicamentos, por afetarem a estabilidade do RNA mensageiro correspondente, ou modificarem a estrutura conformacional da proteína correspondente. Como consequência, essas alterações podem levar à redução ou aumento da atividade da proteína codificada. Um número considerável de evidências sugere que SNPs em genes que codificam transportadores de medicamentos, enzimas metabolizadoras de medicamentos ou envolvidas na biossíntese e reparo do DNA, poderiam determinar a eficácia dos medicamentos e sua toxicidade. Estudos recentes (Kerb, 2006) também demonstraram que os transportadores e enzimas metabolizadoras de drogas desempenham um papel-chave na pré-disposição e resposta individual à droga (Ingelman-Sundberg, 2001; Thorisson & Stein, 2003; Chowbay *et al.* 2005, Kraag *et al.*, 2012).

1.4. Polimorfismos genéticos que afetam o metabolismo de medicamentos

A coexistência de alelos múltiplos em um locus é chamada de polimorfismo genético. Qualquer sítio no qual existam alelos múltiplos como componentes estáveis da população é, por definição, polimórfico. Um alelo é geralmente definido como polimórfico se ele tiver presente em uma frequência maior que 1% na população. Alguns polimorfismos no genoma podem ser detectados pela comparação de mapas de restrição de diferentes indivíduos (Lewin, 2001^a).

Os polimorfismos genéticos são variações na seqüência de DNA que podem criar ou destruir sítios de reconhecimento de enzimas de restrição e parecem estar associados a apenas

uma base. Algumas dessas alterações ocorrerão em seqüências não codificadoras do gene, que na maioria dos casos não terão efeito em suas funções; outras ocorrerão em seqüências codificadoras, levando à produção de proteínas defeituosas. Dois tipos principais de variação na seqüência foram associados à variação do fenótipo: polimorfismo de um único nucleotídeo (PUN) e inserções/ deleções (INDELs), mas em comparação com as substituições de pares de bases, as INDELs são muito menos comuns no genoma e têm frequência particularmente baixa nas regiões dos genes codificadoras. Deste modo, em alguns casos o polimorfismo genético pode aumentar a suscetibilidade ao câncer (Efferth & Volm, 2005, Lovly & Carbone, 2010).

A grande maioria dos polimorfismos genéticos tem impacto moderado nos genes afetados, faz parte de um conjunto de amplos fatores poligênicos que alteram os efeitos dos fármacos, ou afeta genes cujos produtos desempenham papel desprezível na ação dos fármacos, em comparação com um efeito não genético expressivo (Matioli & Passos-Bueno, 2004).

A genotipagem, ou determinação do genótipo de um determinado indivíduo, pode ser realizada através de diferentes métodos. Entre eles podemos incluir a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) por amplificação direta de fragmentos genômicos, a PCR por amplificação de fragmentos de restrição (RFLP), a PCR de Fluorescência em Tempo Real e até o Sequenciamento Direto do DNA do Indivíduo (Santiago et al., 2002).

Os testes de genotipagem são voltados para cada local polimórfico específico conhecido, usando várias estratégias que geralmente dependem até certo ponto da combinação firme e específica de pelo menos um oligonucleotídeo com região flanqueadora ou superposta do DNA do local polimórfico. Como a variabilidade genômica é muito comum (locais polimórficos presentes em todas as poucas centenas de nucleotídeos), os polimorfismos “crípticos” ou não-reconhecidos podem interferir na combinação dos oligonucleotídeos, deste modo resultando em designações genotípicas falsas positivas ou falsas negativas. A integração completa da genotipagem à terapêutica exigirá padrões sofisticados, talvez necessitando de mais de um método para cada local polimórfico (Matioli & Passos-Bueno, 2004, Efferth & Volm, 2005).

Apesar de empregáveis e altamente sensíveis, a maioria destes métodos se torna cara se empregada para estudos populacionais. Assim, dentre estes ensaios, o que mostra melhor relação custo/benefício continua sendo a PCR e suas variantes. Pois tal método é capaz de detectar, simultaneamente, diversos polimorfismos em uma mesma reação (Zainuddin et al. 2003).

A técnica de PCR por amplificação de fragmentos de restrição (RFLP), envolve a clivagem de moléculas de DNA por enzimas de restrição e a separação por eletroforese em gel dos fragmentos gerados, sendo sua visualização em forma de bandas. Esta variabilidade é o reflexo de inserções, deleções ou ainda rearranjos que possam ter ocorrido em uma região, ou

ainda substituição de base na sequência de nucleotídeos que é reconhecida por uma determinada enzima de restrição, alternando dessa forma, o número de sítios de clivagem e, como consequência o tamanho dos fragmentos (Arias & Infante-Malachias, 2004, Gonzáles et al., 2008).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), foi descoberta em 1985 por Kary Mullis, da Cetus Corporation e se mostrou uma nova tecnologia – chave para o projeto genoma. A PCR forneceu uma alternativa simples para o isolamento de quantidades puras de seqüências específicas de DNA (Arias & Infante-Malachias, 2004).

Desde sua concepção, esta tecnologia causou uma verdadeira revolução na biologia tanto na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais como nas áreas aplicadas envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais domésticos. O impacto da PCR e dos métodos dela derivados levaram Kary Mullis a ganhar o prêmio Nobel de medicina no início da década de 90 (Arias & Infante-Malachias, 2004).

A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR, a torna particularmente poderosa para estudos genético e moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo. Muitos métodos tradicionais de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo de DNA foram acelerados ou substituídos pelo uso das inúmeras derivações da técnica de PCR (Alberts et al., 2010).

A detecção de variação de seqüências no DNA é importante para a identificação de mutações que causam doenças em um determinado gene, bem como para a detecção de polimorfismos de DNA. Uma vez que uma grande fração das variações genéticas é devido às diferenças produzidas pela mudança de base única na sequência de DNA, o uso de técnicas capazes de detectar substituições de uma única base quando se procura mutações e seqüências polimórficas foi um avanço tecnológico para a pesquisa destas variações (Matioli & Passos-Bueno, 2004; Reis 2006).

1.5. Reguladores do ciclo celular, mutações e o desenvolvimento de câncer.

O câncer é o resultado de um acúmulo de alterações genéticas que comprometem o controle do crescimento celular normal e a diferenciação terminal, em que o acúmulo de mutações no DNA é a causa subsequente ao desenvolvimento neoplásico e, consequentemente, ao surgimento da doença (Alberts et al., 2010).

A carcinogênese pode ser compreendida como um processo complexo no qual se encontram envolvidos muitos genes, particularmente os que regulam a estabilidade e o reparo do DNA, crescimento celular, imunidade e quimio-resistência às drogas. Um grupo de genes

envolvidos nesse processo é denominado genes supressores tumorais, os quais parecem agir normalmente, como reguladores da proliferação celular (Nagai, 1999; Sigal & Rotter, 2000; Cavalcante et al., 2002; Gleich & Salamone, 2002).

Dados epidemiológicos demonstram que o câncer é a segunda causa de óbitos na população mundial, sendo a primeira causa proveniente das doenças do sistema cardio-respiratório (American Cancer Society, 2013). No Brasil, estimativas para o ano de 2013 apontam que ocorrerão 518.510 novos casos de câncer. Em Goiás, acredita-se que no ano de 2012, a incidência para novos casos seja de 322,72/100.000 habitantes do sexo masculino e 276,37/100.000 para os habitantes do sexo feminino (INCA/MS, 2012). O aumento da expectativa de vida tem sido demonstrado como uma das causas responsáveis pela alta incidência do câncer no Brasil (INCA/MS, 2012).

Estima-se que grande parte das neoplasias resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais, sendo a contribuição exclusivamente genética responsável por apenas 5% de todos os tumores. A fração restante pode ser atribuída a fatores ambientais que atuam em conjunto com a suscetibilidade genética (Yuspa, 2000).

Diversos estudos demonstram que mutações em células somáticas e a progressão do ciclo celular envolvem a expressão de uma série de genes, dentre eles muitos oncogenes (Alberts et al., 2010). Os mecanismos de ativação desses genes, que participam na oncogênese, incluem translocações cromossômicas, mutações de ponto, deleções, inversões e amplificações do DNA (Alama et al., 2009).

Um fenótipo característico de todas as células tumorais é a desregulação do controle do ciclo celular. O crescimento anormal observado nestas células se deve às mutações de genes que controlam o ciclo celular. Tais genes monitoram a progressão das fases do ciclo celular nos pontos de checagem, de modo que uma fase começa quando termina a fase anterior. Diversos fatores extracelulares ou intracelulares podem causar o bloqueio do ciclo celular, por exemplo, a falta de nutrientes, mudanças na temperatura, depleção de nucleotídeos ou dano no DNA. O bloqueio ocorre provavelmente para impedir a herança das mutações genéticas (Canman & Kastan, 1997, Alberts et al., 2010). O bloqueio pode ocorrer também para o reparo do dano, mas caso este seja grave e irreparável, se desencadearia o processo de apoptose (King & Cidlowski, 1998).

É essencial a compreensão da cinética do ciclo celular para o uso apropriado da atual geração de drogas antineoplásicas. Muitos dos mais potentes agentes citotóxicos atuam em fases específicas do ciclo celular e, portanto, têm atividade apenas em células que estão em processo de divisão (Freshney, 2007).

O ciclo celular é composto de duas fases 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 e a G2 (gap 2), que prepara a célula 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. Existem dois pontos de controle durante o ciclo celular, um entre as fases G1 e S e outro entre as fases G2 e M. A maioria dos agentes antineoplásicos atua na fase S, porém alguns agem na fase M e outros exercem ações complexas no ciclo (Griffiths et al., 2000, Alberts et al, 2010).

Nos estudos *in vitro* da ação citotóxica das drogas antineoplásicas, verifica-se que há distúrbios do ciclo celular e morte celular, embora cada droga apresente mecanismos de ação específicos. Isto sugere que vários estímulos citotóxicos iniciam os eventos que conduzem a morte celular (Griffiths et al., 2000, Alama et al., 2009; Alberts et al, 2010).

A duas principais vias de morte celular são por necrose e por apoptose (Galluzzi et al., 2012). A necrose é a morte celular induzida por trauma e, portanto há uma resposta inflamatória. As características das células em necrose são: intumescimento celular e da mitocôndria, aumento da permeabilidade da membrana plasmática e ruptura da mesma, desintegração das organelas e dos componentes nucleares. A necrose é associada a danos graves como a hipóxia aguda e deficiência abrupta de nutrientes (Alberts et al, 2010). A apoptose ou morte celular programada pode ser ativada por diversos estímulos tais como agentes fisiológicos na embriogênese e no sistema imune. Em condições fisiológicas, a apoptose é um processo controlado, estando envolvida na homeostase do tecido, representando um mecanismo de destruição seletiva das células danificadas, cuja sobrevivência poderia prejudicar o organismo como um todo (Ramenghi et al, 2000; Maurillo et al, 2001, Galluzzi et al., 2012). A célula ao sofrer apoptose, apresenta alterações morfológicas e bioquímicas distintas daquela em necrose. A célula apoptótica é caracterizada pelo encolhimento celular, condensação e fragmentação da cromatina que produz fragmentos de 50 a 300 kpb. A célula apoptótica se fragmenta formando os corpos apoptóticos. O vazamento do citocromo c da mitocôndria para o citosol é uma das primeiras características bioquímicas que precede as alterações no núcleo da célula em apoptose. Estas propriedades diferem significativamente das características de necrose ou morte celular acidental (Maurillo et al, 2001, Galluzzi et al., 2012).

A desregulação da apoptose pode interromper o delicado balanço entre proliferação celular e morte celular e contribuir para o aparecimento de neoplasias e doenças auto-imunes (Danial & Korsmeyer, 2004).

As vias de sinalização que desencadeiam o processo apoptótico são complexas, sendo subdivididas principalmente em duas: a via intrínseca (via mitocondrial) e a extrínseca (via receptores de morte). A via extrínseca é mediada por receptores de morte na superfície celular, como FAS, TNFR (receptor do fator de necrose tumoral) ou receptores TRAIL. O estímulo do ligante de morte resulta na oligomerização dos receptores e recrutamento da proteína adaptadora Domínio de Morte FAS-associada (FADD) e caspase-8, formando o complexo de sinalização de indução de morte (DISC). A auto-ativação da caspase-8 no DISC é seguida pela ativação de caspases efetoras, incluindo as caspases 3, 6, e 7, que atuam como efetoras *downstream* do programa de morte celular (Ashkenazi & Dixit, 1998).

A via intrínseca é mediada por diversos estímulos apoptóticos, que convergem na mitocôndria. A migração do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma inicia uma cascata de caspases. O citocromo c citossólico se liga ao fator ativador de protease apoptótica (Apaf-1) e pró-caspases-9, gerando o apoptossomo. Dentro do apoptossomo, a caspase-9 é ativada, levando ao processamento da caspase-3 e, subsequentemente, de outras proteases e nucleases que levam aos eventos terminais da morte celular programada (Jin & El-Deiry, 2005).

A regulação da via mitocondrial é realizada pelos membros da família Bcl-2, proteínas citoplasmáticas capazes de integrar sinais de sobrevivência ou morte celular gerados nos meios intra e extracelular (Kollenko et al, 2000). Essa família subdivide-se em duas classes: proteínas anti-apoptóticas (Bax, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, A1), os quais sensibilizam ou conduzem a célula a apoptose (Kollenko et al, 2000). A via mitocondrial também é susceptível à regulação negativa pelas proteínas da família dos IAPs (c-IAP-1 e c-IAP-2, X-IAP e Survivina), as quais podem inibir, por exemplo, as Caspases 3 e 9, mas cuja atividade pode ser bloqueada pelo SMAC (Kollenko et al, 2000; Shi, 2002, , Galluzzi et al., 2012).

É provável que todas as células do corpo humano possuam a capacidade intrínseca de sofrer apoptose. Isto sugere que todas as estruturas e processos requeridos em pelo menos uma via de apoptose estão presentes na célula e provavelmente sejam necessários à sua sobrevivência (Green & Kroemer, 1998, Galluzzi et al., 2012).

Pesquisas realizadas nesta última década têm demonstrado que a morte celular provocada pelas drogas quimioterápicas ocorre principalmente por indução de apoptose. Esta classe de drogas tem o potencial de restabelecer a apoptose celular, processo este alterado em células cancerígenas (Galluzzi et al., 2012).

1.6. Quimioterapia antineoplásica

A quimioterapia antineoplásica tem como objetivo o tratamento de diversos tumores malignos, tornando-se uma das mais importantes e promissoras maneiras de combater o câncer. Essa forma de tratamento pode ser empregada de forma curativa ou paliativa, dependendo do tipo e extensão do tumor, além da condição física do paciente. A associação da quimioterapia a outras formas de tratamento é bastante comum (Kelland et al., 2007). Seu emprego antes da cirurgia e/ou radioterapia na tentativa de promover a erradicação de micrometástases constitui a quimioterapia neo-adjuvante. Porém, o uso depois da cirurgia e/ou radioterapia constitui a quimioterapia adjuvante (Hartinger, 2006).

O ataque indiscriminado promovido pelas drogas antineoplásicas às células de rápida proliferação, cancerosas ou normais, produz os indesejáveis efeitos colaterais ou tóxicos, conhecidos e extremamente temidos pelos indivíduos que necessitam submeter-se ao tratamento (Silveira-Lacerda et al., 2010).

A modulação dos processos de biotransformação é geneticamente determinada e é provável que isto seja uma das maiores fontes de variabilidade interindividual na suscetibilidade aos agentes carcinógenos (Alberts et al., 2010). Alguns indivíduos ou subgrupos podem apresentar risco aumentado de desenvolver o câncer, devido a diferenças individuais no biometabolismo. O estudo das variações na capacidade de metabolização de xenobióticos já identificou inúmeros polimorfismos genéticos, sendo a maioria desses de relevância clínica (Gozáles et al., 2008).

O processo de biotransformação abrange principalmente duas fases: Fase I, que compreendem as reações de oxidação, hidrólise ou redução, onde grupos funcionais são adicionados à molécula do xenobiótico, ou onde os grupos funcionais já presentes na molécula original são expostos; e reações de Fase II, que englobam as reações de conjugação a substratos endógenos ou síntese, envolvendo os grupos funcionais. A biotransformação converte substâncias originalmente lipofílicas em metabólitos mais hidrofílicos, além de poder levar à perda do potencial tóxico ou farmacológico, e ainda, facilitar sua detoxificação (Parkinson, 2001, Metzger et al., 2006).

A biotransformação de certos xenobióticos (Ex.: Polihidrocarbonetos aromáticos, PHA), altera bioquimicamente essas moléculas que originalmente são pouco reativas, em produtos mais eletrofílicos que irão reagir com centros nucleofílicos das células, como proteínas e o DNA. Essa reação leva a formação de adutos, tornando-os, portanto, mais tóxicos (Parkinson, 2001, Gozáles et al., 2008). Esses adutos tendem a ser reparados por enzimas de reparo, mediadas pela proteína p53, mas caso a célula se divida antes que o reparo seja devidamente efetuado, esse aduto poderá

levar ao aparecimento de mutações, podendo ser do tipo pontual ou mesmo causar perdas cromossômicas como o *cross link* (Emerick 2007).

Alguns carcinógenos ambientais, processos e agentes endógenos, como processos inflamatórios e hormônios esteroidais, podem levar a um estímulo reversível para a proliferação celular, diminuindo as chances do reparo à mutação ocasionado pela formação do aduto, e nestes casos, estes carcinógenos são considerados promotores da carcinogênese. Avaliações subseqüentes deverão fornecer subsídios para o melhor entendimento do papel dos genes "biometabolizadores" na carcinogênese humana (Eubanks, 1994; Guenguerich; 2000, Metzger et al., 2006).

Estudos sobre o polimorfismo genético de enzimas envolvidas na ativação e detoxificação de agentes carcinogênicos sugerem uma correlação com o risco desenvolvido em diversos tipos de neoplasias (Masson et al., 2005). Adicionalmente ao polimorfismo genético, a expressão local de enzimas do metabolismo dos agentes carcinogênicos pode ser também relevante, particularmente para os tumores da cavidade oral, no qual, dieta, fumo, álcool ou inflamação são capazes de induzir a atividade de enzimas específicas no órgão alvo (Kraag et al., 2012).

Os agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer podem ser divididos de acordo com as seguintes classes: agentes alquilantes, no qual a ciclofosfamida está inserida, sendo o agente mais amplamente utilizado desta classe; antimetabólitos; produtos naturais, como os alcalóides da Vinca rósea, os taxanos, alguns antibióticos, entre outros; hormônios e antagonistas e agentes diversos, tais como os complexos de coordenação da platina, a antracenodiona, o inibidor da tirosinocinase (Chabner & Calabresi, 1995; Almeida, et al. 2005).

Os agentes alquilantes, de forma geral, têm como alvo a molécula de DNA da célula tumoral, apresentando geralmente boa eficácia e produzindo aumentos significativos na expectativa de vida de pacientes com câncer, especialmente quando associados à antineoplásicos de diferentes mecanismos de ação (Haskel, 1990, Reis, 2006). Porém, por sua relativa inespecificidade, tornam-se tóxicos também para os tecidos saudáveis, principalmente os de maior grau de proliferação. Conseqüentemente, os esforços agora estão direcionados no sentido de se produzir agentes mais seletivos. Se isso for possível, poderíamos dispor de drogas mais eficazes, pois agiriam especificamente nos mecanismos moleculares da neoplasia, com um grau bem menor de toxicidade (Oliveira & Alves, 2002, Silveira-Lacerda et al., 2010b).

1.7. Genes de Resistência a Múltiplas Drogas (MDRs)

Atualmente, têm alcançado grandes avanços no desenvolvimento, seleção e aplicação de agentes quimioterapêuticos, muitas vezes com sucessos clínicos notáveis, como no caso de tratamento para os linfomas ou de agentes baseados em platina para o tratamento de câncer testicular. No entanto, uma grande parte de pacientes com tumores sólidos, principalmente os em estágios avançados, ainda irão a óbito. Uma parcela dessas mortes acontece, principalmente, devido à administração de uma quimioterapia ineficaz, especialmente quando se emprega agentes citotóxicos, o que leva a um aumento da probabilidade de efeitos colaterais e a consequente diminuição da qualidade de vida do paciente (Potti et al, 2008).

Uma das causas mais importantes da falha no tratamento do câncer é a resistência aos quimioterápicos. A quimioterapia é o principal tratamento para cânceres sistêmicos, os quais não podem ser curados por cirurgia ou radioterapia. Embora estes métodos possam ser eficazes em alguns casos, a maior parte dos cânceres metastáticos se apresenta resistente à quimioterapia ou, embora responda ao tratamento inicialmente, retorna como um câncer que adquiriu resistência. Esse fenômeno recebeu o nome de resistência a múltiplas drogas (*Multidrug Resistance* ou MDR) por abranger um amplo espectro de agentes citotóxicos (Goldman, 2003).

O mecanismo de resistência mais bem estudado é o efluxo de compostos citotóxicos mediado por proteínas transmembrana que levam à diminuição do acúmulo celular da droga e sua toxicidade. Várias bombas de efluxo relacionadas à MDR já foram caracterizadas. A maioria delas pertence à superfamília de transportadores ABC. Dos membros dessa família, a proteína MDR melhor caracterizada é P-glicoproteína codificada pelo gene MDR1. Nos trabalhos iniciais, foi observado que células que apresentavam o fenótipo de resistência a múltiplas drogas apresentavam também um aumento na expressão da glicoproteína P (Pgp, onde P significa permeabilidade). Outros membros da família de transportadores ABC relacionados ao fenótipo de MDR também já foram descritos, como MRP1, MRP3 e BCRP. A LRP é uma proteína que não pertence à superfamília de transportadores ABC, mas também está relacionada à resistência as drogas em alguns tumores. Contudo, o exato valor clínico das proteínas MDR nas neoplasias ainda não se encontra claro (Schwab et al. 2003; Coburger et al, 2009).

1.7.1. Glicoproteína-P

A glicoproteína P pertence à subfamília ABCB da superfamília de transportadores ABC (ATP-binding cassette), que compreende proteínas que transportam uma ampla variedade de substratos, tais como açúcares, aminoácidos, peptídeos, íons inorgânicos, além de diversos compostos hidrofóbicos e metabólitos. Diversos estudos mostraram que a Pgp age sobre uma

grande quantidade de substratos que apresentam como característica comum apenas o fato de serem, em geral, lipofílicos e anfipáticos (Dean et al. 2001; Schwab et al. 2003; Marzolini et al. 2004, Coburger et al, 2009).

São conhecidas várias isoformas da glicoproteína P, classificadas em classes I, II e III. As classes I e II estão relacionadas com a resistência a múltiplas drogas, enquanto a classe III está envolvida no transporte de fosfolipídios (van Helvoort et al. 1996; Dey 2006). Camundongos, ratos e hamsters apresentam as três classes de Pgp. Em humanos, são descritas duas isoformas, MDR1 (classe I) e MDR3 (classe III) codificadas, respectivamente, pelos genes ABCB1 e ABCB4 (Gottesman & Pastan 1993). Há uma alta identidade de sequência entre as isoformas humanas, a despeito das diferenças na função de transporte que apresentam, e mesmo entre genes MDR humanos e murinos é observada uma alta homologia. O gene ABCB1 (NT_007933; NM_000927), em humanos, que é também chamado de MDR1, está localizado em 7q21.1 (Callen et al. 1987) e é constituído por uma região promotora e 29 éxons, totalizando 209 kb (Chen et al. 1990; Bodor et al. 2005).

Embora tenha sido inicialmente detectada em células tumorais, a Pgp é também expressa em células de tecidos normais. No trato gastrointestinal, a primeira barreira de defesa do corpo contra a exposição oral a drogas e toxinas, a Pgp apresenta um gradiente de expressão crescente do estômago em direção ao duodeno e está presente na membrana apical do epitélio (Thiebaut et al. 1987; Thörn et al. 2005). Hepatócitos apresentam Pgp na superfície canalicular apical e se propõe que façam a excreção para a bile de xenobióticos que não tenham sido eliminados no intestino (Leslie et al. 2005). Nos rins, a Pgp é encontrada na superfície apical das células epiteliais dos túbulos proximais, onde medeia a exportação de xenobióticos do sangue para a urina (Thiebaut et al. 1987; Leslie et al. 2005). A atividade da Pgp no fígado e nos rins parece estar relacionada à eliminação de drogas (Kusuhara et al. 1998), enquanto no intestino, reduz a absorção das mesmas (Watkins 1997), além de possivelmente prevenir o acúmulo de bactérias e seus produtos (Leslie et al. 2005). No pulmão, a Pgp está localizada na superfície apical do epitélio dos brônquios e bronquíolos e também em macrófagos alveolares (Scheffer et al. 2002). Na placenta, a Pgp é expressa em níveis relativamente altos na borda do sinciciotrofoblasto (Atkinson et al. 2003). Nestes dois últimos tecidos, e também nas barreiras hemato-encefálica, hemato-cérebro-espinhal e hemato-testicular, a Pgp atua na proteção contra xenobióticos, reduzindo a exposição da célula e tecidos a substâncias potencialmente tóxicas (Fromm 2002).

Células do sistema imunológico também expressam Pgp e diversos dados sugerem um papel importante desta na resposta imunológica, apesar de ainda serem necessárias investigações mais profundas para elucidar em quais processos imunológicos e de que forma a Pgp estaria

envolvida. Chaudhary et al. (1992) analisaram a expressão de Pgp (através de marcação com anticorpos monoclonais), constatando que há um gradiente de expressão desta proteína nas células do sistema imunológico, sendo a expressão em células CD56+>CD8+>CD4+. Da mesma forma, Klimecki et al. (1994) observaram que esta proteína é mais expressa em células CD56+ (NK) e CD8+ (linfócitos T citotóxico) que em células CD4+ (linfócitos T auxiliar), CD19+ (linfócitos B) e CD14+ (monócitos), enquanto células CD15+ (granulócitos) não apresentam Pgp na superfície.

Ainda no contexto imunológico, já foi demonstrado que algumas citocinas (como IL-2, IL-4 e INF- γ) são transportadas pela Pgp e que células expostas a citocinas inflamatórias apresentam aumento na expressão do mRNA de MDR1 (Drach et al. 1996; Bertilsson et al. 2001; Park et al. 2003). Além disso, Randolph et al. (1998) observaram que a migração de células dendríticas é inibida com a presença de inibidores da Pgp (verapamil ou anticorpos monoclonais específicos) e propuseram que a Pgp modula a migração destas através da regulação do transporte de citocinas (IL-1 β e/ou TNF).

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidar a influência da expressão do gene MDR1 na farmacocinética de diferentes substâncias. Além disso, a participação da Pgp na barreira de proteção do organismo contra diversas substâncias e o fato de defeitos em outros transportadores da família ABC terem sido associados a doenças humanas, vêm incentivando a análise do papel da Pgp e dos padrões de expressão do gene MDR1 na susceptibilidade e desenvolvimento de doenças (Krishna & Mayer, 2000).

1.7.2. Citocromos P450

Desde sua descoberta em tumores resistentes à quimioterapia, o papel das proteínas metabolizadoras e de transporte, como a P-gp, vem sendo amplamente reconhecido, não apenas no tratamento quimioterápico, mas também na absorção, distribuição e eliminação de drogas (Fischer et al. 2005). Inclusas nesse grupo estão as enzimas dos citocromos P450 (CYPs), que representam uma superfamília de enzimas capazes de metabolizar várias drogas e substâncias químicas (Santiago, 2002). A superfamília de genes do Citocromo P450 codifica numerosas enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo de compostos endógenos como os hormônios esteróides, ácidos graxos e algumas vitaminas lipossolúveis (A e D), assim como no metabolismo de xenobióticos, entre eles várias drogas, agentes carcinógenos, pesticidas, alcalóides entre outros (Wislocki, 1980; Ortiz De Montellano, 1995). O complexo do citocromo P450 está altamente distribuído em animais, vegetais e protistas, existente na natureza antes mesmo da divisão entre organismos eucariontes e procariontes (Black & Coon, 1986).

As enzimas do citocromo P450 são hemoproteínas que contêm um citocromo do tipo b (Hodgson & Levi, 1994). Estas proteínas apresentam como grupo prostético, o heme ou ferroprotoporfirina IX. No heme, o ferro é capaz de fazer 6 ligações. Quatro destas ligações são feitas com os átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos. A quinta ligação do átomo de ferro é com o tiolato (S-) proveniente do resíduo de cisteína, situado próximo à região C-terminal da cadeia polipeptídica única da apoproteína, composta de 400 a 500 aminoácidos. Graças a sua característica eletrofílica, o enxofre da cisteína faz com que o átomo de ferro mantenha-se, normalmente, no estado férrico (Fe^{+3}). A existência do quinto ligante confere aos citocromos P450, quando reduzidos, uma grande afinidade pelo monóxido de carbono e um espectro característico de absorção máxima a 450 nm. O sexto ligante pode ser a água - CYP no estado férrico; o monóxido de carbono ou o oxigênio molecular - CYP no estado ferroso (Lewis, 1996).

Em mamíferos, as monooxigenases envolvidas na biotransformação de xenobióticos estão localizadas principalmente no fígado, mas também em sítios extra-hepáticos, tais como pulmões, rins, laringe, cérebro, glândulas supra-renais, pâncreas, baço, coração, testículos, ovários e placenta (Parkinson, 2001; Degawa, 1994; Murray & Reidy, 1990). Além de participarem do metabolismo de xenobióticos, os citocromos P450 são essenciais para a homeostase sanguínea, biossíntese do colesterol e esteroidogênese (Nelson, 1993).

