



Ministério da Educação  
Universidade Federal de Goiás  
**Faculdade de Farmácia**  
*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas -  
Mestrado*



**PAULA ROBERTA NUNES**

**Estudo da atividade citotóxica, genotóxica e apoptótica de  
novos complexos de ouro (III) de fluorquinolonas frente às  
células B16-F10, K562 e A20**

**Goiânia**

**2012**

**PAULA ROBERTA NUNES**

**Estudo da atividade citotóxica, genotóxica e apoptótica de  
novos complexos de ouro (III) de fluorquinolonas frente às  
células B16-F10, K562 e A20**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Universidade Federal de  
Goiás para obtenção do Título de Mestre  
em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisângela de Paula  
Silveira Lacerda

Goiânia

2012

Estudo da atividade citotóxica, genotóxica e apoptótica de novos complexos de ouro  
(III) de fluorquinolonas frente às células B16-F10, K562 e A20

Paula Roberta Nunes B.Sc<sup>1</sup>

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisângela de Paula Silveira Lacerda<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Molecular e Citogenética. ICB I – sala 202. Campus II.  
Universidade Federal de Goiás.

\* Correspondência: [silveiralacerda@gmail.com](mailto:silveiralacerda@gmail.com)

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

Fevereiro/2012

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluna: PAULA ROBERTA NUNES

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA LACERDA

**MEMBROS:**

**1. Profa. Dra. Letícia Regina de Souza Teixeira**

**2. Profa. Dra. Danielle Guimarães Almeida Diniz**

**3. Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira-Lacerda**

OU

**4. Prof. Dr. Wagner Batista dos Santos**

**5. Profa. Dra. Daniela Melo e Silva**

Data: 28/02/2012

*Dedico esse trabalho aos meus pais!*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente, agradeço a DEUS por me dar forças para conquistar os objetivos almejados sem deixar que fraquejasse nos momentos dificuldades, pelas oportunidades que surgiram na minha vida e por ter me guiado pelo caminho correto.*

*Aos meus pais, Tanilda Mendes Ferreira Nunes e Vilmar Nunes da Silva, pelo incentivo aos meus estudos e por sempre acreditarem no meu sucesso. Pelo apoio nos momentos difíceis.*

*Ao meu esposo Bruno Rafael Dias de Sousa, pelo amor, compreensão dedicação e pelo apoio nos momentos de dificuldade.*

*Aos meus familiares que torceram por mim e me incentivaram nas minhas conquistas.*

*A minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elisângela de Paula Silveira Lacerda por acreditar no meu potencial e a quem tenho grande admiração por sua conduta pessoal e profissional.*

*Agradeço aos doutorandos do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Aliny Pereira de Lima, Alessandra de Santana Braga Barbosa Ribeiro e César Augusto Sam Tiago Vila-Nova Costa, pela ajuda nos momentos de dificuldade e pela amizade e dedicação. Em especial para a Flávia de Castro Pereira pela ajuda nos momentos difíceis e pela co-orientação, muito obrigada por tudo.*

*Ao amigo de mestrado Hellen Karine Paes Porto e Lucas Carlos Gomes Pereira pela ajuda e dedicação e além de tudo pela amizade. A Adriana Guedes Mundim pela ajuda, dedicação durante o período do mestrado e pela amizade nos momentos de dificuldade*

*Aos estagiários do Laboratório, Wanessa Carvalho Pires, Francielly, Wanderson, Mariana Pedrosa Batista, Bruno Carvalho, Raquel, Jordana e Thallita pelo auxílio durante o mestrado e pela amizade.*

*Aos funcionários da Universidade Federal de Goiás, pelo auxílio.*

*Ao conselho Nacional de Pesquisa, CNPq, pela bolsa de estudos.*

*A todas as pessoas que acreditaram no meu sucesso e torceram por mim.*

*Cada pessoa que passa na nossa vida , passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa pela nossa vida, passa sozinha, não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.*

*(Charles Chaplin)*

## Resumo

O complexo de ouro  $K[Au(CN)_2]$ , por exemplo, foi introduzido na virada do século XX para o tratamento da tuberculose e logo após substituído pelos tiolatos de ouro (I), que foram usados nos anos 30 para o tratamento da artrite reumatóide. A exploração de complexos de ouro para uso como agente anticâncer foi iniciada na tentativa de se obter uma droga menos tóxica que a cisplatina. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico e genotóxico, assim como o mecanismo de morte celular de três novos compostos a base de ouro, que tem como substância bioativa de origem sintética utilizando diferentes linhagens celulares *in vitro*. No ensaio de citotoxicidade os efeitos dos três complexos de ouro foram avaliados frente quatro linhagens tumorais (B16-F10, K562 e A20) e duas linhagens normais (L-929 e MRC-5) através do teste de MTT, em diferentes concentrações dos compostos (0,2; 2; 20; 50; 100; 200  $\mu$ M) por 48 horas de tratamento. Foi realizado para o estudo o ensaio de eletroforese em gel de agarose nas concentrações correspondentes a  $IC_{50}$  das linhagens testadas (Sambrook, 2001), foram realizados também análises de ciclo celular e teste cometa. Análise estatística para comparação entre os grupos tratados e controle foi utilizado Anova segundo um único critério e pós-teste Dunnet's (software GraphPad Prism V4). Os resultados obtidos através do ensaio de MTT frente às linhagens testadas MRC-5, L-929, B16-F10, A20 e K562 para o composto Au Spar foi (104; 65,1; 45; 48,3; 61,2, respectivamente) para o composto Au Levo foi (52,8; 181; 28,8; 48,9; 50, respectivamente) e para o composto Au Nor foi ( 65,1; 79,2; 26,6; 24,9; 55, respectivamente). Após a triagem dos compostos, testes mais específicos foram realizados apenas com algumas linhagens que apresentaram resultados mais promissores. Para a linhagem K562 e B16-F10 tratadas com Au Levo e Au Spar respectivamente, observou-se que no ensaio de degradação de DNA não apresentaram padrão de degradação por apoptose nos ensaios realizados com 48 h de tratamento com os compostos. A linhagem B16-F10 tratada com o composto Au Spar não alterou significativamente a cinética celular, além de não apresentar danos significativos ao DNA após 48 h de tratamento. Testes mais específicos devem ser realizados com a finalidade de aprofundar no mecanismo de morte das células, visto que os testes realizados não foi o bastante para demonstrar qual é a via pelo qual o composto está agindo.

**Palavras-chave:** Complexo de Ouro, Antitumoral, Apoptose, Citotoxicidade.

## Abstract

The complex of gold  $K[Au(CN)_2]$ , for example, was introduced at the beginning of the twentieth century for the treatment of tuberculosis and then replaced for the gold thiolates (I), which were used in the decade of 30 for the treatment of Rheumatoid Arthritis. The exploration of gold complexes for the use as an anti-cancer agent, in an attempt to find a drug less toxic than cisplatin. The current study aimed to evaluate potential cytotoxic and genotoxic, as well as the mechanism of cell death of three new gold-based compounds, which is bioactive substance of synthetic origin, using different cell lines *in vitro*. In the cytotoxicity assay the effects of the three gold complexes were evaluated in four tumor cell lines (B16-F10, K562 and A20) and in two normal lines (L-929, MRC-5) through MTT test, the compounds at different concentrations (0.2, 2, 20, 50, 100, 200  $\mu$ M) per 48 hours of treatment. The study was conducted to test electrophoresis on agarose gel at concentrations corresponding to  $IC_{50}$  of the strains tested. Were also performed cell cycle analysis and comet test. In statistical analysis for comparison between treated groups and control them, was used Anova, in a single criterion and Dunnet's Post-test (GraphPad Prism 3.02). The results obtained with MTT assay the tested strains MRC-5, L-929, B-16-F10, A20, K562, for the Spar Au compound was (104, 65.1, 45, 48.3, 61.2, respectively) for the Au Levo compound was (52.8, 181, 28.8, 48.9, 50, respectively) and the Au Nor compound was (65.1, 79.2, 26.6, 24.9, 55, respectively). After the screening of compounds, more specific tests were performed only with some strains that showed more promising results. For K562 cells and B16-F10 treated with Au Levo and Au Spar, respectively, observed that the test showed no degradation of DNA by apoptosis in the tests performed with 48 hours of treatment with the compounds. The line B16-F10 treated with the compound Au Spar did not significantly alter cell cycle kinetics and no reported significant damage to DNA after 48 hours of treatment. More specific tests have to be made in order to deepen the mechanism of cell death, since the tests were not enough to demonstrate how the compound is acting.

**Keywords:** Complex of Gold, Apoptosis, Cytotoxicity.

## SIGLAS E ABREVEATURAS

- [AuCl<sub>2</sub>(LEVO)]Cl: Complexo de Ouro(III) e Levofloxacina  
[AuCl<sub>2</sub>(NOR)]Cl: Complexo de Ouro(III) e Norfloxacina  
[AuCl<sub>2</sub>(SPAR)]Cl: Complexo de Ouro(III) e Esparfloxacina  
A20: Linfoma murino  
Apaf 1: Protease apoptótica ativadora de fator-1  
Au Levo: Complexo de Ouro(III) com Levofloxacina  
Au Nor: Complexo de Ouro(III) com Norfloxacina  
Au Spar: Complexo de Ouro(III) com Esparfloxacina  
Au(III): Ouro no estado de oxidação III  
B16: Melanoma Murino  
Bak: Proteína destruidora de Antagonistas de Bcl-2  
Bax: Proteína X associada ao Bcl-2  
Bcl-2: Proteína anti-apoptótica (Linfoma células B)  
Bid: Domínio de Morte de Interação com BH3  
CCNS: Ciclo Celular Não-Específico  
CCS: Ciclo Celular Específico  
Cdk: Quinase dependente de Ciclina  
DMEM: Meio Eagle modificado por Dulbecco  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
DNA: Ácido desoxirribonucléico  
EDTA: Ácido Etilenodiaminotetraacético  
Et al: e outros, do latim *et alii*  
FADD/MORT-1: Molécula adaptadora para ativadores de caspases.  
Fase M: Fase de Mitose do Ciclo Celular  
G0: Fase G0 do Ciclo Celular  
G1: Fase G1 do Ciclo Celular:  
G2: Fase G2 do Ciclo Celular  
GAPDH: Gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase  
IC<sub>50</sub>: Concentração que inibe 50% da viabilidade celular  
ID: Índice de Dano  
INCA: Instituto Nacional de Câncer  
K[Au(CN)<sub>2</sub>]: Dicianoaurato de potássio

K562: Linhagem de células de Leucemia Mielóide Crônica Humana

L-929: Fibroblasto de Pulmão

MM: Massa Molecular

MRC-5: Fibroblasto de Pulmão Humano

P388: Leucemia Linfocítica Murina

P815: Mastocitoma Murino

PBS: Tampão Fosfato-Salino

PCR: Reação em Cadeia de Polimerase

PI: Iodeto de Propídio

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RNA: Ácido Ribonucléico

RPMI: Instituto Memorial Park Roswell

rTNF: Receptor de Fator de Necrose Tumoral

S: Fase S do Ciclo Celular

S-180: Sarcoma murino

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

UFG: Universidade Federal de Goiás

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estimativas para o ano 2012 de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária*	20
<b>Tabela 2.</b> Relação entre ciclo celular e principais classes de agentes antineoplásicos.	28
<b>Tabela 3.</b> Cor, fórmula molecular, massa molar (MM) e rendimento para os complexos bidentados de Au(III) com Norfloxacin, Levofloxacin e Esparfloxacin.	38

### TABELAS – CAPÍTULO 1

<b>Table 1</b> - Inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) of $[AuCl_2(SPAR)]Cl$ against the cell lines B16-F10 and L-929	60
---	----

### TABELAS – CAPÍTULO 2

<b>Table 1:</b> $^{13}C$ NMR signals (d) for the norfloxacin, levofloxacin, sparfloxacin and their gold(III) complexes $d^6$ -DMSO	80
<b>Table 2:</b> Compound concentration ( $\mu M$ ) that produces of 50% reduction in cellular viability ( $IC_{50}$ ) gold(III) complexes.	81
<b>Table 3</b> – The binding constants ( $K_b$ ) derived for FQ and Complexes de Au(III).	86
<b>Table 4</b> – The binding constants and parameters ( $K_{sv}$ , $k_q$ ) obtained for the fluorquinolones and gold(III) complexes	89

### LISTA DE QUADRO

<b>Quadro 1</b> - Diferenças macroscópicas do nevo melanocítico e do melanoma (Modificado de National Cancer Institute).	22
--	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrando as etapas da carcinogênese e a relação com os agentes carcinogênicos. Fonte: INCA	19
<b>Figura 2.</b> Processos de morte celular, diferença morfológica entre necrose e apoptose.	24
<b>Figura 3.</b> Via intrínseca de ativação da apoptose. Apaf-1= fator de ativação de protease associada à apoptose 1.	25
<b>Figura 4.</b> Esquema das fases do ciclo celular.	26
<b>Figura 5.</b> Interação da ação de agentes antineoplásicos nas fases do ciclo celular	27
<b>Figura 6.</b> Fórmulas estruturais dos agentes antineoplásicos naturais.	29
<b>Figura 7.</b> Estrutura molecular da Cisplatina e Carboplatina.	31
<b>Figura 8.</b> Ligação intrafita (em cima) e interfita (em baixo) de compostos de platina e a molécula de DNA.	32
<b>Figura 9.</b> Mecanismo de ação de complexos de rutênio (III) sobre células tumorais.	33
<b>Figura 10.</b> Equação de obtenção do complexo (9).	39
<b>Figura 11.</b> Equação de obtenção do complexo (10).	39
<b>Figura 12.</b> Equação de obtenção do complexo (11).	39
<b>Figura 13.</b> Imagem representativa da migração de DNA no teste de cometa.	43

## FIGURAS – CAPÍTULO 1

<b>Figure 1</b> – Equation for the synthesis of the $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ complex.	61
<b>Figure 2</b> – Cytotoxic effects of sparfloxacin and $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ on B16-F10 cells after treatment for 48 h. $*p<0.05$ and $**p<0.01$ .	61
<b>Figure 3</b> – Analysis of plasma membrane damage of B16-F10 cells treated for 48 h with $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ by LDH assay. $*p<0.05$ .	62
<b>Figure 4</b> – B16-F10 cellular kinetics after treatment for 48 h with $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ . (A) Cell cycle distributions at concentrations of 30, 45 and 100 $\mu\text{M}$ were obtained with GraphPad Prism 3.02. (B) ModFit histogram analysis of the negative control and $\text{IC}_{50}$ . There was no significant change in the cell cycle distribution upon treatment with Au Spar, 95% significance ( $p>0.05$ ).	63
<b>Figure 5</b> – B16-F10 cell death distribution after treatment for 48 h with $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ . (A) Annexin V/FITC assays at concentrations of 30 and 45 $\mu\text{M}$ were analysed with GraphPad Prism 3.02. (B) Negative control and $\text{IC}_{50}$ cytograms were analysed with CellQuest FACSCalibur 3. $*p<0.05$ .	64
<b>Figure 6</b> – DNA fragmentation analysis of B16-F10 cells treated with different $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ concentrations. (1) 100 bp DNA ladder, (2) negative control, (3) 30 $\mu\text{M}$ $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ , (4) 45 $\mu\text{M}$ $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ and (5) 100 $\mu\text{M}$ $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ .	65
<b>Figure 7</b> – Damage Index (DI) in B16-F10 and L-929 cell lines after	65

treatment for 48 h with  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ . Dunnett's test showed no significant difference ( $p > 0.05$ ).