Dentre as CYP, aquelas pertencentes à família 3A (CYP3A) são particularmente importantes devido ao seu papel no metabolismo de uma ampla variedade de agentes significativamente importantes toxicologicamente, fisiologicamente e farmacologicamente. A superfamília de citocromo P450 (CYP) é o maior determinante na meia-vida de muitas moléculas terapêuticas e exerce seus efeitos fisiológicos através da modulação de sua atividade enzimática e pela condução destas moléculas para as vias de degradação proteossomal. (Sakuma, 2000).

Assim, a determinação do potencial de inibição de CYP e sua identificação no metabolismo de novas entidades químicas (NCEs) por ela mediado, é absolutamente necessário para a descoberta de drogas mais eficazes e seguras. Pacientes com câncer, às vezes, são submetidos a regimes de múltiplos tratamentos, aumentando o risco de interações droga-droga, o que pode levar a reações adversas. Adicionalmente, polimorfismos genéticos nos genes CYPs podem complicar tais terapias entre diferentes populações étnicas (Purnapatre et al., 2008).

1.8. Os Complexos de Rutênio como agentes quimioterápicos antitumorais

Segundo Keppler & Jakupc (2003), os complexos de rutênio e gálio tem atraído a atenção devido aos seus potenciais antitumorais. Em estudo feito com $\text{Hind}[\text{trans-RuCl}_4(\text{ind})_2]$ e

o tris(8-quinolinato) de gálio(III), observou-se que o complexo de rutênio tem atividade particularmente alta contra tumores coloretais, com melhor biodisponibilidade e concentração plasmática adequada que o gálio. Quando comparado ao complexo de gálio, o composto de rutênio apresenta grande capacidade antiproliferativa e capacidade superior de induzir apoptose *in vitro*.

Os compostos de rutênio têm sido objetos de grande atenção por terem propriedades antimetastática e de baixa toxicidade. Os componentes do rutênio parecem penetrar na célula tumoral e ligar efetivamente ao seu DNA, realizando ligação cruzada com as duas fitas, sendo então chamados de *cross linkers* (Kostova, 2006).

Existem três hipóteses principais do rutênio que fazem com que seus derivados sejam bem apropriados para aplicações biológicas; mudança de ligante – os complexos de rutênio Ru (II) e Ru (III) apresentam cinética de mudança de ligante similar aos complexos de platina (II), sendo importante para as drogas atingirem o alvo biológico sem serem modificadas; estados de oxidação – o rutênio é o único entre o grupo de metais em que os estados de oxidação são acessíveis em condições fisiológicas, permitindo a administração de complexos de Ru (III) que poderão ser ativados por redução formando complexo de Ru (II) nos tecidos alvos. No sistema biológico, a redução de Ru (IV) e Ru (III) é favorecida pela glutatona, ascorbato e proteínas transportadoras de um único elétron, enquanto que o oxigênio e citocromo oxidase promovem a oxidação do Ru (II); mimetizando o ferro – a baixa toxicidade das drogas de rutênio é explicada pela habilidade que este elemento tem de imitar o ferro na ligação a várias biomoléculas, incluindo a transferrina e a albumina. Em mamíferos, estas duas proteínas são responsáveis pela solubilização e transporte de ferro, reduzindo a toxicidade deste metal (Allardyce & Dyson, 2001; Pereira et al., 2009; Silveira-Lacerda, 2010a; Silveira-Lacerda, 2010b).

Quanto aos mecanismos de ação molecular, dentre os compostos de rutênio com atividade antitumoral, o mais bem explorado é o NAMI {Natrans-[Ru (Im) (Me₂SO)Cl₄]}. O complexo de rutênio NAMI, atualmente na fase I de triagem clínica, apresenta atividade antimetastática e é ativo contra uma série de tumores incluindo carcinoma de pulmão, melanoma e câncer mamário (Sava et al, 1992). Segundo Bergamo et al. (1999), NAMI-A apresenta ser mais estável e de maior facilidade de ser sintetizado que NAMI. Tratam-se de compostos menos tóxicos em relação à cisplatina, pois não modifica o crescimento celular causando bloqueio no ciclo celular de células tumorais na fase pré-mitótica, ao contrario da cisplatina que reduz a proliferação celular.

Mestroni et al. (1989) sugeriram que *cis* e *trans*-RuCl₂(DMSO)₄ interagem com o DNA *in vivo*. Estudos de interação *in vitro* com nucleotídeos resultaram na ligação entre rutênio e

DNA, que ocorre principalmente no N7 da guanina entre “clusters” na dupla hélice (Kung et al., 2001).

A redução do Ru (III) para Ru (II) pode ser um mecanismo fundamental da ativação celular por compostos de rutênio (Depenbrock et al., 1997). Os compostos de Ru (III) podem ser reduzidos em áreas tumorais com hipóxia, a qual é capaz de ligar-se rapidamente e causar dano ao DNA (Grguric-Sipka et al., 2003).

Para Kapitza et al. (2003), o complexo *trans*-[tetraclorobisindazólorutenato (III)] e seu sal de sódio análogo, se mostraram efetivos na terapia de tumor colorretal autóctone de ratos, e o seu análogo imidazólico mostrou atividade significativamente mais baixa. O complexo *trans*-[tetraclorobisindazólorutenato(III)] e seu sal de sódio análogo exibiram capacidade de induzir apoptose, além de despolarização da membrana mitocondrial, redução da atividade do bcl2 e ativação da caspase 3. Esses efeitos podem ser parcialmente inibido pela N-acetyl-cisteína, indicando envolvimento do estresse oxidativo tanto na indução da apoptose quanto na indução de danos no DNA. A inibição pela N-acetil-cisteína é muito mais efetiva em células não malignas, apontando para um potencial efeito protetor dos tecidos normais pela ação antioxidante.

Mestroni et al. (1989) sugeriram que *cis* e *trans*-RuCl₂(DMSO)₄ interagem com o DNA in vivo. Estudos de interação in vitro com nucleotídeos resultaram na ligação entre rutênio e DNA, que ocorre principalmente no N7 da guanina entre agrupamentos na dupla hélice (Kung et al., 2001).

Em trabalhos anteriores, foi descrito que o composto cloreto de *cis*-(dicloro)tetraaminorutênio(III) (*cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl) apresenta atividade citotóxica sobre linhagem tumoral humanas Jurkat e HeLa, com IC₅₀ de 190 e 3,5µM, respectivamente (Frasca et al., 2001). Em célula tumoral A-20 de camundongo, a atividade citostática foi observada em concentrações $\geq$ a 0,1mg.mL⁻¹ de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (Silveira-Lacerda et al., 2010b). A citotoxicidade destes complexos de rutênio parece estar correlacionada com sua ligação com o DNA, no entanto, o mecanismo de ação destas drogas permanece ainda desconhecido (Menezes et al., 2007). Com os resultados desses trabalhos iniciais, veio a iniciativa de se testar o mesmo composto frente a células do sangue periférico humano, com objetivo de estudar o efeito genotóxico do mesmo.

Menezes et al. (2007), estudou o mesmo complexo de rutênio e foi observado que esse complexo possui atividade antitumoral sobre a linhagem tumoral Sarcoma 180 de camundongos *in vivo* e *in vitro*; o valor encontrado da DL₅₀ foi de 99,76mg/kg de animal, relativamente alta comparada às DL₅₀ observadas para outros quimioterápicos derivados de. De acordo com as análises bioquímica e hematológica do sangue dos animais correlacionadas a histopatologia dos

órgãos, o complexo de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl não provocou efeito toxicológico grave, não foi genotóxico para células da medula óssea de camundongos, apresentou atividade bactericida sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e demonstrou interagir com o DNA plasmidial pUC18.

Ribeiro et al. (2008), avaliou, através de estudos citogenéticos, cromossomos humanos em metáfase e possíveis fragmentação de DNA, detecção de aberrações espontâneas e/ou induzidas pelo uso do composto cloreto de *cis*-(dicloro)tetraaminorutênio(III), em cultura de linfócitos humanos do sangue periférico. Sendo que não se observou alterações em nenhuma das células tratadas, ou seja, sem danos no DNA.

Finalmente, o complexo ditionato de *cis*-tetraammino(oxalato)rutênio(III), assim como o cloreto de *cis*-(dicloro)tetraaminorutênio(III), apresenta grande potencial para o uso clínico por possuir baixa toxicidade, segundo dados preliminares provenientes de estudos realizados no laboratório de Genética Molecular e Citogenética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. Com este composto tem-se observado baixa toxicidade frente às células humanas normais e grande capacidade de bloqueio do ciclo celular de células de linhagem tumoral (Pereira et al., 2010). Estudos indicam que comparados com outras drogas organometálicas, os compostos baseados em complexos de rutênio estão entre os mais promissores (Allardyce & Dyson, 2001; Lima et al., 2012).

2.0. JUSTIFICATIVA

Da necessidade de se estudar marcadores moleculares associados à resistência, metabolismo e eliminação de fármacos antitumorais e de se realizar um estudo de perfil de expressão gênica de diferentes linhagens celulares tratadas com fármacos antitumorais de rutênio:

O conhecimento da biologia molecular do câncer tem permitido aos pesquisadores criar novos alvos terapêuticos para tratar esta doença e minimizar seus efeitos tóxicos sistêmicos sobre as células saudáveis. Atualmente, é de fundamental importância elucidar a relação entre o polimorfismo genético, a expressão gênica e a capacidade individual de metabolização, eliminação e resistência às drogas. Assim, diversas ferramentas podem ser utilizadas na criação de novos alvos terapêuticos, através da identificação de moléculas alvo em vias metabólicas, transportadores e receptores de medicamentos.

O interesse por novos fármacos antitumorais a base de metais vem crescendo nestes últimos anos, devido aos bons resultados obtidos por grupos de cientistas. Estudos revelam que os complexos de rutênio apresentam uma incrível capacidade de inibir a mitose, o que pode estar relacionado com a inibição da síntese de DNA, o bloqueio do ciclo celular na fase G2 ou até mesmo nos processos de expressão gênica.

A habilidade de modular o recebimento e a liberação de mensageiros celulares e outras moléculas intercelulares, como por exemplo, o Ca^{2+} (Clarke, 2003), revela que as ações realizadas pelos complexos de Ru^{II} e Ru^{III} na célula pode ser mais complexo e amplo do que se espera, abrindo um importante caminho para se entender os mecanismos pelos quais os complexos organometálicos desempenham suas atividades no ambiente celular, conhecimento este que é crucial para o sucesso da aplicação clínica destes complexos.

O estudo dos complexos organometálicos Cloreto de *cis*-(dicloro)Tetraaminorutênio(III) e Ditionato de *cis*-tetraammino(oxalato)rutênio(III), por apresentarem, principalmente, atividade antitumoral, leva a necessidade de se realizar uma avaliação mais profunda e detalhada de forma a se compreender as diferentes propriedades químicas e biológicas desses novos compostos. Estudando seus possíveis efeitos biológicos e toxicológicos, na estabilidade genômica e seu mecanismo de ação, pode-se levar ao desenvolvimento de fármacos com uma atividade mais acentuada e toxicidade diminuída. Os estudos nessa área permitem a descoberta e identificação de novos alvos terapêuticos, a revisão dos protocolos de estudo e das exigências para a

aprovação de novos fármacos, o desenvolvimento de testes citológicos e genéticos para a escolha de medicamentos, a revisão das doses preestabelecidas e outras realizações.

Finalmente, maiores investigações do mecanismo de ação destes complexos de rutênio se tornam importantes para que se possa definir seu potencial clínico, contribuindo para a possível o desenvolvimento de novas drogas antitumorais, com propriedades complementares àquelas exibidas pelos fármacos utilizados na clínica atual.

3.0. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos biológicos de citotoxicidade e indução da expressão gênica de marcadores relacionados à resistência e metabolização de drogas, Glicoproteína-P e Citocromos P450, em duas linhagens celulares tumorais, leucemia mielóide crônica humana (K-562) e carcinoma de pulmão humano (A549), tratadas *in vitro* com dois complexos metálicos de rutênio, o Cloreto de *cis*-(dicloro)tetraaminorutênio(III) e o Ditionato de *cis*-tetraammino(oxalato)rutênio(III).

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade de dois complexos metálicos de rutênio, Cloreto de *cis*-(dicloro)tetraaminorutênio(III) [*cis*CRu(III)] e o Ditionato de *cis*-tetraammino(oxalato)rutênio(III) [*cis*DRu(III)], nas linhagens tumorais leucemia mielóide crônica humana (K-562) e carcinoma de pulmão humano (A549),
- Determinar a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) dos complexos metálicos de rutênio *cis*CRu(III) e *cis*DRu(III) nas linhagens tumorais K-562 e A-459;
- Avaliar a indução da expressão de genes Caspase 3, Caspase 8 e Caspase 9, envolvidos na cascata apoptótica, nas linhagens tumorais K-562 e A-459 tratadas com os complexos metálicos de rutênio *cis*CRu(III) e *cis*DRu(III);
- Avaliar o nível de expressão do gene codificador para P-gp, no contexto celular da Resistência a Múltiplas Drogas (MDR), nas linhagens tumorais leucemia mielóide crônica humana (K-562) e carcinoma de pulmão humano (A549), após tratamento com dois complexos metálicos de rutênio, através de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real;
- Avaliar o nível de expressão dos genes codificadores para as CYPs, no contexto celular da Metabolização de Drogas Antitumorais, em nas linhagens tumorais leucemia mielóide crônica humana (K-562) e carcinoma de pulmão humano (A549) após tratamento com dois complexos metálicos de rutênio, através de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real;

- Correlacionar os efeitos citotóxicos e os níveis de indução de expressão de MDRs e CYPs nas linhagens tumorais leucemia mielóide crônica humana (K-562) e carcinoma de pulmão humano (A549) tratadas com os complexos metálicos de rutênio *cis*CRu(III) e *cis*DRu(III) e os complexos metálicos de platina *cis*-diaminodicloroplatina(II) (Cisplatina) e *cis*-diamino (1,1-ciclobutano dicarboxilato)-platina (II) (Carboplatina);
- Aprofundar os conhecimentos sobre dos efeitos biológicos dos quimioterápicos antitumorais estudados, a fim de favorecer o possível desenvolvimento de novos fármacos com efeito antitumoral.

4.0.MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

A presente pesquisa foi realizada como parte de um estudo multicêntrico desenvolvido pelas equipes que compõem a Rede Goiana de Pesquisa em Farmacogenética e Farmacogenômica, representada pelo Laboratório de Genética Molecular e Citogenética (LGMC) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, pelo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (FarmaTec) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas Toxicológico-Farmacológicas (NEPET) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, pelo Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF) e pelo Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Duas linhagens tumorais, leucemia mielóide crônica humana (K-562) e carcinoma de pulmão humano (A549), cultivadas *in vitro*, foram submetidas ao tratamento com dois compostos baseados em rutênio, Cloreto de *cis*-(dicloro)tetraaminorutênio(III), de fórmula $cis-[Cl_2(NH_3)_4Ru]^+Cl^-$ e Ditionato de *cis*-tetraammino(oxalato)rutênio(III), de fórmula $cis-[Ru(C_2O_2)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$; assim como dois fármacos antitumorais de platina atualmente utilizados clinicamente, a Cisplatina e a Carboplatina. Foram empregadas diferentes concentrações em cada um dos tratamentos. Após os tratamentos foi determinado Concentração Inibitória de 50% (IC_{50}) dos dois compostos de rutênio estudados, assim como dos dois fármacos antitumorais de platina, frente as duas linhagens tumorais estudadas através do método do MTT. Após a determinação da IC_{50} , seus valores passaram a ser utilizados como referência para os estudos posteriores de determinação da concentração de DHL disponível em meio de cultura após o tratamento das linhagens tumorais com os compostos de rutênio e os fármacos antitumorais de platina, de avaliação da expressão de genes envolvidos na cascata apoptótica (caspases 3, 8 e 9), de resistência a múltiplas drogas (Pgp/MDR1) e de metabolização de fármacos CYPs (3A4, 2C9, 2C19).

4.2.Síntese dos compostos Compostos de Rutênio

Os compostos $cis-[Cl_2(NH_3)_4Ru]^+Cl^-$ e $cis-[Ru(C_2O_2)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ foram sintetizados pelo Laboratório de Química Supramolecular do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia e pelo Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, seguindo os procedimentos determinados por Gleu & Breuel (1938), com modificações adaptadas por Pavanin (1988).

4.3. Linhagens celulares e manutenção do cultivo celular

Para os ensaios biológicos foram utilizadas as linhagens leucemia mielóide crônica humana (K-562 ATCC®# CCL-243TM) e carcinoma de pulmão humano (ATCC®# CCL-185TM). Todas as linhagens celulares foram mantidas em cultura a 37°C, 5% CO₂ em meio RPMI 1640 ou DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM L⁻¹ de glutamina, 100IU mL⁻¹ de penicilina e 100µg mL⁻¹ de estreptomicina segundo protocolo estabelecido pela *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EUA).

4.4. Avaliação da viabilidade por azul de tripano

Durante os ensaios para avaliação da viabilidade celular por MTT, da citotoxicidade por DHL, da expressão de genes por PCR em tempo real, assim como na manutenção das culturas *in vitro*, no momento da coleta das células ou do repique, para pré-controle, uma parte das células foi destinada para a avaliação da viabilidade celular pelo método de incorporação do corante azul de tripano. Para o estudo de viabilidade celular por Azul de Tripiano foi seguindo o protocolo definido por Martins (2005), após período de incubação com as drogas a suspensão celular foi diluída (1:10) em solução de Azul de Tripiano, onde foi realizada a leitura em hemocitômetro (Câmara de Neubauer). O princípio do método baseia-se na entrada do corante nas células não viáveis (mortas) que adquirirão uma cor azulada. As células viáveis não apresentam coloração, devido sua membrana celular permanecer íntegra, o que impede a entrada do corante.

4.5. Ensaio de viabilidade celular por Ensaio de MTT

Para avaliar a viabilidade celular após tratamento com os compostos de Rutênio, foi utilizado o método colorimétrico do MTT. Este consiste na medida da atividade da desidrogenase mitocondrial, a qual é capaz de metabolizar o reagente 3-(4,5-dimetiltiazol) 2,5 difenil tetrazólico (MTT) em um composto insolúvel e colorido denominado formazan. 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, 2×10^4 células das linhagens tumorais plaqueadas em microplacas de 96 poços na ausência ou presença dos compostos de rutênio e platina (0,2 – 1000µM) e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂, por 48 horas. 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 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 fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \text{Absorbância do Tratamento} / \text{Absorbância do controle negativo} \times 100.$$

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

4.6. Avaliação da toxicidade pelo ensaio de DHL

O dano à membrana plasmática das células tumorais foi avaliado pela mensuração da quantidade de DHL no meio extracelular. Foram coletados 25 μL de cada poço (placa de 96 poços) o sobrenadante da cultura. A atividade da DHL foi determinada pelo kit colorimétrico Desidrogenase Lactica (DHL) (Doles, Goiânia, GO, Brasil).

4.7. Extração de RNA

Passado os períodos estabelecidos de tratamento, as células foram centrifugadas a 3000 RPM por 10 minutos e o pellet de células foi submetido à extração de RNA total utilizado o reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as instruções presentes no protocolo fornecido pelo fabricante. Todas as amostras obtidas foram quantificadas por espectrofotometria e armazenadas em freezer à temperatura de $-80^{\circ}C$, onde permaneceram até serem submetidas a RT-qPCR.

4.8. Transcrição Reversa e PCR quantitativa em tempo real

As células de diferentes linhagens foram incubadas com diferentes concentrações do composto estudado durante 48 h, em estufa úmida, com 5% de CO_2 e diluídas em tampão TBS a uma concentração final de $2,5 \times 10^6$ células mL^{-1} . Foi realizada então uma PCR quantitativa em tempo real, utilizando-se primers específicos para os genes estudados (Tabel 2), de forma a se avaliar o perfil de expressão destes genes nas células expostas à droga. As análises de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o sistema de detecção LineGene K fluorescence quantitative PCR detection system (Hangzhou BIOER Tech Co., Tóquio, Japan). Para a determinação e normalização dos níveis de expressão dos genes estudados, foram utilizados os controles endógenos β -actina e GAPDH humanos.

Para as qPCRs, o cDNA foi sintetizado a partir 5 μg RNA total das células tratadas, através do anelamento de primers oligo(dT)-T7 à concentração de 5 pmol μL^{-1} . A transcrição reversa, síntese de DNA dupla-fita e desligamento do cDNA, foram realizados de acordo com o protocolo sugerido pela literatura científica.

Resumidamente, o procedimento de amplificação consistiu na transcrição–reversa e síntese do cDNA dupla-fita e posterior PCR quantitativa em tempo real, utilizando o kit one-step Verso™ RT-PCR Kits da ABgene (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante.

Diferenças na expressão dos genes em estudo, entre os grupos células, foram avaliadas mediante a estimativa da eficiência de amplificação. A variação na taxa de expressão dos genes foi normalizada pela frequência de expressão dos controles endógenos (β -actina e GAPDH). As diferenças de expressão dos genes foram apresentadas em relação ao grupo controle.

Tabela 2. Sequência dos Primers utilizados na PCRs quantitativas em tempo real

Primer	Sequência	Tamanho do amplicon
<i>Homo sapiens</i> Caspase 3	Forward 5'-CCTCTTCCCCCATTCTCATT-3' Reverse 5'-CCAGAGTCCATTGATTCGCT3'	122 pb
<i>Homo sapiens</i> Caspase 8	Forward 5'-GGAGTTAGGCAGGTTAGGGG-3' Reverse 5'-GCTTCCTTTGCGGAATGTAG-3'	188 pb
<i>Homo sapiens</i> Caspase 9	Forward 5'-AACAGGCAAGCAGCAAAGTT-3' Reverse 5'-CATGCTCAGGATGTAAGCCA-3'	198 pb
<i>Homo sapiens</i> MDR-1	Forward 5'-CTATGCTGGATGTTTCCGGT-3' Reverse 5'- GCTTTGGCATAGTCAGGAGC-3'	147 pb
<i>Homo sapiens</i> CYP3A4	Forward 5'- GAAACACAGATCCCCCTGAA-3' Reverse 5'- CATGTACAGAATCCCCGGTT-3'	250 pb
<i>Homo sapiens</i> CYP2C9	Forward 5'- TCTGGTTGACCCAAAGAACC-3' Reverse 5'- AGGCCATCTGCTCTTCTTCA-3'	110 pb
<i>Homo sapiens</i> CYP2C19	Forward 5'- GCTGCATGGATATGAAGTGG-3' Reverse 5'-GCTTCCTCTTGAACACGGTC-3'	219 pb
<i>Homo sapiens</i> GAPDH	Forward 5'- ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3' Reverse 5'-GTAAAAGCAGCCCTGGTGA-3'	127 pb
<i>Homo sapiens</i> B2M	Forward 5'-GTGCTCGCGCTACTCTCTCT-3' Reverse 5'-TCAATGTCGGATGGATGAAA-3'	143 pb

4.9. Análise estatística

Para comparação entre os grupos tratados e controle foram utilizado Anova segundo um único critério e pós-teste Dunnet's e Tukey (software GraphPad Prism V4). Foi considerado como diferença significativa valores de p menores que 0,05 ($p < 0.05$).

5.0. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

ARTIGO 1 – The ruthenium complexes cis-(Dichloro)tetramineruthenium(III) chloride and cis-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate overcome resistance inducing apoptosis on Human lung carcinoma cells (A549).

Autores – Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa, Hellen Karine Paes Porto, Flávia de Castro Pereira, Aliny Pereira de Lima, Wagner Batista dos Santos, Elisângela de Paula Silveira-Lacerda.

Proposta de Periódico Científico – ChemMedChem, Wiley.

Fator de impacto – 3,151.

ARTIGO 2 – Cisplatin and Ru(III) metallocomplexes induce differences on cellular response and expression of multidrug resistance gene MDR1(ABCB1) and cytochrome P450 genes CYP3A4, CYP2C9 and CYP2C19 in human chronic myelogenous leukemia cells (K-562).

Autores – Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa, Hellen Karine Paes Porto, Flávia de Castro Pereira, Aliny Pereira de Lima, Lucas Carlos Gomes Pereira, Bruno Pereira de Carvalho, Wagner Batista dos Santos, Elisângela de Paula Silveira-Lacerda.

Proposta de Periódico Científico – Toxicology in Vitro, Elsevier.

Fator de impacto – 2,775.

ARTIGO 1

The ruthenium complexes *cis*-(Dichloro)tetramineruthenium(III) chloride and *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate overcome resistance inducing apoptosis on Human lung carcinoma cells (A549).

Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa^a (vilanovacosta@gmail.com)

Hellen Karine Paes Porto^a (paesporto@gmail.com)

Flávia de Castro Pereira^a (pereiraafc@gmail.com)

Aliny Pereira de Lima^a (alinypererialima@gmail.com)

Wagner Batista dos Santos^b (wbsantos32@yahoo.com.br)

Elisângela de Paula Silveira-Lacerda^{a*} (silveiralacerda@gmail.com)

^aLaboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia, Goiás, Brazil.

^bInstituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT, Barra do Garça, Mato Grosso, Brazil.

*Corresponding author:

Elisângela de Paula Silveira Lacerda

E-mail: silveiralacerda@gmail.com

Laboratório de Genética Molecular e Citogenética

Instituto de Ciências Biológicas - ICB I - Sala 200

Universidade Federal de Goiás

Campus Samambaia (Campus II)

Cx. Postal: 131

Goiânia-GO, Brasil – 74

Phone/Fax +55-62-3521-1481

Cell Phone +55-62-9293-3121

Abstract

Lung cancer is one of the leading causes of death in the world, and non-small cell lung carcinoma (NSCLC) accounts for approximately 75-85% of all lung cancers. In the present work, we studied the antitumor activity of the compound *cis*-(dichloro)tetramineruthenium(III) chloride {*cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl} against human lung carcinoma tumor cell line A549. The present study aimed to investigate the relationship between the expression of MDR1 and CYP450 genes in human lung carcinoma cell lines A549 treated with *cis*CarboPt, *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III). Ruthenium-based coordinated complexes, presented low cytotoxic and antiproliferative activities, with high IC₅₀ values, 196 (±15.49), 472 (± 20.29) and 175 (±1.41) for *cis*CarboPt, *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III), respectively. The tested compounds induced apoptosis in A549 tumor cells as evidenced by caspase 3 activation, but only at high concentrations. Results also revealed that the amplification of P-gp gene is greater in A549 cells exposed to *cis*CarboPt and *cis*CRu(III) than *cis*DRu(III). Taken together all these results strongly demonstrate that MDR-1 over-expression in A549 cells could be associated to a MDR phenotype of these cells and moreover, it is also contributing to the Platinum, and structurally-related compound, resistance in these cells. The identification and characterization of novel mechanisms of drug resistance will enable the development of a new generation of anti-cancer drugs that increase cancer sensitivity and/or represent more effective chemotherapeutic agents.

Keywords: Carboplatin; *cis*-(dichloro)tetramineruthenium(III) chloride; *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate, A549, MDR-1, CYPs, Apoptosis.

1. INTRODUCTION

Lung cancer is one of the leading causes of death in the world, and non-small cell lung carcinoma (NSCLC) accounts for approximately 75-85% of all lung cancers. At the time of diagnosis, 40% of NSCLC cases are often at an advanced. Only 15% of lung cancers are diagnosed at a localized stage, for which the 5-year survival rate is 52%. The 5-year survival for NSCLC is 18% (American Cancer Society, 2013).

First-line treatment for patients with advanced NSCLC includes Platinum compounds such cisplatin, carboplatin and oxaliplatin. The platinum-based chemotherapy drugs are among the most active and widely used agents for the treatment of malignancies, including testicular, head and neck, ovarian, lung, colorectal, and bladder cancers (Kelland, 2007; Varbanov et al., 2012). Nevertheless, the clinical utility of these drugs has been proven limited due to the development of acquired drug resistance (Karki et al., 2007, Wagner & Karnitz, 2009).

The clinical treatment of cancer with chemotherapeutic drugs is frequently hindered by either intrinsic or acquired resistance of the tumor cells (Kelland, 2007). When tumor cells acquire resistance against a single chemotherapeutic drug, they often show cross resistance to a variety of antitumor drugs, a state termed multidrug resistance (MDR). According to statistical data, the failure of treatment in over 90% of patients with metastatic cancer is caused by MDR (Liu et al., 2012). Although MDR can develop by several mechanisms, a common cause is believed to be overexpression of an energy-dependent drug efflux pump, P-glycoprotein (P-gp). P-gp lowers the intracellular concentration of cytotoxic agents by pumping them outside of the tumor cells (Tang et al., 2012, Liu et al., 2012).

The side effects of chemotherapy hamper many normal activities of patients undergoing treatment (Kim et al., 2002). Ruthenium complexes have shown potential utility in chemotherapy with lower toxicities compared to platinum-based chemotherapeutics attributed to their specific accumulation in cancer tissues. Ruthenium complexes have shown potential utility in chemotherapy with lower toxicities compared to Platinum-based compounds attributed to their specific accumulation in cancer (Silveira-Lacerda et al., 2010a).