**Figure 8** – Tail:head ratio distribution for B16-F10 and L-929 cell lines after treatment for 48 h with  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ . Tukey test showed no significant difference ( $p > 0.05$ ). 66

**Figure 9** - Effect of  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  on caspase-3 mRNA expression as assessed by real-time PCR after treatment for 6 h.  $*p < 0.05$ . 66

## FIGURAS – CAPÍTULO 2

**Fig.1:** Structures of (a) norfloxacin, (b) levofloxacin and (c) sparfloxacin. 74

**Fig.2:** Proposed structure for  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  81

**Fig.3:** DNA agarose gel electrophoresis profile of K562 cells cultured in the presence of AuLEVO compound.  $2 \times 10^6$  K562 cells were cultured with different concentrations of  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  (25 – 75  $\mu\text{M}$ ) for 48h. Samples were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis. Gels were stained with ethidium bromide and visualized by ultraviolet transillumination (1 = Ladder; 2 = C- (Cells and medium); 3 =  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  25  $\mu\text{M}$ ; 4 =  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  50  $\mu\text{M}$ ; 5 =  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  75  $\mu\text{M}$ ). 82

**Fig.4:** Cell cycle profile of K562 cells cultured with different concentrations of  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  (25 – 75 $\mu\text{M}$ ) for 48 hours.  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$  83

**Fig.5:** Plots of (a) NOR, (b) LEV, (c) SPAR, (d)  $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ , (e)  $[\text{AuCl}_2(\text{LEV})]\text{Cl}$ , (f)  $[\text{AuCl}_2(\text{SPA})]\text{Cl}$  in the presence of CT DNA at increasing amounts. The arrows show the changes upon increasing amounts of CT DNA.  $[\text{Compound}] = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  at pH 7.4 85

**Fig. 6.** Fluorescence spectra of BSA (2  $\mu\text{M}$ ) in the presence of (a) NOR, (b) LEV, (c) SPAR, (d)  $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ , (e)  $[\text{AuCl}_2(\text{LEV})]\text{Cl}$ , (f)  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ . The solutions were prepared in 8  $\mu\text{M}$  universal buffer in pH 7.4. Inset: Stern–Volmer plot. 87

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO DE LITERATURA</b>	18
1.1. Câncer	18
1.2. Câncer e Tratamento	19
1.3. Melanoma e sua Incidência	21
1.4. Leucemia	22
1.5. Apoptose e Câncer	23
1.6. Ciclo Celular e Câncer	26
1.7. Classificação dos Quimioterápicos Antineoplásicos	27
1.8. Antibióticos e quimioterapia	30
1.9. Complexos Metálicos e Cancer	31
1.10. Complexos de Ouro e sua Ação Antitumoral	34
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	36
<b>3. OBJETIVOS</b>	37
3.1. Objetivo Geral	37
3.2. Objetivos Específicos	37
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	38
4.1. Sínteses dos complexos de Au(III) bidentados de norfloxacin, levofloxacin e sparfloxacin	38
4.2. Preparação do composto de Ouro e droga controle para ensaios biológicos <i>in vitro</i>	39
4.3. Linhagens celulares e manutenção do cultivo celular	40
4.4. Ensaio de viabilidade celular por Ensaio de MTT	40
4.5. Análise da cinética do ciclo celular por citometria de fluxo	41
4.6. Análise do mecanismo de morte: Ensaio de Apoptose (Anexina V-FICT/Iodeto de Propídio)	41
4.7. Fragmentação do DNA por eletroforese em gel de agarose	42
4.8. Ensaio de genotoxicidade (Teste cometa)	42
4.9. Extração de RNA	44
4.10. Transcrição Reversa e PCR quantitativa em tempo real	44
4.11. Análise estatística	45
<b>5. CAPÍTULO 1 – Artigo:</b> Induction of apoptosis by a complex of gold (III) and sparfloxacin in the murine melanoma cell line B16-F10	46
<b>6. Capítulo 2 - Artigo:</b> Unusual fluorquinolone gold(III) chelates as potential anticancer agents: Relevance of DNA and protein interactions	70

for their mechanism of action

<b>7. CONCLUSÃO</b>	91
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	92
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	93

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

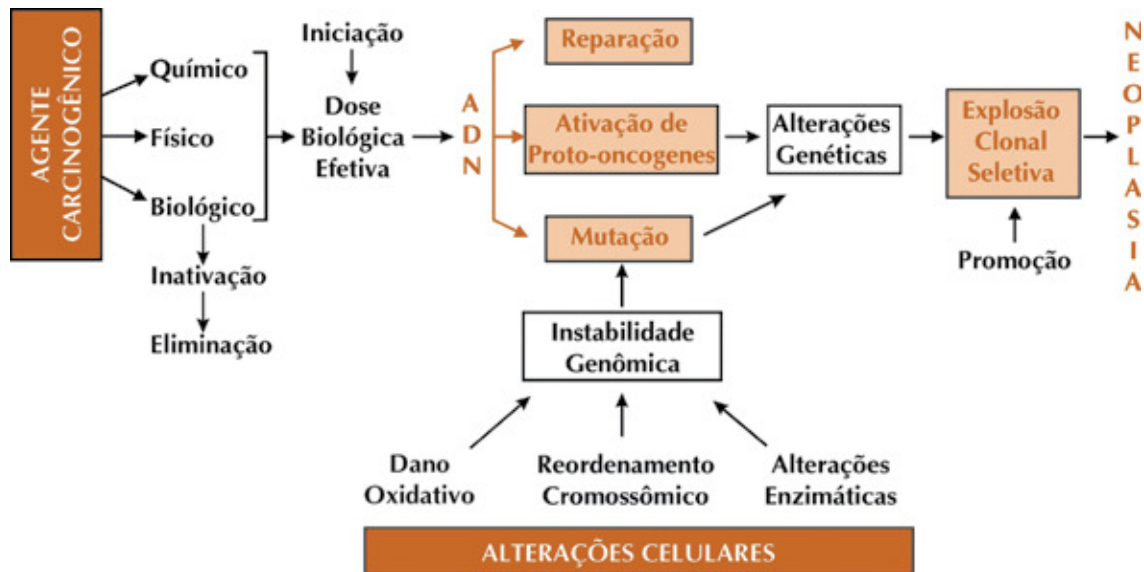
### 1.1. Câncer

O organismo humano está diariamente exposto a vários agentes carcinogênicos com efeitos aditivos ou multiplicativos, no qual sua predisposição a patologia, exercerá um papel decisivo na resposta final. No entanto, as células normais já são predispostas a sofrerem mutações espontâneas que podem ou não serem cruciais para o desenvolvimento de processos iniciais da carcinogênese (INCA, 2002).

O câncer é uma doença genética das células somáticas. Nas células cancerosas, surgem várias mutações que afetam a sua multiplicação e sua propagação. Tanto as mutações de ganho de função dos oncogenes quanto às mutações de perda de função dos genes supressores tumorais podem contribuir para a progressão de um tumor através do desequilíbrio dos controles normais que reprimem o ciclo celular ou aqueles que promovem a apoptose (GRIFFITH et al., 2001). As causas do câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando elas inter-relacionadas (DIFFLEY & EVAN, 1999; INCA, 2012). Resumindo, o surgimento de câncer pode ser de forma espontânea ou induzido por agentes carcinogênicos (físicos, químicos e biológicos) (Figura 1) (INCA, 2002).

A oncogênese física é induzida por energia radiante, solar ou ionizante e esse mecanismo se dá devido ao fato da radiação ter a capacidade de induzir mutações. Esse tipo de oncogênese promove o surgimento de cânceres de mama, ossos e intestinos. A oncogênese química é dividida em duas fases – de iniciação e de promoção. A primeira fase consiste na exposição de um fator iniciador ou carcinogênico que irá causar danos ou mutação ao DNA. A fase de promoção compreende o período em que há o estímulo das células que sofreram danos e pode acontecer a qualquer momento. Muitos dos agentes químicos encontram-se no ambiente humano, mantendo uma relação direta com seus hábitos sociais, envolvendo a alimentação e seus atos ocupacionais. Já a oncogênese biológica pode ocorrer pela atividade viral; isso se dá devido ao fato de haver incorporação do material genético viral ao da célula hospedeira. Durante esse processo ou após ele, poderá ocorrer a ativação de anti-oncogenes e proto-oncogenes, que podem imortalizar as células ou estimular a replicação celular, respectivamente (INCA, 2002).

**Figura 1** – Esquema ilustrando as etapas da carcinogênese e a relação com os agentes carcinogênicos (INCA, 2002).



O câncer é hoje um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, representa cerca de 12 % de todas as causas de morte no mundo (WHO, 2002). No Brasil, as estimativas, para o ano de 2012 (Tabela 1), que serão válidas também para o ano de 2013, apontam para a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer (INCA, 2012).

## 1.2. Câncer e Tratamento

Existem três abordagens principais para o tratamento de câncer: excisão cirúrgica, irradiação e quimioterapia dependendo do tipo de tumor e o estágio de desenvolvimento (LAURENCE et al., 1997). A cirurgia foi à primeira modalidade de tratamento que significativamente alterou o curso de uma neoplasia (KOWALSKI, 2002). As aplicações de técnicas cirúrgicas, radioterápicas, quimioterápicas e biológicas para o tratamento resultam na cura de mais de 50% dos pacientes diagnosticados com câncer (LONGO, 2001).

A quimioterapia constitui o método mais utilizado como adjuvante da cirurgia para muitos tipos de tumores. A maioria dos agentes quimioterápicos não são seletivos, pois destroem células tumorais e normais. Um fator importante para aumentar o êxito da quimioterapia é a precocidade dos diagnósticos em tumores

com tamanho inferior a 1 cm (LAURENCE et al., 1997; SALMONM, 1998; SPENCE & JONHSTON, 2001).

**Tabela 1** - Estimativas para o ano 2012 de número de casos novos de câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária\*

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	60.180	62,54	15.660	75,26	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	52.680	52,50	18.160	78,02
Colo do Útero	-	-	-	-	17.540	17,49	5.050	21,72
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	17,90	4.520	21,85	10.110	10,08	3.060	13,31
Cólon e Reto	14.180	14,75	4.860	23,24	15.960	15,94	5.850	25,27
Estômago	12.670	13,20	3.200	15,34	7.420	7,42	2.170	9,47
Cavidade Oral	9.990	10,41	2.760	13,34	4.180	4,18	1.130	4,92
Laringe	6.110	6,31	1.540	7,56	-	-	-	-
Bexiga	6.210	6,49	1.900	9,28	2.690	2,71	880	3,72
Esôfago	7.770	8,10	1.500	7,26	2.650	2,67	520	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.190	6,17	2.220	9,53
Linfoma não Hodgkin	5.190	5,40	1.560	7,66	4.450	4,44	1.560	6,85
Glândula Tireoide	-	-	-	-	10.590	10,59	3.490	14,97
Sistema Nervoso Central	4.820	5,02	1.190	5,82	4.450	4,46	1.200	5,23
Leucemias	4.570	4,76	1.180	5,81	3.940	3,94	1.180	5,02
Corpo do Útero	-	-	-	-	4.520	4,53	1.700	7,39
Pele Melanoma	3.170	3,29	810	4,05	3.060	3,09	790	3,46
Outras Localizações	43.120	44,80	11.100	53,33	38.720	38,61	10.320	44,50
Subtotal	195.190	202,85	51.780	248,60	189.150	188,58	59.280	254,86
Pele não Melanoma	62.680	65,17	14.620	70,39	71.490	71,30	15.900	68,36
<b>Todas as Neoplasias</b>	<b>257.870</b>	<b>267,99</b>	<b>66.400</b>	<b>318,79</b>	<b>260.640</b>	<b>259,86</b>	<b>75.180</b>	<b>323,22</b>

\*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Fonte: Instituto Nacional de Câncer - INCA/MS

Já a radioterapia consiste em expor as células malignas à radiação ionizante e é utilizada para tumores localizados que podem ser extraídos totalmente ou aqueles que apresentaram alta taxa de recidivas locais após a cirurgia. No entanto, mesmo utilizada com drogas que diminuam os efeitos colaterais, o tratamento por radiação está sujeito a severas limitações (O'SULLIVAN & WALDRON, 2006; MURAD & KATZ, 1990).

Outra técnica antineoplásica utilizada é a terapia de fotorradiação, sendo considerada um importante avanço no combate do câncer, esta terapia consiste em uma técnica mais seletiva, que permite a localização e destruição do tumor através de radiação específica de fluorescência com o uso de fibra ótica (SALMONM, 1998; OLIVEIRA & ALVES, 2002).









Outro tratamento antineoplásico é a imunoterapia que utiliza as próprias defesas do organismo. No entanto, é uma técnica adjuvante usada principalmente para destruir restos de células tumorais que ficaram após o processo de tratamentos anteriores (de ALMEIDA et al., 2005; MACHADO, 2000). A terapia hormonal também se encaixa no tratamento antitumoral, visto que a proliferação ou inibição do crescimento celular sofrem alterações influenciadas pelo equilíbrio hormonal, esta técnica é utilizada para o tratamento de cânceres relacionados aos órgãos genitais (OLIVEIRA & ALVES, 2002).

### **1.3. Melanoma e sua incidência**

Melanoma cutâneo é um tipo de câncer que atinge os melanócitos e ocorre predominantemente em adultos brancos. Representa cerca de 4% dos tipos de câncer de pele, sendo considerado o mais grave devido a sua capacidade de metástase. O melanoma de pele tem baixa incidência (3.170 novos casos para homens e 3.060 novos casos para mulheres) (INCA, 2012). No entanto, sua letalidade é elevada e as maiores taxas de incidência em homens e mulheres encontram-se na Região Sul. Os fatores de risco que aumentam a predisposição ao melanoma são: sensibilidade ou exposição excessiva ao sol, histórico familiar de câncer de pele, nevo congênito e displásico, maturidade e xeroderma pigmentoso. O melanoma pode ser prevenido evitando o sol nos períodos nos quais a incidência de raios solares seja mais intensos. O seu surgimento é a partir de uma pele normal ou de uma lesão pigmentada. O tratamento mais indicado é a cirurgia. No entanto, a radioterapia e a quimioterapia podem ser utilizadas dependendo do estágio da doença e quando há metástase o melanoma é incurável na maioria dos casos (INCA, 2011).

Algumas características do melanoma podem auxiliar a diferenciá-lo de forma macroscópica, como por exemplo: o melanoma é assimétrico, as bordas são irregulares, a cor não é uniforme, o diâmetro é superior 6 mm e sofre evolução (Quadro 1) (INCA, 2011).

**Quadro 1** - Diferenças macroscópicas do nevo melanocítico e do melanoma (Modificado de National Cancer Institute).

Verruga	Melanoma	Sintoma	Características
		Assimétrico	Quando a metade da verruga não coincide com a outra
		Borda	Quando a borda da verruga é irregular ou regular.
		Coloração	Quando a coloração da verruga varia inteiramente.
		Diâmetro	Se o diâmetro da verruga for maior que 6 mm.

#### 1.4. Leucemia

Leucemia mielóide crônica é uma doença tumoral maligna, caracterizada por uma proliferação de células mielóides seguida por uma diminuição progressiva da capacidade de diferenciação celular. A doença se manifesta devido a uma anormalidade citogenética, devido a translocação recíproca dos braços longos dos cromossomos 9 e 22, levando a formação de um novo gene leucemia – específico (SAWYERS, 1999).

A leucemia crônica é uma doença que na maioria dos casos não tem cura com base nas terapias medicamentosas, a única modalidade curativa que se encaixa é o transplante de medula (DOBBIN & GADELHA, 2002).

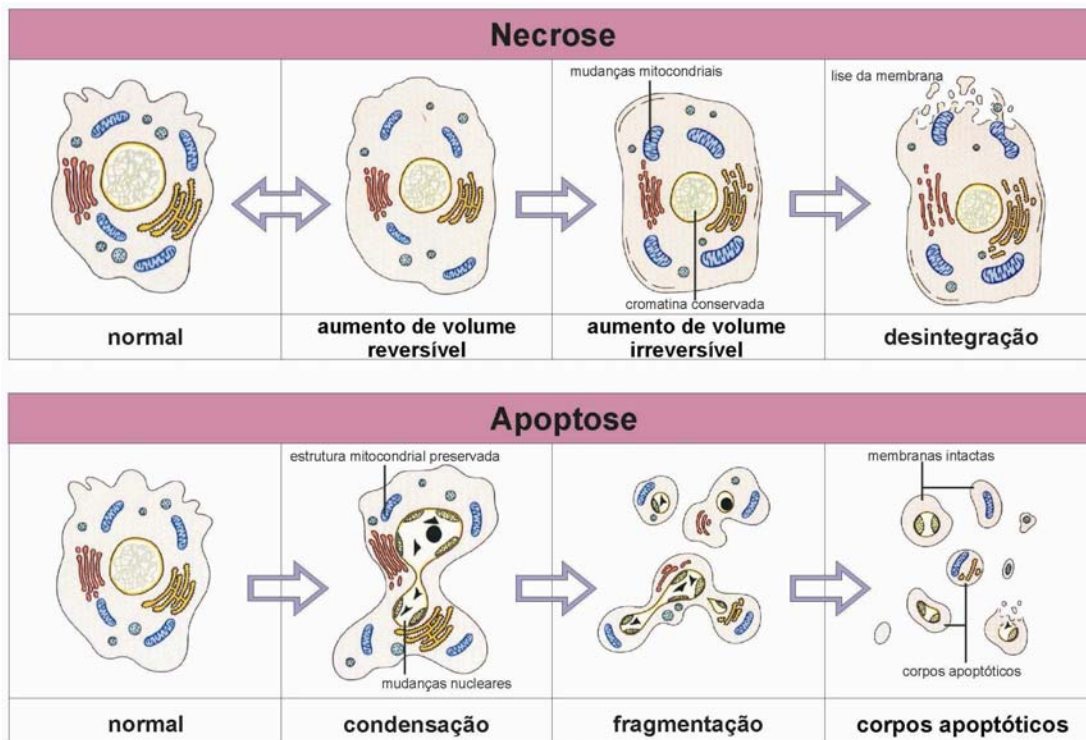
## 1.5. Apoptose e câncer

A morte celular por muito tempo foi considerada um processo passivo degenerativo, no qual as células alteram a integridade da membrana, ocorre o aumento do volume citoplasmático e perda da atividade metabólica (YU & CHOI, 2000). No entanto, nem todo o processo de morte celular é passivo em organismos multicelulares, podendo haver a indução programada da morte celular através de estímulos interno ou externo (HENGARTNER, 2000).

Quanto aos processos de morte celular, eles podem ser classificados conforme alterações morfológicas e bioquímicas em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência (OKADA & MAK, 2004). A autofagia é um processo que foi conservado durante a evolução e nesse processo a célula degrada componentes celulares através de lisossomos (KELEKAR, 2005). A necrose é um processo acidental induzida por lesões agudas, durante o qual o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas levando a uma resposta inflamatória (ALBERTS, 2004; ZIEGLER, 2004). A senescência é um processo natural e metabólico essencial para o envelhecimento celular e células que entram nesse processo perdem a capacidade de proliferação (MOOI & PEEPER, 2006).

Apoptose, ou morte celular programada (Figura 2), é um processo essencial para a manutenção dos seres vivos, pois ela tem como função eliminar células defeituosas (ROCHA et al., 2010). É caracterizada pela retração celular, fragmentação do DNA nuclear, perda da aderência com a matriz extracelular, formação de corpos apoptóticos, sendo que os últimos são rapidamente fagocitados por macrófagos sem ocasionar um processo inflamatório (ZIEGLER, 2004). As alterações morfológicas observadas são decorrentes de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos geneticamente regulados. O processo de apoptose é mediado por proteínas pró-apoptóticas como as famílias das caspases, que sinalizam para a apoptose, assim acarretando a condensação e fragmentação do DNA (SARASTE & PULKKI, 2000). Proteínas da família Bcl-2 participam ativamente na regulação de apoptose, pois agem como indutoras e repressoras de morte programada, sendo que a Bcl-2 e Bcl-XL são consideradas antiapoptóticas, Bax, Bid e Bak são consideradas pró-apoptóticas (HENGARTNER, 2000).