Among the ruthenium complexes studied for anticancer application, the *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride and *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate complexes have shown promising results on tumour cells in humans and

mice (Menezes et al., 2007; Pereira et al., 2009; Silveira-Lacerda et al. 2010a, Silveira-Lacerda et al. 2010b, Lima et al., 2011, Lima et al. 2012).

Although platinating agents are among the most widely used chemotherapy agents, and ruthenates presents a potential role as new anticancer drugs, the molecular mechanism of multidrug resistance to chemotherapy remained largely unknown, especially in lung tumor cells. Since previous studies show that the resistance to chemotherapy exhibited in multidrug-resistant human lung tumor cells was mediated by P-gp and others CYP450 proteins, the present study aimed to investigate the relationship between the expression of MDR1 and CYP450 genes as mediators of metallocomplexes cytotoxicity in human lung carcinoma cells (A549) treated with Carboplatin and two Ruthenium(III) compounds.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Ruthenium (III) compound synthesis, Carboplatin and Chemicals

The Ruthenium(III) complexes *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride {*cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl} and *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate {*cis*-[Ru(C₂O₂)(NH₃)₄]₂(S₂O₆)} were synthesized at the Chemistry Institute of Universidade Federal de Mato Grosso by the methods described in detail previously (Pavanin et al., 1985; Pereira et al., 2009; Silveira-Lacerda et al., 2010a). Carboplatin [*cis*-Diammine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II)] was obtained from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA).

The stock solutions of Ru(III) complexes and Carboplatin were freshly prepared before use in DMSO (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA). The final concentration of DMSO in cell culture medium did not exceed 0.25% (v/v).

2.2. Cell culture

The human lung carcinoma cells (A549 ATCC®# CCL-185™) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Tumor cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (pH 7.2 – 7.4) at 37 °C, under a 5% CO₂ humidified atmosphere. Media were supplemented with 100 U mL⁻¹ penicillin G, 100 µg mL⁻¹ streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1.5 g L⁻¹ sodium bicarbonate, 4.5 g L⁻¹ glucose, 10 mM HEPES, 1.0 mM sodium pyruvate and 10% fetal calf serum

(FCS) (w/v) (all reagents were obtained from Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and subcultured 2 times a week at an appropriate plating density.

2.3. Cell viability determination by MTT assay.

The cytotoxic activity of Ruthenium(III) compounds was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay as previously described (Mosman, 1983). Carboplatin and Ru(III) metallodrugs were added to final concentrations from 0 to 500 μM . The logarithmically growing A549 cells were washed twice with supplemented DMEM medium and centrifuged at (1,000 rpm) $300\times g/15$ min/ 10°C . Cells were plated at a density of 5×10^4 cells/well into flat-bottomed 96-well microplates (Techno Plastic Products, Trasadingem, Switzerland) and cultured for 24 h.

Cell death was evaluated after tumor cells were exposed to the complexes for 48 h; then, after removal of medium with the complexes, a fresh medium was added, and cells were incubated for 24 h of recovery time. Then, 10 μL MTT (5 mg mL^{-1}) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to each well and incubated for an additional 6 h. The microplates were then centrifuged ($300\times g/15$ min/ 10°C) and the culture media were discarded. Then, 200 μL of PBS/20% of SDS was added to each well and plates were kept in the dark overnight.

Absorbance was measured at 545nm ($\text{OD}_{545\text{nm}}$) using an automated microplate reader (Stat Fax 2100, Awareness Technology Inc, Palm City, FL, USA). The viability rate was calculated as follows: Viability (%) = (absorbance of the treated wells)/(absorbance of the control wells) $\times 100\%$. The IC_{50} values (compound concentrations that produce 50% of cell growth inhibition) were calculated from curves constructed by plotting cell survival (%) versus drug concentration (μM) using GraphPad Prism 4.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All experiments were made in triplicate.

2.4. Cell toxicity measurement with LDH assay

LDH is a cytoplasmic enzyme, and LDH reduction is often associated with cell membrane damage and cell death (Lobner, 2000). The activity of LDH was measured spectrophotometrically by assaying reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) oxidation at 510 nm during LDH-catalyzed reduction of pyruvate to lactate. Briefly, cells were cultured at a density of 5×10^4 cells/well into flat-bottomed 96-well microplates (Techno Plastic Products, Trasadingem, Switzerland) and incubated for 24 h with

Cisplatin and Ruthenium(III) complexes at IC₅₀ concentrations. After 24h of incubation, the cell culture supernatant was removed and centrifuged to eliminate nonadherent particles and cell debris. Samples of supernatant for each drug tested were then analyzed for DHL activity using a DHL colorimetric kit (Doles LTDA, Goiânia, GO, Brazil). All experiments were made in triplicate.

2.5. Reverse transcription and Real time quantitative PCR

The human lung carcinoma cells A549 were treated with different concentrations of Ru(III) complexes and Carboplatin for different periods. Total RNA was extracted with Tri Reagent® (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) following the manufacturer's protocol. Total RNA (2.0 µg) was used to produce cDNA with ABgene one-step Verso™ RT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) in a total of 25 µL reaction mixture according to the manufacturer's protocol. Real-time PCR reactions were then carried out by a LineGene K fluorescence quantitative PCR detection system (Hangzhou BIOER Tech Co., Tokyo, Japan). *Homo sapiens* apoptosis-related cysteine peptidases (Caspases) 3, 8 and 9 mRNAs expression were quantified for apoptosis cell profiling using specific primers (Table 1).

Futhermore, MDR-1 mRNA [*Homo sapiens* ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (ABCB1)]; CYP3A4 mRNA (*Homo sapiens* cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4); CYP2C9 mRNA (*Homo sapiens* cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9) and CYP2C19 mRNA (*Homo sapiens* cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19) were detected in order to evaluate the expression profile of these genes in cells exposed to the Cisplatin and Ruthenium(III) complexes (Table 1).

A total of 25 µL reaction mixture: 2 µL of cDNA, 10 µL of SYBR Green PCR Master Mix (LGC Biotechnology, Middlesex, UK), 2.5 µL of each forward and reverse primer (100nM.µL⁻¹). The PCR program was initiated at 15 minutes at 95°C before 40 thermal cycles, each of 30s at 95°C and 30s at 55°C and 30s at 72°C. Data were analyzed according to relative quantification method. Each sample was normalized by the expression of following endogenous genes: GAPDH (*Homo sapiens* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and B2M (*Homo sapiens* beta-2-microglobulin) (Table 1). Checking of the products was performed by melting curve analysis and agarose gel eletroforesis of qPCR products.

Table 1. Primers sequences used in Reverse Transcription Real Time Quantitative Polymerase Chain Reactions.

Primer	Sequence	Amplicon lenght
<i>Homo sapiens</i> Caspase 3	Forward 5'-CCTCTTCCCCCATTCTCATT-3' Reverse 5'-CCAGAGTCCATTGATTCGCT-3'	122 pb
<i>Homo sapiens</i> Caspase 8	Forward 5'-GGAGTTAGGCAGGTTAGGGG-3' Reverse 5'-GCTTCCTTTGCGGAATGTAG-3'	188 pb
<i>Homo sapiens</i> Caspase 9	Forward 5'-AACAGGCAAGCAGCAAAGTT-3' Reverse 5'-CATGCTCAGGATGTAAGCCA-3'	198 pb
<i>Homo sapiens</i> MDR-1	Forward 5'-CTATGCTGGATGTTTCCGGT-3' Reverse 5'- GCTTTGGCATAGTCAGGAGC-3'	147 pb
<i>Homo sapiens</i> CYP3A4	Forward 5'- GAAACACAGATCCCCCTGAA-3' Reverse 5'- CATGTACAGAATCCCCGGTT-3'	250 pb
<i>Homo sapiens</i> CYP2C9	Forward 5'- TCTGGTTGACCCAAAGAACC-3' Reverse 5'- AGGCCATCTGCTCTTCTTCA-3'	110 pb
<i>Homo sapiens</i> CYP2C19	Forward 5'- GCTGCATGGATATGAAGTGG-3' Reverse 5'-GCTTCCTCTTGAACACGGTC-3'	219 pb
<i>Homo sapiens</i> GAPDH	Forward 5'- ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3' Reverse 5'-GTAAAGCAGCCCTGGTGA-3'	127 pb
<i>Homo sapiens</i> B2M	Forward 5'-GTGCTCGCGCTACTCTCTCT-3' Reverse 5'-TCAATGTCGGATGGATGAAA-3'	143 pb

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis of the results was performed using one-way ANOVA and Tukey's post test for multiple comparisons with controls. All statistical analyses were performed using the statistical software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). A probability of 0.05 or less was deemed statistically significant. The following notation was used throughout: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, relative to control.

3.0. RESULTS

3.1 The *cis*CarboPt, *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III) cytotoxicity on A549 tumor cells

The anticancer drug *cis*-diammine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) [*cis*CarboPt] and the two Ruthenium(III) complexes, *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride [*cis*CRu(III)] and *cis*-

tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate [*cis*DRu(III)] (Fig. 1), were evaluated in a comparative *in vitro* MTT cell viability assay with human lung carcinoma cells A549.

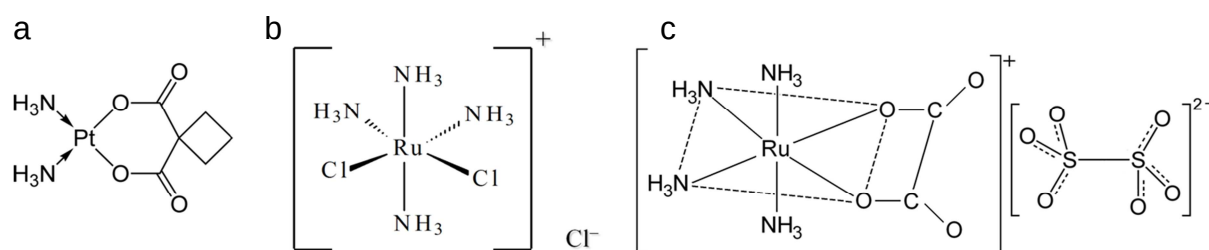


Fig. 1 Chemical structure of *cis*-diammine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) [a], *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride [b] and *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate [c].

Cell viability was detected after the cells were treated with *cis*CarboPt, *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III) at concentrations from 0.2 to 1,000 μ M for 24h.

Table 2 lists the IC_{50} values obtained with the tested compounds *cis*CarboPt, *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III). The inhibitory effect of the test drugs on cell viability was measured by the MTT colorimetric method as described previously.

The data indicate that *cis*CRu(III) proved be the most cytotoxic compound of three on tested cell line, presenting the value of IC_{50} 472 (± 20.29), followed by *cis*CarboPt and *cis*DRu(III) (Fig. 2).

Table 2. IC_{50} Values of Compounds *cis*CarboPt, *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III) on A549 lung carcinoma cell line after 48 h of incubation, determined using the MTT assay. Results are expressed as means ($\pm$ standard deviation) of at least three independent experiments

Compound	IC_{50} A549 (μ M)
<i>cis</i> CarboPt	196 (± 15.49)
<i>cis</i> CRu(III)	472 (± 20.29)
<i>cis</i> DRu(III)	175 (± 1.41)

Although the cytotoxicity of *cis*CRu(III) on A549 presented be higher than others two metal complexes, the results show that A549 tumor cells treated with different concentration of *cis*CarboPt and Ruthenium complexes *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III), Ruthenium-based coordinated complexes, presented low cytotoxic and antiproliferative activities.

The three metal complexes showed low cytotoxic effects, where *cis*DRu(III) (IC_{50} 175 μ M) and *cis*CarboPt (IC_{50} 196 μ M) were more active than *cis*CRu(III) (IC_{50} 472 μ M) against the A549 cancer cells (Fig. 2).

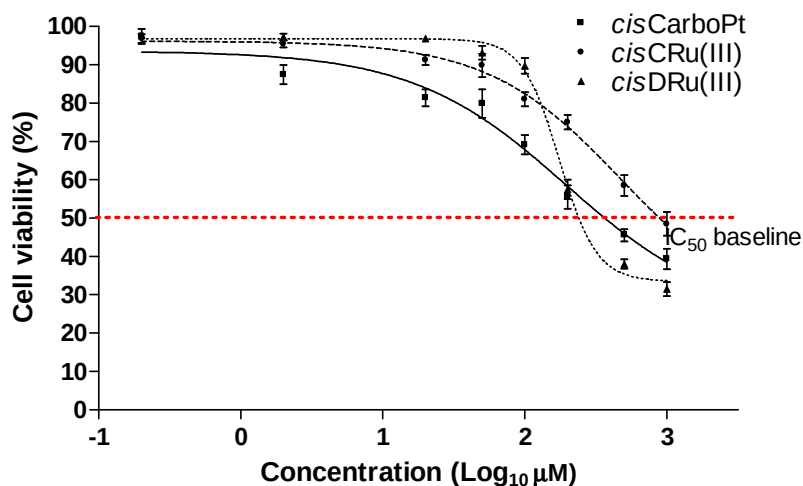


Fig. 2. Effect of *cisCarboPt*, *cisCRu*(III) and *cisDRu*(III) (0.2 – 1,000 μM) upon cell viability, determined by MTT assay in human A549 tumor cells. Data are mean ± SD (n = 3).

3.2. Increased cytomembrane damage of A549 cells induced by *cisCarboPt* and Ruthenium(III) complexes

The platinum and ruthenium compounds were also evaluated for cytotoxic potential via plasma membrane damage of A549 tumour cells assessed by the colorimetric quantification of LDH based on lactate dehydrogenase (LDH) release experiments (Fig. 3).

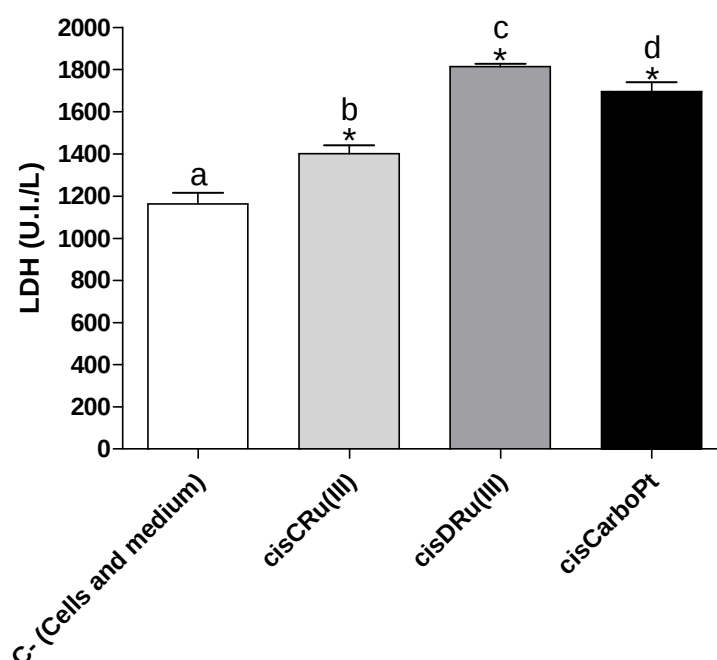


Fig. 3. Effect of *cisCarboPt*, *cisCRu*(III) and *cisDRu*(III) (IC₅₀ concentration) upon A549 cellular membrane integrity determined by LDH activity (U.I./L), in human A549 tumor cells. Data are mean ± SD (n = 3). Significant differences from the untreated control are indicated by *p < 0.05. Means among bars without a common letter are statistically different (Tukey's test, p < 0.05).

Using A549 IC_{50} concentrations of *cisCarboPt*, *cisCRu(III)* and *cisDRu(III)* showed loss of cell vitality which corroborates results observed on MTT assays. The compounds *cisDRu(III)* and *cisCarboPt* caused A549 cytomembrane damage on a scale higher than *cisCRu(III)*. The ruthenium complex *cisDRu(III)* caused the release of 650 U.I/L of DHL, followed by platinum complex *cisCarboPt* (530 U.I/L), whilst *cisCRu(III)* caused an increase of 235 U.I/L of DHL leaking, when compared to negative control.

3.3. Induction of caspase activity and apoptotic cell death on A549 tumor cell line by *cisCarboPt*, *cisCRu(III)* and *cisDRu(III)*

In one of our recent studies, we have shown that the expression of caspase 3 increases in the A549 cells treated with *cisCRu(III)* on a ratio of 3.8 fold, which is associated to apoptosis cell death (Lima et al., 2012). In present study we tested *cisCarboPt*, *cisDRu(III)*, and *cisCRu(III)* as well, against A549 lung cancer cells for mRNA expression of caspase 3, caspase 8 and caspase 9, using Real-Time Quantitative PCR after 12 hours of treatment (Fig. 3).

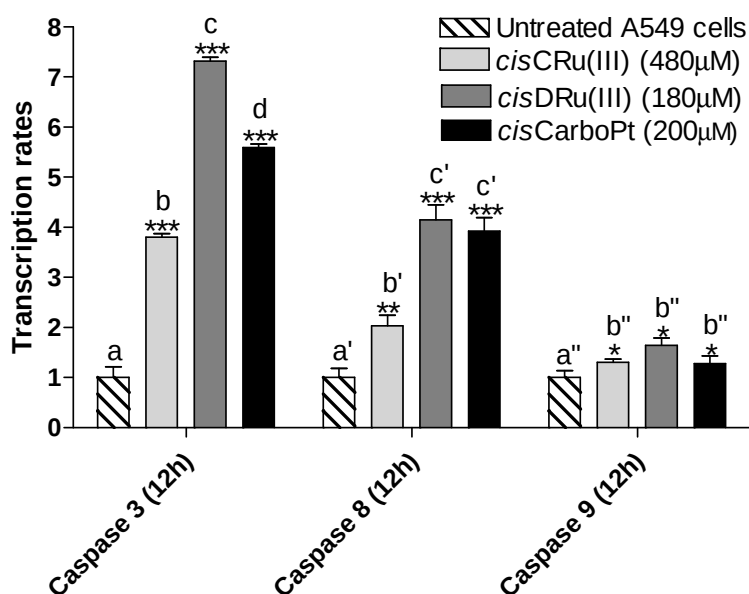


Fig. 4. Alterations of Caspases expression after treatment with *cisCarboPt*, *cisCRu(III)* and *cisDRu(III)*, for 6h. Samples are in relation to the untreated control cell line with a transcription rate set up to a value of one. The data are expressed as mean $\pm$ SEM of n=3. Significant differences from the untreated control are indicated by *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001. Means among bars without a common letter are statistically different (Tukey's test, p < 0.05).

In our *in vitro* model system, we observed that A549 tumor cells overexpressed caspase 3, 8 and 9 in different levels when exposed to metallocomplexes. We found that

cisDRu(III) induced overexpression of caspase 3, 8 and 9 by 7.3, 4.1 and 1.6 fold, respectively. The anticancer drug *cisCarboPt* induced overexpression of 5.5, 3.9 and 1.2; while *cisCRu(III)* was more modest showing 3.8, 2.1 and 1.3 on expression gain levels of caspase 3, 8 and 9, respectively.

3.4. The *cisCarboPt*, *cisCRu(III)* and *cisDRu(III)* induced different profiles of MDR and CYPs expression in A549 tumor cell line

The expression levels P-gp production on A549 tumor cell were measured by real time reverse transcription PCR using specific primers for MDR1, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 after 24 and 48h of treatment with near IC_{50} doses of *cisCarboPt*, *cisCRu(III)* and *cisDRu(III)*. As shown in Figure 5, *cisCarboPt* and *cisCRu(III)* increased MDR1 expression by approximately 8 fold and 9 fold, respectively, relative to the control group; while *cisDRu(III)* induced lower MDR1 expression levels, nearly 2.5 fold that of the untreated cells group.

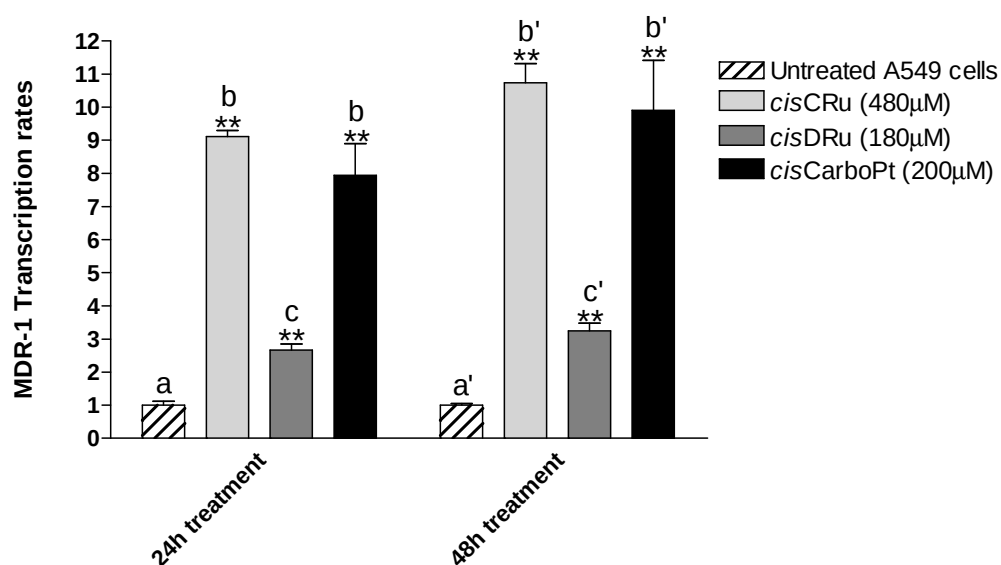


Fig. 5. Alterations of MDR1-mRNA expression using RT-qPCR after treatment with *cisCarboPt*, *cisCRu(III)* and *cisDRu(III)*, respectively, for 24 and 48h. Samples are in relation to the untreated control cell line with a transcription rate set up to a value of one. The data are expressed as mean $\pm$ SD of n=3. Significant differences from the untreated control are indicated by **p < 0.01. Means among bars without a common letter are statistically different (Tukey's test, p < 0.05).

The metallocomplexes *cisCarboPt*, *cisCRu(III)* and *cisDRu(III)* exert a significant effect on CYP3A4 expression profile, inducing a overpression of this gene by 7.2-7.9, 5.2-6.3 and 8.8-9.5 for 24 and 48h exposition time, respectively on A549 tumor cells. The compounds *cisCarboPt*, *cisCRu(III)* and *cisDRu(III)* also enhanced CYP2C9 and CYP2C19 mRNAs expression levels; *cisDRu(III)* caused a elevenfold CYP2C9

increase, while *cisCarboPt* and *cisCRu*(III) were shown to increase the expression of CYP2C9 by five and sixfold, and six and sevenfold on CYP2C19 by *cisCarboPt* and *cisCRu*(III) respectively, after 48 hours of treatment.

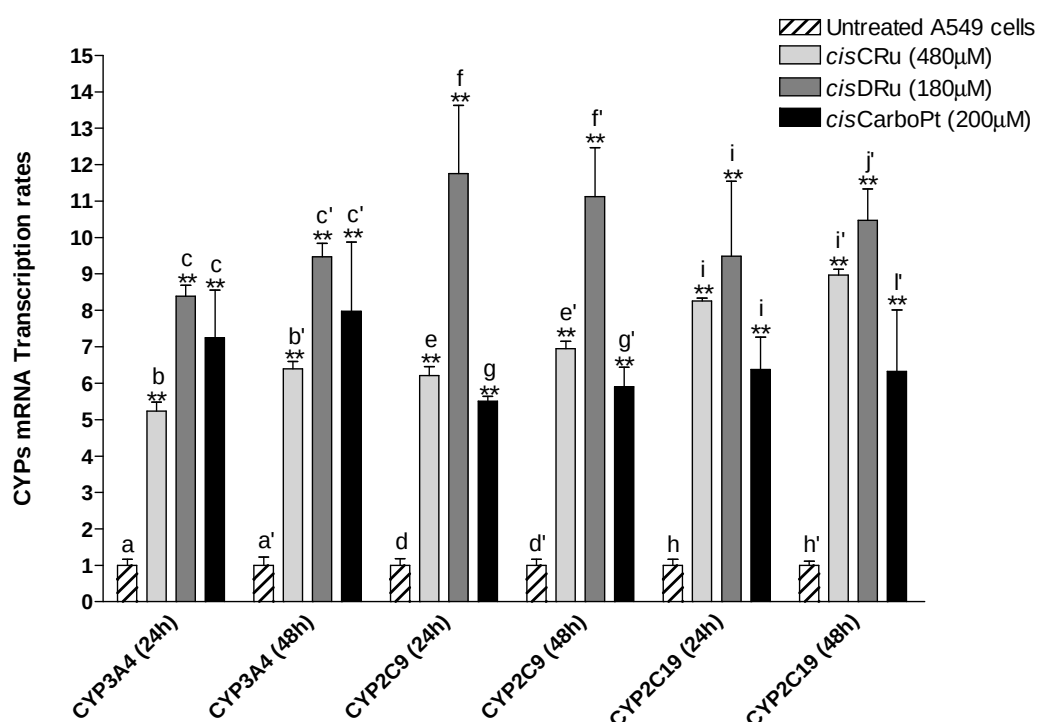


Fig. 6. Alterations of CYPs mRNAs expression using RT-qPCR after treatment with *cisCarboPt*, *cisCRu*(III) and *cisDRu*(III), respectively, for 24 and 48h. Samples are in relation to the untreated control cell line with a transcription rate set up to a value of one. The data are expressed as mean $\pm$ SD of n=3. Significant differences from the untreated control are indicated by **p < 0.01. Means among bars without a common letter are statistically different (Tukey's test, p < 0.05).

4.0. DISCUSSION

Chemotherapy is one of the primary treatments for lung cancer; however, primary or secondary drug-resistance is a significant reason why chemotherapy is often ineffective against non-small cell lung cancer (NSCLC). This presents a major obstacle to successful treatment of this disease, since NSCLC is extremely difficult to treat because of its low therapeutic and long-term survival rates. Thus, it is crucial to develop better therapeutic strategies for the management of lung carcinomas (Kim et al., 2002, Wu et al., 2010, Lima et al., 2012).

The chemotherapeutic drug Carboplatin is one of the most frequently used agents in the treatment of lung cancer. Still, the therapeutic effects of platinum-based drugs are weakened by its severe toxicity and the chemoresistance of most NSCLC (Rosell et al., 2002; Socinski, 2004; Kelland, 2007). It is thought that clinical multidrug

resistance to chemotherapeutic agents is a key obstacle to curative treatment for advanced NSCLC (Clarke, 2003).

Studies have shown ruthenium complexes to be active against certain tumors both *in vivo* and *in vitro*, with fewer side effects than cisplatin (Bergamo et al., 1999; Scolaro et al., 2005). In addition, two ruthenium-based drugs, ImH[*trans*-RuCl₄(DMSO)Im] (NAMI-A) and indazolium *trans*-[tetrachlorobis (1*H*-indazole)ruthenate(III)] (KP1019), were the first ruthenium-based anticancer drugs transferred into to enter clinical trials (Rademaker-Lakhai et al., 2004; Hartinger et al., 2006). Many other compounds that include ruthenium centers are being developed and tested (Lima et al., 2012). Among these, the ruthenium(III) complex *cis*-(dichloro)tetramineruthenium(III) chloride (*cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl) is particularly promising among non-resistant cells. It is being characterized by very low toxicity and has potential as an antitumor drug. Recently, the antitumor activity of *cis*CRu(III) was evaluated *in vivo* using Sarcoma 180 (S180) murine ascitic tumor cells and a number of *in vitro* murine (S180, A-20) and human (Jurkat, SKBR-3) tumor cell lines. In all cases *cis*CRu(III) demonstrated a very encouraging activity profile (Silveira-Lacerda et al., 2010b).

In the present study, we examined the cytotoxic activities and multidrug resistance induction of two ruthenium(III) complexes, *cis*-(dichloro)tetramineruthenium(III) chloride and *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate; and a common clinic used metallodrug, the *cis*-diammine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II), on NSCLC human lung carcinoma cell line A549.

Results derived from cell viability MTT assay revealed that the ruthenium(III) compounds *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III) and platinum compound *cis*CarboPt showed dissimilar concentration dependent reduction of cell viability in A549 tumor cell line, where *cis*DRu(III) and *cis*CarboPt presented an IC₅₀ concentration of 175 and 196 μM respectively, that are over a half of *cis*CRu(III) IC₅₀= 472 μM. The LDH assay also showed that *cis*DRu(III) and *cis*CarboPt also induced more cell membrane injury and enzyme leakage on A549 tumor cells than *cis*CRu(III). Is important to note that *cis*CarboPt and *cis*DRu(III) are structurally similar, being broader and more complex molecules containing carbon and amines groups in their structures, differing from *cis*CRu(III), a structurally chloride rich complex.

Sadler and Dyson studies, established that the mechanism of action of ruthenium chlorinated compounds, like *cis*CRu(III), has many of analogies to that of cisplatin. It

first involves hydrolysis of the Ru-Cl bond of the prodrug to generate an active aqua-ruthenium species (Allardyce & Dyson, 2003, Scolaro et al., 2005). Detailed kinetic studies showed that the Ru-Cl bond hydrolysis can be strongly influenced by the nature of the coligands as well as the nature of the metal ion (Malina et al., 2001, Bacac et al., 2004). Importantly, this step could be suppressed in the blood because of the high chloride concentrations enabling to chloride rich ruthenium complexes cross the cell and nuclear membranes (Scolaro et al., 2005). Inside the cell, the hydrolysis of the chloro anion takes place because of the much lower chloride concentration (circa 25 times lower). It is then assumed that the aqua-ruthenium complex binds to nuclear DNA with a high affinity for the N7 position of guanine bases, damaging the cell DNA and leading to apoptosis (Nováková et al., 1995; Brabek & Nováková, 2006, Silveira-Lacerda et al., 2010b).