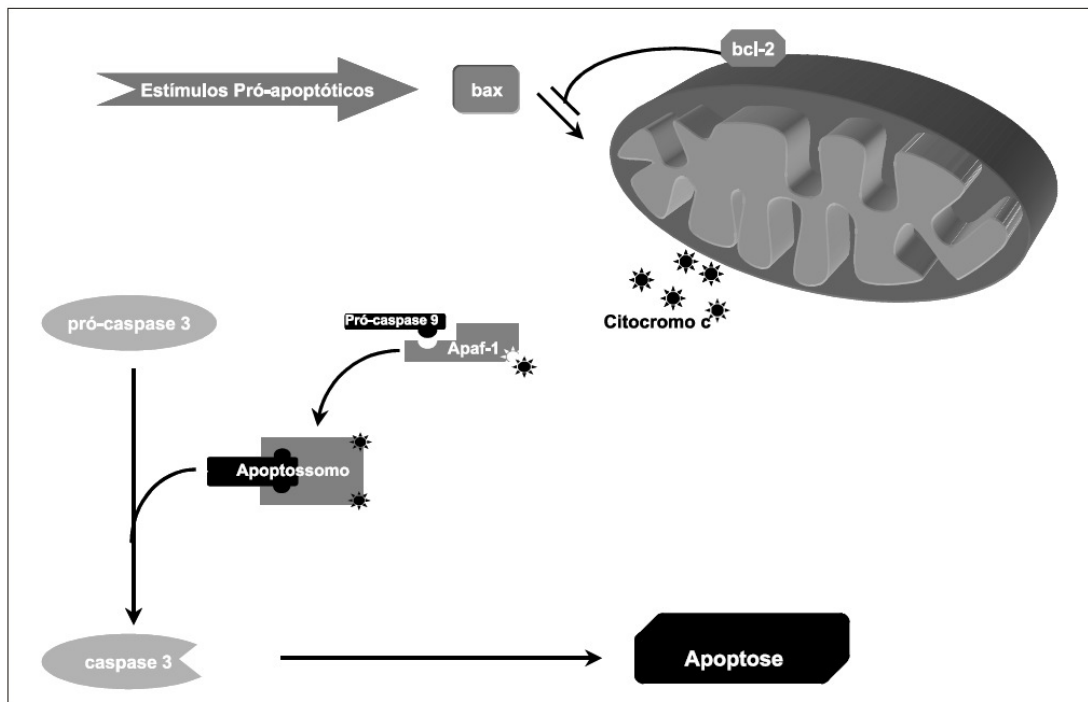
**Figura 2** – Processos de morte celular, diferença morfológica entre necrose e apoptose. (ANAZETTI & MELLO, 2007).



A apoptose pode ser iniciada por meio de duas vias principais: a via extrínseca (citoplasmática) e a via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é desencadeada através da interação ligantes específicos a um grupos de receptores rTNF (receptor de fator de necrose tumoral), quando esses receptores reconhecem o ligante específico eles ativam uma molécula denominada FADD/MORT-1 e essa por sua vez recruta a caspase 8 que irá ativar a caspase 3, assim levando a célula à morte (BUDIHardjo et al., 1999; NAISMITH & SPRANG, 1998).

Já a via intrínseca (Figura 3) é desencadeada por estresse intra ou extracelular, por diminuição de fatores de crescimento, danos no DNA e ativação de oncogenes, esses sinais levam a migração de proteínas Bax, presente no citoplasma para a mitocôndria, alternando sua permeabilidade e permitindo a liberação de citocromo c. Esse se liga à proteína adaptadora Apaf-1 e a caspase 9 formando o apoptossomo que irá ativar a caspase 3, levando a morte celular via mitocondrial (HENGARTNER, 2000; KAUFMANN & EARNSHAW, 2000).

**Figura 3** – Via intrínseca de ativação da apoptose. Apaf-1= fator de ativação de protease associada à apoptose 1 (GRIVICICH et al., 2007).



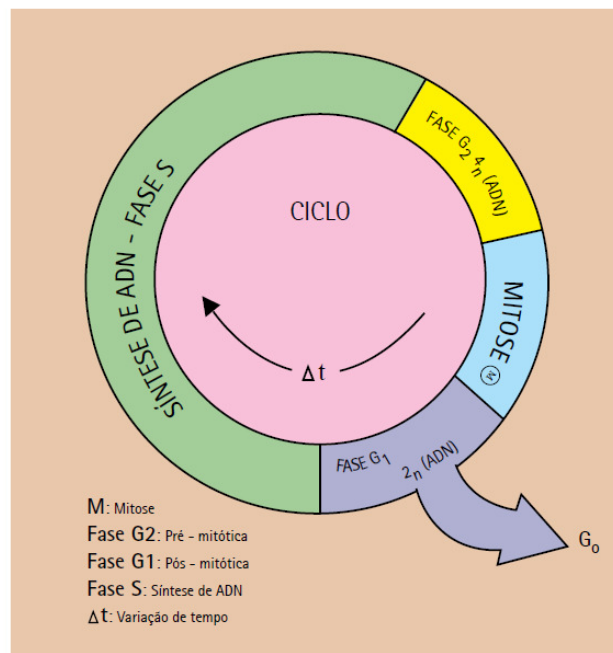
O surgimento de tumores está relacionado a diversos fatores e eles apresentam características heterogêneas. No entanto, tumores malignos adquiriram a capacidade de crescerem sem limite, tornando as células cancerígenas imortais. Uma característica marcante das células tumorais é ser resistente ao mecanismo de apoptose natural (GRIVICICH et al., 2007). Sabe-se que as drogas antitumorais utilizadas apresentam diferentes mecanismos de ação sobre as células alvo. Pesquisas tem demonstrado que a morte celular provocada pelas drogas quimioterápicas ocorre principalmente por indução a apoptose. Essas drogas tem a capacidade de restabelecer a apoptose celular, visto que esse processo é alterado nas células tumorais (GRIVICICH et al., 2007). Dados da literatura sugerem que a indução a apoptose é um evento comum de diferentes classes de drogas antitumorais e que atualmente é um dos objetivos de grupos de pesquisa que visam formular novos fármacos para o tratamento de câncer (LOWE & LIN, 2000; LIU et al., 2006; HYUN et al., 2009).

Estudos demonstram que a apoptose é um mecanismo com grande potencial para a prática clínica, pois ajuda a evidenciar o mecanismo de morte de células tumorais. Além de, compreender o processo de resistência que algumas células têm frente à radioterapia e a quimioterapia (NICHOLSON, 2000; DEBATIN, 2004).

## 1.6. Ciclo Celular e Câncer

A compreensão do ciclo celular é fundamental para o entendimento do crescimento tumoral. O mecanismo de divisão celular é um evento precisamente controlado e dividido em cinco fases: G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M (Figura 4). Na fase G<sub>0</sub>, as células encontram-se em repouso, ou seja, não estão replicando e com a atividade nuclear baixa. Quando as células passam para a fase G<sub>1</sub>, ocorre a preparação para a divisão celular e a atividade nuclear é aumentada para a produção de constituintes essenciais celulares que serão necessários na nova célula, preparando o DNA para a síntese, que irá ocorrer na fase S. Nas fases G<sub>1</sub> e S há diversos mecanismos que regulam o processo de divisão celular. Na fase G<sub>2</sub> haverá a síntese de componentes para a mitose e após a divisão celular, com a formação de duas células filhas e finalizando o ciclo celular, algumas células podem voltar a entrar em G<sub>0</sub>. Entretanto, células tumorais após terminarem seu processo de replicação, não retornam para G<sub>0</sub>, e assim que termina a fase M, elas vão para a fase G<sub>1</sub> (de ALMEIDA et al., 2005).

**Figura 4** – Esquema das fases do ciclo celular. (Fonte: INCA, 2002).



Pontos de checagem do ciclo celular podem interromper a divisão celular, se determinados eventos não se concluírem, por exemplo: entrada na mitose é evitada quando a replicação do DNA não está completa, a separação dos cromossomos na

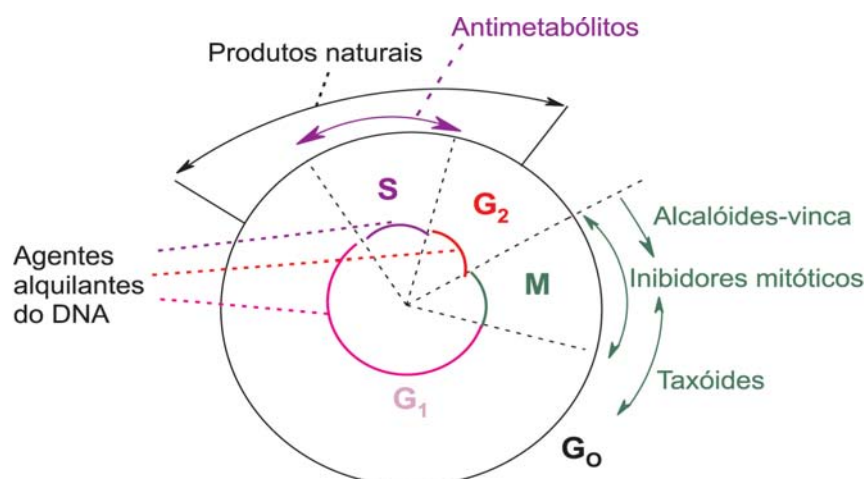
mitose é atrasada se alguns dos cromossomos caso não estiverem adequadamente fixados no fuso mitótico, e por fim, o avanço através de G1 e G2 é atrasado pelos mecanismos de checagem se o DNA no cromossomo estiver danificado por radiação ou por processos químicos. O atraso nestes pontos de checagem fornece tempo para o DNA danificado ser reparado, então a parada do mecanismo é liberada e o processo de divisão celular é retomado (ALBERTS et al., 2004).

A entrada e as passagens pelas fases do ciclo são controladas e reguladas por proteínas como as ciclinas, quinases dependentes de ciclinas (Cdk), essas por sua vez checam a progressão do ciclo e mantêm as células em divisão ou levam elas a entrar em apoptose, caso as condições não sejam favoráveis. Entretanto, a falha de uma ciclina ou a mutação de alguma das proteínas envolvidas pode levar o surgimento de tumores (INCA, 2011; LODISH et al., 2002).

### 1.7. Classificação dos quimioterápicos antineoplásicos

Os fármacos utilizados para o tratamento de câncer são classificados conforme seu sítio de ação em: fármacos ciclo-celular específico (CCS) e fármacos ciclo-celular não específico (CCNS) (Tabela 2). Sendo que o primeiro grupo CCS tem sua ação diretamente nas fases do ciclo-celular. Já os fármacos CCNS agem sobre vários momentos matando as células independentemente se elas estão em alguma fase do ciclo ou em repouso (Figura 5) (MURAD & KATZ, 1990; SALMONM, 1998).

**Figura 5** – Interação da ação de agentes antineoplásicos nas fases do ciclo celular (de ALMEIDA, 2005).



Os agentes antitumorais naturais extraídos de vegetais são classificados no grupo dos CCS. Há um grande número de fármacos desse tipo sendo utilizados na clínica contra o câncer devido a sua eficiência (de ALMEIDA et al., 2005).

**Tabela 2** – Relação entre ciclo celular e principais classes de agentes antineoplásicos (modificado por de ALMEIDA et al., 2005).

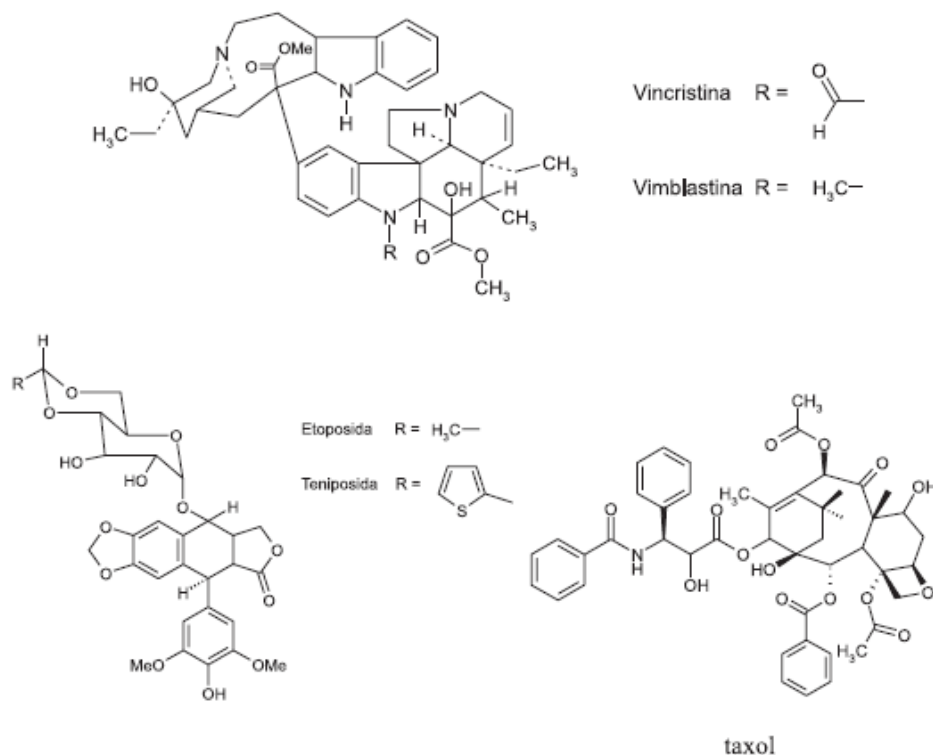
1. Agentes ciclo-celular específicos (CCS, "Cell Cycle-Specific")	2. Agentes ciclo-celular não específicos (CCNS, "Cell Cycle-NonSpecific")
1.1. Agentes Antimetabólitos	2.1. Produtos Naturais
1.1.a. Análogo do ácido fólico	2.1.a. Antibióticos naturais
1.1.b. Antagonistas das pirimidinas	2.1.a.1. Antraciclinas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

Dentre alguns produtos naturais utilizados, destacam-se os alcalóides de vegetais tais como: a) alcalóides de vinca (vinblastina e vincristina) agem inibindo a ação do fuso mitótico, ligando-se às proteínas microtubulares (OLIVEIRA & ALVES, 2002); b) taxol, éster alcalóide (nome comercial Paclitaxel<sup>®</sup>) também agem na inibição do fuso mitótico e na dimerização da tubulina (OLIVEIRA & ALVES, 2002); c) podofilotoxinas (derivados semi-sintético: epotosida – VP-16; teniposida – VM-26), extraído da raiz do podofilo (*Podophyllum peltatum*) agem no bloqueio das células na fase S e G2 (Figura 6) (CHABNER & CALABRESI, 1995; SALMONM, 1998).

Os antineoplásicos mais antigos agem como agentes alquilantes, pois comprovadamente, interagem quimicamente com o DNA, não sendo ativo apenas no processo de divisão celular. Na quimioterapia atual são descrito diversos alvos moleculares que tem sido estudados com o intuito de estabelecer novas drogas

antitumorais mais específicas. Entretanto, a interação com o DNA é um dos alvos mais estudados (de ALMEIDA et al., 2005; KESKIN et al., 2000).

**Figura 6** – Fórmulas estruturais dos agentes antineoplásicos naturais. (de ALMEIDA et al., 2005).



Diversos antitumorais utilizados clinicamente apresentam mecanismo de ação CCNS e relacionado ao DNA. Nesse grupo entram os produtos naturais, complexos de coordenação de platina, agentes alquilantes e agentes intercalantes (de ALMEIDA et al., 2005). Dados da literatura sugerem que os fármacos CCNS, são importantes devido a sua potencialidade para o tratamento de diversos tumores (RAJSKI & WILLIAMS, 1998).

Os agentes antimetabólicos, que são fármacos do tipo CCS, agem sobre o metabolismo intermediário das células em proliferação e são bastante estudados e empregados clinicamente. Embora estudos não tenham demonstrado similaridade entre as propriedades bioquímicas das células tumorais e das células normais, sabe-se que elas são mais susceptíveis a ação de fármacos antimetabólicos e análogos estruturais das bases nitrogenadas (de ALMEIDA et al., 2005; OLIVEIRA & ALVES, 2002).

Os agentes antimetabólicos exercem seus efeitos principalmente bloqueando a fase S do ciclo celular. Os antimetabólicos utilizados clinicamente são divididos em três subclasses: análogos do ácido fólico – Metotrexato (MXT); antagonistas das pirimidinas – Fluorouracil, Floxuridina e Citarabina; análogos das purinas – Mercaptopurina, Tioguanina, Pentostatina, Fosfato de fludarabina e Cladribina (MURAD & KATZ; OLIVEIRA & ALVES, 2002; de ALMEIDA et al., 2005).

### **1.8. Antibióticos e quimioterapia**

Os antibióticos são substâncias químicas naturais ou sintéticas que têm como função impedir ou destruir o crescimento de microorganismo, com exceção dos vírus. Os antibióticos naturais são extraídos de fungos e bactérias e há alguns anos também já existem antibióticos totalmente sintéticos (INCA, 2011).

As fluoroquinolonas são uma importante classe de antibióticos sintéticos desenvolvidos através da modificação estrutural de quinolonas com ação contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (BRIGHTY & GOOTZ, 2000). A complexação de metais às fluoroquinolonas aumenta suas atividades biológicas (PSOMAS et al., 2006). As vantagens das fluoroquinolonas é que apresentam fácil administração, excelente absorção oral e penetração nos tecidos, uma meia vida prolongada e uma boa margem de segurança (EZINE ARTICLE, 2011).

Todos os antibióticos utilizados no tratamento de neoplasias são produtos semi-sintéticos, derivados de várias cepas do fungo *Streptomyces sp.* Embora os antibióticos interajam com o DNA e iniba a síntese desse ácido e das proteínas, eles não atuam como fármacos de CCS. Eles apresentam grupos funcionais que fornecem a eles vários mecanismos de ação, como alquilação (mitomicina C), inibição enzimática (actinomicina D e mitramicina) ou intercalação com as moléculas de DNA (bleomicina, daunorrubicina e adriamicina e seus análogos). Assim como os outros quimioterápicos, os antibióticos agem tanto sobre células normais como em tumorais e por isso apresentam vários efeitos indesejáveis (INCA, 2011).

## 1.9. Complexos metálicos e câncer

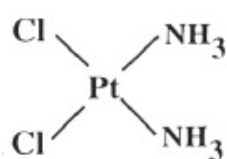
Pesquisas sobre complexos de metais de transição têm sido o principal foco de vários grupos de pesquisa, devido ao seu potencial terapêutico e a ação biológica destes compostos (BEIRITH et al., 1999).

Vários compostos derivados de metais têm sido testados contra tumores, tais como: bismuto, vanádio, irídio, rutênio, gálio, titânio, germânio e outros (KATSAROS & ANAGNOSTOPOULOU, 2002; SILVEIRA-LACERDA, 2003).

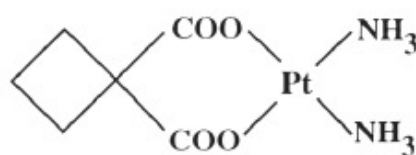
Os complexos de platina, como a cisplatina e a carboplatina (Figura 7), obtiveram maior sucesso no tratamento de certos tipos de cânceres (BERNERS-PRICE & SADLER, 1996). Os estudos com a cisplatina iniciaram no fim dos anos 60 com a descoberta, ao acaso, por Rosenberg e colaboradores na inibição da divisão celular de bactérias *Escherichia coli* em solução contendo cisplatina (FONTES et al., 2005). No início da década de 70 iniciaram-se os testes pré-clínicos com a cisplatina em pacientes terminais e posteriormente em tumores localizados de testículo e ovário. Atualmente a cisplatina é utilizada no tratamento de diversas neoplasias como de pulmão, cabeça, melanoma, estômago, mama entre outras, principalmente com a associação a outras drogas (FONTES et al., 2005).

Estudos para descrever o mecanismo de ação da cisplatina foram realizados e relatam que antes de chegar ao interior celular a cisplatina passa por reações de substituições, na qual a principal é a reação de hidrólise substituindo os ligantes cloretos (FONTES et al., 2005). Atualmente, é reconhecido que o mecanismo de ação de compostos a base de platina são as moléculas de DNA, causando danos em níveis moleculares (REEDIJK et al., 1987).

**Figura 7** – Estrutura molecular da Cisplatina e Carboplatina (FONTES & ALMEIDA, 1996).



**Cisplatina**

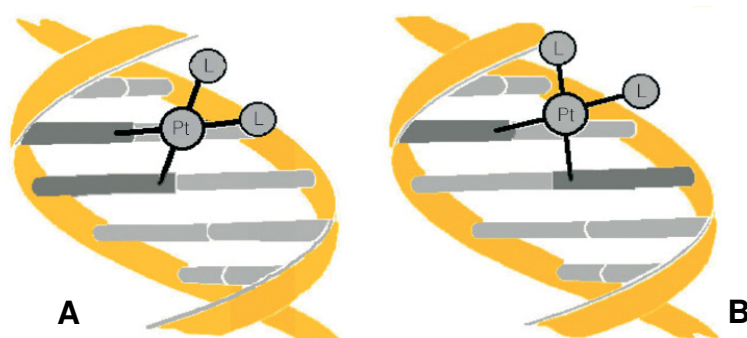


**Carboplatina**

A ligação da platina ocorre preferencialmente nos átomos de nitrogênio das bases púricas do DNA, sendo que, a interação mais estável é com o nitrogênio da guanina. Há vários tipos de ligação que podem ser formadas entre o DNA e a platina, visto que as principais são: monofuncionais; bifuncionais, e essa podem ser de três tipos – intrafita, interfita (Figura 8) e intermolecular. Devido ao fato da platina se ligar à molécula de DNA observa-se que o processo de divisão celular é inibido, dessa forma qualquer composto que interfira nesse processo é considerado citotóxico e podendo levar a morte celular. Por isso que compostos que apresentam esse mecanismo de ação são utilizados para o tratamento de neoplasias (FONTES et al., 2005). A utilização dos fármacos derivados de platina é limitada devido à resistência que algumas linhagens tumorais adquiriram além da neuro e nefrotoxicidade significantes (LOKISH & ANDERSON, 1998).

No início da década de 80 estudos com complexos de rutênio mostraram atividades antitumorais promissoras. Posteriormente, pesquisas levaram ao desenvolvimento do (H2im)[*trans*-RuCl<sub>4</sub>(Him)(DMSO)] conhecido como (NAMI-A) e o Indazolium *trans*-[tetrachlorobis(H1-indazole)ruthenate(III)] conhecido como (KP1019) (Figura 10), sendo que essas drogas antitumorais hoje estão sendo submetidas a testes de triagem clínica (RADEMAKER-LAKAHAI et al., 2004; HARTINGER et al., 2006).

**Figura 8** – Ligação intrafita (A) e interfita (B) de compostos de platina e a molécula de DNA (FONTES et al., 2005).

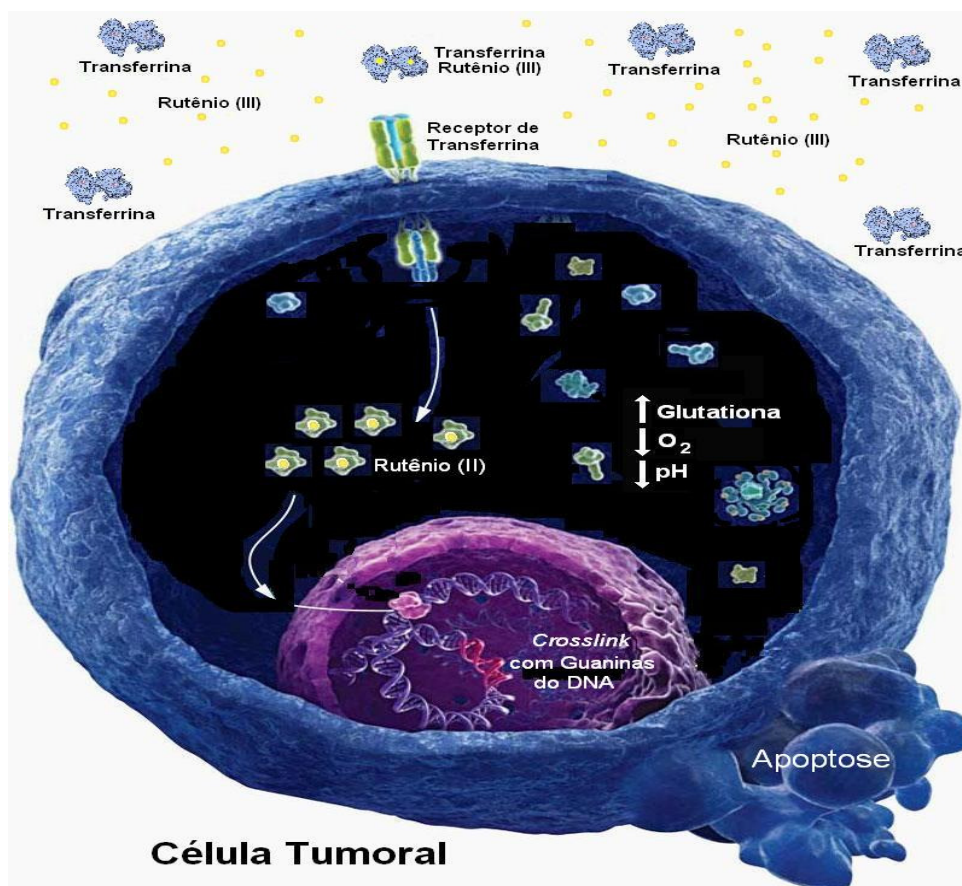


Nos testes pré-clínicos, o NAMI-A demonstrou eficiência contra os processos de metástases e o KP1019 apresentou potencial antitumoral contra carcinoma (KAPITZA et al., 2005; PACOR et al., 2004). Estudos com o composto *cis*-tetraaminodiclororutênio(III) demonstraram que ele apresentou potencial antitumoral

frente a diferentes linhagens tumorais *in vitro* e em estudos anteriores observou-se que esse composto apresentou atividade antitumoral sobre a linhagem tumoral Sarcoma 180 (S180) *in vivo* (MENEZES et al., 2007; SILVEIRA-LACERDA et al., 2009).

Com a finalidade de se obter drogas antitumorais mais específicas e menos tóxicas, os estudos com complexos de rutênio se fizeram necessário. Pesquisadores propuseram uma hipótese referente ao mecanismo de ação para os complexos de Ru(III): capacidade de se ligar à transferrina, mimetizando o ferro, e como consequência se tornam alvos das células tumorais, devido ao aumento da necessidade de ferro (Figura 9) (HUXHAM et al., 2003). Os complexos de rutênio(III) servem como pró-droga o qual necessitam ser reduzidos para desenvolver seu potencial farmacológico, onde o estado de redução é favorecido pelas condições de hipóxia e pH acidificado, encontrado nos tecidos tumorais (BERGAMO et al., 1999; CLARKE, 2003).

**Figura 9** - Mecanismo de ação de complexos de rutênio(III) sobre células tumorais (PEREIRA, 2009).



Outros complexos também foram testados com intuito de avaliar suas atividades biológicas como, por exemplo, os complexos de ferro que apresentaram atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* frente à linhagem tumoral de Ehrlich, sendo que essas células apresentavam resistência a antitumorais clássicos (GOLSTEIN & KROEMER 2007).

### 1.10. Complexos de Ouro e sua ação antitumoral

Os compostos de ouro são usados há muito tempo na medicina e há relatos de sua utilização pelos antigos egípcios durante parte da idade média e no período do renascimento. Compostos de ouro foram utilizados para o tratamento de doenças anti-infecciosas e antituberculose.

Os complexos metálicos são usados comumente como medicamentos. O complexo de ouro  $K[Au(CN)_2]$ , por exemplo, foi introduzido na virada do século XX para o tratamento da tuberculose e logo após substituído pelos tiolatos de ouro(I), que foram usados nos anos 30 para o tratamento da artrite reumatóide. Várias formas de tiolatos de ouro(I), injetáveis ou orais, são utilizadas clinicamente (BERNERS-PRICE & SADLER, 1996).

Compostos a base de ouro vem sendo utilizados há muitas décadas para o tratamento de artrite reumatóide e apresenta resultados para atividade antitumoral, atividade anti-HIV, malária e bronquite asmática (SHAW, 1999).

A auranofina é um fármaco de uso oral utilizada para a terapia artrite reumatóide desde a década de 70 (KEAN et al., 1997). No início da década de 80, observaram que a auranofina foi capaz de aumentar o período de vida de ratos portadores de leucemia P388 em comparação com a cisplatina (MIRABELLI et al., 1985; SIMON et al., 1981) e também apresentou atividade *in vitro* em células da linhagem HeLa (SIMON et al., 1979), a ação da auranofina foi evidenciada com testes *in vitro* com compostos análogos da droga (MIRABELLI et al., 1986). Testes citotóxicos *in vitro* com complexos de ouro foram realizados frente a linhagens murinas P815, B16 e P388 visando encontrar compostos com valores de  $IC_{50}$  que pudessem ser comparados com os resultados encontrados nas referências com compostos a base de cisplatina (MCKEAGE et al., 2002).

Complexos metálicos de ouro(I) e prata(I) contendo sulfametaxazol foram avaliados em *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Observou-se que os complexos apresentaram uma atividade mais significativa com relação a outros complexos de antibióticos (ROCHA et al., 2010).

Devido ao aumento das pesquisas *in vitro* com complexos de ouro nos últimos anos, várias hipóteses foram levantadas a respeito dos possíveis mecanismos de ação do ouro. Entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos biológicos ainda são bem esclarecidos (NOBILI et al., 2009).

A partir da análise de estudos da literatura, observou-se que há três principais classes de complexos de ouro, de acordo com seu modo de ação com alvos biológicos: (1) – compostos de ouro que agem como pró-drogas e são capazes de coordenar firmemente biomoléculas. Nesse modo envolve um processo de alquilação similar ao dos compostos de platina; (2) – compostos de ouro que atuam como cátions grandes com a capacidade de atravessar a membrana e de se ligar fortemente a biomoléculas, baseado no mecanismo de intercalação ao DNA; (3) – compostos de ouro que reagem com biomoléculas, por meio de reações químicas de oxirredução, causando dano oxidativo (NOBILI et al., 2009).

Desta forma, estudo com complexos de ouro, por apresentar atividade citotóxica, induz a investigações dos efeitos das propriedades químicas e biológicas destes complexos de ouro, tanto na área dos antineoplásicos quanto na detecção de diferentes atividades biológicas para esses compostos.

## 2. JUSTIFICATIVA

Os complexos de ouro vem ganhando espaço nas pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novos quimioterápicos antitumorais, por se tratar de um metal inerte e formar complexos estáveis.

Estudos revelam que complexos de ouro tem a capacidade de inibir o crescimento tumoral através da atividade de oxirredução dos compostos levando a célula a apoptose. Além, de induzir a parada do ciclo celular na fase G1, impedindo que a célula entre na fase de síntese do DNA. Tais características contribuíram significativamente na sua atividade antitumoral.

Com as descobertas e sínteses desses novos compostos, vê-se a necessidade da realização de estudos de triagem *in vitro* através da realização de testes citotóxicos e antitumoral em novas linhagens de células tumorais e normal ainda não testadas. Estudando os possíveis efeitos biológicos, a estabilidade genômica, assim como o seu mecanismo de ação, pode-se levar ao desenvolvimento de fármacos com atividades mais acentuadas em relação aos fármacos antitumorais atualmente utilizados.

Com a finalidade de se obter dados mais seguros dos compostos antes de submetê-los a testes pré-clínicos três novos complexos de ouro(III) ligados a antibióticos da família das fluorquinolonas foram submetidos a testes de triagem citotóxica e a estudos pré-clínicos *in vitro*, assim contribuindo para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial antitumoral.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mecanismo de morte de três compostos de ouro de esparfloxacina, levofloxacina e norfloxacina (Au Spar, Au Levo e Au Nor, respectivamente) utilizando diferentes linhagens celulares *in vitro*.

#### 3.2. Objetivo Específicos

- Avaliar o efeito inibidor da proliferação celular em linhagens de células tumorais humanas *in vitro* A20 (Linfoma murino), B16-F10 (Melanoma murino), K562 (Leucemia mielóide humana);
- Avaliar o efeito inibidor da proliferação celular em linhagem de células humanas basais *in vitro* MCR5 (Fibroblasto de pulmão humano) e células murinas basais *in vitro* L-929 (Fibroblasto de pulmão de camundongo);
- Investigar a distribuição das fases do ciclo celular em células B16-F10 após tratamento com os complexos de ouro;
- Avaliar o mecanismo de morte celular e o efeito apoptótico das linhagens B16-F10 e K562;
- Avaliar a integridade do DNA das células tratadas com os complexos de ouro e avaliar a ação genotóxica dos compostos na linhagem B16-F10 e L-929;
- Avaliar a expressão de marcadores para apoptose (Caspases 3) na linhagem tumoral B16-F10.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Sínteses dos complexos de Au(III) bidentados de norfloxacin, levofloxacin e esparfloxacin

Os complexos de ouro foram sintetizados no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob responsabilidade da Professora Doutora Letícia R. Teixeira, e foram encaminhados para o Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da Universidade Federal de Goiás (UFG).

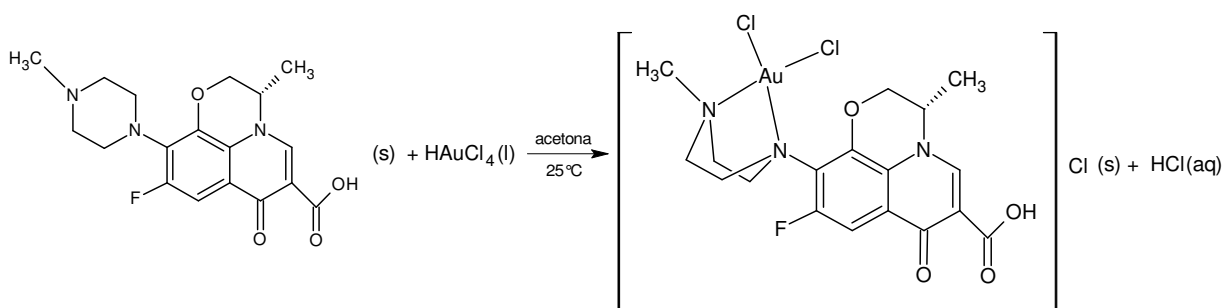
A síntese do composto foi com base no protocolo a seguir, no qual, os complexos de Au(III) foram obtidos dissolvendo-se 0,25 mmol dos ligantes Norfloxacin (NOR) em, aproximadamente, 40 mL de acetona e a Levofloxacin (LEVO) e Esparfloxacin (SPAR) em, aproximadamente, 40 mL de metanol. Após a dissolução dos ligantes, 0,25 mmol de ácido cloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>) foram adicionados, previamente dissolvido nos mesmos solventes utilizados para os ligantes. A mistura permaneceu sob refluxo e agitação por, aproximadamente, 24 horas. Os precipitados formados foram filtrados a vácuo e secos. Três novos complexos foram obtidos: [AuCl<sub>2</sub>(NOR)]Cl, [AuCl<sub>2</sub>(LEVO)]Cl, [AuCl<sub>2</sub>(SPAR)]Cl.

**Tabela 3** - Cor, fórmula molecular, massa molar (MM) e rendimento para os complexos bidentados de Au(III) com Norfloxacin, Levofloxacin e Esparfloxacin.

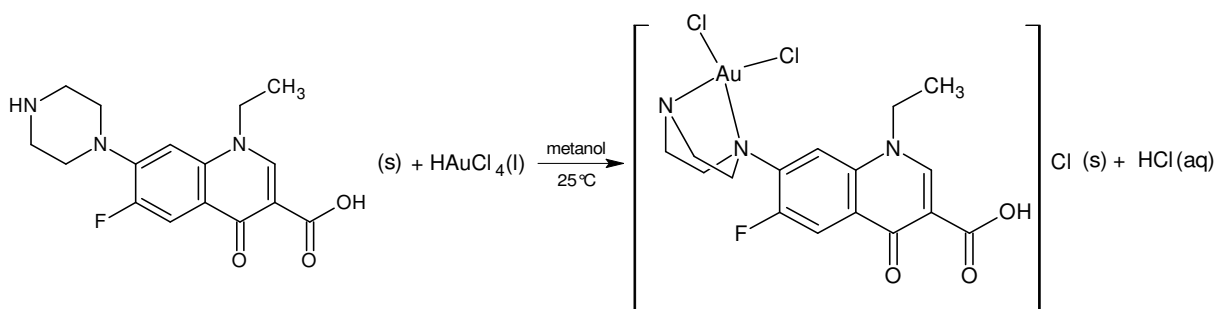
Composto	Cor	Fórmula molecular	MM (g mol <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)
[AuCl <sub>2</sub> (NOR)]Cl	Amarelo	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> AuCl <sub>4</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>9</sub>	765,2	80
[AuCl <sub>2</sub> (LEVO)]Cl	Marrom	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> AuCl <sub>3</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	664,7	79
[AuCl <sub>2</sub> (SPAR)]Cl	Marrom	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> AuCl <sub>3</sub> F <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	694,7	92

Os produtos obtidos foram caracterizados através de seus pontos de fusão, análise elementar e termogravimétrica, medidas de condutividade, espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e carbono (RMN <sup>13</sup>C). A Tabela 3 apresenta cor, fórmula molecular, massa molar e rendimento para os complexos bidentados de Au(III). As Figuras 10, 11 e 12 mostram as equações de obtenção dos complexos.