Apoptosis is an important biological process in many systems and can be triggered by a variety of stimuli received by the cells. Caspase-family represents the key components of the apoptotic machinery within the cells and consists of at least 14 different cysteine proteases that act in concert in a cascade triggered by apoptosis signaling. The culmination of this cascade is the cleavage of a number of proteins in the cell, followed by cell disassembly, cell death, and, ultimately, the phagocytosis and removal of the cell debris (Krajewska et al., 2005, Galuzzi et al., 2012).

In the present study, exposure of A549 tumor cells to Platinum and Ruthenium compounds induced increased significant changes in the of RNAm expression of caspase 3 and caspase 8, although caspase 9 expression remains relatively unchanged. The *cisDRu(III)* complex induced overexpression of caspase 3 and 8 by 7.3 and 4.1 fold, respectively, *cisCarboPt* drug induced overexpression of 5.5 and 3.9 fold; whilst *cisCRu(III)* complex was more modest, showing 3.8 and 2.1 on expression gain levels of caspase 3 and 8, respectively. Those results corroborate recently studies reporting that ruthenium compound induced apoptosis in A549 cells as evidenced by sub-G1 peak observed in Flow cytometry assays and caspase-3 activation found by Lima et al. (2011).

Caspase-3 is the most prevalent caspase within cells, responsible for the majority of apoptotic effects. The activation of caspase-3 induces poly (ADPribose) polymerase (PARP) cleavage, chromosomal DNA breaks and finally lead to apoptosis (Cohen, 1997). In some cell types, active caspase-8 directly catalyzes the proteolytic maturation of caspase-3, thereby triggering the executioner phase of caspase-dependent apoptosis

in a mitochondrion-independent manner (Galuzzi et al., 2012). Since in present work, caspase-3 and caspase-8 showed be overpressed by Ruthenium (III) complexes *cisCRu(III)* and *cisDRu(III)*, we can infer that ruthenium(III) compounds-induced apoptosis by extrinsic pathway.

Although several studies have been performed regarding cytotoxic potential of ruthenium(III) chloride and ditionate (Menezes et al., 2007, Pereira et al., 2009; Ribeiro et al., 2009, Silveira-Lacerda et al., 2010b, Lima et al., 2010, Lima et al., 2012) no study has been performed regarding the potential multidrug resistance induction of these compounds on tumor cells.

A common mechanism of lung cancer chemoresistance is the overexpression of plasma membrane drug efflux proteins, such as P-gp. Herein we investigated if MDR1 expression profile on A549 lung cells is changed when tumor cells are treated with complexes containing mettalic ions such platinum and ruthenium. Results revealed that both Pt and Ru complexes upregulated MDR1 expression, leading to tenfold overexpression pikes.

Importantly to point out that ruthenium complexes containig carbonic structures, like carboplatin and oxaliplatin, were found to be active against cisplatin-resistant cell lines, indicating that the detoxification mechanism is different from the one of cisplatin (Schluga et al., 2006). It was assumed that the carboxylato ligands would hydrolyze more slowly and in a more controllable way than the chloride ligands rich molecules, like cisplatin and *cisCRu(III)*. All evidence taken together indicate that carboxylato rich compounds, like *cisCarboPt* and *cisDRu(III)*, seem to operate by a different mode of action compared to cisplatin, Ru(II) arene ethylenediamine compounds, and most of the known anticancer compounds in general.

It was shown by mass spectrometry that carboxylato rich compounds form adducts with proteins and that their reactivity and cisplatin in the presence of proteins are much different. Other proteins have been proposed as the target for Ru organometallics (Scolaro et al., 2005; Casini et al.m 2009). P-Glycoprotein (Pgp) is a plasmamembrane protein that is responsible for drug efflux from cells and is involved in multidrug resistance (MDR). Interestingly, for one of these ruthenium carboxylato derivatives, it was shown that the ruthenium coordination to the Pgp inhibitor derivative induced an even stronger protein inhibition (Vock et al., 2007). This can probably explain why MDR1 was so overexpressed on *cisCRu(III)* treated A549 cells when compared to *cisDRu(III)* treated A549 cells.

In a similar line of thought, other proteins can also be the target of cytotoxic ruthenium metallocomplexes, indicating that P-gp is not the major or only mechanism of chemoresistance (Bugarcic et al., 2009). Cytochrome P450 superfamily represent key enzymes in drug metabolism, especially the CYP3A4. CYPs enzymes catalyze important bioactivations acting directly on oxidative stress and xenobiotics metabolism (Masubuchi & Horie, 2007). Since CYPs are known to metabolize a number of drugs, and since their expression is modifiable by a number of drugs and agents, we investigated the expression of CYP3A4 expression in A549 tumor cells.

Results revealed that metallocomplexes *cisCarboPt*, *cisCRu(III)* and *cisDRu(III)* exert a significant effect on CYP3A4 expression profile, inducing a overpression of this gene by 7.9, 6.3 and 9.5 , respectively, after 48h of treatment. Our results suggest that oxidative stress may be affecting CYP expression in A549 tumor cells, which may alter the metabolism of drug *cisCarboPt* and metallocomplexes *cisCRu(III)* and *cisDRu(III)* thus, the toxicity of these compounds and that could be a promising approach to enhance the efficacy of chemotherapy treatment of multidrug-resistant cancer to cancer lung A549 cell.

In summary, the mechanisms by which ruthenium complexes induce cytotoxicity and apoptosis on A549 tumor cell line than *cisCRu(III)* may not only be by the consequence of direct DNA binding and damage, but also by the interactions with a myriad of proteins like Cytochrome P450, P-gp and caspases; via oxidative stress promotion, reduction of MDR1 phenotype and apoptosis induction via extrinsic activation pathway.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of Research and Projects Financing (FINEP) (Grant No.01.06.0941.00/CT-Saúde to Elisângela de Paula Silveira-Lacerda) and Foundation for the Support of Research in the State of Goiás (FAPEG). Coordination for the Advancement of Higher Education Staff (CAPES) through fellowship to Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa, Flávia de Castro Pereira and Hellen Karine Paes Porto; and Brazilian National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) through fellowship to Aliny Pereira de Lima (Grant No. 141648/2010-4).

Funding sources

There are no financial or personal interests that might be viewed as inappropriate influences on the work presented herein. This manuscript was completely financed by governmental and nonprofit institutions, the Brazilian National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Research and Projects Financing (FINEP), Coordination for the Advancement of Higher Education Staff (CAPES) and Foundation for the Support of Research in the State of Goias (FAPEG).

Ethical Approval

No studies involving humans or experimental animals were conducted in this work. The human lung carcinoma A549 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) and cultured *in vitro*.

REFERENCES

1. Allardyce CS, Dyson PJ, Ellis DJ, Salter PA, Scopelliti R (2003). Synthesis and characterisation of some water soluble Ruthenium(II)–arene complexes and an investigation of their antibiotic and antiviral properties. *Journal of Organometallic Chemistry* 668:35-42.
2. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures*, 2013. Atlanta: American Cancer Society .
3. Bacac, M.; Hotze, A. C. G.; van der Schilden, K.; Haasnoot, J. G.; Pacor, S.; Alessio, E.; Sava, G.; Reedijk, J. (2004) The hydrolysis of the anti-cancer ruthenium complex NAMI-A affects its DNA binding and antimetastatic activity: an NMR evaluation. *J. Inorg. Biochem.* 98:402-412.
4. Bergamo A, Gagliardi R, Scarcia V, Furlani A, Alessio E, Mestroni G, Sava G (1999) In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 289:559–564.
5. Brabec V, Nováková O (2006) DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resistance Updates* 9:111-122.
6. Bugarcic, T.; Habtemariam, A.; Deeth, R. J.; Fabbiani, F. P. A.; Parsons, S.; Sadler, P. J. Ruthenium(II) arene anticancer complexes with redox-active diamine ligands. *Inorg. Chem.* 2009, 48, 9444–9453.

7. Casini, A.; Gabbiani, C.; Michelucci, E.; Pieraccini, G.; Moneti, G.; Dyson, P. J.; Messori, L. Exploring metallodrug-protein interactions by mass spectrometry: comparisons between platinum coordination complexes and an organometallic ruthenium compound. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2009, 14, 761–770.
8. Clarke MJ (2003) Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coord Chem Rev.* 236:209-233
9. Edelman MJ, Meyers FJ, Miller TR et al. Phase I/II study of paclitaxel, carboplatin, and methotrexate in advanced transitional cell carcinoma: a well-tolerated regimen with activity independent of p53 mutation. *Urology* 2000; 55 (4): 521–525.
10. Gallori, E.; Vettori, C.; Alessio, E.; Vilchez, F. G.; Vilaplana, R.; Orioli, P.; Casini, A.; Messori, L. (2000) DNA as a possible target for antitumor ruthenium(III) complexes. A spectroscopic and molecular biology study of the interactions of two representative antineoplastic ruthenium(III) complexes with DNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 376: 156-162.
11. Galluzzi L, I Vitale, JM Abrams, ES Alnemri, EH Baehrecke, MV Blagosklonny, TM Dawson, VL Dawson, WS El-Deiry, S Fulda, E Gottlieb, DR Green, MO Hengartner, O Kepp, RA Knight, S Kumar, SA Lipton, X Lu, F Madeo, W Malorni, P Mehlen, G Nuñez, ME Peter, M Piacentini, DC Rubinsztein, Y Shi, H-U Simon, P Vandenabeele, E White, J Yuan, B Zhivotovsky, G Melino and G Kroemer (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell and Differentiation* 10:107-120.
12. Hartinger CG, Zorbas-Seifried S, Jakupec MA, Kynast B, Zorbas H, Keppler BK (2006) From bench to bedside- preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans- [tetrachlorobis (1 H-indazole)ruthenate (III)] KP1019 or FFC14A). *Journal of Inorganic Biochemistry* 100: 891-904.
13. Karki, S.S., Thota, S., Darj, S.Y., Balzarini, J., Clercq. E., 2007. Synthesis, anticancer, and cytotoxic activities of some mononuclear Ru(II) compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15, 6632–6641.
14. Kelland L (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews.* 7: 573-584.
15. Kim, R., Tanabe, K., Uchida, Y., Emi, M., Inoue, H., Toge, T. 2002. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis and the contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 50, 343-52.

16. Krajewska M, Kim H, Shin E, et al (2005) Tumor-associated alterations in caspase-14 expression in epithelial malignancies. *Clin Cancer Res* 11:5462-5471. Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326:1-16.
17. Lima AP, Pereira FC, Vilanova-Costa CAST, Mello FMS, Ribeiro ASBB, Benfica PL, Valadares MC, Pavanin LA, Santos WB, Silveira-Lacerda EP (2010b). The compound cis-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride induces caspase-mediated apoptosis in K562 cells. *Toxicology in Vitro* 24:1562-1568.
18. Lima AP, Pereira FC, Vilanova-Costa CAST, Ribeiro ASBB, Pavanin LA, Santos WB, Silveira-Lacerda EP (2010). The ruthenium complex cis-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride induces apoptosis and damages DNA in murine sarcoma 180 (S-180) cells. *Journal of Biosciences* 35:371-378.
19. Lima AP, Pereira FC, Vilanova-Costa CAST, Soares JR, Pereira LCG, Porto HKP, Pavanin LA, Santos WB, Silveira-Lacerda, EP (2012). Induction of cell cycle arrest and apoptosis by ruthenium complex cis-(Dichloro)tetrammineruthenium(III) Chloride in human lung carcinoma cells A549. *Biological Trace Element Research* 147:8-15.
20. Liu, H.-K.; Wang, F.; Parkinson, J. A.; Bella, J.; Sadler, P. J. Ruthenation of duplex and single-stranded d(CGGCCG) by organometallic anticancer complexes. *Chem.;Eur. J.* 2006, 12, 6151–6165.
21. Malina J, Novakova O, Keppler BK, Alessio E, Brabec V (2001). Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by anticancer heterocyclic complexes of ruthenium(III) in cell-free media. *J. Biol. Inorg. Chem.* 6:435-445.
22. Masubuchi Y and Horie T (2007) Toxicological significance of mechanism-based inactivation of cytochrome p450 enzymes by drugs. *Crit Rev Toxicol* **37**:389–412.
23. Menezes C, Depaulacosta L, Ávila VMR, Ferreira MVC, Pavanin L, Homs-Brandeburgo MI, Hamaguchi A, Silveira-Lacerda EP (2007). Analysis in vivo of antitumor activity, Cytotoxicity and Interaction between plasmid DNA and the cis-dichlorotetraammineruthenium(III) chloride. *Chemico-Biological Interactions* 167: 116-124.
24. Nováková O, Vrana O, Kiseleva VI, Brabec V (1995) DNA interactions of antitumor platinum(IV) complexes. *Eur J Biochem* 228:616-624.
25. Novakova, O.; Chen, H.; Vrana, O.; Rodger, A.; Sadler, P. J.; Brabec, V. DNA interactions of monofunctional organometallic ruthenium(II) antitumor complexes in cell-free media. *Biochemistry* 2003, 42, 11544–11554.
26. Pereira, F. C. ; Vilanova-Costa, C. A. S. T. ; Lima, A. P. ; Ribeiro, A. S. B. B. ; Silva, H. D. ; Pavanin, L. A. ; Silveira-Lacerda, E. P. . 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, p. 258-268, 2009.
27. Rademaker-Lakhai JM, van den Bongard D, Pluim D, Beijnen JH, Schellens JH (2004) A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. *Clin. Cancer Res.* 10:3717-3727.
 28. Rosell R, Reginald VNL, Taron M, Reguart N (2002). DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 38: 217-/227
 29. Schluga, P.; Hartinger, C. G.; Egger, A.; Reisner, E.; Galanski, M.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K. (2006) Redox behavior of tumorinhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP. *Dalton Trans.* 1796-1802.
 30. Scolaro C, Bergamo A, Brescacin L, Delfino R, Cocchietto M, Laurenczy G, Geldbach TJ, Sava G, Dyson PJ (2005). In vitro e In vivo Evaluation of Ruthenium (II)- Arene PTA Complexes. *Journal Med. Chem.* 48: 4161-4171
 31. Scolaro, C.; Bergamo, A.; Brescacin, L.; Delfino, R.; Cocchietto, M.; Laurenczy, G.; Geldbach, T. J.; Sava, G.; Dyson, P. J. In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 4161–4171.
 32. Silveira-Lacerda EP, Vilanova-Costa CAST, Pereira FC, Hamaguchi A, Pavanin LA, Goulart LR, Homs-Brandeburgo MI, Soares AM, Santos WB, Nomizo A (2010). The Ruthenium Complex cis-(Dichloro)Tetraammineruthenium(III) Chloride Presents Immune Stimulatory Activity on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Biological Trace Element Research* 133:270-283.
 33. Silveira-Lacerda EP, Vilanova-Costa CAST, Pereira FC, Hamaguchi A, Pavanin LA, Goulart LR, Homs-Brandeburgo MI, Soares AM, Santos WB, Nomizo A (2010b). 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* 135:98-111.
 34. Socinski MA (2004). Cytotoxic Chemotherapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Review of Standard Treatment Paradigms. *Clinical Cancer Research* 10:4210-4214
 35. Tang J, Wang Y, Wang D, Wang Y, Xu Z, Racette K, Liu F(2012). Key Structure of Brij for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer. *Biomacromolecules*, dx.doi.org/10.1021/bm301661w

36. Vock, C. A.; Ang, W. H.; Scolaro, C.; Phillips, A. D.; Lagopoulos, L.; Juillerat-Jeanneret, L.; Sava, G.; Scopelliti, R.; Dyson, P. J. Development of ruthenium antitumor drugs that overcome multidrug resistance mechanisms. *J. Med. Chem.* 2007, 50, 2166–2175.
37. Wagner JM, Karnitz LM (2009) Cisplatin-Induced DNA Damage Activates Replication Checkpoint Signaling Components that Differentially Affect Tumor Cell Survival. *MOLECULAR PHARMACOLOGY* 76:208-214.
38. Wang, F.; Chen, H.; Parsons, S.; Oswald, I. D. H.; Davidson, J. E.; Sadler, P. J. Kinetics of aquation and anation of ruthenium- (II) arene anticancer complexes, acidity and X-ray structures of aqua adducts. *Chem.;Eur. J.* 2003, 9, 5810–5820.
39. Wang, F.; Xu, J.; Habtemariam, A.; Bella, J.; Sadler, P. J. Competition between glutathione and guanine for a ruthenium-(II) arene anticancer complex: detection of a sulfenato intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 17734–17743.
40. Wu J, Hu C, Gu Q, Li Y, Song M (2010). Trichostatin A sensitizes cisplatin-resistant A549 cells to apoptosis by up-regulating death-associated protein kinase. *Acta Pharmacologica Sinica* 31:93-101.
41. Yan, Y. K.; Melchart, M.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J. (2005) Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. *Chem. Commun.* 38:4764-4776.

ARTIGO 2

Cisplatin and Ru(III) metallocomplexes induce differences on cellular response and expression of multidrug resistance gene MDR1(ABCB1) and cytochrome P450 genes CYP3A4, CYP2C9 and CYP2C19 in human chronic myelogenous leukemia cells (K-562).

Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa^a (vilanovacosta@gmail.com)

Hellen Karine Paes Porto^a (paesporto@gmail.com)

Flávia de Castro Pereira^a (pereiraafc@gmail.com)

Aliny Pereira de Lima^a (alinypererialima@gmail.com)

Lucas Carlos Gomes Pereira^a (pereira.lcg@gmail.com)

Bruno Pereira Carvalho^a (brunocarvalhoufg@gmail.com)

Wagner Batista dos Santos^b (wbsantos32@yahoo.com.br)

Elisângela de Paula Silveira-Lacerda^{a*} (silveiralacerda@gmail.com)

^aLaboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia, Goiás, Brazil.

^bInstituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT, Barra do Garça, Mato Grosso, Brazil.

*Corresponding author:

Elisângela de Paula Silveira Lacerda

E-mail: silveiralacerda@gmail.com

Laboratório de Genética Molecular e Citogenética

Instituto de Ciências Biológicas - ICB I - Sala 200

Universidade Federal de Goiás

Campus Samambaia (Campus II)

Cx. Postal: 131

Goiânia-GO, Brasil – 74

Phone/Fax +55-62-3521-1481

Cell Phone +55-62-9293-3121

Abstract

The multidrug resistance phenotype (MDR) is considered one of the major causes of failure in cancer chemotherapy and it is associated with the over-expression of P-glycoprotein (P-gp or MDR1) in tumor cell membranes. While cytochrome P450 proteins are responsible for phase I metabolism of xenobiotics, P-gp, the product of the MDR1 gene, is an ATP-dependent pump that transports a wide variety of structurally diverse compounds out of the cell, resulting in a decrease of its intracellular accumulation and it is among the strongest prognostic factors in acute myeloid leukemia. The present study aimed to investigate the relationship between the expression of MDR1 and CYP450 genes in human chronic myelogenous leukemia cells (K-562) treated with Cisplatin (*cisPt*) and two Ruthenium-based coordinated complexes [*cisCRu*(III) and *cisDRu*(III)]. The tested compounds induced apoptosis in K-562 tumor cells as evidenced by caspase 3 activation. Results also revealed that the amplification of P-gp gene is greater in K-562 cells exposed to *cisPt* and *cisCRu*(III) than *cisDRu*(III). Taken together all these results strongly demonstrate that MDR-1 over-expression in K-562 cells could be associated to a MDR phenotype and moreover, it is also contributing to the Platinum, and structurally-related compound, resistance in these cells.

Keywords: Cisplatin; *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride; *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate, K-562, MDR-1, CYPs, Apoptosis.

1. INTRODUCTION

Leukemia is a major type of cancer affecting a significant segment of the population, and especially children. In fact, leukemia is the most frequent childhood cancer, with 26% of all cases, and 20% mortality. Chemotherapy is a common treatment for leukemia [1]. Chronic myelogenous leukemia (CML) cells are characterized by the presence of a bcr-abl fusion gene, which produce a chimeric protein known as Bcr-Abl with constitutive tyrosine kinase activity [2-3]. Imatinib mesylate emerged as a very useful compound for clinical development, since it potently inhibits all of the ABL tyrosine kinases and it has proven to be highly effective in the treatment of the CML [4]. However, some leukemia relapse can occur and several mechanisms of resistance were well described [5].

The multidrug resistance phenotype (MDR) is considered one of the major causes of failure in cancer chemotherapy and it is associated with the over-expression of P-glycoprotein (P-gp or MDR1) in tumor cell membranes. While cytochrome P450 proteins are responsible for phase I metabolism of xenobiotics, P-gp, the product of the MDR1 gene, is an ATP-dependent pump that transports a wide variety of structurally diverse compounds out of the cell, resulting in a decrease of its intracellular accumulation [6 - 7] and it is among the strongest prognostic factors in acute myeloid leukemia [8].

Heavy metal coordination complexes such as platinum, gallium and ruthenium have been investigated for their possible antitumor activity [8-9]. Among the most studied metal complexes, cisplatin and related platinum-based drugs have drawn much attention. Since cisplatin [*cis*-diamminedichloroplatinum (II)] was approved by the American Food and Drugs Administration (FDA) for cancer therapy in 1978, it has become the most widely used anticancer drug, with an estimated 70% of patients receiving the compound as part of their treatment [10-11].

Whilst the chemotherapeutic success of platinum is undeniable, it is by no means the perfect drug. It is not effective against many common types of cancer, toxicity and drug resistance are common and it has a deplorable range of side effects, which can include nerve damage, hair loss and nausea [12].

To overcome these limitations, some compounds based on ruthenium have been developed and tested against cancer cell lines. Several studies have been shown that ruthenium compounds present relevant antineoplastic activities towards several tumor

lineages *in vitro* and *in vivo*, as well as antimetastatic properties with lower systemic cytotoxicity, when compared to platinum-based compounds; additionally, these ruthenium compounds were shown to have a greater effect on tumor cells than on normal cells [13-14].

The molecular mechanism of multidrug resistance to chemotherapy remained largely unknown in leukemic K-562 cells. Since previous studies show that the resistance to chemotherapy exhibited in multidrug-resistant human leukemic K-562 cells was mediated by P-gp and others CYP450 proteins, the present study aimed to investigate the relationship between the expression of MDR1 and CYP450 genes in human chronic myelogenous leukemia cells (K-562) treated with Cisplatin and two Ruthenium(III) compounds.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Ruthenium (III) compound synthesis, Cisplatin and Chemicals

The Ruthenium(III) complexes *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride {*cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl} and *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate {*cis*-[Ru(C₂O₂)(NH₃)₄]₂(S₂O₆)} were synthesized at the Chemistry Institute of Universidade Federal de Mato Grosso by the methods described in detail previously [15, 16, 17]. Cisplatin [*cis*-diamminedichloroplatinum (II)] was obtained from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA).

The stock solutions of Ru(III) complexes and cisplatin were freshly prepared before use in DMSO (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA). The final concentration of DMSO in cell culture medium did not exceed 0.25% (v/v).

2.2. Cell culture

The human chronic myelogenous leukemia cells (K-562 ATCC®# CCL-243™) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Tumor cells were cultured in RPMI 1640 medium (pH 7.2 – 7.4) at 37 °C, under a 5% CO₂ humidified atmosphere. Media were supplemented with 100 U mL⁻¹ penicillin G, 100 µg mL⁻¹ streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1.5 g L⁻¹ sodium bicarbonate, 4.5 g L⁻¹ glucose, 10 mM HEPES, 1.0 mM sodium pyruvate and 10% fetal calf serum (FCS) (w/v) (all reagents were obtained from Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and subcultured 2–3 times a week at an appropriate plating density.

2.3. Cell viability determination by MTT assay.

The cytotoxic activity of Ruthenium(III) compound was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay as previously described [18]. Cisplatin and Ru(III) metallodrugs were added to final concentrations from 0 to 500 μM . The logarithmically growing K-562 cells were washed twice with supplemented RPMI medium and centrifuged at (1,000 rpm) $300\times g/15\text{ min}/10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cells were plated at a density of 5×10^4 cells/well into flat-bottomed 96-well microplates (Techno Plastic Products, Trasadingem, Switzerland) and cultured for 24 h.

Cell death was evaluated after tumor cells were exposed to the complexes for 24 h; then, after removal of medium with the complexes, a fresh medium was added, and cells were incubated for 48 h of recovery time. Then, 10 μL MTT (5 mg mL^{-1}) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to each well and incubated for an additional 6 h. The microplates were then centrifuged ($300\times g/15\text{ min}/10\text{ }^{\circ}\text{C}$) and the culture media were discarded. Then, 200 μL of PBS/20% of SDS was added to each well and plates were kept in the dark overnight.

Absorbance was measured at 545nm ($\text{OD}_{545\text{nm}}$) using an automated microplate reader (Stat Fax 2100, Awareness Technology Inc, Palm City, FL, USA). The viability rate was calculated as follows: $\text{Viability (\%)} = (\text{absorbance of the treated wells})/(\text{absorbance of the control wells})\times 100\%$. The IC_{50} values (compound concentration that produce 50% of cell growth inhibition) were calculated from curves constructed by plotting cell survival (%) versus drug concentration (μM) using GraphPad Prism 4.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All experiments were made in triplicate.

2.4. Cell toxicity measurement with LDH assay

LDH is a cytoplasmic enzyme, and LDH reduction is often associated with cell membrane damage and cell death [19]. The activity of LDH was measured spectrophotometrically by assaying reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) oxidation at 510 nm during LDH-catalyzed reduction of pyruvate to lactate. Briefly, cells were cultured at a density of 5×10^4 cells/well into flat-bottomed 96-well microplates (Techno Plastic Products, Trasadingem, Switzerland) and incubated for 24 h with Cisplatin and Ruthenium(III) complexes at IC_{50} concentrations. After 24h of incubation, the cell culture supernatant was removed and centrifuged to eliminate nonadherent particles and cell debris. Samples of supernatant for each drug tested were then

analyzed for DHL activity using a DHL colorimetric kit (Doles LTDA, Goiânia, GO, Brazil). All experiments were made in triplicate.

2.5. Reverse transcription and Real time quantitative PCR

The human chronic myelogenous leukemia cells K-562 were treated with different concentrations of Ru(III) complexes and Cisplatin for different periods. Total RNA was extracted with Tri Reagent® (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) following the manufacturer's protocol. Total RNA (2.0 µg) was used to produce cDNA with ABgene one-step Verso™ RT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) in a total of 25 µL reaction mixture according to the manufacturer's protocol. Real-time PCR reactions were then carried out by a LineGene K fluorescence quantitative PCR detection system (Hangzhou BIOER Tech Co., Tokyo, Japan). *Homo sapiens* apoptosis-related cysteine peptidases (Caspases) 3, 8 and 9 mRNAs expression were quantified for apoptosis cell profiling using specific primers (Table 1).

Futhermore, MDR-1 mRNA [*Homo sapiens* ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (ABCB1)]; CYP3A4 mRNA (*Homo sapiens* cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4); CYP2C9 mRNA (*Homo sapiens* cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9) and CYP2C19 mRNA (*Homo sapiens* cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19) were detected in order to evaluate the expression profile of these genes in cells exposed to the Cisplatin and Ruthenium(III) complexes (Table 1).

A total of 25 µL reaction mixture: 2 µL of cDNA, 10 µL of SYBR Green PCR Master Mix (LGC Biotechnology, Middlesex, UK), 2.5 µL of each forward and reverse primer (100nM.µL⁻¹). The PCR program was initiated at 15 minutes at 95°C before 40 thermal cycles, each of 30s at 95°C and 30s at 55°C and 30s at 72°C. Data were analyzed according to relative quantification method. Each sample was normalized by the expression of following endogenous genes: GAPDH (*Homo sapiens* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and B2M (*Homo sapiens* beta-2-microglobulin) (Table 1). Checking of the products was performed by melting curve analysis and agarose gel eletroforesis of qPCR products.

Table 1. Primers sequences used in Reverse Transcription Real Time Quantitative Polymerase Chain Reactions.