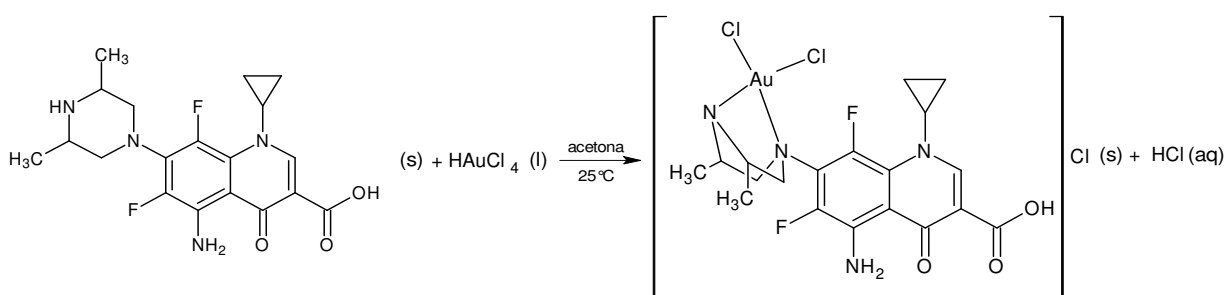
**Figura 10** - Equação de obtenção do complexo  $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ .



**Figura 11** - Equação de obtenção do complexo  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$ .



**Figura 12** - Equação de obtenção do complexo  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ .



#### 4.2. Preparação do composto de ouro e da droga controle para ensaios biológicos *in vitro*

Para os ensaios biológicos os compostos foram pesados e dissolvidos em DMSO em concentrações pré-determinadas a partir de 0,2 a 200  $\mu\text{M}$ . Após preparo das soluções estoques dos compostos de ouro, estas soluções foram submetidas à

agitação vigorosa para dissolução completa utilizando ultrasom (Ultra Sonic Cleaner Unique).

### **4.3. Linhagens celulares e manutenção do cultivo celular**

Para os ensaios biológicos foram utilizadas as linhagens tumorais estabelecidas A20 (Linfoma Murino), B16-F10 (Melanoma Murino), K562 (Leucemia Mielóide Crônica Humana) e como células basais (controle), foram utilizadas as linhagens estabelecidas MCR-5 (Fibroblasto de Pulmão Humano) e L-929 (Fibroblasto de Pulmão Murino). Todas as linhagens celulares foram mantidas em cultura a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> em meio RPMI 1640 ou DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM L-Gln, 100IU/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina segundo protocolo estabelecido pela *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EUA).

### **4.4. Ensaio de viabilidade celular por Ensaio de MTT**

Para avaliar a atividade citotóxica dos compostos de ouro 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.

As células das diversas linhagens selecionadas foram semeadas em placas de 96 poços. No dia seguinte, concentrações crescentes de drogas foram adicionadas, incubando-se a seguir por 48 horas em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C. Ao final do período adicionou-se a solução de MTT, deixando em incubação por 3 horas, para metabolização do reagente. A solubilização do reagente formazan foi feita com uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS). A quantificação de densidade óptica (DO) foi medida por espectrofotômetro (Awareness Technology INE/ Stat Fax 2100). O valor de IC<sub>50</sub> (concentração em µM que inibe 50% da viabilidade celular) foi determinada por meio da curva concentração resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

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

As fases do ciclo celular podem ser caracterizadas por variações no seu conteúdo de DNA, que quando analisado por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídio permite quantificar a percentagem de células em cada fase do ciclo celular. Para esta análise,  $1 \times 10^6$  células tumorais foram plaqueadas em microplacas de 12 poços na presença ou ausência dos compostos de ouro. Após exposição das células aos compostos de ouro, estas foram centrifugadas e em seguida lavadas com PBS. Ao final da lavagem o sobrenadante foi desprezado, e o “pellet” celular foi incubado com 1 mL de álcool etílico gelado (70%) por 24 h a 4°C. Ao final da incubação as células foram lavadas novamente com PBS e em seguida estas foram incubadas por 30 min em uma solução contendo ribonuclease A (RNase A) 0.05% e iodeto de propídio ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). A análise da porcentagem de células em G1, S, G2 e sub-G1 foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences), através do software CellQuest Pro.

#### **4.6. Análise do Mecanismo de Morte: Ensaio Apoptose (Anexina V-FITC/Iodeto de Propídio)**

O procedimento de detecção de apoptose por Anexina V-FITC/Iodeto de Propídio consiste na ligação da anexina V-FITC à fosfatidilserina, na membrana das células que estão iniciando o processo apoptótico, e na ligação do iodeto de propídeo ao DNA das células no processo final da apoptose.

Para detecção de apoptose foi utilizado o Kit de detecção de apoptose Anexina V/Iodeto de Propídio (PI) (BD, Biosciences) de acordo com as instruções do próprio fabricante. Para este ensaio  $5 \times 10^5$  células foram semeadas em microplacas de 12 poços e incubadas na ausência ou presença dos compostos de ouro (III). Após tratamento com o composto as células foram centrifugadas e posteriormente lavadas com PBS. O sobrenadante foi descartado e ao pellet celular foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de tampão anexina e em seguida acrescentados 5  $\mu\text{L}$  de Anexina V-FITC e 1  $\mu\text{L}$  de iodeto de propídio. As células foram então incubadas em temperatura ambiente por 15 min, e posteriormente foi feito à aquisição dos dados em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences). Para análise dos

dados foi utilizado o software Diva.

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

#### **4.7. Fragmentação do DNA por Eletroforese em gel de Agarose**

Para o ensaio de extração de DNA em gel de agarose as células de linhagens tumorais e basais foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos em estudo por 48 h, incubados na estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e a 37°C. Uma quantidade de 2 x 10<sup>6</sup> células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos por 48 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram retiradas do tratamento e centrifugadas e lavadas com PBS. As células foram ressuspensas a uma concentração de 1 x 10<sup>6</sup> células/ mL em um tampão de extração (Tris-HCl, Na<sub>2</sub>EDTA e SDS) e tratadas com 20 mg·L<sup>-1</sup> de RNase a 37°C por 60 min. Passado o tempo, as células foram incubadas com proteinase K a 37°C por 60 min. Depois da ação da proteinase K, foi adicionada solução salina e centrifugada. O sobrenadante foi então coletado e um volume igual de etanol gelado foi adicionado. As amostras foram centrifugadas a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os pellets dissolvidos em tampão TE e guardado em ultra-freezer (-80°C) até o momento de uso.

A concentração de DNA foi detectada por UV utilizando um espectrofotômetro (Beckman DU-640). O DNA foi transferido para um gel de agarose, que foi submetido a uma eletroforese a 100 V/cm por 90 min. O DNA foi visualizado nos géis através de transiluminação por ultravioleta, após a coloração por brometo de etídio utilizando um sistema de imageamento Omega<sup>®</sup> (UltraLum Inc. Claremont, CA, EUA).

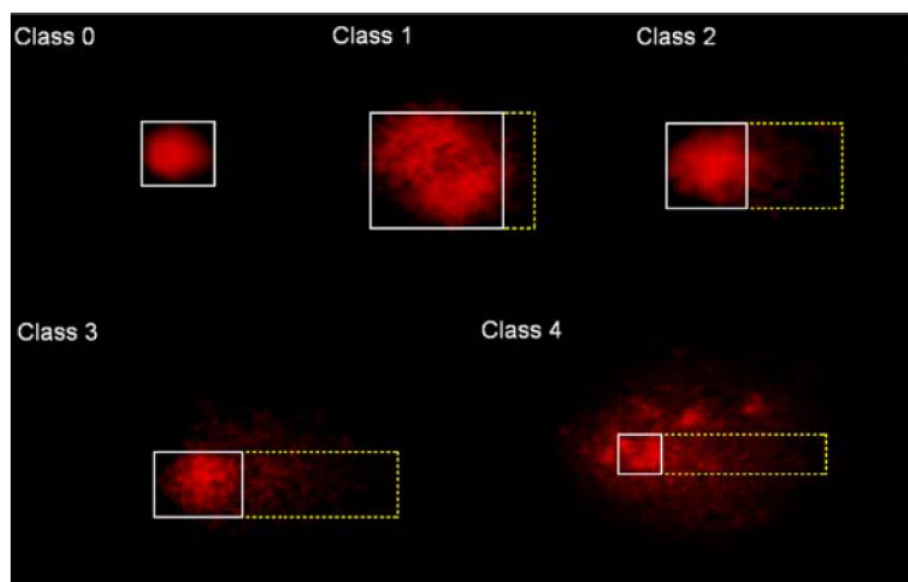
#### **4.8. Ensaio de genotoxicidade (Teste Cometa)**

O Ensaio Cometa é um método versátil e sensível para a detecção de quebras de fita simples e dupla no DNA. Ele tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta para avaliação das respostas celulares aos danos causados ao

DNA. O princípio deste teste consiste em isolar células individualizadas em uma matriz de agarose e submetê-la a uma etapa de lise celular onde restará apenas o conteúdo do DNA nuclear aderido a essa matriz (GONTIJO & TICE, 2003).

Para detecção de danos ao DNA, foi utilizada a versão alcalina do ensaio cometa segundo Singh (1988), onde  $1 \times 10^5$  de células foram semeadas na ausência ou presença dos complexos de ouro por 48 h. Após tratamento, a suspensão de células foram homogeneizadas com 100 $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), e então colocadas em lâminas que já continham agarose padrão (1,5%). Estas lâminas foram posteriormente colocadas a 4 °C por 10 min e em seguida colocadas em solução de lise (2,4 M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris, 10% DMSO and 1% Triton-X, pH 10) por 24 h. Após etapa de lise as lâminas foram transferidas para cuba de eletroforese contendo tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH ~13) à 4°C, em corrente de 25V, 300mA. Na etapa seguinte as lâminas foram retiradas da cuba de eletroforese e posteriormente submetidas a uma solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 min, após a secagem das lâminas elas foram então fixadas com álcool etílico absoluto e posteriormente coradas com brometo de etídio e analisadas por microscopia de fluorescência (Leica application suite V3). Os cometas foram classificados pelo software CometScore 15, em classes: ausência de cauda, ou seja, sem dano (classe 0); cauda menor do que o diâmetro da cabeça (classe 1); cauda até duas vezes o diâmetro da cabeça (classe 2); cauda maior que duas vezes o diâmetro da cabeça (classe 3) e sem cabeça (classe 4) (Figura 13).

**Figura 13** - Imagem representativa da migração de DNA no teste de cometa (RIBEIRO et al., 2009).



Para o cálculo do índice de dano (ID) (Equação 1) foi utilizada a seguinte fórmula de acordo com Cavalcanti et al., 2008:

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

Onde n = número de núcleos de cada classe analisada. Desta forma o índice de dano para 100 nucleóides variou de zero (completamente sem danos 0 X 100) a 400 (totalmente danificadas 100 X 4).

#### 4.9. 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, California, 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°C, onde permaneceram até serem submetidas a RT-qPCR.

#### 4.10. 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<sub>2</sub> e diluídas em tampão TBS a uma concentração final de 2,5 x 10<sup>6</sup> células/mL. Foi realizada então uma PCR quantitativa em tempo real, utilizando-se *primers* específicos para os genes estudados (Caspases 3, 8 e 9), 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., Tokyo, Japan).

Para as qPCR, 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/ $\mu$ l. A transcrição reversa, síntese de DNA dupla-fita e desligamento do cDNA, foram realizados de acordo com o protocolo sugerido pela literatura científica.

Diferenças na expressão dos genes em estudo, entre os grupos células, foram avaliadas mediante a estimativa da eficiência de amplificação. As diferenças de expressão dos genes foram apresentadas em relação ao grupo controle.

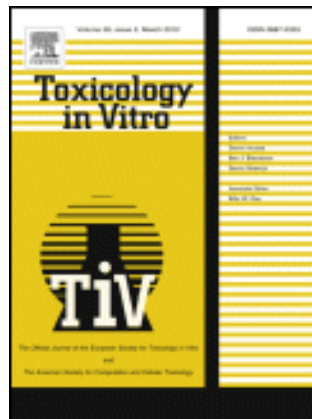
#### **4.11. Análise estatística**

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

**5. CAPÍTULO 1 – Artigo:** Induction of apoptosis by a sparfloxacin gold(III) complex in the murine melanoma cell line B16-F10

## ARTIGO

**Induction of apoptosis by a sparfloxacin gold(III) complex in  
the murine melanoma cell line B16-F10**



**Revista:** Toxicology in Vitro

**Fator de impacto:** 2,54

**Induction of apoptosis by a sparfloxacin gold(III) complex in the murine  
melanoma cell line B16-F10**

Paula Roberta Nunes<sup>a</sup>, Hellen Karine Paes Porto<sup>a</sup>, Wanderson Lucas Pereira<sup>a</sup>,  
Bruno Pereira de Carvalho<sup>a</sup>, Flávia de Castro Pereira<sup>a</sup>, Ligiane R. Gouvea<sup>b</sup>, Letícia  
R. Teixeira<sup>b</sup>, Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa<sup>a</sup>, Aliny Pereira de Lima<sup>a</sup>  
Elisângela de Paula Silveira Lacerda<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, Goiás, Brazil;

<sup>b</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo  
Horizonte (MG), Brazil.

\*Corresponding author: Elisângela de Paula Silveira Lacerda, email:  
[silveiralacerda@gmail.com](mailto:silveiralacerda@gmail.com)

Laboratório de Genética Molecular e Citogenética  
Instituto de Ciências Biológicas – ICB I – Sala 202  
Universidade Federal de Goiás  
Campus Samambaia (Campus II)  
Cx. Postal: 131  
Goiânia-GO, Brasil – 74001-970  
Phone/Fax +55-62-3521-1481  
Cell Phone +55-62-9293-3121

## Abstract

Transition metal complexes have been the subjects of several studies that aimed to develop new therapeutic drugs. Gold-based complexes, such as auranofin, have been investigated for many decades and are currently used to treat rheumatoid arthritis; however, *in vitro* studies have been conducted to discover new gold-based drugs that are more efficient and less toxic than the currently available drugs. This study aims to demonstrate the cytotoxic and apoptotic potential of a new gold(III) complex with the antibiotic sparfloxacin (SPAR),  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ , against the murine melanoma cell line B16-F10 and the murine lung fibroblast cell line L-929. The results from the cytotoxicity assay revealed that  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  has an  $\text{IC}_{50}$  of 45  $\mu\text{M}$  for the cell line B16-F10 and 65.1  $\mu\text{M}$  for the normal cell line L-929. In addition,  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  induced late apoptosis in both cell lines after treatment for 48 h, with no changes in cell cycle kinetics. The compound was deemed to have no genotoxic effects because it did not cause DNA damage to the cells after treatment for 48 h.

**Keywords:** Apoptosis, gold(III) complex, cytotoxicity, antibiotic, sparfloxacin, B16-F10, DNA damage.

## Introduction

Transition metal complexes (TMC) have been the focus of several studies because of their therapeutic potential and biological action (Beirith et al. 1999). Gold-based complexes are TMCs that have been used for several decades in the treatment of rheumatoid arthritis, malaria and asthmatic bronchitis and for their activity against cancer cells and HIV (Shaw, 1999).

Auranofin is an orally administered drug that has been used for the treatment of rheumatoid arthritis since the 1970s (Shaw, 1999). During the early 1980s, it was determined that auranofin increased the life span of P388 leukaemia-bearing mice compared with cisplatin (Mirabelli et al., 1985; Simon et al., 1981) and demonstrated cytotoxicity activity in HeLa cells (Simon et al., 1979). Cytotoxic tests were performed with gold complexes against the murine cell lines P815, B16 and P388 with the goal of discovering compounds with  $IC_{50}$  values (concentration of the compound that inhibits 50% of cells) comparable to the  $IC_{50}$  of cisplatin (Mckeage et al., 1998).

Au(I) and Ag(III) metal complexes containing the antibiotic sulfamethoxazole as a ligand have been evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. These complexes exhibited greater activity compared with other antibiotic complexes; thereby suggesting that metal complexation increases the biological potential of drugs (Rocha et al., 2010). In addition, the fluoroquinolones are an important class of synthetic antibiotics developed through the structural modification of quinolones, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria (Brighty & Gootz, 2000); the complexation of metals to fluoroquinolones increases their biological activities (Psomas et al., 1998).

With increased research on gold complexes, various hypotheses regarding their mechanism of action have been proposed. However, the molecular and biochemical mechanisms responsible for their biological effects are still unknown (Nobili et al., 2009).

Based on the biological potential of gold complexes, the aim of this study was to evaluate the cytotoxicity, genotoxicity and the effects of the  $[AuCl_2(SPAR)]Cl$  complex against the tumour cell line B16-F10 (murine melanoma) and the normal cell line L-929 (murine lung fibroblasts) in the cell cycle and the mechanism of death by apoptosis.

## Methods

### 2.1. Complex synthesis

The gold(III) complex was synthesised by the Chemistry Department at the Federal University of Minas Gerais (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG) under the supervision of Professor Dr. Leticia R. Teixeira and was transferred to the Laboratory of Molecular Genetics and Cytogenetics of the Federal University of Goiás (Universidade Federal de Goiás - UFG).

The gold (III) complex was obtained by dissolving 0.25 mmol of the ligand sparfloxacin (SPAR) in approximately 40 mL of methanol. After dissolution of the ligand, 0.25 mmol of  $\text{HAuCl}_4$ , also dissolved in methanol, was added to the reaction. The mixture was placed under reflux and agitated for approximately 24 h. The precipitate that formed was filtered and dried under vacuum, and a new complex,  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ , was obtained (Figure 1).