Primer	Sequence	Amplicon length
<i>Homo sapiens</i> Caspase 3	Forward 5'-CCTCTTCCCCATTCTCATT-3' Reverse 5'-CCAGAGTCCATTGATTGCT-3'	122 pb
<i>Homo sapiens</i> Caspase 8	Forward 5'-GGAGTTAGGCAGGTTAGGGG-3' Reverse 5'-GCTTCCTTTGCGGAATGTAG-3'	188 pb
<i>Homo sapiens</i> Caspase 9	Forward 5'-AACAGGCAAGCAGCAAAGTT-3' Reverse 5'-CATGCTCAGGATGTAAGCCA-3'	198 pb
<i>Homo sapiens</i> MDR-1	Forward 5'-CTATGCTGGATGTTTCCGGT-3' Reverse 5'-GCTTTGGCATAGTCAGGAGC-3'	147 pb
<i>Homo sapiens</i> CYP3A4	Forward 5'-GAAACACAGATCCCCCTGAA-3' Reverse 5'-CATGTACAGAATCCCCGGTT-3'	250 pb
<i>Homo sapiens</i> CYP2C9	Forward 5'-TCTGGTTGACCCAAAGAACC-3' Reverse 5'-AGGCCATCTGCTCTTCTTCA-3'	110 pb
<i>Homo sapiens</i> CYP2C19	Forward 5'-GCTGCATGGATATGAAGTGG-3' Reverse 5'-GCTTCCTCTTGAACACGGTC-3'	219 pb
<i>Homo sapiens</i> GAPDH	Forward 5'-ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3' Reverse 5'-GTAAAAGCAGCCCTGGTGA-3'	127 pb
<i>Homo sapiens</i> B2M	Forward 5'-GTGCTCGCGCTACTCTCTCT-3' Reverse 5'-TCAATGTGCGATGGATGAAA-3'	143 pb

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis of the results was performed using one-way ANOVA and Tukey's post test for multiple comparisons with controls. All statistical analyses were performed using the statistical software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). A probability of 0.05 or less was deemed statistically significant. The following notation was used throughout: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, relative to control.

3.0. RESULTS

3.1 The dose dependent cytotoxicity of *cis*Pt, *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III) on K-562 tumor cells

The anticancer drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II) [*cis*Pt] and two Ruthenium(III) complexes, *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride [*cis*CRu(III)] and *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate [*cis*DRu(III)] (Fig. 1), were evaluated in a comparative *in vitro* MTT cell viability assay with human chronic myelogenous leukemia cell line K-562.

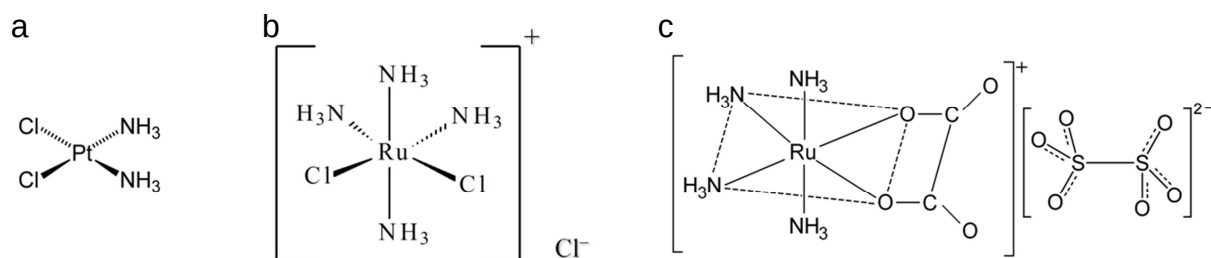


Fig. 1 Chemical structure of *cis*-diamminedichloroplatinum(II)[a], *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride [b] and *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate [c].

Cell viability was detected after the cells were treated with *cis*Pt, *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III) at concentrations from 0.2 to 500 μ M for 24 h.

Measurement of the number of living cells using MTT or similar assays in drug-treated and control cultures is the most commonly used method in cell-based screening experiments. The results can be interpreted as an indicator for the cytotoxic selectivity of the applied drug toward tumorigenic tissue. The IC_{50} values for compounds tested are depicted in Table 2. The data indicate that *cis*DRu(III) is the less cytotoxic compound of three on tested cell line, followed by *cis*Pt and *cis*CRu(III) (Fig. 2).

Table 2. IC_{50} values of compounds *cis*Pt, *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III) on tumorigenic K-562 cell line after 48 h of incubation, determined using the MTT Assay. Results are expressed as means ($\pm$ error) of at least two independent experiments

Compound	IC_{50} K-562 (μ M)
<i>cis</i> Pt	81.01 ($\pm$ 6.42)
<i>cis</i> CRu(III)	80.40 ($\pm$ 6.16)
<i>cis</i> DRu(III)	46.51 ($\pm$ 6.56)

Although the cytotoxicity of *cis*DRu(III) on K-562 presented be lower than the others two metallocomplexes, the results show that K-562 tumor cells treated with different concentration of *cis*Pt and Ruthenium complexes *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III), Ruthenium-based coordinated complexes, presented moderate cytotoxic and antiproliferative activities.

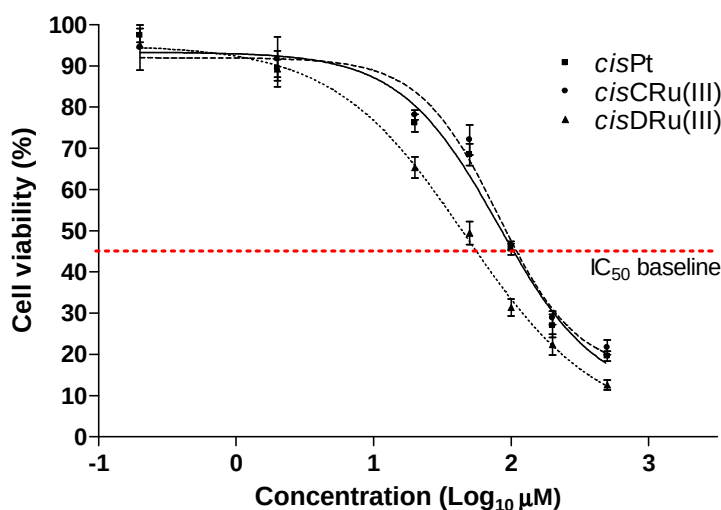


Fig. 2 Effect of *cisPt*, *cisCRu*(III) and *cisDRu*(III) (0.2 - 500 μM) upon cell viability, determined by MTT assay in human K-562 tumor cells. Data are mean ± SD (n = 3).

3.2. Cytomembrane damage of K-562 cells induced by *cisPt* and Ruthenium(III) complexes

The lactate dehydrogenase (LDH) release experiments (Fig. 3) using K-562 IC₅₀ concentrations of *cisPt*, *cisCRu*(III) and *cisDRu*(III) showed loss of cell vitality, which corroborates results observed on MTT assays. The compound *cisDRu*(III) caused K562 cytomembrane damage on a scale higher than *cisPt* and *cisCRu*(III). Thus, under the same condition, *cisDRu*(III) a DHL release induction approximately 3.4 fold than negative control, while *cisCRu*(III) and *cisPt*, showed a induction of 2.2 and 2.3 fold, respectively.

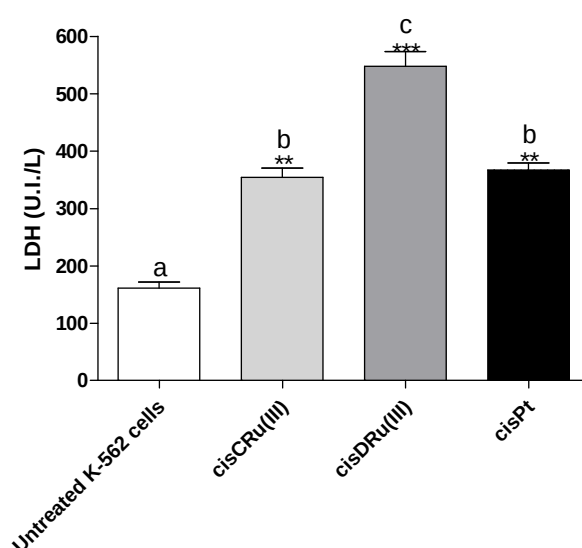


Fig. 3. Effect of *cisPt*, *cisCRu*(III) and *cisDRu*(III) (IC₅₀ concentration) upon K-562 cellular membrane integrity determined by LDH activity (U.I./L), in human K-562 tumor cells. Data are mean ± SD (n = 3). Significant differences from the untreated control are indicated by **p < 0.01; ***p < 0.001. Means among bars without a common letter are statistically different (Tukey's test, p < 0.05).

3.3. Caspase activity and apoptosis on K-562 tumor cell line

The effects of *cis*Pt, *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III) on mRNA expression of caspase 3, caspase 8 and caspase 9 were analyzed by Real-Time Quantitative PCR after 6 hours of treatment. Activation of caspase 3 plays the central role in the initiation of apoptosis and is a hallmark of apoptosis in response to death inducing signals originated from cell surface receptors, mitochondria or endoplasmic reticulum [20]. The mRNA expression of caspase 3 on K-562 tumorigenic cell line was increased after 6h exposure to *cis*Pt (1.35 fold), *cis*CRu(III) (1.43 fold) and *cis*DRu(III) (1.6 fold) (Fig. 4). The activities of caspase 8 and caspase 9 changed modestly in treated cells when compared to untreated control cells. As caspase 3 was reported to be an important key executioner of apoptosis (Dorrie et al. 2001), the most preeminent induction of caspase 3 expression by *cis*DRu(III) when related to *cis*Pt and *cis*CRu(III) levels, could probably explain the relative low IC₅₀ of *cis*DRu(III).

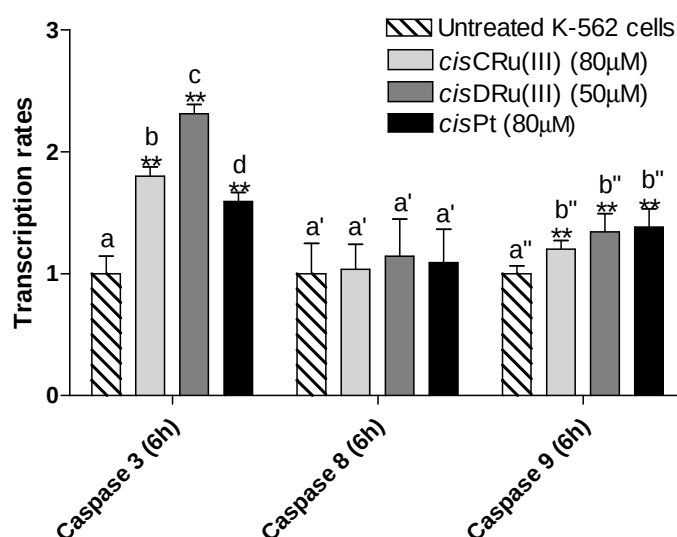


Fig. 4. Alterations of caspases expression after treatment with *cis*Pt, *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III), for 6h. Samples are in relation to the untreated control cell line with a transcription rate set up to a value of one. The data are expressed as mean±SEM of n=3. Significant differences from the untreated control are indicated by **p < 0.01. Means among bars without a common letter are statistically different (Tukey's test, p < 0.05).

3.4. Determination of multidrug resistance phenotype in K-562 tumor cell line

The levels expression of MDR and CYPs genes in K-562 tumor cells were evaluated by real-time reverse-transcription PCR using specific primers. Although K-562 tumor cells have never been exposed to *cis*Pt, *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III) before these experiments, qPCR analysis revealed that the amplification of MDR-1 and CYPs genes are greater on K-562 cells treated with metallocomplexes compared to untreated

cells. As shown in Fig. 5, treatment of K-562 with *cis*Pt, *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III) resulted in significantly induced MDR-1 expression levels. K-562 tumour cells treated with *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III) for 24h shown that MDR1 gene expression was up-regulated by 8.1 to 9.3 and 4.2 to 6,1 fold for 24 and 48h respectively, as compared to control. Not withstand, the K-562 cells treated with *cis*Pt shown an increase of MDR expression by 21.9 and 23.1 for 24 and 48h treatment.

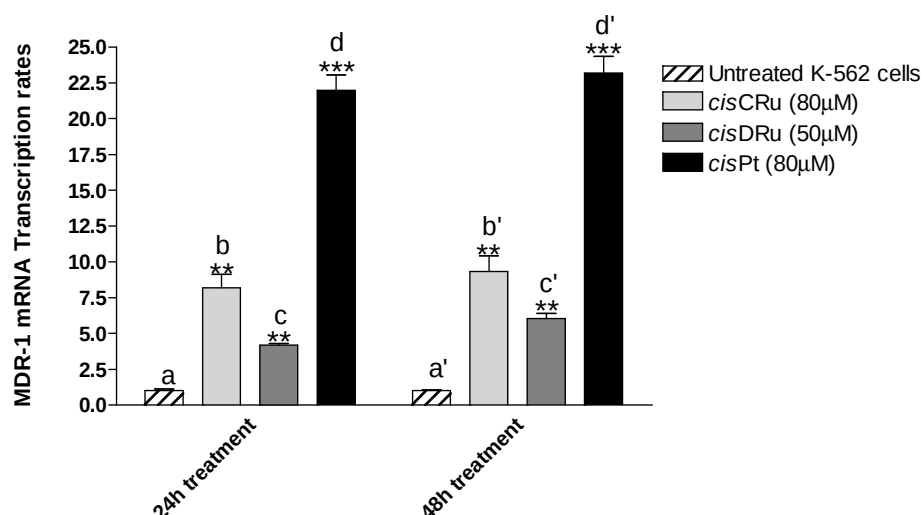


Fig. 5. Alterations of MDR1-mRNA expression using RT-qPCR after treatment with *cis*Pt, *cis*CRu(III) and *cis*DRu(III), respectively, for 24 and 48h. Samples are in relation to the untreated control cell line with a transcription rate set up to a value of one. The data are expressed as mean±SD of n=3. Significant differences from the untreated control are indicated by **p < 0.01; ***p < 0.001. Means among bars without a common letter are statistically different (Tukey's test, p < 0.05).

To evaluate the clinical relevance of the observations that certain anticancer drugs are able to induce Cytochrome P450 (CYPs) genes activity, and mRNA and protein expression levels, expression levels of CYPs was quantified by real-time PCR after treatment with metallodrugs (Fig. 6).

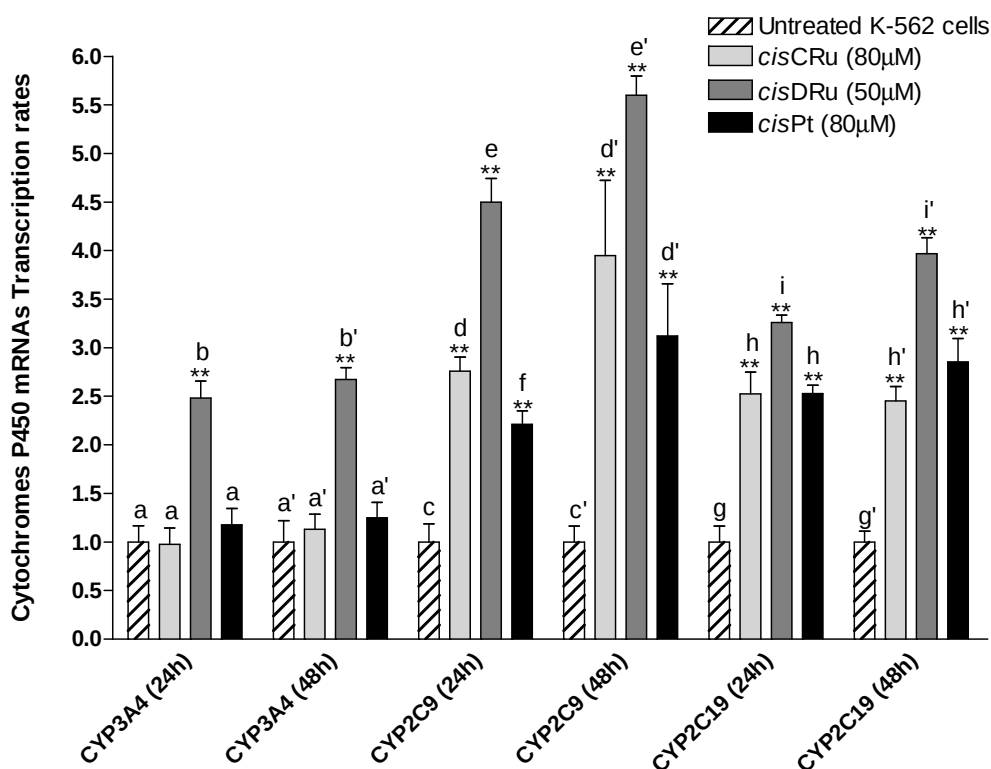


Fig. 6. Alterations of CYPs mRNAs expression using RT-qPCR after treatment with *cisPt*, *cisCRu*(III) and *cisDRu*(III), respectively, for 24 and 48h. Samples are in relation to the untreated control cell line with a transcription rate set up to a value of one. The data are expressed as mean $\pm$ SD of n=3. Significant differences from the untreated control are indicated by **p < 0.01; ***p < 0.001. Means among bars without a common letter are statistically different (Tukey's test, p < 0.05).

CYP2C9 is an important cytochrome P450 enzyme with a major role in the oxidation of both xenobiotic and endogenous compounds. The metallocomplexes did not exert a significant effect on induction of CYP3A4 expression on K-562 cells. On the other hand, *cisPt*, *cisCRu*(III) and *cisDRu*(III) enhanced CYP2C9 and CYP2C19 mRNAs expression levels; *cisDRu*(III) caused a fivefold CYP2C9 increase, while *cisPt* and *cisCRu*(III) were shown to increase the expression of CYP2C9 by three and fourfold, respectively, after 48 hours of treatment. CYP2C19 also showed an increasing on mRNA levels, although they were more modest than those presented by CYP2C9.

4.0. DISCUSSION

Metal-based chemotherapy for cancer treatment has been broadly used for many decades, and cisplatin, an inorganic platinum complex, is one of the most widely used metal-based anticancer drugs [21]. Cisplatin is known to exert its anticancer effects by interacting with DNA and inducing programmed cell death and has proven to be a highly effective chemotherapeutic agent for treating a variety of cancers, especially testicular

cancer, for which it has a >90% cure rate [22]. Unfortunately, similar to most chemotherapeutic agents, cisplatin is nonselective and attacks other types of rapidly dividing cells in the body, such that nearly all people treated with cisplatin experience gastrointestinal problems, including intense nausea and vomiting [21].

The issue of drug resistance should also be considered. The cellular mechanisms leading to MDR are still not fully understood, and several factors seem to be of importance [23]. Most frequently discussed are (a) lowering of the intracellular concentration of the drug either by blocking uptake or increasing efflux, (b) increased rates of repair of the drug damage, and (c) accelerated rates of drug inactivation by protein binding (e.g., metallothioneine and glutathione-S-transferase) and conjugation to small molecules such as glutathione [7].

It has been shown that MDR cells overexpress certain efflux proteins, which leads to a significantly lower intracellular level of chemotherapeutical agents. The most prominent example of this superfamily of proteins, for which a similar mechanism of action is assumed, is P-glycoprotein (P-gp) or MDR protein (MRP1). MRP1 mainly transports neutral and charged molecules in unmodified form, but it can also accept metabolized substrates such as GSH, glucuronide, or sulfate conjugates [24, 25].

In this study, we have investigated the effects of Platinum and Ruthenium-based compounds on transmembrane transport proteins involved in drug efflux (MDR-1). Furthermore, the expression of cytochrome P450 genes was also analyzed. Results demonstrate that human chronic myelogenous leukemia cells K-562 expressed high levels of P-gp, as detected by RT-PCR analyses (Fig. 5). This is in line with previous reports, in which MDR-1 expression was detected in K-562 tumor cells treated with *cisPt*.

Results also revealed that the amplification of P-gp gene is greater in K-562 cells exposed to *cisPt* and *cisCRu(III)* than *cisDRu(III)*. It's important to note that structurally-related compounds might act relatively equally, inducing the expression of these proteins. K-562 tumor cells treated with the metal complexes *cisPt* and *cisCRu(III)*, pretty similar compounds, have much higher levels of MDR-1 expression than cells treated with *cisDRu(III)*, a broader and more complex compound. These results strongly demonstrate that P-gp overexpression in K-562 cells could be associated to a MDR phenotype and moreover, it is also contributing to the Platinum, and structurally-related *cisCRu(III)* compound, resistance in these cells.

All metal compounds used in this study induced specific members of cytochrome P450 families. The three compounds tested, *cisPt*, *cisCRu(III)* and *cisDRu(III)*, enhanced CYP2C9 and CYP2C19 mRNAs expression levels but only *cisDRu(III)* affected CYP3A4 mRNA expression levels (Fig. 6).

CYPs isoforms are involved in the metabolism of a number of therapeutic drugs [26]. Pharmacogenetic variations in CYP2C family leads to inappropriate concentration of drugs and their metabolites, which may result in toxicity and risk of adverse drug reactions, or lack of therapeutic benefits [27]. Poor metabolizer (PM) and extensive metabolizer (EM) phenotypes has been demonstrated based on the ability to metabolize CYP2C substrates [28]. Our results suggest that *cisDRu(III)* induces CYP2C9 and CYP2C19 activity, in a manner much more intense than *cisPt* and *cisCRu(III)*, and this activity could be involved in *cisDRu(III)* mechanism of action, since CYP2C family is known to be involved in the bioactivation of some environmental procarcinogen(s) and therapeutic agents to reactive DNA binding metabolites [29, 30, 31]. We also observed an increase CYP3A4 mRNA expression in human erythroleukemic K562 cells treated with *cisDRu(III)*. This compound also shows the lower IC₅₀ concentration and MDR1 gene expression levels. Together, with the high expression of caspase 3 and caspase 9, results indicate apoptosis as a consequence of oxidative stress induced by intrinsic pathway. This stress induced apoptosis may occurs by a mechanism that involves altering mitochondrial permeability and subsequent cytochrome release and formation of the Apoptosome, a catalytic multiprotein platform that activates Caspase9. Activated Caspase9 then cleaves Caspase3 resulting in downstream events involved in cell death. Ruthenium complexes have been shown to have DNA-binding activities that can inhibit tumor cells growth. It also have been demonstrated that treatment with Ruthenium(III) complexes causes DNA damage and oxidative stress in a number cancer cells [8, 17, 32].

Cell death under physiological conditions usually occurs via apoptosis. Morphologically, the most obvious characteristics of this form of cell death are cytoplasmatic and nuclear condensation, followed by internucleosomal DNA cleavage, membrane blebbing, and finally cell fragmentation [33]. Cell death due to apoptosis has received much attention, since it has been found that many chemotherapeutic drugs induce apoptosis in a variety of tumour cell [34].

The mechanisms of apoptosis mainly involve two signaling pathways identified according to the initiator caspase: the death receptor pathway involving caspase-8

(extrinsic), and the mitochondrial pathway (intrinsic), in which various signals can trigger the release of harmful proteins by mitochondria into the cytoplasm, leading to activation of caspase-9. Both pathways result in the downstream activation of caspase-3. Caspase-3 is able to cleave a variety of substrates, thereby contributing to the typical morphological and biochemical features observed in apoptosis inducing DNA fragmentation [35, 36, 37, 38].

In the present study, our results showed clearly that *cisPt*, *cisCRu(III)* and *cisDRu(III)*, induced apoptosis in K-562 tumor cells as evidenced by caspase 3 activation. However, only a slight increase in caspase 8 and 9 activation was observed in K-562 treated cells. This result could be related to the fact that caspase 8 and 9 are considered to be an important initiating event in apoptosis, whereas caspase 3 is involved in the effector phase of the apoptotic process [38]. Based on this evaluation, it is possible that caspases play an important role in the activation and executioner phase of Platinum and Ruthenium compounds-induced apoptosis.

Several studies have shown that ruthenium complexes, such as Nami-A, KP1019, and RAPTA-C, induce apoptosis through caspase activation, particularly caspase 3 [40, 41]. On the other hand, it has been described that P-gp protects MDR cells from apoptosis by inhibiting caspases-8, as P-gp positive cells have been found to resist the apoptotic death [42 - 44]. In our leukemic cell model K-562, the acquisition of the MDR phenotype is associated with high levels of P-gp activity on cells treated with *cisPt*. However, taking into account the diversity of the intrinsic factors involved in the regulation of apoptotic pathways in different cancer cells, we cannot exclude the possibility that there may be other factors, apart from P-gp expression, that may block the caspase 8 and even caspase 3 enzymatic activities. Additionally, at present it cannot be ruled out that the induction of 170-kDa P-gp expression has other effects on key cellular metabolic pathways, which could influence the cellular sensitivity to apoptosis inducers. Further experiments should be made to clarify this issue.

In summary, the data presented here clearly show that *cisPt*, *cisCRu(III)* and *cisDRu(III)* induces apoptosis in human K562 cells, as verified by caspase 3 activation. Although some genes that confer multi-drug resistance are known, it is clear that many other genes remain to be identified. Based on this investigation, we propose that Cytochrome P450 genes represent a useful chemosensitivity marker in K-562 cells, especially Cyp3A4. We plan to investigate other cell lines and other P450 proteins that may be associated with its role in drug-resistance. It is anticipated that the continued

identification and characterization of novel mechanisms of drug resistance will enable the development of a new generation of anti-cancer drugs that increase cancer sensitivity and/or represent more effective chemotherapeutic agents.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of Research and Projects Financing (FINEP) (Grant No.01.06.0941.00/CT-Saúde to Elisângela de Paula Silveira-Lacerda) and Foundation for the Support of Research in the State of Goiás (FAPEG). Coordination for the Advancement of Higher Education Staff (CAPES) through fellowship to Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa, Flávia de Castro Pereira and Hellen Karine Paes Porto; and Brazilian National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) through fellowship to Aliny Pereira de Lima (Grant No. 141648/2010-4).

Funding sources

There are no financial or personal interests that might be viewed as inappropriate influences on the work presented herein. This manuscript was completely financed by governmental and nonprofit institutions, the Brazilian National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Research and Projects Financing (FINEP), Coordination for the Advancement of Higher Education Staff (CAPES) and Foundation for the Support of Research in the State of Goiás (FAPEG).

Ethical Approval

No studies involving humans or experimental animals were conducted in this work. The human lung carcinoma A549 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) and cultured *in vitro*.

REFERENCES

- [1] Ge H, Kong X, Shi L, Hou L, Liu Z, Li P. (2009). Gamma-linolenic acid induces apoptosis and lipid peroxidation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells. **Cell Biology International** 33, 402-410.
- [2] Lozzio CB, Lozzio BB. (1977) Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome. **Blood** 45:321-34.

- [3] Srabanti R, Jayashree B, Labanya M, Kausik P, Dipyaman G, Sandip B, Monidipa G, Nabendu B, Utpal C, Santu B. (2009) N-acetyl cysteine enhances imatinib-induced apoptosis of Bcr-Abl⁺ cells by endothelial nitric oxide synthase-mediated production of nitric oxide. **Apoptosis** 14:298–308.
- [4] Deininger MWN, Goldman JM, Melo JV. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood** 96, 3343–3356.
- [5] Mahon FX, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. (2003) MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. **Blood** 101(6):2368-2373.
- [6] Runge D, Kohler C, Kostrubsky VE, Jager D, Lehmann T, Runge DM, May U, Stolz DB, Strom SC, Fleig WE, Michalopoulos GK. (2000) Induction of Cytochrome P450 (CYP)1A1, CYP1A2, and CYP3A4 but Not of CYP2C9, CYP2C19, Multidrug Resistance (MDR-1) and Multidrug Resistance Associated Protein (MRP-1) by Prototypical Inducers in Human Hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 273, 333-341.
- [7] Coburger C, Lage H, Molnár J, Hilgeroth A. (2009). Impact of Novel MDR Modulators on Human Cancer Cells: Reversal Activities and Induction Studies. **Pharmaceutical Research** 26(1).
- [8] Assef Y, Rubio F, Coló G, del Mónaco S, Costas MA, Kotsias BA. (2009) Imatinib resistance in multidrug-resistant K562 human leukemic cells. **Leuk Res.** 33(5):710-716.
- [9] Alama A, Tasso B, Novelli F, Sparatore F. (2009). Organometallic compound in oncology: implications of novel organotin as antitumor agents. **Drug Discovery Today** 14:500-508.
- [10] Dorcier A, Ang WH, Bolaño S, Gonsalvi L, Juillerat-Jeannerat L, Laurenczy G, Peruzzini M, Phillips A. D, Zanobini F, Dyson P. (2006) J. In vitro evaluation of rhodium and osmium RAPTA analogues: the case for organometallic anticancer drugs not based on ruthenium. **Organometallics** 25:4090-4096.
- [11] Stordal B, Pavlakakis N, Davey R (2007). A systematic review of platinum and taxane resistance from bench to clinic: an inverse relationship. **Cancer Treat. Rev.** 33 (8): 688–703.
- [12] Jirsova K, Mandys V, Gispen WH, Bar PR. (2006) Cisplatin-Induced Apoptosis in Cultures of Human Schwann Cell. **Neuroscience Letters** 392:22-26.
- [13] Sava G, Bergamo A (2000) Ruthenium-based compounds and tumour growth control (review). **Int. J. Oncol.** 17:353-365.
- [14] Vock CA, Ang WH, Scolaro C, Phillips AD, Lagopoulos L, Juillerat-Jeanneret L, Sava G, Scopelliti R, Dyson PJ. (2007). Development of Ruthenium Antitumor Drugs that Overcome Multidrug Resistance Mechanisms. **J. Med. Chem.** 50 (9), 2166-2175.
- [15] Pavanin LA, Giesbrecht E, Tfouni E. (1985) Synthesis and properties of the

ruthenium(II) complexes *cis*-Ru(NH₃)₄(isn)L²⁺ spectra and reduction potentials. **Inorganic Chemistry** 24:4444–4446.

[16] Pereira, F.C., Vilanova-Costa, C.A.S.T., Lima, A.P., Ribeiro, A.S.B.B., da Silva, H.D., Pavanin, L.A., Silveira-Lacerda, E.P. (2009). Cytotoxic and genotoxic effects of *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Biological Trace Element Research** 128(3):258–268.