### 2.2. Cell culture

The murine melanoma B16-F10 (ATCC CRL-6475<sup>TM</sup>) and basal murine lung fibroblast L-929 (ATCC CCL-1<sup>TM</sup>) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA).

The adherent cell line B16-F10 was cultured in RPMI 1640 medium (pH 7.2-7.4) (Sigma Chemical Co., MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU  $\text{mL}^{-1}$  penicillin and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin and was incubated at 37°C and 5%  $\text{CO}_2$ . The murine fibroblast cell line L-929 was cultured in DMEM medium (pH 7.2-7.4) supplemented with 10% FBS, 100 IU  $\text{mL}^{-1}$  penicillin, 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1.5  $\text{g L}^{-1}$  sodium bicarbonate, 4.5  $\text{g L}^{-1}$  glucose and 10 mM HEPES and was incubated at 37°C and 5%  $\text{CO}_2$  (all reagents were obtained from Gibco, Grand Island, NY).

### 2.3. Viability (MTT) assay

The effect of the complex  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  and the ligand (SPAR) on the viability of B16-F10 and L-929 cells was evaluated by the MTT (3-(4,5-

Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay as described by Mosman (1983). Culture medium without cells was used as a negative control, whereas cisplatin treatments at the same concentrations tested were used as positive controls. Briefly,  $1 \times 10^4$  cells (B16-F10 and L-929) were seeded in 96-well plates and treated with different concentrations of  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  and the ligand SPAR (0.2 mM, 2 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM or 200 mM) for 48 h. The *cis*-diamminedichloroplatinum(II), cisplatin, was used as positive control. After treatment, the supernatant was discarded, 40 mL of PBS and 10 mL of MTT ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) were added to each well, and the plate was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 5 h. Purple formazan crystals were dissolved in 50 mL of 10% SDS. Optical density (OD) quantification was performed on a spectrophotometer (Awareness Technology INE/ Stat Fax 2100). The  $\text{IC}_{50}$  value was determined by concentration response curves using the statistical software GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### **2.4. Cytotoxicity (LDH) assay**

B16-F10 plasma membrane damage was evaluated by measuring the amount of LDH released into 25  $\mu\text{L}$  of the culture medium collected from each well. LDH activity was determined by a colorimetric assay according to the manufacturer's instructions (Doles Reagents Ltda, Goiânia, GO, Brazil).

#### **2.5. Cell cycle analysis**

B16-F10 cells were treated with  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  (30, 45 and 100  $\mu\text{M}$ ) for 48 h. Briefly,  $5 \times 10^5$  cells were centrifuged, washed with PBS, fixed with cold 70% ethanol and stored overnight in a freezer at  $-20^\circ\text{C}$ . The fixed cells were washed with PBS, incubated with RNase for 30 min at  $37^\circ\text{C}$ , centrifuged and incubated with a propidium iodide solution (PI; Sigma). The cells were incubated at  $4^\circ\text{C}$  in the dark and analysed by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences). The percentage of cells in G0/G1, S, G2/M and sub-G1 was determined using CellQuest Pro (BD Biosciences). This assay was performed according to the manufacturer's instructions of BD Biosciences.

## 2.6. Apoptosis assay (Annexin V-FITC/Propidium Iodide)

For apoptosis detection, an Annexin V-FITC/Propidium Iodide (PI) kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) was used according to the manufacturer's instructions. For this assay,  $5 \times 10^5$  cells (B16-F10) were seeded in 12-well microplates and incubated with and without  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ . After treatment, the cells were centrifuged and then washed with PBS. The supernatant was discarded, and 200  $\mu\text{L}$  of Annexin buffer was added to the cell pellet followed by 5  $\mu\text{L}$  of Annexin V-FITC and 1  $\mu\text{L}$  of PI. The cells were incubated at room temperature for 15 min and subsequently analysed by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences). Data analysis was performed using CellQuest Pro (BD Biosciences).

Cells in early apoptosis are only stained with Annexin-V (AN+)/(PI-), cells in late apoptosis exhibit double staining with Annexin V and PI (AN+)/(PI+) and viable cells remain unstained (Annexin-V) /(AN-)/(PI-). This assay was performed according to the manufacturer's instructions of BD Biosciences.

## 2.7. DNA fragmentation analysis

For DNA analysis by agarose gel electrophoresis,  $2 \times 10^6$  (BF16-F10 and L-929) cells were treated with different concentrations of the compounds (30, 45 and 100  $\mu\text{M}$ ) for 48 h at 37°C and 5%  $\text{CO}_2$ . After 48 h, the cells were collected, pelleted by centrifugation and washed with PBS. The pellets were resuspended at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  in extraction buffer (Tris-HCl,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  and SDS) and treated with 20  $\text{mg L}^{-1}$  RNase at 37°C for 1 h followed by proteinase K at 37°C for 1 h. After treatment with proteinase K, a saline solution was added, and the lysate was clarified by centrifugation. The supernatant was collected, and an equal volume of cold absolute ethanol was added followed by centrifugation at 4°C. The supernatant was discarded, and the DNA pellets were dissolved in buffer.

The concentration of the DNA was determined by UV spectrophotometry (Beckman DU-640). The DNA was separated by electrophoresis on an agarose gel at 100 V/cm for 1.5 h. The gels were subsequently stained with ethidium bromide, and the DNA was visualised on the ultraviolet transilluminator using the Omega® imaging system (UltraLum Inc. Claremont, CA, USA).

## 2.8. Comet assay

For the detection of DNA damage, the alkaline comet assay described by Singh (1988) was used. Briefly,  $1 \times 10^5$  cells (B16-F10 and L-929) were seeded in the absence or presence of  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  complexes for 48 h. After treatment, the cell suspension was homogenised with 100  $\mu\text{L}$  of low-melting-temperature agarose (0.5%) and placed on slides containing standard agarose (1.5%). The slides were subsequently placed at 4°C for 10 min and then placed in lysis buffer (2.4 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO and 1% Triton-X, pH 10) for 24 h. After the lysis step, the slides were transferred to an electrophoresis chamber containing buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13) at 4°C under 25 V and 300 mA. Subsequently, the slides were removed from the electrophoresis chamber and placed in a neutralisation solution (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) for 15 min. After drying, the slides were fixed with absolute ethanol, stained with ethidium bromide and analysed by fluorescence microscopy (Leica Application Suite V3). Comets were classified by CometScore 15 and assigned to one of the following classes: no tail, that is, no damage (class 0); tail smaller than the diameter of the head (class 1); tail up to two times the diameter of the head (class 2); tail more than twice the diameter of the head (class 3); and headless (class 4).

To calculate the damage index (DI) (Equation 1), the formula was used according to Cavalcanti et al., 2008:

$$\text{DI} = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4) \quad (1)$$

where  $n$  = the number of nuclei of each analysed class. Thus, the damage index for 100 nucleoids ranges from zero (completely undamaged  $0 \times 100$ ) to 400 (completely damaged  $100 \times 4$ ).

## 2.9. Real-time quantitative PCR

B16-F10 cells were treated with 45  $\mu\text{M}$  of  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) for 3 or 6 h. Total RNA was extracted with the TRIzol reagent (Sigma-Aldrich, USA) following the manufacturer's protocol. cDNA was produced from 2.0  $\mu\text{g}$  of total RNA with random priming (Applied Biosystems, USA) in a 20  $\mu\text{L}$  reaction according to the manufacturer's protocol. Real-time quantitative PCR (qPCR) reactions were then performed in a 20  $\mu\text{L}$  reaction mixture containing 2  $\mu\text{L}$  of cDNA, 10  $\mu\text{L}$  of SYBR

Green PCR Master Mix (LGC Biotechnology, UK) and 2.0  $\mu$ L each of 500 nM forward and reverse primers. PCR amplification was performed with one cycle of 60 s at 95 °C followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 15 s at 60 °C and 45 s at 72 °C. Differences in caspase-3 expression levels were determined relative to the control group using the formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Schmittgen & Livak, 2008).

## 2.10. Statistical analysis

For the MTT, comet and LDH data analyses, one-way ANOVA and the Tukey or Dunnett's post-test were used, with a significance of  $p < 0.05$  for group comparisons. For the cell cycle and apoptosis analyses, two-way ANOVA and the Bonferroni post-test were applied. Analyses were performed in GraphPad Prism 3.02. For all groups, data with  $p$  values less than 0.05 ( $p < 0.05$ ) were considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Viability (MTT) analysis

The  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  complex was tested against the cancer cell line B16-F10 to evaluate its cytotoxic potential. The L-929 fibroblast cell line was used to evaluate and compare the drug's activity against a normal cell line.  $\text{IC}_{50}$  values calculated from the concentration-response curve of the MTT assay after treatment for 48h are listed in Table 1. The ligand SPAR showed no cytotoxic activity against B16-F10 as shown in Figure 2, with no calculated  $\text{IC}_{50}$  value ( $\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{M}$ ).  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  exhibited an  $\text{IC}_{50}$  value of 45  $\mu\text{M}$  in B16-F10 cells whereas the cisplatin exhibited an  $\text{IC}_{50}$  value of 86  $\mu\text{M}$  in B16-F10. So, the complex was approximately 1.9 times more effective than the cisplatin. The complex also showed a cytotoxic activity 1.4 times higher in B16-F10 than in L-929 cells.

### 3.2. Cytotoxicity (LDH) assay

The LDH assay revealed that  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  damaged the B16-F10 plasma membrane and that this damage was concentration dependent, as increasing

concentrations produced more cell membrane damage. A 3.8-fold increase in LDH concentrations was observed at the IC<sub>50</sub> (45 µM) compared with the negative control, whereas a concentration of 100 µM produced a 5-fold increase (Figure 3).

### 3.3. Cell cycle analysis

The [AuCl<sub>2</sub>(SPAR)]Cl complex did not alter cell cycle kinetics, and the cell cycle distribution did not change significantly after treatment for 48 h. Moreover, the proportion of cells in G0/G1 in the control group was similar to that in the drug treatment groups; however, a 5% increase in the number of cells in G0/G1 in the IC<sub>50</sub> group compared with the control group was observed (Figure 4), although this difference was not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

### 3.4. Analysis of apoptosis by flow cytometry

In the Annexin-V/PI apoptosis assay performed on B16-F10 cells, treatment with 30 µM of [AuCl<sub>2</sub>(SPAR)]Cl for 48 h resulted in no significant difference in the frequency of apoptosis or necrosis compared with the untreated negative control. However, when cells were treated at the IC<sub>50</sub> (45 µM) for 48 h, approximately a 30% decrease in cell viability and a 32% increase in the rate of apoptosis was observed compared with the untreated negative control. No significant change was found in the necrosis index (Figure 5). These data suggest that treatment with 45 µM [AuCl<sub>2</sub>(SPAR)]Cl for 48 h induces late apoptosis in B16-F10 cancer cells.

### 3.5. DNA fragmentation analysis

A DNA fragmentation assay performed on B16-F10 cells revealed that [AuCl<sub>2</sub>(SPAR)]Cl did not induce the DNA degradation pattern that is usually observed during apoptosis. However, a reduction in the density of the DNA band was observed in cells treated with 30, 45 and 100 µM by [AuCl<sub>2</sub>(SPAR)]Cl compared with the untreated negative control (Figure 6).

### 3.6. Comet assay analysis

The comet assay showed a low DNA damage index (DI) in B16-F10 and L-929 cells treated with  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  compared with the untreated negative control. Treatments at the indicated concentrations (Figure 7) did not show statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

The 'tail:head' ratio, which identifies DNA migration to the tail of the comet, confirms the DI that showed no DNA degradation in the cell lines treated with different concentrations of  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  (Figure 8). The tail: head ratios ranged from 0.16 to 0.24 for the normal and cancer cell lines compared with the untreated control, respectively, indicating no statistically significant difference.

### 3.7. Quantification of caspase-3 expression by qPCR

qPCR was used to determine the effects of  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  on caspase-3 mRNA expression. The level of caspase-3 transcripts was significantly higher after 6 h of exposure to  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ , with a 9-fold increase compared with the control, thereby demonstrating that caspase-3 expression is time dependent, as shown in Figure 9.

## Discussion

Gold(III) complexes have been studied because of their electronic similarity with platinum(II). These characteristics led to the development of new gold(III) complexes that may have antitumor activities similar to or better than platinum complexes (Messori et al., 2000; Shaw, 1999; Tiekink, 2002). To discover new compounds that are effective against cancer, it is necessary to study their cytotoxic activity. While free SPAR did not present cytotoxicity activity, the coordination to gold(III) led to the  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  complex with significant cytotoxic activity against the tumour cell line B16-F10 (45  $\mu\text{M}$ ) compared with the fibroblast cell line L-929 (65.1  $\mu\text{M}$ ). This complex is also more active than the cisplatin, which is the reference drug.

The increased LDH concentration in the supernatant confirms the data obtained in the MTT assay, thereby demonstrating the cytotoxic potential of  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  and that its activity is concentration dependant.

Data in the literature regarding the effective concentrations of other gold complexes in the cell line B16-F10 were lower than the data found in this study. For example, in the studies performed by Mirabelli et al. (1986) and McKeage et al. (1998), the effective concentrations were 112 times and 82 times lower, respectively, compared with the results obtained in the present study. However, the lower cytotoxic activity of  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  may be related to the reduced activity of the ligand because it showed no cytotoxicity against the cell lines tested. These results imply that the cytotoxic effect of  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  is due to the joint action of gold and the ligand sparfloxacin.

In the literature, there are numerous reports that emphasise the antitumour potential of several gold-derived compounds (Tiekink, 2002; Sadler, 1976; Shaw, 1999). Using clonogenic assays, Mirabelli et al. (1986) studied the cytotoxic potential of 62 gold-based compounds with different ligands against the murine cancer cell lines B16 and P388. The  $\text{IC}_{50}$  for the B16 cell line ranged from 0.4 to 200  $\mu\text{M}$  and from 9 to 91  $\mu\text{M}$  for the P388 cell line. McKeage et al. (1998) demonstrated that seven gold(I) compounds exhibited significant cytotoxic activity against the cancer cell lines B16, P388 and P815. The  $\text{IC}_{50}$  for each cell line varied from 0.55 to 5.20  $\mu\text{M}$  (B16), 0.10 to 5.80  $\mu\text{M}$  (P388) and 0.22 to 9.25  $\mu\text{M}$  (P815).

DNA is thought to be the main target of action of metal-derived drugs with antitumour activities as has been previously observed with platinum(II)- and ruthenium(III)-based complexes (Brabec & Novakova, 2006; Gallori et al., 2000).

Due to its characteristics and advantages, the comet assay is used for toxicogenetic testing because it detects DNA damage that may result in mutations (Tice et al., 2000; Rosa et al., 2007). Here, the results from the comet assay revealed that  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  was not genotoxic toward the cell lines B16-F10 and L-929 because there was no significant DNA damage in any of the lines. These results suggest that  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  did not break directly the nuclear material; it is likely that another biological target triggers its mechanism of action.

The mechanism of action for gold-based complexes is not fully understood. Nobili et al. (2009) proposed three possible mechanisms of action for gold complexes, which were classified into three different drug groups. The first group

describes the gold compounds that act as pro-drugs and firmly coordinate the biomolecules, such as auranofin. The second group includes the gold compounds that have the ability to cross the cell membrane and bind to biomolecules, with activities similar to those of platinum complexes that bind to DNA. The third group comprises the gold complexes that react with biomolecules through oxidoreduction, causing oxidative damage and cell death. Our results suggest that the  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  complex is a member of the third group, in which cell death is linked to oxidative stress induced by the compound.

Cell cycle interference is a common mechanism of several antitumour chemotherapeutic drugs (Tu et al., 2009). Mueller et al. (2006) found that cisplatin arrests cells in the G2/M phase of the cell cycle, thereby inhibiting human tumour cells from synthesising genetic material. Tu et al. (2009) found that HCT-15 cells were arrested in G0/G1, with a 56.1% increase in cell frequency. Contrary to what is reported in the literature,  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  did not interfere with the cell cycle kinetics, that is, the cell cycle was not affected by any of the concentrations tested. However, testing different lengths of treatment could elucidate whether the compound has any effect on the cell cycle of the cell lines tested.

Other studies have suggested that gold-based compounds induce cell death by apoptosis (Rigobello, 2008).  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  showed pro-apoptotic activity in the Annexin V/PI assay, indicating that the cells died by this mechanism after treatment for 48 h at the  $\text{IC}_{50}$ . Tu et al. (2009) demonstrated that a porphyrin gold(III) complex (at concentrations of 1 and 3  $\mu\text{M}$ ) induced significant nuclear morphological changes in HTC-15 cells treated for 24 and 48 h. In addition, the authors reported an increase of up to 37.2% in the number of cells in the sub-G1 phase, which is indicative of apoptotic cells.

Apoptosis is a very important process in many biological systems that can be triggered by a variety of stimuli (Handermaker-Lakhai et al., 2004). The caspase family represents the main component of the apoptotic machinery, consisting of at least 14 different caspase proteases in mammals (Hartinger et al., 2006). In the present study, exposure of B16-F10 cells to 45  $\mu\text{M}$  of  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  significantly increased the number of apoptotic cells, causing significant changes in caspase-3 mRNA expression. Caspase-3 mRNA expression was significantly higher after 6 h of exposure to  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ . Similar to  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ , Rigobello et al. (2008)

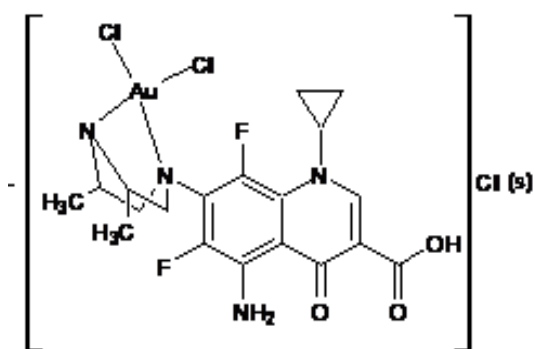
reported that auranofin possesses pro-apoptotic activity via the activation of caspases.

Nuclear DNA fragmentation is a hallmark of apoptosis (Riedl & Salvesen, 2007). Here, DNA fragmentation assays revealed the absence of a banding pattern indicative of degradation. However,  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  demonstrated cytotoxic activity against the B16-F10 cancer cell line, which is concentration dependant, as shown by a decrease in DNA band intensity.

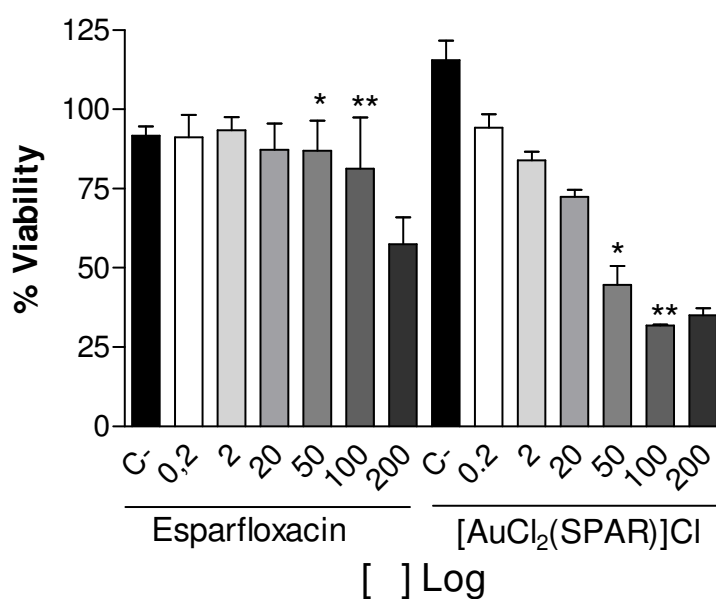
From our results, it can be concluded that  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  was cytotoxic against the tumour cell line B16-F10 and that its mechanism of action probably was not related to interactions with DNA; or, else, that DNA was not the main target, as is found in platinum-derived complexes. However, tests that are more specific should be performed to elucidate the molecular mechanism that induces these tumour cells to undergo apoptosis.

**Table 1** - Inhibitory concentrations ( $\text{IC}_{50}$ ) of  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  against the cell lines B16-F10 and L-929. The values correspond to the average of three independent triplicates.

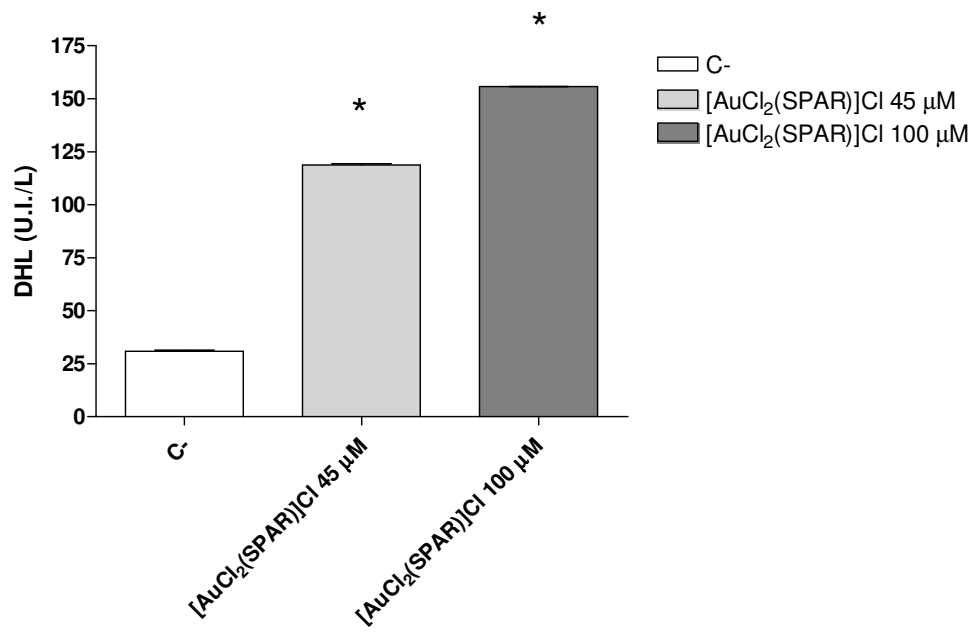
Compound	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	
	L-929	B16-F10
SPAR	>200	>200
$[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$	$65.1 \pm 3.8$	$45 \pm 6.6$
Cisplatin	$37.1 \pm 0.7$	$86 \pm 3.4$



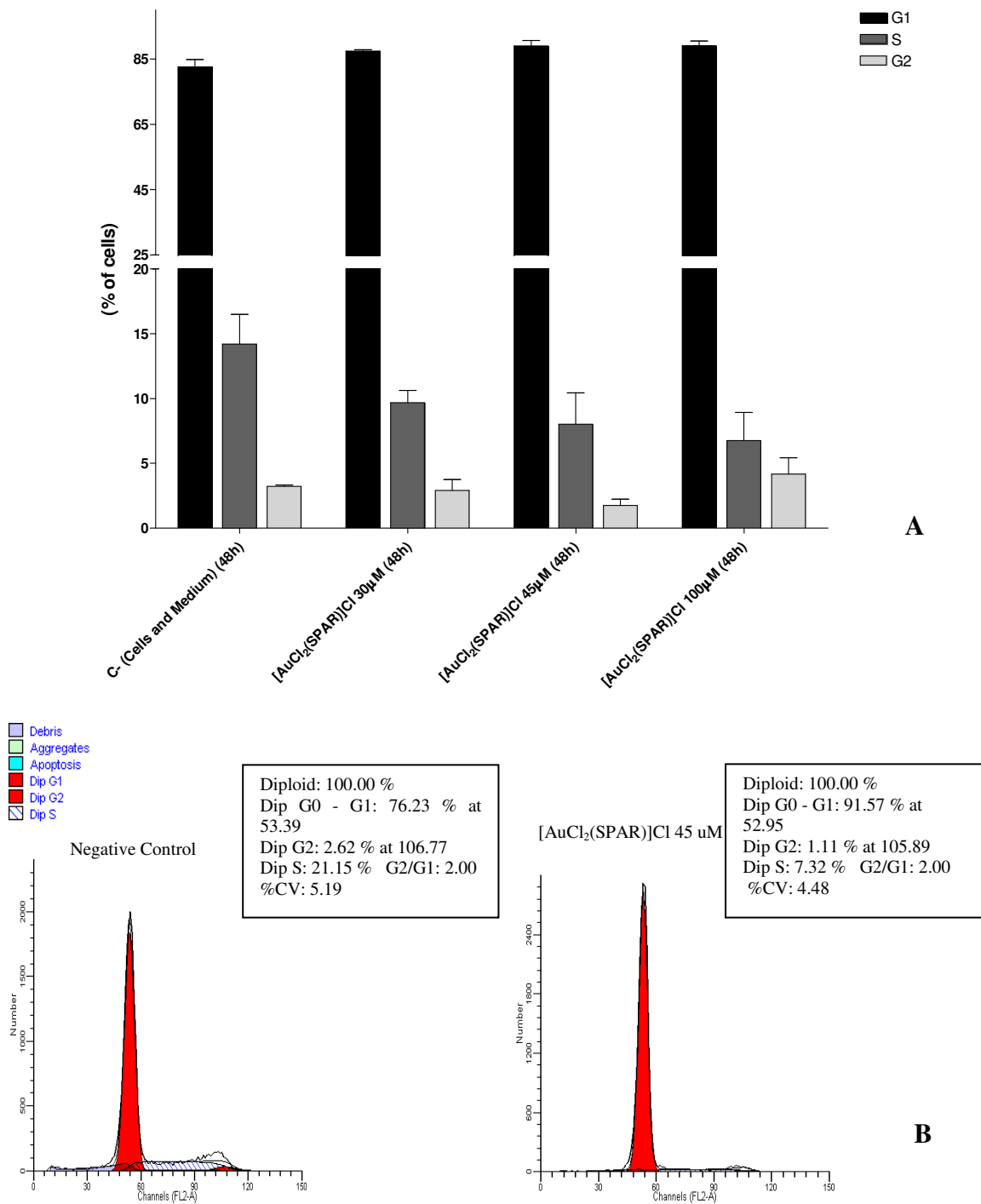
**Figure 1** – Proposed structure for the  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAP})]\text{Cl}$  complex.



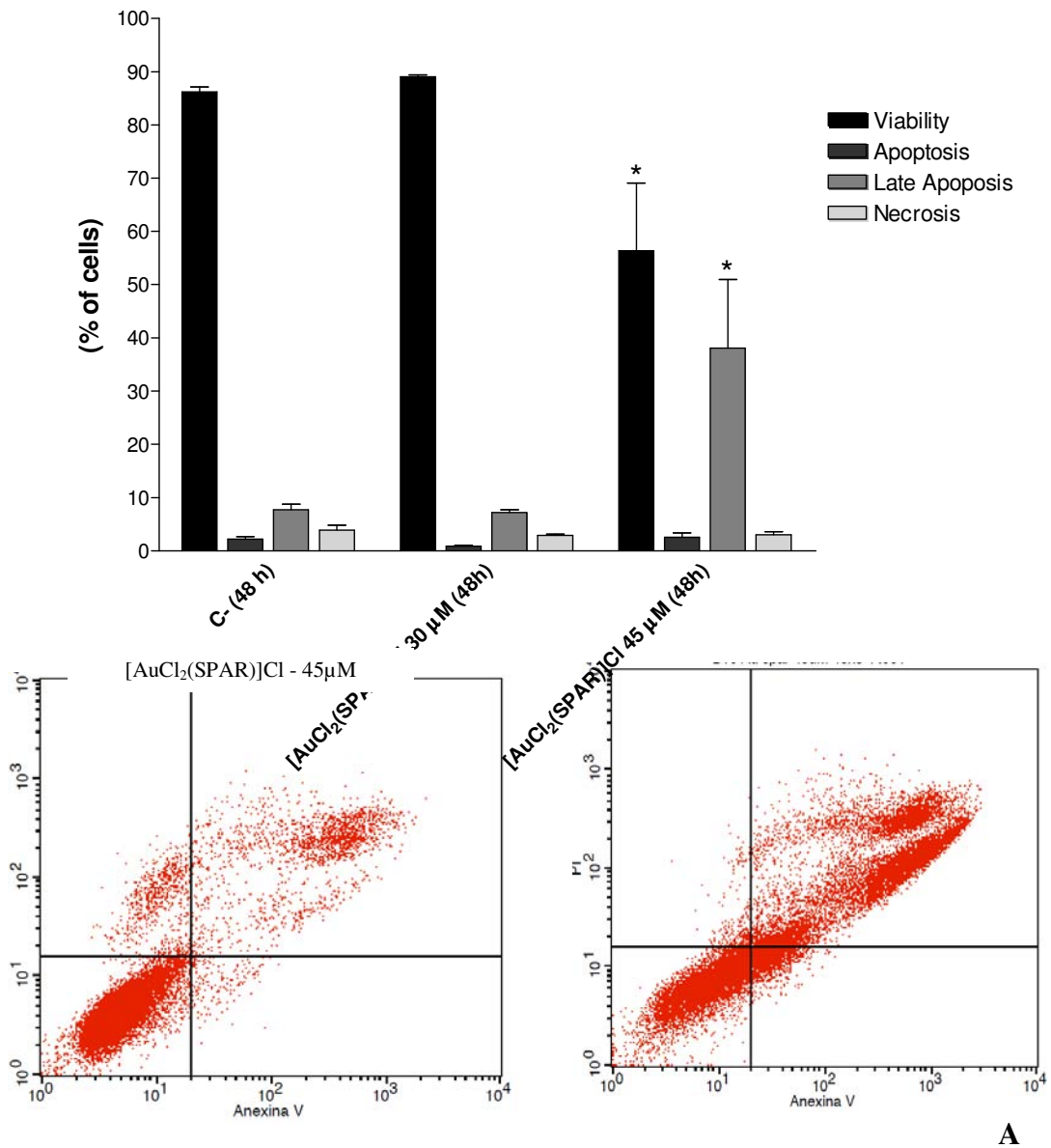
**Figure 2** – Cytotoxic effects of sparfloxacin and  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAP})]\text{Cl}$  on B16-F10 cells after treatment for 48 h. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .



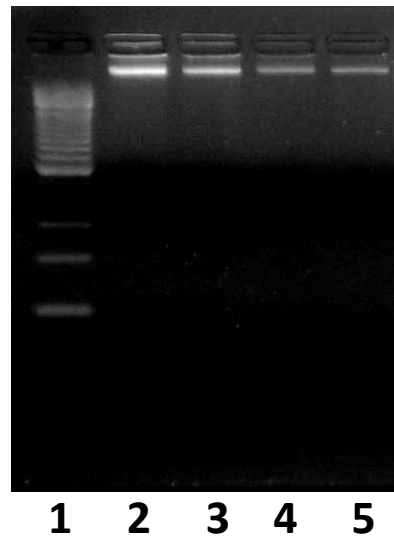
**Figure 3** – Analysis of plasma membrane damage of B16-F10 cells treated for 48 h with [AuCl<sub>2</sub>(SPAR)]Cl by LDH assay. \**p* < 0.05.



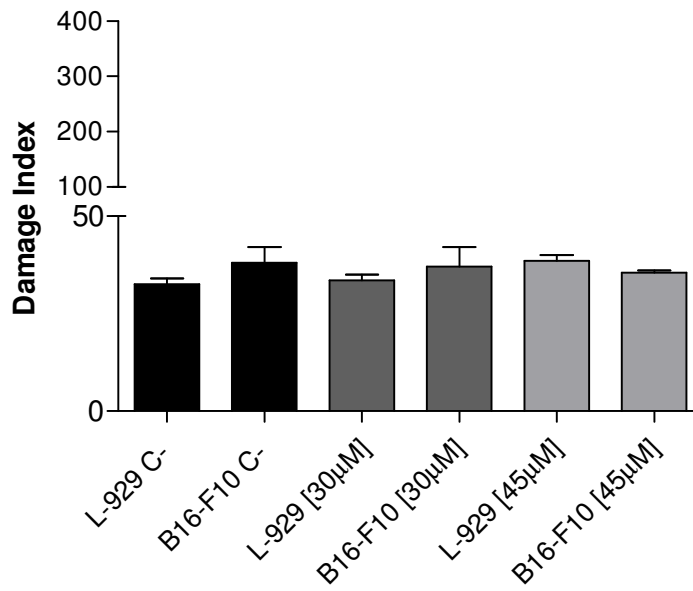
**Figure 4** – B16-F10 cellular kinetics after treatment for 48 h with [AuCl<sub>2</sub>(SPAR)]Cl. (A) Cell cycle distributions at concentrations of 30, 45 and 100 µM were obtained with GraphPad Prism 3.02. (B) ModFit histogram analysis of the negative control and IC<sub>50</sub>. There was no significant change in the cell cycle distribution upon treatment with [AuCl<sub>2</sub>(SPAR)]Cl, 95% significance ( $p > 0.05$ ).



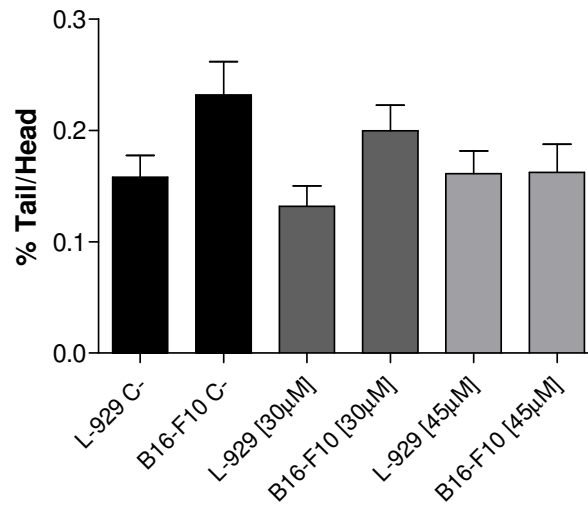
**Figure 5** – B16-F10 cell death distribution after treatment for 48 h with [AuCl<sub>2</sub>(SPAR)]Cl. (A) Annexin V/FITC assays at concentrations of 30 and 45 μM were analysed with GraphPad Prism 3.02. (B) Negative control and IC<sub>50</sub> cytograms were analysed with CellQuest FACSCalibur 3. \**p*<0.05.



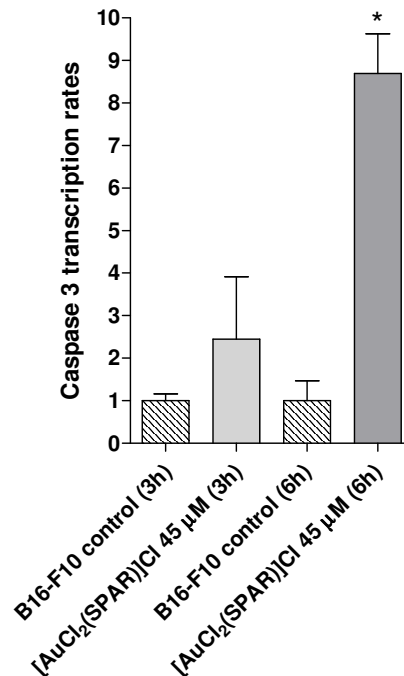
**Figure 6** – DNA fragmentation analysis of B16-F10 cells treated with different concentrations of  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ . (1) 100 bp DNA ladder, (2) negative control, (3) 30  $\mu\text{M}$   $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ , (4) 45  $\mu\text{M}$   $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  and (5) 100  $\mu\text{M}$   $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ .



**Figure 7** – Damage Index (DI) in B16-F10 and L-929 cell lines after treatment for 48 h with  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ . Dunnett's test showed no significant difference ( $p > 0.05$ ).



**Figure 8** – Tail:head ratio distribution for B16-F10 and L-929 cell lines after treatment for 48 h with  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ . Tukey test showed no significant difference ( $p > 0.05$ ).



**Figure 9** - Effect of  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  on caspase-3 mRNA expression as assessed by real-time PCR after treatment for 6 h. \* $p < 0.05$ .

## References

Beirith, A., Creczynski-Pasa, TB, Bonetti, VR, Konzen, M, Seifriz, I, Paula, MMS, Franco, CV, Calixto, JB, 1999. Antinociceptive properties and nitric oxide synthase inhibitory action of new ruthenium complexes. *Eur. J. Pharmacol.* 369, 289-297.