[17] Silveira-Lacerda EP, Vilanova-Costa CAST, Pereira FC, Hamaguchi A, Pavanin LA, Goulart LR, Homs-Brandenburg MI, Santos WB, Soares AM, Nomizo A (2010). The Ruthenium Complex *cis*-(Dichloro)Tetraammineruthenium(III) Chloride Presents Immune Stimulatory Activity on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Biological Trace Element Research** 133:270-283.

[18] Mosman T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** 16, 55–63.

[19] Lobner D. (2000) Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis. **J Neurosci Methods** 96:147-52.

[20] Yang L, Wu S, Zhang Q, (2007) 23,24-Dihydrocucurbitacin B induces G2/M cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37). **Cancer Letters** 256:267-78.

[21] Alderden RA, Mellor HR, Modok S, Hambley TW, Callaghan R. (2006) Cytotoxic efficacy of an anthraquinone linked platinum anticancer drug. **Biochem Pharmacol** 2006;71:1136–45.

[22] Zhang CX, Lippard SJ. (2003) New metal complexes as potential therapeutics. **Curr Opin Chem Biol.** 7(4):481-489.

[23] Ang WH, Khalaila I, Allardyce CS, Juillerat-Jeanneret L, Dyson PJ. (2005) Rational design of platinum(IV) compounds to overcome glutathione-S-transferase mediated drug resistance. **J. Am. Chem. Soc.** 127, 1382-1383.

[24] Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. (2004) Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. **Clin Pharmacol Ther** 75: 13-33.

[25] Fischer V, Einolf HJ, Cohen D. (2005) Efflux transporters and their clinical relevance. **Mini Rev Med Chem** 5:183-195.

[26] Goldstein JA. (2001) Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily, **Br. J. Clin. Pharmacol.** 52:349–355.

[27] Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M. (2006) Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer, **Oncogene** 25:1679-1691.

[28] Tanaka E. (1999) Update: genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes in Humans. **J. Clin. Pharm. Ther.** 24:323-329.

- [29] Tsuneoka Y, Fukushima K, Matsuo Y, Ichikawa Y, Watanabe Y. (1996) Genotype analysis of the CYP2C19 gene in the Japanese population. **Life Sci.** 59:1711-1715.
- [30] Xing SW, Qing CS. (2004) Frequencies of poormetabolizers of cytochrome P450 2C19 in esophagus cancer, stomach cancer, lung cancer and bladder cancer in Chinese population. **World Journal of Gastroenterology** 10:1961-1963.
- [31] Yoshiyuki Y, Ken-ichi F, Nakayama K, Suzuki A, Nakamura K, Yamazaki H, Kamataki T (2004) Establishment of ten strains of genetically engineered *Salmonella typhimurium* TA1538 each co-expressing a form of human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase sensitive to various promutagens, **Mutat. Res.** 562:151-162.
- [32] Menezes CSR, Gebrim LC, Ávila VMR, Ferreira MJ, Vieira CU, Pavanin LA, Homsibrandeburgo MI, Hamaguchi A, Silveira-Lacerda EP. (2007). Analysis in vivo of antitumor activity, Cytotoxicity and Interaction between plasmid DNA and the *cis*-dichlorotetraammineruthenium (III) chloride. **Chemico-Biological Interactions** 167, 116-124.
- [33] Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology** 68:251-306.
- [34] SILVEIRA-LACERDA, EP, VILANOVA-COSTA CAST, HAMAGUCHI A, PAVANIN LA, GOULART LR, HOMSI-BRANDEBURGO MI, SANTOS WB, SOARES AM, NOMIZO A. (2010) 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* 135:98-111.
- [35] Cohen GM. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochemistry Journal** 326:1-16.
- [36] Kaufmann SH, Earnshaw WC. (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Exp Cell Res.**256(1):42-9.
- [37] Kaufmann SH, Hengartner MO.(2001) Programmed cell death: alive and well in the new millennium. **Trends Cell Biol.** 11(12):526-34.
- [38] Fesik SW. (2005) Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery; **Nature** 5:876-885
- [39] Shi Y. (2002) Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during poptosis. **Molecular Cell** 9:459-470.
- [40] Kapitza S, Jakupiec MA, Uhl M, Keppler BK, Marian B. (2005). The heterocyclic ruthenium(III) complex KP1019 (FFC14A) causes DNA damage and oxidative stress in colorectal tumor cells. **Cancer Letters** 226:115-121.

- [41] Chatterjee S, Kundu S, Bhattacharya A, Christian G, Hartinger CG, Dyson PJ, (2008). The ruthenium(II)–arene compound RAPTA-C induces apoptosis in EAC cells through mitochondrial and p53–JNK pathways. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry** 13, 1149-1155.
- [42] Ruefli AA, Tainton KM, Darcy PK, Smyth MJ, Johnstone RW (2002). P-glycoprotein inhibits caspase-8 activation but not formation of the death inducing signal complex (disc) following Fas ligation. *Cell Death Differ* 9: 1266–1272.
- [43] Martin-Orozco E, Ferragut J, Garcia-Penarrubia P, Ferrer-Montiel A. (2005). Acquisition of multidrug resistance by L1210 leukemia cells decreases their tumorigenicity and enhances their susceptibility to the host immune response. *Cancer Immunol Immunother* 54:328-336.
- [44] Sarkady B, Homolya L, Szakacs G, Varadi A. (2009). Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: Participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev* 86:1179-1236.

6.0. CONCLUSÕES

O ataque indiscriminado promovido pelas drogas antineoplásicas às células de rápida proliferação, indistintivamente cancerosas e normais, produz os indesejáveis efeitos colaterais ou tóxicos (Kelland, 2007). Atualmente, os complexos metálicos de platina são muito utilizados no tratamento de uma variedade de neoplasias. Porém, o sucesso clínico desses fármacos antitumorais platinados é limitado pelos efeitos colaterais significantes causados nos pacientes e pela resistência adquirida ou intrínseca de vários tumores (Wu et al., 2010). Devido a sua relativa inespecificidade, estes antineoplásicos tornam-se tóxicos também para os tecidos saudáveis, principalmente aqueles que apresentam um maior grau de proliferação. Conseqüentemente, os esforços dos pesquisadores agora estão direcionados no sentido de se estudar e produzir agentes antitumorais mais seletivos. Estudos de síntese e avaliação farmacológica de compostos contendo íons metálicos diferentes de platina têm despertado grandes interesses na terapêutica do câncer.

Complexos contendo rutênio, um metal do grupo da platina, têm demonstrado potencial antitumoral, com menor toxicidade sistêmica quando comparados aos de platina (Silveira-Lacerda et al., 2010b; Lima et al., 2012). Estudos desses rutenatos poderão levar a descoberta de drogas mais eficazes, que agiriam especificamente nos mecanismos moleculares da neoplasia, com um grau bem menor de toxicidade. Para isto, tornam-se necessários estudos que delineiem o perfil de ação biológica desses compostos de rutênio. É com base nesse princípio que o presente trabalho foi realizado. Para tanto, utilizamos dois complexos metálicos de rutênio, o Cloreto de *cis*-(dicloro)tetraaminorutênio(III) e o Ditionato de *cis*-tetraammino(oxalato)rutênio(III), compostos que vêm sendo estudados por Silveira-Lacerda e colaboradores, a mais de uma década (Silveira-Lacerda, 2003; Menezes et al., 2007, Pereira et al., 2009; Ribeiro et al., 2009, Silveira-Lacerda et al., 2010b, Lima et al., 2010, Lima et al., 2012).

Foram escolhidas duas linhagens celulares de cancer, a leucemia mielóide crônica humana (K-562) e o carcinoma de pulmão humano (A549) para a realização dos estudos. Esta escolha se norteou pelo fato dos dois tipos serem muito frequentes e ambos apresentarem intensa resposta de resistência, quando em tratamento com complexos metálicos de platina em pacientes (American Cancer Society, 2013). Desta forma, avaliamos os efeitos biológicos de citotoxicidade e indução da expressão gênica de marcadores relacionados à resistência e metabolização de drogas, Glicoproteína-P e Citocromos P450. Estes genes foram escolhidos devido ao fato de estarem mais intimamente relacionados aos mecanismos biológicos de resistência ao tratamento, que levam a uma baixa resposta terapêutica em pacientes tratados com quimioterápicos.

Face aos resultados obtidos nos experimentos realizados, podemos concluir que:

1. **Os complexos de rutênio cloreto de *cis*-(dicloro)tetraaminorutênio(III) e ditionato de *cis*-tetraammino(oxalato)rutênio(III) são citotóxicos às células tumorais de leucemia mielóide crônica humana K-562 e de carcinoma de pulmão humano A549.**
 - Dentre os dois complexos de rutênio estudados, o ditionato de *cis*-tetraammino(oxalato)rutênio(III) foi o que produziu maior efeito citotóxico nos modelos tumorais estudados, apresentando uma IC₅₀ de 175 µM frente ao carcinoma de pulmão A459 e de 46,51 µM na leucemia mielóide crônica K-562;
 - O complexo de rutênio cloreto de *cis*-(dicloro)tetraaminorutênio(III) apresentou atividade citotóxica com IC₅₀ de 80,40 µM em leucemia mielóide crônica K-562, compatível com a apresentada pela droga antitumoral de platina(II) Cisplatina, apresentou IC₅₀ de 81,01 µM na mesma linhagem tumoral K-562.
2. **Os complexos de rutênio e de platina induziram morte celular nas linhagens tumorais estudadas, presumivelmente por apoptose, devido ao aumento significativo da expressão de genes pró-apoptóticos, como Caspase 3, 8 e 9.**
 - Dentre os compostos estudados, o ditionato de *cis*-tetraammino(oxalato)rutênio(III) foi o que mais induziu a expressão de caspases, especialmente a caspase 3 em cerca de 1,5 na linhagem celular de leucemia mielóide crônica humana K562 e 7,3 vezes no carcinoma de pulmão humano A549.
3. **As linhagens tumorais K-562 de leucemia mielóide crônica humana e A549 de carcinoma de pulmão humano expressam MDR1 quando tratadas com complexos de rutênio(III) e platina(II).**
 - Apesar de todos os complexos metálicos estudados no presente estudo terem induzido aumento da expressão do gene MRD1 nas linhagens tumorais estudadas, o complexo ditionato de *cis*-tetraammino(oxalato)rutênio(III) foi o que menos estimulou a sua expressão.
4. **Foi observado o aumento da expressão das CYPs 3A4, 2C9 e 2C19 em linhagens tumorais K-562 de leucemia mielóide crônica humana e A549 de carcinoma de pulmão humano, e em diferentes níveis, quando tratadas com complexos de rutênio(III) e platina(II).**

- O complexo metálico ditionato de *cis*-tetraammino(oxalato)rutênio(III) foi o que mais estimulou a expressão de CYPs nas células tumorais K562 e A549, em especial a CYP2C9.
5. **A estrutura molecular do composto parece estar intimamente relacionada com a sua capacidade citotóxica, de indução de estresse oxidativo, de apoptose, e de indução na expressão de genes de resistência a múltiplas drogas (MDR) e de metabolismo e detoxificação de fármacos CYPs em células tumorais leucêmicas K562 e carcinomas de pulmão A549.**

7.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi com a descoberta da atividade antimitótica da cisplatina por Rosenberg na década de 1960 e 70, em seu célebre estudo com bactérias *Escherichia coli*, que surgiu o interesse em sintetizar e entender as bases moleculares responsáveis pelo mecanismo de ação biológica dos compostos metálicos, visto que a própria cisplatina foi inicialmente sintetizada por Peyrone nos anos de 1840.

Os primeiros estudos envolvendo o uso de complexos metálicos de rutênio como agentes antitumorais foram realizados por Tochter no final dos anos 1980 (Dale et al., 1992). Àquela época, foi inferido que todos os compostos de rutênio apresentavam como mecanismo de ação, a sua ligação com o DNA, formando adutos e desencadeando processos celulares de natureza deletéria que, por fim, levariam a morte celular. É interessante lembrar que esse é o mesmo mecanismo de ação dos compostos de platina mais aceitos nos dias atuais.

Sadler e Dyson (2003) estudando compostos de rutênio que continham cloro em sua estrutura, como o cloreto de *cis*-(dicloro)tetraaminorutênio(III) [*cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl], observaram que estes compostos apresentavam mecanismos de ação biológica muito parecidos com os apresentados pela cisplatina [Pt(NH₃)₂Cl₂], onde a hidrólise da ligação Ru–Cl pode ser fortemente influenciada pela natureza dos coligantes presentes na estrutura do rutenato, como grupamentos amino ou até mesmo pela presença de átomos de carbono. A alta concentração de cloretos no sangue permite a esses compostos metálicos, levados por proteínas séricas, chegar até as células e atravessar sua membrana celular e nuclear. Uma vez no interior do núcleo, a ligação Ru–Cl é hidrolisada, devido a queda abrupta da concentração de cloretos (que é cerca de 25 vezes menor), levando o composto a se ligar ao DNA, mais especificamente à posição N7 da base nitrogenada guanina.

Por outro lado, compostos que não possuem cloro em sua estrutura, parecem apresentar mecanismos de ação diferentes ao padrão "ligação ao DNA". Sabe-se que compostos que apresentam carboxilatos em sua molécula, como a carboplatina, oxaliplatina e o próprio ditionato de *cis*-tetraammino(oxalato)rutênio(III) [*Cis*-[Ru(C₂O₂)(NH₃)₄]₂(S₂O₆)], uma vez no interior das células, são hidrolisados muito mais lentamente do que os compostos ricos em cloretos, o que leva a um acúmulo desses compostos no citoplasma, diminuindo sua migração até o núcleo e, assim reduzindo a sua capacidade de se ligar ao DNA.

Mas se o DNA não é o alvo desses compostos, então, quem poderia ser?

Essa pergunta está sendo respondida com recentes estudos, que revelaram a interação desses compostos, ricos em carboxilatos, com uma miríade de proteínas e enzimas, que vão desde catepsinas, chegando até mesmo à Pgp (Melchart & Sadler, 2008).

Estudos realizados por Dyson e colaboradores (2007), utilizando alguns inibidores da proteína Pgp, como fenoxazinas e antracenos, coordenados com compostos de rutênio, observaram que estes novos complexos não somente inibiram a ação da enzima, como também induziram morte celular, demonstrando uma multifuncionalidade. Seguindo essa linha de pensamento, acreditamos que a capacidade do composto ditionato de *cis*-tetraammino(oxalato)rutênio(III) em induzir apoptose nas células tumorais, assim como os baixos níveis de expressão de Pgp apresentados pelas células tratadas, corroboram os resultados previamente observados por outros grupos, utilizando compostos de rutênio similares.

A resistência a fármacos mediada por Pgp é o mecanismo de MDR mais estudado atualmente. Apesar do desenvolvimento de novos agentes antitumorais, a MDR mediada pela Pgp protege as células de possíveis agentes citotóxicos, limitando a eficácia dos tratamentos quimioterápicos em pacientes com câncer. Atualmente, a extensa maioria dos inibidores da Pgp disponíveis estão associados a vários inconvenientes, que limitam o seu uso no reestabelecimento da eficácia da quimioterapia antineoplásica, após o aparecimento do fenótipo MDR. A procura de inibidores de Pgp alternativos, com um processo sintético exequível e efeitos secundários reduzidos, continua a ser um desafio para os químicos, farmacêuticos e pesquisadores. É nesse contexto que estão sendo desenvolvidos e estudados novos agentes antitumorais que possam agir como inibidores de Pgp, apresentando um efeito dual, ou até mesmo multifuncional, no tratamento clínico das neoplasias malignas.

Muito tem se discutido que a próxima geração de fármacos antitumorais poderá ser formada por substâncias que se ligam a mais do que um único alvo terapêutico, o que poderia acelerar tratamento contra a doença, reduzindo o número e a concentração de fármacos que deveriam ser administrados, como os coquetéis atualmente utilizados, e até mesmo aumentando a adesão ao tratamento por parte do paciente.

No presente trabalho, estudamos dois complexos de rutênio, o cloreto e o ditionato de rutênio(III), que se apresentam como promissores no possível desenvolvimento de um novo fármaco antitumoral. Essa promessa transparece no fato de ambos serem de síntese química relativamente simples (processo sintético exequível) e, principalmente, por apresentarem efeito biológico de interesse em células tumorais, como citotoxicidade e indução de morte celular, especialmente por apoptose.

Pelo que foi observado nos resultados de nossa pesquisa, os complexos aqui estudados, podem constituir um modelo para o estudo de novos agentes anticancerígenos com concomitante capacidade de não induzir MDR. Esta característica se mostrou muito evidente sobre a linhagem leucêmica K-562, onde os níveis de expressão de MDR1, após o tratamento com os rutenatos, foram muito inferiores aos apresentados pelas células tumorais tratadas com o fármaco controle Cisplatina. Ainda, é importante pontuar que o composto ditionato de *cis*-tetraammino(oxalato)rutênio(III) apresentou efeito citotóxico em ambas as linhagens tumorais K-562 e A549, sem contudo induzir altos níveis de expressão de Pgp (MDR1), apresentados pelos fármacos platinados.

Assim, estudos mais aprofundados sobre a estrutura e funcionamento biológico desses complexos de rutênio, representam um ponto de partida interessante para o desenvolvimento de fármacos multifuncionais e de efeito desejável, auxiliando na delineação de estudos clínicos dirigidos a grupos selecionados de pacientes que reúnam características genotípicas e fenotípicas preditivas de máxima resposta terapêutica com mínima toxicidade. Posteriormente, estes estudos podem levar às realizações de testes diagnósticos e farmacológicos mais eficazes que poderão ser estabelecidos como rotina voltada para uma melhor definição de tratamentos. Isso traria um maior sucesso no teste de novos medicamentos e reduziria os custos e riscos, minimizando o tempo gasto para aprovação de um novo medicamento e a sua disponibilização para a sociedade.

8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERTS, B. et al. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª edição. Editora Artmed. São Paulo, 2010.
2. ALLARDYCE CS, DYSON PJ, ELLIS DJ, SALTER PA, SCOPELLITI R (2003). Synthesis and characterisation of some water soluble Ruthenium(II)–arene complexes and an investigation of their antibiotic and antiviral properties. *Journal of Organometallic Chemistry* 668:35-42.
3. ALMEIDA, VL; LEITÃO, A; REINA, LCB; MONTANARI, CA; DONNICI, CL & LOPES, MTP (2005). Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que Interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim. Nova*, 28(1): 118-129.
4. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures*, 2013. Atlanta: American Cancer Society.
5. ANAKK, S. et al. Genomic characterization and regulation of CYP3a13: role of xenobiotics and nuclear receptors. *The FASEB Journal*, v. 17, p. 1736-1738. Set. 2003.
6. ANDERSON, MW; REYNOLDS, SH; YOU, M & MARONPOT, RM (1992): Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, 98:13-24.
7. ANDERSSON, BS; MROUE, M; BRITTEN, RA; MURRAY, D (1994). The role of DNA damage in the resistance of human chronic myeloid leukemia cells to cyclophosphamide analogues. *Cancer Research*. 15;54(20):5394-400.
8. ARIAS, M.C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismo no DNA. In: *Biologia Molecular e Evolução*. São Paulo: Ed. Oholos, 2004. cap. 14.
9. ASHKENAZI, A. & DIXIT, V. M. (1998). Death Receptors: Signaling and Modulation, *Science* 281 (5381), 1305.
10. AUTRUP, H (2000). Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolising enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mut. Res.*, 464: 65-76.
11. BABBITT, PC (2000). Reengineering the glutathione Stransferase scaffold: a rational design strategy pays off. *Proceeding National Academy Sciences*, Washington, 97(19): 10293-10300.
12. BACAC, M.; HOTZE, A. C. G.; VAN DER SCHILDEN, K.; HAASNOOT, J. G.; PACOR, S.; ALESSIO, E.; SAVA, G.; REEDIJK, J. (2004) The hydrolysis of the anti-cancer ruthenium complexNAMI-Aaffects itsDNAbinding and antimetastatic activity: an NMR evaluation. *J. Inorg. Biochem.* 98:402-412.
13. BARACAT, F.F; FERNANDES JR., H.J.; DA SILVA, M.J. *Cancerologia atual: um enfoque multidisciplinar*. Parte I: As Modalidades do Tratamento Médico Oncológico. Cap. I: Introdução ao Estudo das Neoplasias. Editora Rocca. p. 3-10. São Paulo, 2000.

14. BARRETO, ML (1998). Tendências das doenças crônicas no Brasil. O adulto brasileiro e as doenças da modernidade: epidemiologia das doenças crônicas não transmissíveis. Lessa I, editor. Rio de Janeiro: Hucitece, 17.
15. BARSCH, H & HIETANEN, E (1996). The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. *Environ. Health Perspect.* 104: 569-577.
16. BERGAMO A, GAGLIARDI R, SCARCIA V, FURLANI A, ALESSIO E, MESTRONI G, SAVA G (1999) In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 289:559–564.
17. BLACK, SD & COON, MJ (1986). In: Cytochrome P450, P. Ortiz de Montellano, *Ed. Plenum*, New York. 161-216.
18. BLAGOSKLONNY, M. V. (2005). Why therapeutic response may not prolong the life of a cancer patient: selection for oncogenic resistance. *Cell Cycle* 4, 1693–1698.
19. BODE, A. M.; ZIGANG, D. The functional contrariety of JNK. *Molecular Carcinogen.* v. 46, n. 8, p. 591-598. 2007.
20. BORTOLETTO, M. É., BOCHER, R., Impacto dos medicamentos nas intoxicações humanas no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 15(4), p. 859-869, 1999.
21. BRABEC V, NOVÁKOVÁ O (2006) DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resistance Updates* 9:111-122.
22. BROXTERMAN, H.J. & GEORGOPAPADAKOU, N.H. Anticancer therapeutics: “addictive” targets, multi-targeted drugs, new drug combinations. *Drug Resist. Updat.* 8, 183–197 (2005).
23. BUGARCIC, T.; HABTEMARIAM, A.; DEETH, R. J.; FABBIANI, F. P. A.; PARSONS, S.; SADLER, P. J. Ruthenium(II) arene anticancer complexes with redox-active diamine ligands. *Inorg. Chem.* 2009, 48, 9444–9453.
24. CAIRNS, J (1995): The cost of prevention. *B.M.J.*, 311(7019):1520.
25. CASINI, A.; GABBIANI, C.; MICHELUCCI, E.; PIERACCINI, G.; MONETI, G.; DYSON, P. J.; MESSORI, L. Exploring metallodrug-protein interactions by mass spectrometry: comparisons between platinum coordination complexes and an organometallic ruthenium compound. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2009, 14, 761–770.
26. CAVALCANTE Jr., GB; KLUMB, CE; MAIA, RC (2002). p53 e as hemopatias malignas. *Revista Brasileira de Cancerologia*; 48(3): 419-427.
27. CHABNER, BA; CALABRESI, P (1995). As Bases Farmacológicas da Terapêutica; Goodman, LS; Gilman, A, eds.; *Mc Graw Hill*: Rio de Janeiro, 903-949.

28. CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. (2007) Animais de laboratório: o camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 28(1):11-23.
29. CHOUDHARY, D; JANSSON, I; STOILOV, I; SARFARAZI, M & SCHENKMAN, JB (2005). Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1–4) during development and in different adult tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 436: 50–61.
30. CHOWBAY B, ZHOU S, LEE EJ. (2005) An interethnic comparison of polymorphisms of the genes encoding drug-metabolizing enzymes and drug transporters: experience in Singapore. *Drug Metab Rev*; 37(2):327-78.
31. CLARKE MJ (2003) Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coord Chem Rev*. 236:209-233.
32. COBURGER C, LAGE H, MOLNÁR J, HILGEROTH A. (2009). Impact of Novel MDR Modulators on Human Cancer Cells: Reversal Activities and Induction Studies. *Pharmaceutical Research*, 26:1.
33. D.R. GREEN AND G. KROEMER (1998) The central executioner of apoptosis: mitochondria or caspases?. *Trends Cell Biol*. 8: 267.
34. DAI D, ZELDIN DC, BLASIDELL JA, CHANAS B, COULTER SJ, GHANEYEM BI, et al. Polymorphism in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics* 2001;11(7):597–607.
35. DALE, L. D.; TOCHER, J. H.; DYSON, T. M.; EDWARDS, D. I.; TOCHER, D. A. Studies on DNA damage and induction of SOS repair by novel multifunctional bio-reducible compounds. II. A metronidazole adduct of a ruthenium-arene compound. *Anti-Cancer Drug Des*. 1992, 7, 3–14.
36. DANIAL, N.N. & KORSMEYER, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116(2): 205-219.
37. DE LUCA, RR; ALEXANDRE, SR *et al.* (1996). Manual Para Técnicos em Bioterismo. COBEA/FINEP, 2ª ed.
38. DEGAWA, M; STER, SJ; MARTIN, MV; GUENGERICH, FP; FU, PP; ILETT, KF; KADERLIK, RK & KADLUBAR, FF (1994). Metabolic activation and carcinogen – DNA adduct detection in human larynx. *Cancer Research*, 54: 4915-4919.
39. DYBING, E; DOE, J; GROTEN, J; KLEINER, J; O'BRIEN, J; RENWICK, AG; SCHLATTER, J; STEINBERG, P; TRITSCHER, A; WLAKER, R; YOUNES, M (2002). Hazard characterization of chemicals in food and diet. *Food Chemical and Toxicology*, London, 40(1-2): 237-282.
40. EDELMAN MJ, MEYERS FJ, MILLER TR ET AL. Phase I/II study of paclitaxel, carboplatin, and methotrexate in advanced transitional cell carcinoma: a well-tolerated regimen with activity independent of p53 mutation. *Urology* 2000; 55 (4): 521–525.

41. EDVARDSEN, H. et al. Germline glutathione S-transferase variants in breast cancer: Relation to diagnosis and cutaneous long-term adverse effects after two fractionation patterns of radiotherapy. *International Journal Radiation Oncology Biology Physics*. v. 67, n. 4, p. 1163-1171. 2007.
42. EFFERTH T, VOLM M. (2005) Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacology & Therapeutics*; 107(2): 155-176.
43. EUBANKS, M (1994). Biomarkers: the clues to genetic susceptibility. *Environ. Health Perspect.* 102: 50-56.
44. EVANS. W. E. & RELLING M. V. 'Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics'. *Science* 1999; 286:487.
45. FERREIRA, CG & ROCHA, JC (2005). *Oncologia Molecular*. In: *Oncologia Molecular*. Parte III: Oncogenética. Cap. 27: Suscetibilidade Genética ao Câncer. *Atheneu Editora*. 3: 295:305.
46. GALLORI, E.; VETTORI, C.; ALESSIO, E.; VILCHEZ, F. G.; VILAPLANA, R.; ORIOLI, P.; CASINI, A.; MESSORI, L. (2000) DNA as a possible target for antitumor ruthenium(III) complexes. A spectroscopic and molecular biology study of the interactions of two representative antineoplastic ruthenium(III) complexes with DNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 376: 156-162.
47. GALLUZZI L, I VITALE, JM ABRAMS, ES ALNEMRI, EH BAEHRECKE, MV BLAGOSKLONNY, TM DAWSON, VL DAWSON, WS EL-DEIRY, S FULDA, E GOTTLIEB, DR GREEN, MO HENGARTNER, O KEPP, RA KNIGHT, S KUMAR, SA LIPTON, X LU, F MADEO, W MALORNI, P MEHLEN, G NUÑEZ, ME PETER, M PIACENTINI, DC RUBINSZTEIN, Y SHI, H-U SIMON, P VANDENABEELE, E WHITE, J YUAN, B ZHIVOTOVSKY, G MELINO AND G KROEMER (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell and Differentiation* 10:107-120.
48. GLEICH, LL & SALAMONE, FN (2002). Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control*; 9(5): 396-378.
49. GOLDMAN, B. Multidrug resistance: can new drugs help chemotherapy score against cancer? *J. Natl. Cancer Inst.* 95:255–257 (2003).
50. GONZÁLES DM, CABRERA SJ, HURLÉ AD. Farmacogenética em oncologia. *Medicina Clínica* 2008; 131(5): 184-195.
51. GOODMAN & GILMAN (2003). *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: *McGraw-Hill*.
52. GRIFFITHS AJF, MILLER JH, SUZUKI DT, LEWONTIN RC, GELBART WM. *Introdução à Genética*. 7a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

53. GUENGUERICH; FP (2000). Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*. 21:345-351.
54. GYORFFY, B. et al. Gene expression profiling of 30 cancer cell lines predicts resistance towards 11 anticancer drugs at clinically achieved concentrations. *Int. J. Cancer* 118, 1699–1712 (2005).
55. HABIG, WH; PABST, MJ; JAKOBY, WB (1974). Glutathione s-Transferases. The first enzymatic in mercapturic acid formation. *The J. of Biol. Chemistry*, 249(22): 7130-7139.
56. HARRIS, CC (1987): Tobacco smoke and lung disease: Who is susceptible? *Ann. Intern. Med.*, 105:607-609.
57. HARTINGER CG, ZORBAS-SEIFRIED S, JAKUPEC MA, KYNAST B, ZORBAS H, KEPPLER BK (2006) From bench to bedside- preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans- [tetrachlorobis (1 H-indazazole)ruthenate (III)] KP1019 or FFC14A). *Journal of Inorganic Biochemistry* 100: 891-904.
58. Hartinger CG, Zorbas-Seifried S, Jakupiec MA, Kynast B, Zorbas H, Keppler BK (2006) From bench to bedside- preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans- [tetrachlorobis (1 H-indazazole)ruthenate (III)] KP1019 or FFC14A). *Journal of Inorganic Biochemistry* 100: 891-904.
59. HASKEL, CM (1990). Cancer Treatment, *Saunders*: Philadelphia.
60. HAYES, JD; PULFORD, DJ (1995). The glutathione Stransferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Review Biochemistry Molecular Biology*, 30: 445-600.
61. HAYES, RB (1995). Genetic susceptibility and occupational cancer. *Med. Lav.* 86: 206-213.
62. HERBST, R.S. et al. Clinical cancer advances 2005: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening—a report from the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* 24, 190–205 (2006).
63. HILL R.P. Tumour Metastasis Models. In; *The Cancer Handbook*. Nature Publishing Group. v. 2, p. 999-1008. London, 2002.
64. HODGSON, E. & LEVI, P.E. (1994). Metabolism of toxicants Phase I Reactions. In: *Introduction to Biochemical Toxicology*. 2nd, *Appleton & Lange*. Norwalk, Connecticut.
65. HOFFMEYER, S., BURK, O., VON RICHTER, O., ARNOLD, HP., ROCKMÖLLER, J., JOHNE, A., CASCORBI, I., GERLOFF, T., ROOTS, I., EICHELBAUN, M. & BRINKMANN, U. 2000. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3473-3478.
66. HOLLSTEIN, M; SIDRANSKY, D; VOGELSTEIN, B & HARRIS, CC (1991): p53 Mutations in Human Cancers. *Science*, 253(5015): 49-53.

67. HONKAKOSKI, P.;NEGISHI, M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochemistry Journal*. v. 347, p. 321-337. 2000.
68. HUSS, J. M.; KASPER, C. B. Nuclear receptor involvement in the regulation of rat cytochrome P450 3^a23 expression. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 273, n. 26, p. 155-162. 1998.
69. IDLE, J (1991). Is environmental carcinogenesis modulated by host polymorphism? *Mut. Res.* 247: 259-266.
70. INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde (2003). Falando sobre câncer do intestino. Secretaria de Assistência à Saúde. *Instituto Nacional de Câncer - INCA*. Rio de Janeiro.
71. INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde (2005). *Estimativas 2006: Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro.
72. INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde. Estimativas 2008: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2007.
73. INGELMAN-SUNDBERG M. Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *J Intern Med* 2001;250(3):186-200.
74. ITOH, S. et al., A novel form of mouse cytochrome P450 3A (Cyp3a- 16). Its cDNA cloning and expression in fetal liver. *European Journal Biochemistry*. v. 226, p. 877–882. 1994.
75. JIN, Z., & EL-DEIRY, W.S. The distinct roles of adaptors and caspases in death receptor-mediated apoptosis. *Molecular Cell*, in second revision, 2005.
76. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Biologia Celular e Molecular. In: *Biologia Celular e Molecular*. Cap. 16: A Célula Cancerosa. Editora Guanabara koogan S.A. p. 287:297. São Paulo, 2005.
77. JURBERG, C.; GOUVEIA, M.E.; BELISÁRIO, C. Na mira do câncer: o papel da mídia brasileira. *Revista Brasileira de Cancerologia*; v.52, n. 2, p. 139-146. 2006.
78. KALOW, W. 'Pharmacogenetics and personalised medicine', *Fundam Clin Pharmacol* 2002; 16: 337.
79. KAPITZA, S., PONGRATZ, M., JAKUPEC, M.A., BERGER, W., LACKINGER, L., KEPPLER, B.K., MARIAN, B. Heterocyclic Complexes of Ruthenium(III) Induce Apoptosis in Colorectal Carcinoma Cells by Oxygen Stress Induced Mechanisms. In: *Oral Presentations at the Symposium Novel Approaches for the Discovery of Anticancer Agents*. Freiburg, Alemanha, 18–21 Jun. 2003.
80. KARKI, S.S., THOTA, S., DARJ, S.Y., BALZARINI, J., CLERCQ. E., 2007. Synthesis, anticancer, and cytotoxic activities of some mononuclear Ru(II) compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15, 6632–6641.

81. KELLAND L (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews*.7: 573-584.
82. KEPPLER, B.K.; JAKUPEC, M. Indazolium Trans-[Tetrachlorobisindazolruthenat(III)] and Tris(8-quinolinolato)Gallium(III): Two New Metal Complexes Exhibiting Promising Antitumor Activity. In: Oral Presentations at the Symposium Novel Approaches for the Discovery of Anticancer Agents. Freiburg, Alemanha, 18–21 Jun. 2003.
83. KERB R. Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Letters* 2006, 234: 4–33.
84. KIM, R., TANABE, K., UCHIDA, Y., EMI, M., INOUE, H., TOGE, T. 2002. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis e the contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 50, 343-52.
85. KIRCHHEINER J, HEESCH C, BAUER S, MEISEL C, SERINGER A, GOLDAMMER M, et al. Impact of the ultrarapid metabolizer genotype of cytochrome P450 2D6 on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 2004;76(4):302-12.
86. KOLENKO, V.M., UZZO, R.G., BUKOWSKI, R. AND FINKE, J.H., 2000. Caspase-dependent and -independent death pathways in cancer therapy. *Apoptosis* 5, pp. 17–20.
87. KRAAG TM, MIKAMI LR, CHRISTOFF AO (2012). Farmacogenética – Uma revisão . *Cadernos da Escola de Saúde*, Curitiba, 6:18-29
88. KRAJEWSKA M, KIM H, SHIN E, ET AL (2005) Tumor-associated alterations in caspase-14 expression in epithelial malignancies. *Clin Cancer Res* 11:5462-5471. Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326:1-16.
89. LAM, LKT; SPARNINS, VL; WATTENBERG, LW (1982). Isolation and identification of kahweol palmitate and cafestol palmitate as active constituents of green coffee beans that enhance glutathione s-transferase activity in the mouse. *Cancer Res.*, 42: 1193-1198.
90. LAM, LKT; ZHANG, J; ZHANG, F; ZHANG, B (1994). Inhibition of chemically induced carcinogenesis by 2- n-heptylfuran and 2-n-butylthiophene from roast beef aroma In: Mussinan, C. J.; KEELAN, M. E, (Eds). *Sulfur Compounds in Food*. Washington, DC: *ACS Symposium Series*, 278-291.
91. LAZAROU J, POMERANZ BH, COREY PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998; 279: 1200–05.
92. LEWIN, B. Genes VII. In: Genes VII. Parte I: Genes. Cap. 2: De Genes à Genomas. Artmed Editora. p. 39-41. São Paulo, 2001.^a
93. LEWIN, B. Genes VII. In: Genes VII. Parte VI: Células. Cap. 28: Oncogenes e Câncer. Artmed Editora. p. 837-873. São Paulo, 2001.^b

94. LEWIS, DFV (1996). Cytochromes P450: Structures, function and mechanism. 1th Edition. Taylor & Francis Ltd. *T.J. Press*. London, Bristol.
95. LIMA AP, PEREIRA FC, VILANOVA-COSTA CAST, MELLO FMS, RIBEIRO ASBB, BENFICA PL, VALADARES MC, PAVANIN LA, SANTOS WB, SILVEIRA-LACERDA EP (2010B). The compound cis-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride induces caspase-mediated apoptosis in K562 cells. *Toxicology in Vitro* 24:1562-1568.
96. LIMA AP, PEREIRA FC, VILANOVA-COSTA CAST, RIBEIRO ASBB, PAVANIN LA, SANTOS WB, SILVEIRA-LACERDA EP (2010). The ruthenium complex cis-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride induces apoptosis and damages DNA in murine sarcoma 180 (S-180) cells. *Journal of Biosciences* 35:371-378.
97. LIMA AP, PEREIRA FC, VILANOVA-COSTA CAST, SOARES JR, PEREIRA LCG, PORTO HKP, PAVANIN LA, SANTOS WB, SILVEIRA-LACERDA, EP (2012). Induction of cell cycle arrest and apoptosis by ruthenium complex cis-(Dichloro)tetrammineruthenium(III) Chloride in human lung carcinoma cells A549. *Biological Trace Element Research* 147:8-15.
98. LIU, H.-K.; WANG, F.; PARKINSON, J. A.; BELLA, J.; SADLER, P. J. Ruthenation of duplex and single-stranded d(CGGCCG) by organometallic anticancer complexes. *Chem.;Eur. J.* 2006, 12, 6151–6165.
99. LOVLY CM, CARBONE DP. Lung cancer in 2010: One size does not fit all. *Nature reviews/ Clinical oncology* 2011; 8(1): 68-70.
100. LUGTHART, S. et al. Identification of genes associated with chemotherapy crossresistance and treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*
101. MALINA J, NOVAKOVA O, KEPPLER BK, ALESSIO E, BRABEC V (2001). Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by anticancer heterocyclic complexes of ruthenium(III) in cell-free media. *J. Biol. Inorg. Chem.* 6:435-445.
102. MALMEZAT, D; BREUILLE, P; CAPITAN, P; MIRANDA, P; OBLED, C (2000). Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, 130: 1239-1246.
103. MARCHÉ-COVA A. et al. GST-pi expression in BCR-ABL+ and BCR-ABL- cells from CML patients. *Rev Invest Clin.* v. 52, n. 3, p. 266-74. 2000.
104. MASSON, LF; SHARP, L; COTTON, SC & LITTLE, J (2005). Cytochrome P-450 1A1 Gene Polymorphisms and Risk of Breast Cancer: A HuGE Review. *Am. J. Epidemiol*, 161: 901-915.
105. Masubuchi Y and Horie T (2007) Toxicological significance of mechanism-based inactivation of cytochrome p450 enzymes by drugs. *Crit Rev Toxicol* 37:389–412.

- 106.MATIOLI, S.R. & PASSOS-BUENO, M.R.S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucleicos. In: *Biologia Molecular e Evolução*. São Paulo: Ed. Oholos, 2004. cap. 15.
- 107.MATSUBUCHI Y AND HORIE T (2007) Toxicological significance of mechanism-based inactivation of cytochrome p450 enzymes by drugs. *Crit Rev Toxicol* **37**:389–412.
- 108.MAURILLO L, POETA GD, VENDITTI A, et al. Quantitative analysis of Fas and bcl-2 expression in hematopoietic precursors. *Haematologica* 2001;86:237-43.
- 109.MEALEY, BL *et al.*, (1994). Dentistry and the cancer patient: part 1- oral manifestantions and complications of chemotherapy. *Compendium*, Janesburg, 15(10): 1252.
- 110.MELCHART, M.; SADLER, P. J. Ruthenium Arene Anticancer Complexes. In *Bioorganometallics*; Jaouen,G., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2006; pp 39-64.
- 111.MENEZES C, DEPAULACOSTA L, ÁVILA VMR, FERREIRA MVC, PAVANIN L, HOMSI-BRANDEBURGO MI, HAMAGUCHI A, SILVEIRA-LACERDA EP (2007). Analysis in vivo of antitumor activity, Cytotoxicity and Interaction between plasmid DNA and the cis-dichlorotetraammineruthenium(III) chloride. *Chemico-Biological Interactions* 167: 116-124.
- 112.MERRITT, WD; WEISSLER, MC; TURK, BF & GILMER, TM (1990): Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 116(12):1394-8.
- 113.METZGER IF, SOUZA-COSTA DC, TANUS-SANTOS JE. (2006) Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. *Medicina (Ribeirão Preto)* 39 (4): 515-21.
- 114.MURATA, M; TAGAWA, M; KIMURA, K; KAKISAWA, K; SHIRASAWA, H & FUJISAWA, T (1998). Correlation of the mutation of p53 gene and the polymorphism at codon 72 in smoking-related non small cell lung cancer patients. *Int. J. Cancer*, 12: 577-581.
- 115.MURRAY, M & REIDY, GF (1990). Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P-450 by chemical agents. *Pharmacological Reviews*, 42(2): 85-101.
- 116.MUTHIAH YD, et al. A simple multiplex PCR method for the concurrent detection of three CYP2C8 variants *Clinica Chimica Acta* 349 (2004) 191–198.
- 117.NAGAI, MA (1999). Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Brazilian Journal of Medical na Biological Research*; 32(7): 897-904.
- 118.NELSO, DR; KAMATAKI, T; WAXMAN, DJ; GUENGERICH, FP; ESTABROOK, RW; FEYEREISEN, R; GONZALEZ, FJ; COON, MJ; GUNSALUS, IC; GOTOH, O; OKUDA, K & NEBERT, DW (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomeclature. *DNA and Cell Biology*, 12: 1-51.

119. NOVÁKOVÁ O, VRANA O, KISELEVA VI, BRABEC V (1995) DNA interactions of antitumor platinum(IV) complexes. *Eur J Biochem* 228:616-624.
120. NOVÁKOVÁ, O.; CHEN, H.; VRANA, O.; RODGER, A.; SADLER, P. J.; BRABEC, V. DNA interactions of monofunctional organometallic ruthenium(II) antitumor complexes in cell-free media. *Biochemistry* 2003, 42, 11544–11554.
121. OJOPI, EPB & DIAS NETO, E (2002). Genes e Câncer – alguns eventos moleculares envolvidos na formação de um tumor. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*; 27:28-38.
122. OLIVEIRA, RB & ALVES, RJ (2002). Agentes Antineoplásicos Biorredutíveis: Uma nova Alternativa Para o Tratamento de Tumores Sólidos. *Quim. Nova.* 25(6): 976-984.
123. ORTIZ DE MONTELLANO, PR (1995). *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Plenum Press, 2nd, New York.
124. PARKINSON, A (2001). Biotransformation of Xenobiotics. In: Casarett and Doull's *Toxicology – The Basic Science of Poisons*, International Edition, McGraw-Hill, 6: 133-224.
125. PEREIRA, F. C. ; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T. ; LIMA, A. P. ; RIBEIRO, A. S. B. B. ; SILVA, H. D. ; PAVANIN, L. A. ; SILVEIRA-LACERDA, E. P. . 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, p. 258-268, 2009.
126. QUATTROCHI, L. C., GUZELIAN, P. S. Cyp3A regulation: from pharmacology to nuclear receptors. *Drug Metabolism and Disposition*. v. 29, n. 5, p. 615–622. 2001.
127. R. KRISHNA, AND L. D. MAYER. Multidrug resistance (MDR) in cancer mechanisms, reversal using modulators and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11:265–283 (2000) doi:10.1016/S0928-0987(00)00114-7.
128. RADEMAKER-LAKHAI JM, VAN DEN BONGARD D, PLUIM D, BEIJNEN JH, SCHELLENS JH (2004) A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. *Clin. Cancer Res.* 10:3717-3727.
129. RANNUG, H.; ALEXANDRIE, A-K.; PERSSON, I.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic polymorphism of cytochromes p450 1A1, 2D6 and 2E1: Regulation and toxicological significance. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, v. 37, p. 25-36, 1995.
130. REIS M. Farmacogenética aplicada ao câncer. *Quimioterapia individualizada e especificidade molecular. Medicina (Ribeirão Preto)* 2006; 39(4): 577-586.

- 131.RIOS, D. P., BASTOS, F. M., CUNHA, L. C., VALADARES, M. C. Tentativa de suicídio com o uso de medicamentos registrados pelo CIT-GO nos anos de 2003 e 2004. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 2 (1), p. 6-14, 2005.
- 132.ROGERS, A.S. The role of cytochrome P450 in developmental pharmacology. *Journal of Adolescent Health*, v. 15 p. 635-640, 1994.
- 133.ROSELL R, REGINALD VNL, TARON M , REGUART N (2002). DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 38: 217-/227
- 134.ROSES AD. Pharmacogenetics and future drug development and delivery. *Lancet* 2000; 355: 1358–61.
- 135.ROSES, A.D. Pharmacogenetics place in modern medical science and practice. *Life Sciences*. n. 70, p. 1471-1480. 2002.
- 136.SAKUMA, T. et al., A novel female-specific member of the CYP3A gene subfamily in the mouse liver. *Arch Biochemistry Biophys* 377:153–162 (2000).
- 137.SANTIAGO, C; Bandrés, F & Gómez-Gallego, F (2002). Polimorfismos de citocromo P450: papel como marcador biológico. *Medicina del Trabajo*. 11(3): 130-140.
- 138.SCHLUGA, P.; HARTINGER, C. G.; EGGER, A.; REISNER, E.; GALANSKI, M.; JAKUPEC, M. A.; KEPPLER, B. K. (2006) Redox behavior of tumorinhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP. *Dalton Trans*. 1796-1802.
- 139.SCOLARO C, BERGAMO A, BRESCACIN L, DELFINO R, COCCHIETTO M, LAURENCZY G, GELDBACH TJ, SAVA G, DYSON PJ (2005). In vitro e In vivo Evaluation of Ruthenium (II)- Arene PTA Complexes. *Journal Med. Chem*. 48: 4161-4171
- 140.SHI, Y., 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell* 9, pp. 459–470
- 141.SIGAL, A & ROTTER, V (2000). Oncogenic mutations of the p53 tumor supressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Research*; 60: 6788-6793.
- 142.SILVEIRA-LACERDA EP, VILANOVA-COSTA CAST, PEREIRA FC, HAMAGUCHI A, PAVANIN LA, GOULART LR, HOMSI-BRANDEBURGO MI, SOARES AM, SANTOS WB, NOMIZO A (2010a). The Ruthenium Complex cis-(Dichloro)Tetraammineruthenium(III) Chloride Presents Immune Stimulatory Activity on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Biological Trace Element Research* 133:270-283.
- 143.SILVEIRA-LACERDA EP, VILANOVA-COSTA CAST, PEREIRA FC, HAMAGUCHI A, PAVANIN LA, GOULART LR, HOMSI-BRANDEBURGO MI, SOARES AM, SANTOS WB, NOMIZO A (2010B). 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* 135:98-111.

- 144.SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. < www.fiocruz.br/sinitox_novo/> Acessado em 05 de fevereiro de 2013.
- 145.SOCINSKI MA (2004). Cytotoxic Chemotherapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Review of Standard Treatment Paradigms. *Clinical Cancer Research* 10:4210-4214
- 146.SONIS, ST (1998). Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol.*, Kidlington, 34: 39-43.
- 147.STRANGE, R. C.; JONES, P. W.; FTYER, A. A. Glutathione S-transferase: genetics and a role in toxicology. *Toxicology Letters*, p. 357-363. 2000.
- 148.SUAREZ-KURTZ G. Farmacogenômica: A genética dos medicamentos. *Ciência Hoje* 2004; 34(208):20-27.
- 149.TANG J, WANG Y, WANG D, WANG Y, XU Z, RACETTE K, LIU F(2012). Key Structure of Brij for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer. *Biomacromolecules*, [dx.doi.org/10.1021/bm301661w](https://doi.org/10.1021/bm301661w)
- 150.TANNOCK, I.F., HILL, R.P. Eds. *The Basic Science of Oncology*. 3rd Edition. McGraw-Hill, 1998.
- 151.THOMPSON, TC; TIMME, TL; KADMON, D; PARK, SH; EGAWA, S & YOSHIDA, K (1993): Genetic predisposition and mesenchymal-epithelial interactions in ras+myc-induced carcinogenesis in reconstituted mouse prostate. *Mol. Carcinog.*, 7(3):165-79.
- 152.THORISSON GA, STEIN LD. The SNP Consortium website: past, present and future. *Nucleic Acids Res* 2003;31(1):124-7.
- 153.TORRES, M.C.L.; SOARES, N.F.F.; PEREIRA, J.A.M. Extração, purificação e avaliação da glutathione s-transferase de fígado de bovino. *Ciências agrotécnicas*, Lavras. v. 30, n. 2, p. 302-307. 2006.
- 154.ÜNAL, M. et al. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 gene polymorphism in laryngeal squamous cell carcinoma. *American Journal of Otolaryngology*. v. 25, n. 5, p. 318-322. 2004.
- 155.VAN DER AAR, EM; BOUWMAN, T; COMMANDEUR, NM; VERMEULEN, NPE (1996). Structure-activity relationships for chemical and glutathione stransferase-catalysed glutathione conjugation reactions of a series of 2-substitued 1-chloro-4-nitrobenzenes. *Biochem. J.*, 320: 531-540.
- 156.VENTER JC, ADAMS MD, MYERS EW, LI PW, MURAL RJ, SUTTON GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291(5507):1304-51.

- 157.VIANNA-JORGE, R.; PERINI, J. A.; RONDINELLI, E. & SUAREZ-KURTZ, G. 'CYP2C9 genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians'. *Clin Pharmacol Ther*, v. 76, p. 18, 2004.
- 158.VOCK, C. A.; ANG, W. H.; SCOLARO, C.; PHILLIPS, A. D.; LAGOPOULOS, L.; JUILLERAT-JEANNERET, L.; SAVA, G.; SCOPELLITI, R.; DYSON, P. J. Development of ruthenium antitumor drugs that overcome multidrug resistance mechanisms. *J. Med. Chem.* 2007, 50, 2166–2175.
- 159.WAETZIG, V.; HERDEGEN, T.; Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Br. J. Pharmacol.* v. 26, n. 9, p. 455-461. 2005.
- 160.WAGNER JM, KARNITZ LM (2009) Cisplatin-Induced DNA Damage Activates Replication Checkpoint Signaling Components that Differentially Affect Tumor Cell Survival. *MOLECULAR PHARMACOLOGY* 76:208-214.
- 161.WAL, R; SATO, D; OLIVEIRA, CC; LOPES, L; OLIVEIRA, SM; DIBERNARDI, RP; GEHRKE, S; PALAURO, FR; BUCHI, DF (2003). Immunomodulation in Sarcoma-180 Bearing Mice. *Cell and Molecular Biology of Cancer*. p34.
- 162.WANG, F.; CHEN, H.; PARSONS, S.; OSWALD, I. D. H.; DAVIDSON, J. E.; SADLER, P. J. Kinetics of aquation and anation of ruthenium- (II) arene anticancer complexes, acidity and X-ray structures of aqua adducts. *Chem.;Eur. J.* 2003, 9, 5810–5820.
- 163.WANG, F.; XU, J.; HABTEMARIAM, A.; BELLA, J.; SADLER, P. J. Competition between glutathione and guanine for a ruthenium-(II) arene anticancer complex: detection of a sulfenato intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 17734–17743.
- 164.WATTENBERG, LM (1983). Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res.*, 43(5): 2448s-2453s (Suppl.).
- 165.WATTERS, JW; KLOSS, EF; LINK, DC; GRAUBERT, TA & McLEOD, HL (2003). A mouse-based strategy for cyclophosphamide pharmacogenomic discovery. *J. Appl. Physiol.*, 95: 1352-1360.
- 166.WAXMAN, D.J. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 369, p. 11-23, 1999.
- 167.WHEATLEY, JB; KELLEY, MK; MONTALI, JA; BERRY, COA; SCHMIDT Jr., DE (1994). Examination of glutathione S transferase isoenzyme profiles in human liver using high-performance affinity chromatography. *J. Chromat. A.*, 663: 53-63.
- 168.WIDERSTEN, M; MANNERVIK, B (1995). Glutathione transferase with novel active sites isolated by phase display from a library of random mutants. *Journal Molecular Biological*, 250: 115-122.

169. WILKINSON GR. Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution, and elimination. In: Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10^o ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3-29.
170. WISLOCKI, PG; MIWA, GT; LU, AYH (1980): Enzymatic Basis of Detoxication. Academic Press, New York, 1: 135-182.
171. WU J, HU C, GU Q, LI Y, SONG M (2010). Trichostatin A sensitizes cisplatin-resistant A549 cells to apoptosis by up-regulating death-associated protein kinase. *Acta Pharmacologica Sinica* 31:93-101.
172. WYLLIE AH, KERR JFR, CURRIE AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.
173. YAN, Y. K.; MELCHART, M.; HABTEMARIAM, A.; SADLER, P. J. (2005) Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. *Chem. Commun.* 38:4764-4776.
174. YUSPA, SH (2000). Overview of carcinogenesis: past, present and future. *Carcinogenesis*; 21: 341-344.
175. ZAINUDDIN, Z. et al. (2003) A simple method for the detection of CYP2C9 polymorphisms: nested allele-specific multiplex polymerase chain reaction. *Clinica Chimica Acta*, 336:97-102.

9.0 ANEXOS

Publicações no Período decorrido do Doutorado

Cytotoxic and Genotoxic Effects of *cis*-Tetraammine (oxalato)Ruthenium(III) Dithionate on the Root Meristem Cells of *Allium cepa*

Flávia de Castro Pereira •
Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa •
Aliny Pereira de Lima •
Alessandra de Santana Braga Barbosa Ribeiro •
Hugo Delleon da Silva • Luiz Alfredo Pavanin •
Elisângela de Paula Silveira-Lacerda

Received: 28 August 2008 / Accepted: 29 October 2008 /
Published online: 20 November 2008
© Humana Press Inc. 2008

Abstract Ruthenium complexes have attracted much attention as possible building blocks for new transition-metal-based antitumor agents. The present study examines the mitotoxic and clastogenic effects induced in the root tips of *Allium cepa* by *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate $\{cis-[Ru(C_2O_2)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)\}$ at different exposure durations and concentrations. Correlation tests were performed to determine the effects of the time of exposure and concentration of ruthenium complex on mitotic index (MI) and mitotic aberration index. A comparison of MI results of *cis*- $[Ru(C_2O_2)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ to those of lead nitrate reveals that the ruthenium complex demonstrates an average mitotic inhibition

F. C. Pereira • C. A. S. T. Vilanova-Costa (✉) • A. P. Lima • A. S. B. B. Ribeiro • H. D. Silva •
E. P. Silveira-Lacerda
Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas–ICB I–Sala 200,
Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia (Campus II), Cx. Postal: 2425-0, Goiânia,
GO 74690-970, Brazil
e-mail: vilanovacosta@gmail.com

F. C. Pereira
e-mail: pereirafc@gmail.com

A. P. Lima
e-mail: alinypereiralima@gmail.com

A. S. B. B. Ribeiro
e-mail: agarbio@gmail.com

H. D. Silva
e-mail: hugo_bioufg@yahoo.com.br

E. P. Silveira-Lacerda
e-mail: elacerda@icb.ufg.br

L. A. Pavanin
Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia–UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil
e-mail: pavanin@gmail.com

Mutagenic and Genotoxic Effects of *cis*-(Dichloro)tetraammineruthenium(III) Chloride on Human Peripheral Blood Lymphocytes

Alessandra de Santana Braga Barbosa Ribeiro • Cláudio Carlos da Silva •
Flávia de Castro Pereira • Aliny Pereira de Lima •
Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa • Simone Santos Aguiar •
Luiz Alfredo Pavanin • Aparecido Divino da Cruz •
Elisângela de Paula Silveira-Lacerda

Received: 31 October 2008 / Accepted: 28 January 2009 /
Published online: 13 February 2009
© Humana Press Inc. 2009

Abstract Chemotherapeutic agents play an important role in cancer treatment mostly due their systemic action on human organism allowing access to liquid tumors and even metastases. Among these drugs, ruthenium compounds have been showing promising results to treat tumors and represent an important development of new antitumor therapy. This study presents the evaluation of *cis*-(dichloro)tetraammineruthenium(III) chloride, *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl, genotoxic effects using human peripheral blood lymphocytes cultured in vitro. Mitotic index (MI), chromosome aberrations (CA), and DNA damage using the comet assay were analyzed. MI in human peripheral blood lymphocyte cultures treated with 1, 10, 100, and 1,000 µg mL⁻¹ *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl were 5.9%, 4.6%, 3.9%, and 0%, respectively. Doxorubicin chloridate was used as the positive control. CA derived from 1, 10, and 100 µg mL⁻¹ concentrations were defined as spontaneous when compared with the negative control, and at the concentration of 1,000 µg mL⁻¹, the cell cycle was inhibited

A. S. B. B. Ribeiro (✉) • F. C. Pereira • A. P. Lima • C. A. S. T. Vilanova-Costa • S. S. Aguiar •
E. P. Silveira-Lacerda

Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Goiás-UFG, ICB I-Sala 200, Campus Samambaia (Campus II), Cx. Postal: 131,
Goiânia, Goiás 74001-970, Brazil
e-mail: agarbio@gmail.com

F. C. Pereira
e-mail: pereirafc@gmail.com

A. P. Lima
e-mail: alinyperiralima@gmail.com

C. A. S. T. Vilanova-Costa
e-mail: vilanovacosta@gmail.com

S. S. Aguiar
e-mail: simonebioufg@yahoo.com.br

E. P. Silveira-Lacerda
e-mail: elacerda@icb.ufg.br



The compound *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride induces caspase-mediated apoptosis in K562 cells

Aliny Pereira de Lima^a, Flávia de Castro Pereira^a, Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa^a, Francylli Mariana dos Santos Mello^a, Alessandra de Santana Braga Barbosa Ribeiro^a, Polyana Lopes Benfica^d, Marize Campos Valadares^d, Luiz Alfredo Pavanin^b, Wagner Batista dos Santos^c, Elisângela de Paula Silveira Lacerda^{a,*}

^a Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás – UFG, Campus Samambaia (Campus II), Cx. Postal: 131, 74001-970 Goiânia, Goiás, Brazil

^b Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

^c Faculdade Patos de Minas – FPM, Patos de Minas, Minas Gerais, Brazil

^d Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, GO, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 January 2010

Accepted 24 June 2010

Available online 30 June 2010

Keywords:

Apoptosis

cis-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride

Cytotoxicity

K562

MRC-5

ABSTRACT

Ruthenium(III) complexes are increasingly attracting the interest of researchers due to their promising pharmacological properties. In the present study, we investigated the ability of *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride to produce lethal effects in human chronic myelogenous leukemia K562 cells. The MTT tetrazolium reduction test and the trypan blue exclusion assay revealed that the IC₅₀ for the compound after 48 h of incubation with K562 cells was approximately 10.74 and 73.45 μM, respectively. Interestingly, it was observed that this compound exhibits mild cytotoxicity towards MRC-5 human fibroblast cells (IC₅₀ > 383 μM). Flow cytometric analysis revealed that *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride was capable of change cell cycle distribution since the percentage of cells in the G1, S and G2 phases decreased. In addition, treatment with this compound induced apoptotic cell death in K562 cells, demonstrated by increased DNA content in the sub-G1-peak and a significant increase in caspase-3 activity. Assay using cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore (MPT) showed that the preincubation of K562 cells with this inhibitor had not effect on *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride induced caspase-3 activation. In summary, *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride displayed a significant cytotoxic effect through cell cycle arrest and apoptotic induction in K562 cells, which suggests that *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride might have therapeutic potential against leukemia.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a hematological disorder characterized by the Philadelphia chromosome, which is formed by the reciprocal translocation of chromosomes 9 and 22

Abbreviations: A-20, Murine B-cell lymphoma; *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl, *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride; IC₅₀, concentration that produces a 50% reduction in cellular viability; K562, chronic myelogenous leukemia cell line; MPT, mitochondrial permeability transition; MRC-5, human fibroblast cell line; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; PBMC, human peripheral blood mononuclear cells; PI, propidium iodide; SK-Br-3, human breast adenocarcinoma; S180, Murine sarcoma 180; TNF, tumor factor necrosis.

* Corresponding author. Tel.: +55 62 3521 1481, +55 62 9293 3121; fax: +55 62 3521 1481.

E-mail address: silveiralacerda@gmail.com (E. de Paula Silveira Lacerda).

and results in a constitutively activated fusion oncoprotein (Bcr-Abl) with unregulated tyrosine kinase activity (Deininger et al., 2000). The tyrosine kinase activity of Bcr-Abl, which is the principal driving force behind its oncogenic potential, is responsible for mediating tyrosine phosphorylation of specific cellular proteins and Bcr-Abl itself (Hantschel and Superti-Furga, 2004). The resulting Bcr-Abl protein product is an oncoprotein that confers resistance to apoptosis induced by many anticancer drugs (Fernandez-luna, 2000; le Coutre et al., 2000; Gorre et al., 2001).

Heavy metal coordination complexes such as platinum, gallium and ruthenium have been investigated for their possible antitumor activity (Jakupec et al., 2008; Alama et al., 2009). Among the most studied metal complexes, cisplatin and related platinum-based drugs have drawn much attention. However, the development of these metallo-drugs is hindered by some major problems such as

The Ruthenium Complex *cis*-(Dichloro) Tetraammineruthenium(III) Chloride Presents Immune Stimulatory Activity on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells

Elisângela de Paula Silveira-Lacerda · Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa · Flávia de Castro Pereira · Amélia Hamaguchi · Luiz Alfredo Pavanin · Luiz Ricardo Goulart · Maria Inês Homs-Brandenburg · Andreimar Martins Soares · Wagner Batista dos Santos · Auro Nomizo

Received: 18 May 2009 / Accepted: 22 June 2009 /
Published online: 10 July 2009
© Humana Press Inc. 2009

Abstract Ruthenium compounds in general are well suited for medicinal applications. They have been investigated as immunosuppressants, nitric oxide scavengers, antimicrobial agents, and antimalarials. The aim of this study is to evaluate the immunomodulatory activity of *cis*-(dichloro)tetraammineruthenium(III) chloride (*cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The cytotoxic studies performed here revealed that the ruthenium(III) complex presents a cytotoxic activity towards normal human PBMC, only at very high concentration. Results also showed that *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl presents

E. P. Silveira-Lacerda (✉) · C. A. S. T. Vilanova-Costa · F. C. Pereira
Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas (ICB I),
Universidade Federal de Goiás (UFG), Sala 200, Campus Samambaia (Campus II), Cx. Postal: 131
Goiânia, Goiás, Brazil
e-mail: silveiralacerda@gmail.com

C. A. S. T. Vilanova-Costa
e-mail: vilanovacosta@gmail.com

F. C. Pereira
e-mail: pereirafo@gmail.com

A. Hamaguchi · L. R. Goulart · M. I. Homs-Brandenburg
Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas
Gerais, Brazil

A. Hamaguchi
e-mail: hamaguchi@ufu.br

L. R. Goulart
e-mail: lrgoulart@ufu.br

M. I. Homs-Brandenburg
e-mail: homsibrandenburg@yahoo.com.br

L. A. Pavanin
Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brazil
e-mail: pavanin@gmail.com

The ruthenium complex *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride induces apoptosis and damages DNA in murine sarcoma 180 cells

ALINY PEREIRA DE LIMA¹, FLÁVIA DE CASTRO PEREIRA¹, CESAR AUGUSTO SAM TIAGO VILANOVA-COSTA¹,
ALESSANDRA DE SANTANA BRAGA BARBOSA RIBEIRO¹, LUIZ ALFREDO PAVANIN²,
WAGNER BATISTA DOS SANTOS³ and ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA-LACERDA^{1,*}

¹Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia, Goiás, Brazil

²Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

³Faculdade Patos de Minas - FPM, Patos de Minas, Minas Gerais, Brazil

*Corresponding author (Fax, +55-62-3521-1481; Email, silveiralacerda@gmail.com)

Ruthenium(III) complexes are increasingly attracting the interest of researchers due to their promising pharmacological properties. Recently, we reported that the *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride compound has cytotoxic effects on murine sarcoma 180 (S-180) cells. In an effort to understand the mechanism responsible for their cytotoxicity, study we investigated the genotoxicity, cell cycle distribution and induction of apoptosis caused by *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride in S-180 tumour cells. *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride treatment induced significant DNA damage in S-180 cells, as detected by the alkaline comet assay. In the cell cycle analysis, *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride caused an increase in the number of cells in G1 phase, accompanied by a decrease in the S and G2 phases after 24 h of treatment. In contrast, the cell cycle distribution of S-180 cells treated with *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride for 48 h showed a concentration-dependent increase in the sub-G1 phase (indicating apoptosis), with a corresponding decrease in cells in the G1, S and G2 phases. In addition, *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride treatment induced apoptosis in a time-dependent manner, as observed by the increased numbers of annexin V-positive cells. Taken together, these findings strongly demonstrate that DNA damage, cell cycle changes and apoptosis may correlate with the cytotoxic effects of *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride on S-180 cells.

[Lima A P, Pereira F C, Vilanova-Costa C A S T, Ribeiro A S B B, Pavanin L A, Santos W B S and Silveira-Lacerda E P 2010 The ruthenium complex *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride induces apoptosis and damages DNA in murine sarcoma 180 cells; *J. Biosci.* **35** 371–378]
DOI 10.1007/s12038-010-0042-2

1. Introduction

Apoptosis is an active physiological process that results in cellular self-destruction involving specific morphological and biochemical changes in the nucleus and cytoplasm (Kerr *et al.* 1994; Kaufmann and Hengartner 2001). Agents that suppress the proliferation of malignant cells by inducing

apoptosis may represent a useful mechanistic approach to both cancer chemoprevention and chemotherapy. While many anticancer agents have been developed, unfavourable side-effects and resistance to apoptosis are serious problems (Lowe and Lin 2000; Fesik 2005). Thus, there is growing interest in the design, synthesis and pharmacological evaluation of metal-based antitumour agents for the

Keywords. Apoptosis; *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride; cell cycle; DNA damage; S-180

Abbreviations used: A-20, murine B-cell lymphoma; *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄] Cl, *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride; DI, damage index; FITC, fluorescein isothiocyanate; Jurkat, human T-cell leukaemia; KP1019, indazolium *trans*-[tetrachlorobis (1*H*-indazole) ruthenate(III)]; NAMI-A, ImH[*trans*-RuCl₄(DMSO)Im]; PBL, peripheral blood lymphocytes; RDC, ruthenium-derived compound; PI, propidium iodide; SCGE, single-cell gel electrophoresis; S-180, murine sarcoma 180 cells



Siolmatra brasiliensis (Cogn.) Baill., Cucurbitaceae, acute toxicity in mice

Aliny P. Lima,¹ Carlos E. S. Barbosa,¹ Flávia C. Pereira,¹ Cesar A. S. T. Vilanova-Costa,¹
Alessandra S. B. B. Ribeiro,¹ Hugo D. Silva,¹ Neucirio R. Azevedo,² Vera L. Gomes-Klein,³
Elisângela P. Silveira-Lacerda^{*,1}

¹Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Rua Estrada do Campus s/n Campus Samambaia (Campus II) 74001-970 Goiânia-GO, Brazil,

²Laboratório de Produtos Naturais, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Rua Estrada do Campus s/n Campus Samambaia (Campus II) 74001-970 Goiânia-GO, Brazil,

³Laboratório de Morfologia e Taxonomia Vegetal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Rua Estrada do Campus s/n Campus Samambaia (Campus II) 74001-970 Goiânia-GO, Brazil.

RESUMO: “Toxicidade aguda de *Siolmatra brasiliensis* (Cogn.) Baill., Cucurbitaceae, em camundongos”. *Siolmatra brasiliensis* (Cogn.) Baill., Cucurbitaceae, popularmente conhecida como “pluméria” ou “taiuiá” é utilizada na medicina popular brasileira para diversos fins terapêuticos. O estudo de toxicidade aguda do extrato bruto etanólico (EBE) de *Siolmatra brasiliensis* foi investigado em camundongos. Nenhuma mortalidade ou sinais de toxicidade foram observados nas doses de 10 e 100 mg/kg, entretanto em doses administradas de 1000 e 2000 mg/kg levou as diversas alterações comportamentais e mortalidade. A DL50 para o EBE foi de 1000 mg/kg. Análise macroscópica dos órgãos demonstrou alterações morfológicas no coração dos animais tratados com 1000 e 2000 mg/kg. Por meios destes resultados conclui-se que o EBE de *Siolmatra brasiliensis* é seguro em doses de 10 and 100 mg/kg e apresentou toxicidade nas doses de 1000 e 2000 mg/kg.

Unitermos: *Siolmatra brasiliensis*, toxicidade, camundongo, Cucurbitaceae.

ABSTRACT: *Siolmatra brasiliensis* (Cogn.) Baill., Cucurbitaceae, commonly known as “pluméria” or “taiuiá”, is widely used in different ways in Brazilian popular medicine to treat several diseases. Acute toxicity of *Siolmatra brasiliensis* crude ethanolic extract (CEE) was investigated in mice. No mortality or signs of CEE toxicity were observed at the doses of 10 and 100 mg/kg bw, but the administration of 1000 and 2000 mg/kg bw caused several adverse behavioral effects and mortality. Macroscopic inspection of the organs showed morphologic alterations in the heart of animals treated with doses of 1000 and 2000 mg/kg bw. According to our results, *S. brasiliensis* CEE has an LD50 of 1000 mg/kg bw. We conclude that *S. brasiliensis* CEE was safe at the doses of 10 and 100 mg/kg bw and presented toxicity at the doses of 1000 and 2000 mg/kg bw.

Keywords: *Siolmatra brasiliensis*, toxicity, mice, Cucurbitaceae.

INTRODUCTION

A World Health Organization survey indicated that about 65-80% of the world's population relies on non-conventional medicine, mainly of herbal source, in their primary healthcare (Calixto, 2000). Nevertheless, various plants used in folk medicine still need better quality control since scientific reports indicate they can present bioactive principles that may cause adverse effects (Calixto, 2000; Capasso et al., 2000). Consequently, in

order to certify their safety and efficacy, all the products employed in alternative medicine should be evaluated using the same methods applied to test new synthetic drugs (Talalay & Talalay, 2001).

Many species of the Cucurbitaceae family are edible (fruit) or used for medicinal purposes (roots, leaves, and fruits), whereas others are highly toxic (Gomes-Klein, 1996). The frequent occurrence of core substances, named cucurbitacins, in members of the family Cucurbitaceae has been reported (Cronquist,

*E-mail: elacerda@icb.ufg.br, Tel. +55 62 3521 1481, Fax: +55 62 3521 1078.

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

Elisângela de Paula Silveira-Lacerda • Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa •
Amélia Hamaguchi • Luiz Alfredo Pavanin • Luiz Ricardo Goulart •
Maria Inês Homs-Brandenburg • Wagner Batista dos Santos •
Andreimar Martins Soares • Auro Nomizo

Received: 11 May 2009 / Accepted: 6 August 2009 /
Published online: 2 September 2009
© Humana Press Inc. 2009

Abstract The aim of present study was to verify the in vitro antitumor activity of a ruthenium complex, *cis*-(dichloro)tetraammineruthenium(III) chloride (*cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl) toward different tumor cell lines. The antitumor studies showed that ruthenium(III) complex presents a relevant cytotoxic activity 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) cell lines and a very low cytotoxicity toward human peripheral blood mononuclear cells. The ruthenium(III) complex decreased the fraction of tumor cells in G0/G1 and/or G2-M phases, indicating that this compound may act on resting/early entering G0/G1 cells and/or precycling G2-M cells. The cytotoxic activity of a high

E. de P. Silveira-Lacerda (✉) • C. A. S. T. Vilanova-Costa
Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas—ICB I—Sala 200,
Universidade Federal de Goiás—UFG, Campus Samambaia (Campus II), Goiânia, Goiás, Brazil
e-mail: elacerda@icb.ufg.br
e-mail: silveiralacerda@gmail.com

C. A. S. T. Vilanova-Costa
e-mail: vilanovacosta@gmail.com

A. Hamaguchi • L. R. Goulart • M. I. Homs-Brandenburg
Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia—UFU, Uberlândia,
Minas Gerais, Brazil

A. Hamaguchi
e-mail: hamaguchi@ufu.br

L. R. Goulart
e-mail: lrgoulart@ufu.br

M. I. Homs-Brandenburg
e-mail: homsibrandenburg@yahoo.com.br

Molecular Detection of Adenoviruses in Lakes and Rivers of Goiânia, Goiás, Brazil

Hugo D. Silva · Ludimila A. C. Wosnjuk · Sônia F. O. Santos · Cesar A. S. T. Vilanova-Costa · Flávia C. Pereira · Elisângela P. Silveira-Lacerda · Marco T. A. Garcíazapata · Carlos E. Anunciação

Received: 10 June 2009 / Accepted: 20 November 2009 / Published online: 11 December 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract Adenoviruses are a highly important public health issue, since they are among the most persistent and ubiquitous viruses present in water and associated with a variety of clinical manifestations. The aim of this study was to use molecular techniques for the detection of adenovirus in public and recreational water supplies in Goiânia, Brazil. From December 2007 to November 2008, 54 water samples were collected in 5 different sites in 2 lakes and 2 rivers of the city. The samples were filtered in a positively charged nylon membrane, and the DNA was extracted using the phenol–chloroform–isoamyl alcohol method. Semi-nested PCR was used to detect adenovirus DNA, and sequence analysis of the semi-nested PCR products was performed to identify the recovered viruses. Adenovirus DNA was detected in 43% (24 of 54) of samples collected. Considering all examined sites, MP1 presented the highest occurrence of adenovirus (6 positive from 10 collected samples), followed by MP2 (3 positive from 6 collected samples), JL (10 positive from 21

collected samples), VB (3 positive from 9 collected samples), and BB (2 positive from 8 collected samples), respectively. The methodology employed proved to be feasible, fast, low-cost, and suitable to be used as screening approach on adenovirus detection in water for public sanitation companies.

Keywords Adenoviruses · Untreated water · Nested-PCR · Public health

Introduction

Goiânia, the capital of the state of Goiás, located in the Midwestern Region of Brazil, has ca. 1,221,654 inhabitants and is considered a regional metropolis, among the major Brazilian cities that receive a large number of migrants (Alves and Chaveiro 2007). As a result, the city faces problems of disorderly and unsustainable urban growth with a consequent increase in superficial waste, which is a continuous source of contamination of water courses.

The current sources of public water supply for the city of Goiânia, the Meia Ponte river basin and its tributary river João Leite, are constantly submitted to degradation processes due to anthropic action, such as agriculture, intensive livestock production, and urbanization. And although all the water supplies of Goiânia come from this basin (52% from the João Leite River and 48% from the Meia Ponte River), this municipality is its largest polluter.

Among the microorganisms that contaminate the aquatic environment, special attention should be given to enteric viruses. More than 140 different viruses are shed in the gastro-intestinal tract of infected humans (Hurst 1991) and can be found in surface waters (Cho et al. 2000; Hot et al. 2003). Their presence in water courses is considered a

H. D. Silva · L. A. C. Wosnjuk · C. E. Anunciação (✉)
Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular, Instituto de Ciências Biológicas II, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Caixa Postal 131, Goiânia, GO 74001-970, Brazil
e-mail: carlose@icb.ufg.br

S. F. O. Santos · M. T. A. Garcíazapata
Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Caixa Postal 12911, Setor Leste Vila Nova, Goiânia, GO 74643-970, Brazil

C. A. S. T. Vilanova-Costa · F. C. Pereira · E. P. Silveira-Lacerda
Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas I, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Caixa Postal 131, Goiânia, GO 74001-970, Brazil

Environmental Monitoring of Opportunistic Protozoa in Rivers and Lakes in the Neotropics Based on Yearly Monitoring

Sônia F.O. Santos · Hugo D. Silva · Edson S. Souza Júnior · Carlos E. Anunciação ·
Elisângela P. Silveira-Lacerda · Cesar A.S.T. Vilanova-Costa ·
Marco T.A. Garcíazapata

Received: 2 January 2010 / Revised: 27 May 2010 / Accepted: 30 May 2010 / Published online: 18 June 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract The goal of this study was to standardise and use parasitological and molecular techniques in the analysis and seasonal monitoring of opportunistic protozoa in water from fluvial systems for human usage in the municipality of Goiânia, the capital of the state of Goiás, in the mid-western region of Brazil. We focused on *Cryptosporidium* sp. *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli*, *Microsporidia* and *Giardia lamblia*. Water samples were collected monthly from February 2006 to January 2007 and concentrated using vacuum filtration and a positively charged membrane. Several methods were used to identify the different protozoa of interest. To detect coccidia (*Cryptosporidium* sp., *Isospora belli*, and *Cyclospora cayetanensis*), we used a Kinyoun hot-staining method and a modified Ziehl–Neelsen technique. Enteral microsporidia were detected by a hot-chromotrope technique while a MERIFLUOR® *Cryptosporidium* kit was used to confirm the presence of *Cryptosporidium* sp. Finally, we used PCR to detect *Cryptosporidium parvum/hominis*. Water is of vital importance to living beings; however, due to anthropic action, several microorganisms are disseminated into aquatic environments. Among them are opportunistic protozoa that infect mainly immunodepressed and immunosuppressed individuals, children and elderly people. These

protozoa pose a significant health hazard. Nevertheless, the presence of these pathogens is underestimated because they are not considered during routine environmental monitoring. In our study, we were able to observe the presence of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* sp. and *Cryptosporidium parvum* oocysts in the bodies of water monitored in this research.

Keywords Environmental monitoring · Lakes · Neotropics · Opportunistic protozoa · River

Introduction

Water is a natural resource of vital importance to living beings. Due to anthropic action, several microorganisms are disseminated into aquatic environments. Opportunistic protozoa, such as coccidia (*Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, and *Cyclospora* sp.), microsporidia, an emergent pathogen which infects the gastrointestinal tract (Gomes et al. 2002), and *Giardia lamblia* which causes diarrhea (States et al. 1997), can be spread through water.

In developing countries, over one billion people do not have access to clean, properly treated water, and approximately three billion people do not have access to adequate sanitary facilities (Kraszewski 2001). This lack of clean water is probably a consequence of increased environmental degradation, depletion of water resources, and constant contamination of bodies of water with wastewater and industrial effluents (Pedro and Germano 2001), which cause microorganisms from soil, faeces, decomposing organic matter, and other pollutant sources to spread into water.

The magnitude of the danger that enteric protozoa pose to public health should be emphasised because of their high

S.F.O. Santos · H.D. Silva · E.S. Souza Júnior · C.E. Anunciação ·
E.P. Silveira-Lacerda · M.T.A. Garcíazapata (✉)
Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Re-emergentes,
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade
Federal de Goiás, Caixa Postal 12911, Setor Leste Vila Nova,
Goiânia, GO 74643-970, Brazil
e-mail: nupereme@gmail.com

C.A.S.T. Vilanova-Costa
Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de
Ciências Biológicas I, Universidade Federal de Goiás, Campus
Samambaia, Caixa Postal 131, Goiânia, GO 74001-970, Brazil

A

ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *SPERMACOCE POAYA* A. SAINT-HILAIRE (RUBIACEAE) EM CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS *IN VITRO*

FRANCYELLI MARIANA DOS SANTOS MELLO
WANESSA CARVALHO PIRES
FLÁVIA DE CASTRO PEREIRA
ALINY PEREIRA LIMA
CESAR AUGUSTO SAM TIAGO VILANOVA-COSTA

Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Caixa postal 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil

LUCILIA KATO

Laboratório de Produtos Naturais, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Caixa postal 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil

ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA-LACERDA

Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Caixa postal 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil; e-mail: silveiralacerda@gmail.com

25

RESUMO: *Spermacoce poaya* é uma espécie pertencente à família Rubiaceae, tribo Spermacoceae, gênero *Borreria*, popularmente conhecida no Brasil como poaia-do-campo, poaia-rasteira e poaia-do-arador. Sua infusão é utilizada em casos de bronquite, asma e pneumonia. Nenhum estudo fitoquímico, farmacológico e/ou toxicológico foi encontrado na literatura acerca dessa espécie até o presente momento. No presente estudo, foi investigada a atividade citotóxica do extrato bruto de *S. poaya* por meio dos testes colorimétricos MTT e azul de tripano. As linhagens celulares HFF-1 e K-562 foram expostas por 24 h a diferentes concentrações do extrato bruto etanólico das folhas de *S. poaya*. Os resultados mostraram que, para as células normais (HFF-1), o extrato bruto é antiproliferativo nas concentrações de 0,001 mg.mL⁻¹ e 0,1 mg.mL⁻¹; já para as células tumorais (K-562), não apresentou efeito citotóxico em nenhuma das concentrações testadas. Torna-se necessária a continuação dos estudos com essa planta utilizando outras linhagens celulares tumorais e, principalmente, células normais, para que seu efeito citotóxico possa ser comprovado.

PALAVRAS-CHAVE: Azul de tripano, citotoxicidade celular, MTT, proliferação celular, *Spermacoce poaya*.

CYTOTOXIC ACTIVITY OF THE ETHANOLIC CRUDE EXTRACT OF *SPERMACOCE POAYA* A. SAINT-HILAIRE (RUBIACEAE) IN NORMAL AND TUMOR CELLS *IN VITRO*

ABSTRACT: *Spermacoce poaya* is a species that belongs to the family Rubiaceae, tribe Spermacoce, and genus *Borreria*, popularly known in Brazil as "poaia-do-campo", "poaia-rasteira", and "poaia-do-arador". The infusion is used in cases of bronchitis, asthma, and pneumonia. So far, no phytochemical, pharmacological, and/or toxicological studies about this species have been found in the literature. In the present study, we investigated the cytotoxic activity of *S. poaya* crude extract using the colorimetric assays MTT and trypan blue. The cellular strains HFF-1 and K-562 were exposed for 24 h to different concentrations of the ethanolic crude extract of *S. poaya* leaves. The results showed that, for normal cells (HFF-1),

E

ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *PSYCHOTRIA PRUNIFOLIA* (RUBIACEAE) EM CÉLULAS TUMORAIS E NORMAIS *IN VITRO***WANESSA CARVALHO PIRES****FRANCYELLI MARIANA DOS SANTOS MELLO****MARIANA PEDROSA BATISTA****FLÁVIA DE CASTRO PEREIRA****ALINY PEREIRA LIMA****CESAR AUGUSTO SAM TIAGO VILANOVA-COSTA**

Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Caixa postal 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil

LUCILIA KATO

Laboratório de Produtos Naturais, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Caixa postal 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil

ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA-LACERDA

Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Caixa postal 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil; e-mail: silveiralacerda@gmail.com

15

RESUMO: A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo também na comunidade médica, desde que suas atividades biológicas, eficácia e segurança tenham sido investigadas cientificamente e comprovadas. Por isso, investigamos o potencial citotóxico do extrato bruto etanólico de *Psychotria prunifolia* em células tumorais e células normais, usadas como controle para as células tumorais. Para tal, foram utilizados dois testes independentes: MTT e azul de tripano. Os resultados sugerem que essa planta tem atividade citotóxica em células tumorais, embora esta atividade também tenha sido observada em células normais. Assim, torna-se necessário proceder a estudos mais detalhados, já que a planta se mostrou promissora no que diz respeito à atividade antitumoral.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade citotóxica, azul de tripano, MTT, *Psychotria prunifolia*.

STUDY OF CYTOTOXIC ACTIVITY OF *PSYCHOTRIA PRUNIFOLIA* (RUBIACEAE) CRUDE ETHANOLIC EXTRACT IN NORMAL AND TUMOR CELLS *IN VITRO*

ABSTRACT: The use of medicinal plants has become a widely accepted therapeutic alternative by the population and it has been also growing in the medical community, provided that their biological activities, efficacy, and safety have been scientifically investigated and proved. Therefore we investigated the cytotoxic potential of the crude ethanolic extract of *Psychotria prunifolia* in tumor and normal cells, used as the control for tumor cells. To do this, we used two independent tests: the MTT and trypan blue. The results suggest that this plant presents cytotoxic activity in tumor cells, although this activity could also be observed in normal cells. Thus, it is necessary to perform more detailed studies, since the plant has proved promising with regard to antitumor activity.

KEY WORDS: Cytotoxic activity, trypan blue, MTT, *Psychotria prunifolia*.

Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptosis by Ruthenium Complex *cis*-(Dichloro)tetramineruthenium(III) Chloride in Human Lung Carcinoma Cells A549

Aliny Pereira de Lima · Flávia de Castro Pereira ·
Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa · Jordana Ribeiro Soares ·
Lucas Carlos Gomes Pereira · Hellen Karine Paes Porto · Luiz Alfredo Pavanin ·
Wagner Batista dos Santos · Elisângela de Paula Silveira-Lacerda

Received: 20 January 2010 / Accepted: 13 November 2011 / Published online: 6 December 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Lung cancer is one of the leading causes of death in the world, and non-small cell lung carcinoma (NSCLC) accounts for approximately 75–85% of all lung cancers. In the present work, we studied the cytotoxic activity, cell cycle arrest and induction apoptosis of the compound *cis*-(dichloro)tetramineruthenium(III) chloride {*cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl} in human lung carcinoma tumor cell line A549. The results of MTT and trypan blue assays showed that *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl causes reduction in the viability of A549 cells when treating with 95 and 383 μM of the compound for 48 and 72 h. Lower concentrations of the compound (19, 3.8 and 0.38 μM), however, only slightly affected cell viability. The IC₅₀ value for the compound was about 383 μM. Survival analysis of the A549 cells after treatment with ruthenium(III) compound using long term clonogenic assay showed that it reduced colony formation ability at concentrations of 0.38 and

3.8 μM, and at concentrations of 95 and 383 μM no colonies were observed. Cell cycle analysis showed that compound ruthenium led to an accumulation of A549 cells in S phase and increased in the sub-G1 peak. In addition, *cis*-(dichloro)tetramineruthenium(III) chloride treatment induced apoptosis, as observed by the increased numbers of annexin V-positive cells and increased messenger RNA expression of caspase-3.

Keywords A549 · *cis*-(Dichloro)tetramineruthenium(III) chloride · Cytotoxicity · Lung cancer

Introduction

Lung cancer is one of the leading causes of death in the world, and non-small cell lung carcinoma (NSCLC)

A. P. de Lima · F. C. Pereira · C. A. S. T. Vilanova-Costa ·
J. R. Soares · L. C. G. Pereira · H. K. P. Porto ·
E. P. Silveira-Lacerda (✉)
Laboratório de Genética Molecular e Citogenética,
Instituto de Ciências Biológicas- ICB I - Sala 200 - UFG,
Campus Samambaia (Campus II),
Universidade Federal de Goiás—UFG.,
Goiânia, Goiás, Brazil
e-mail: silveiralacerda@gmail.com

A. P. de Lima
e-mail: alinyperiralima@gmail.com

F. C. Pereira
e-mail: pereirafc@gmail.com

C. A. S. T. Vilanova-Costa
e-mail: vilanovacosta@gmail.com

J. R. Soares
e-mail: jordanabiologia@gmail.com

L. C. G. Pereira
e-mail: lucascarlos_bio@hotmail.com

H. K. P. Porto
e-mail: paesporto@gmail.com

L. A. Pavanin
Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia—UFU.,
Uberlândia, Minas Gerais, Brazil
e-mail: pavanin@ufu.br

W. B. dos Santos
Instituto de Química,
Universidade Federal de Mato Grosso—UFMT.,
Barra do Garça, Mato Grosso, Brazil
e-mail: wbsantos32@yahoo.com.br