Brabec, V., Nováková, O., 2006. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resistance Updates.* 9. 111-122.

Brighty K.E., Gootz, T.D, 2000. Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials. *J Antimicrob Chemother.* 45, 437-46.

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. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 376, 156-162.

Hartinger, C.G., Zorbas-Seifried, S., Jakupec, M.A., Kynast, B., Zorbas, H., Keppler, B.K., 2006. From bench to bedside - preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachloro bis(1Hindazole) ruthenate(III)] (KP1019 or FFC144). *Journal of Inorganic Biochemistry.* 100, 891-904.

Mckeage, M.J., Berners-Price, S., Ding, L., Galettis, P., Farr, A., Brouwer, W., Baguley, B.C., 1998. Antitumor phosphine complexes of gold(I) and silver(I): relationship between lipophilicity, cellular uptake, and cytotoxicity. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 39, p.1506.

Messori, L., Abbate, F., Marcon, G., Orioli, P., Fontani, M., Mini, E., Mazzei, T., Carotti, S., O'Connell, T., Zanello, P., 2000. Gold(III) complexes as potential antitumor agents: Solution chemistry and cytotoxic properties of some selected gold(III) compounds. *J Med Chem.* 43, 3541-3548.

Mirabelli, C.J., Johnson, R.K., Hill, D.T., Faucette, L., Girard, G.R., Kuo, G.Y., Sung, C.M., Crooke, S.T., 1986. Correlation of the *in vitro* cytotoxic and *in vivo* antitumor activities of gold(I) coordination complexes. *J. Med. Chem.* 29, 218-223.

Mirabelli, C.J., Johnson, R.K., Sung, C.M., Faucette, L., Muirhead, K., Crooke, S.T., 1985. Evaluation of the *in vivo* antitumor activity and *in vitro*. *Cancer Res.* 45, 32-39.

Mosman, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 16, 55-63.

Mueller, S., Schittenhelm, M., Honecker, F., Malenke, E., Lauber, K., Wesselborg, S., Hartmann, J.T., Bokemeyer, C., Mayer, F., 2006. Cell-cycle progression and response of germ cell tumors to cisplatin *in vitro*. *Int J Oncol.* 29,471-479.

Nobili, S., Mini, E., Landini, I., Gabbiani, C., Casini, A., Messori, L., 2009. Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies. *Medicinal Research Reviews.* 30, 550-580.

Psomas, G., Dendrinou-Samara, C., Philippakopoulos, P., Tangoulis, V., Raptopoulou, C.P., Samaras, E., Kessissoglou, D.P., 1998. CU<sup>II</sup>-HERBICIDE COMPLEXES: STRUCTURE AND BIOACTIVITY. *INORG. CHIM. ACTA.* 272, 24-32.

Rademaker-Lakahai, J.M., Bongard, D.V.D., Pluim, D., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M., 2004. A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent. *Clinical Cancer Research.* 10, 3717-3727.

Riedl, S.J., Salvesen, G.S., 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8, 405–413.

Rigobello M.P., Folda, A., Dani, B., Menabò, R., Scutari, G., Bindoli, A., 2008. Gold(I) complexes determine apoptosis with limited oxidative stress in Jurkat T cells. *Eur J Pharmacol.* 582, 26–34.

Rocha, D.P., Pinto, G.F., Ruggiero, R., Oliveira, C.A., Guerra, W., Fontes, A.P.S., Tavares, T.T., Marzano, I.M., Pereira-Maia, E.C., 2010. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. *Quim. Nova.* XY, 1-8.

Rosa, R.M., Hoch, N.C., Furtado, G.Y., Saffi, J., Henriques, J.A., 2007. DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. *Mutation Research.* 6, 35-45.

Sadler, P.J., 1976. The biological chemistry of gold: a metallo-drug and heavy-atom label with variable valency. *Struct Bond.* 29,171–214.

Schmittgen, D. S., Livak, K., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. 3, 1101-1108.

Shaw, C.F.III., 1999. Gold-Based therapeutic agents. *Chemical Reviews*.

Simon, T.M., Kunishima, D.H., Vibert, G.J., Lorber, A., 1979. *Cancer Res.* 44, 1965-1975.

Simon, T.M., Kunishima, D.H., Vibert, G.J., Lorber, A., 1981. Screening Trial with the Coordinated Gold Compound Auranofin Using Mouse Lymphocytic Leukemia P388. *Cancer Res.* 41, 94-97.

Singh, N.P., Mc Coy, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low DNA levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlison, B., Hartmann, A., Kabayashi, H.; Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J., Susaki, Y., 2000. Single cell/gel comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.

Tiekink, E.R.T., 2002. Gold derivatives for the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 42, 225-248.

Tu, S., Sun, R.W., Lin, M.C.M., Cui, J.T.A., Zou, B., Gu, Q., Kung, H., Che, C., Wong, B.C.Y., 2009. Gold(III) porphyrin complexes induce apoptosis and cell cycle arrest and inhibit tumor growth in colon cancer. *Cancer.* 115, 4459-4469.

**6. Capítulo 2 – Artigo:** Unusual fluorquinolone gold(III) chelates as potential anticancer agents: Relevance of DNA and protein interactions for their mechanism of action

**Unusual fluorquinolone gold(III) chelates as potential anticancer agents:  
Relevance of DNA and protein interactions for their mechanism of action**

Ligiane R. Gouvea<sup>a</sup>, Luciene S. Garcia<sup>b</sup>, Daniela R. Lachter<sup>b</sup>, Paulo J. S. Barbeira<sup>a</sup>,  
Rosane A. S. San Gil<sup>c</sup>, Paula Roberta Nunes<sup>d</sup>, Elisângela P. Silveira-Lacerda<sup>d</sup>,  
Letícia R. Teixeira<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte (MG), Brazil.*

<sup>b</sup>*Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 22653-900, Rio de Janeiro (RJ), Brazil.*

<sup>b</sup>*Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-901, Rio de Janeiro (RJ), Brazil.*

<sup>d</sup>*Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia (GO), Brazil.*

\*Corresponding author. Tel.: 55-31-3409-5764; fax: 55-31-3409-5700. E-mail address: [lregina@qui.ufmg.br](mailto:lregina@qui.ufmg.br) (Leticia R. Teixeira)

## Abstract

Quinolones are known for their antimicrobial and antitumor activities. Gold(III) compounds constitute an emerging class of biologically active substances, of special interest as potential anticancer agents. In this work three gold(III) complexes of the fluorquinolones antimicrobial agents norfloxacin (NOR), levofloxacin (LEV) and sparfloxacin (SPAR) have been prepared and characterized with physicochemical and spectroscopic techniques. In these complexes, NOR, LEV and SPAR acts as a bidentate neutral ligands bound to the gold(III) through the nitrogen atoms of the piperazine ring, which is an unusual mode of coordination for this class of compounds. Two chloride ions occupy the remains coordination sites.

The cytotoxic activity of the fluorquinolones and their gold(III) complexes was tested against the A20 (murine lymphoma), and K562 (human myeloid leukemia) tumor cell lines as well as the MCR-5 (human lung fibroblasts) normal cell line. All complexes were more active than their corresponding free ligands. Complex  $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}$  revealed to be the most active among all tumor cell lines, with  $\text{IC}_{50} = 25\text{-}61 \mu\text{M}$ .

Spectroscopic titration with calf-thymus DNA (CT DNA) has shown that the complexes can bind to CT DNA, probably by the intercalative mode. The complexes exhibit good binding propensity to bovine serum albumin (BSA) proteins having relatively high binding constant values.

Keywords: Fluoroquinolones, Gold(III) complexes, Cytotoxic activity, Interaction with calf-thymus DNA, Interaction with serum albumin.

## 1. Introduction

Quinolones are known for their antimicrobial and antitumor activities through DNA intercalation and alteration of the normal functions of bacterial gyrase, and have been found to be a topoisomerase II inhibitor in humans [1].

Numerous studies regarding the interaction between quinolones and metal ions have been reported in the literature [1-5]. However few studies regarding metal complexes of quinolones as antitumor agents can be found. Kim (2001) [1] describe a new series of quinolone–platinum(II) conjugates,  $[\text{Pt}(\text{Q}'\text{-NH})(\text{dmsO})\text{X}]$  and *cis*- $[\text{Pt}(\text{Q}''\text{-en})\text{X}]$ , where Q' and Q'' are quinolones (flumequine, nalidixic acid or oxolinic acid) linked to monodentate and bidentate amine ligands, respectively, and X<sub>2</sub> is Cl<sub>2</sub> or 1,1-cyclobutanedicarboxylate. The antitumor activity of the compounds was assayed *in vitro* and *in vivo* against the leukemia L1210 cell line.

Gold (III) compounds constitute an emerging class of biologically active substances, of special interest as potential anticancer agents. During the past decade a number of structurally diverse gold(III) complexes were reported to be acceptably stable under physiological like conditions and to manifest very promising cytotoxic effects against selected human tumour cell lines, making them good candidates as anti-tumour agents [6]. As we know, the literature reports only one example of gold complex with fluoroquinolone [3], of the type  $[\text{Au}(\text{NOR})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_3$  (where, NOR = norfloxacin). The norfloxacin ligand is coordinated to Au(III) ion as a neutral monodentate chelating through the N atom of piperidyl ring.

The synthesis and characterization of new metal complexes with fluorquinolone antibacterial agents are of great importance for understanding the drug-metal ion interaction and for their potential pharmacological use. In this context, the present work describes the interaction of Au(III) with norfloxacin, levofloxacin and sparfloxacin (Fig. 1) in an attempt to examine the binding mode and the biological properties of the complexes. The resultant mononuclear complexes have been characterized with elemental analysis, IR, UV–vis and NMR spectroscopy.

The cytotoxic activity of the fluorquinolones and their Au(III) complexes was tested against the A20 and K562 human tumor cell lines as well as the MCR-5 (human lung fibroblasts) normal cell line. The binding properties of the complexes with CT DNA have been investigated with UV titration. Finally, the affinity of NOR, LEV, SPAR and the complexes for bovine serum albumin (BSA), proteins

responsible for the transport of drugs in the body, has been investigated with fluorescence spectroscopy.

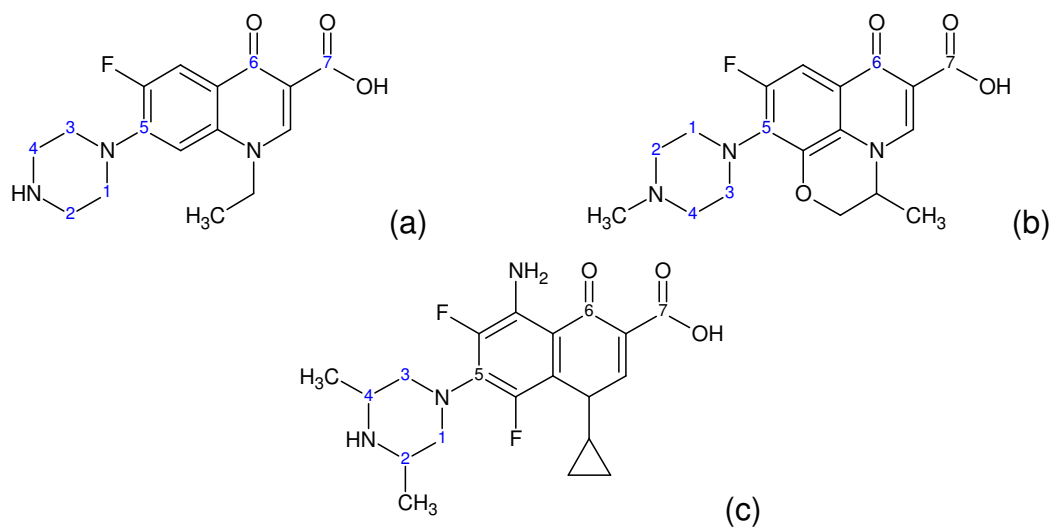


Fig.1: Structures of (a) norfloxacin, (b) levofloxacin and (c) sparfloxacin.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Norfloxacin, Levofloxacin, Sparfloxacin, calf-thymus DNA (CT DNA), bovine serum albumin (BSA) and  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  were purchased from Sigma-Aldrich. All solvents were purchased from Merck.

DNA stock solution was prepared by dilution of CT DNA to universal buffer at pH 7.4 [13] followed by exhaustive stirring at 4 °C for three days, and kept at 4 °C for no longer than a week. The stock solution of CT DNA gave a ratio of UV absorbance at 260 and 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) of 1.90, indicating that DNA was sufficiently free of protein contamination. The DNA concentration was determined by the UV, absorbance at 260 nm after 1:20 dilution using  $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [9].

The solutions of fluorquinolones, Au(III) complexes and BSA were prepared in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  universal buffer at pH 7.4.

### 2.2. Apparatus

Elemental analyses were performed on a CE Instruments, model EA 1110. Molar conductivity measurements were performed at RT in DMF,  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

concentration using a Tecnocon, model *mCA-150*, conductivity meter. The IR spectra were acquired on a Perkin Elmer, model 2000 Ft-IR spectrophotometer using KBr pellets. NMR spectra were obtained with a Bruker DRX-400 Avance (400 MHz) spectrometer using  $d^6$ -DMSO as the solvent and TMS as internal reference.

Fluorescence measurements were performed on a Shimadzu spectrophotometer Model RF 5301PC using a 1.00 cm quartz cell. A Hewlett Packard 8451-A UV-vis spectrophotometer was used for scanning UV-vis spectra with a 1.00 cm quartz cell.

### 2.3. Synthesis of the complexes

Appropriate quantities of the ligands (*0.25 mmol*) were dissolved in methanol (40 mL), which were then added to the solutions of  $\text{HAuCl}_4$  (*0.25 mmol*) in methanol (5 mL). Immediately after the addition of the ligand, a precipitate formed. The reaction mixture remained stirring at room temperature for 24 h. The solids obtained were filtered under vacuum, washed with diethyl ether, and dried.

**[AuCl<sub>2</sub>(NOR)]Cl·2H<sub>2</sub>O (1)**: Anal. Calc.: C, 29.2; H, 3.2; N, 6.4. Found: C, 29.0; H, 3.1; N, 6.2%. Conductivity ( $1 \times 10^{-3}$  mol/L in DMF): 102  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . Yield: 79,1%. IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3390 s  $\nu(\text{OH})$ ; 1628 s  $\nu(\text{C}=\text{O})$ ; 1706 s  $\nu(\text{COOH})$ .

**[AuCl<sub>2</sub>(LEV)]Cl·2H<sub>2</sub>O (2)**: Anal. Calc.: C, 30.9; H, 3.4; N, 6.0. Found: C, 31,0; H, 3.0; N, 6.0 %. Conductivity ( $1 \times 10^{-3}$  mol/L in DMF): 89  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . Yield: 80,1%. IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3390 s  $\nu(\text{OH})$ ; 1619 s  $\nu(\text{C}=\text{O})$ ; 1700 s  $\nu(\text{COOH})$ .

**[AuCl<sub>2</sub>(SPAR)]Cl·2H<sub>2</sub>O (3)**: Anal. Calc.: C, 31.2; H, 3.6; N, 7.7 %. Found: C, 31.0; H, 3.1; N, 7.5%. Conductivity ( $1 \times 10^{-3}$  mol/L in DMF): 94  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . Yield: 92,0 %. IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3390 s  $\nu(\text{OH})$ ; 1636 s  $\nu(\text{C}=\text{O})$ ; 1708 s  $\nu(\text{COOH})$ .

### 2.4. Cytotoxic activity

The A20 (murine lymphoma) and K562 (human myeloid leukemia) tumor cell lines as well as the MRC-5 (human lung fibroblasts) normal cell line were purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank/RJ, Brazil. They were cultured RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., MO) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 UI/ml

penicillin, and  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin in a humidified atmosphere at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  (humidified atmosphere).

The effects of the gold complexes in the cytotoxicity of A20, K562 and MRC-5 cells were studied by MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, assay as described by Mosman (1983) [7]. Briefly,  $1 \times 10^4$  of A20 and K562 cells were plated in 96-well tissue culture plates and treated with different concentrations of gold complexes (0.2, 2, 20, 50, 100 and  $200 \mu\text{M}$ ) for 48 h. After treatment,  $10 \mu\text{L}$  MTT ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) was added to each well and the plates were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for another 3 h. The purple formazan crystals were dissolved in  $50 \mu\text{L}$  SDS (10%), and absorbance was determined at 565 nm using an Stat Fax 2100 microplate reader (Awareness Technology, Palm City, FL, USA). The cell viability was calculated as follows:  $\text{Cytotoxicity (\%)} = (\text{Absorbance of the treated wells})/(\text{Absorbance of the control wells}) \times 100$ . Each concentration was tested in three different experiments run in triplicate. The  $\text{IC}_{50}$  (compound concentration ( $\mu\text{M}$ ) that produces a 50 % reduction in cellular viability) was obtained from the dose-response curves using GraphPad Prism 4.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 2.6. DNA fragmentation analysis

For DNA fragmentation assay,  $2 \times 10^6$  cells (K562) were treated with different concentrations of  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  ( $25 - 75 \mu\text{M}$ ) for 48 h at  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ . Cells were harvested and centrifuged at  $300 \times g/15 \text{ min}/10^\circ\text{C}$  and washed with PBS. The cells were then resuspended at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  in an extraction buffer ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl,  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  EDTA,  $5 \text{ g mL}^{-1}$  SDS) and treated with  $20 \text{ mg L}^{-1}$  RNase A at  $37^\circ\text{C}$  for 60 min, followed by incubation with proteinase K ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) at  $37^\circ\text{C}$  for 60 min. An equal volume of saline solution ( $\text{NaCl } 6 \text{ M}$ ) was added to the cells and centrifuged at  $13,000 \times g$  for 10 min. The supernatant was collected and 2 volume ethanol ( $-20^\circ\text{C}$ ) were added. The samples were centrifuged at  $13,000 \times g$  for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant was then discarded and the pellets dissolved in TE buffer (1 $\times$ ). The concentration of DNA was detected using a UV spectrophotometer (Beckman DU-640, USA). The DNA ( $5 \mu\text{g}/\text{tube}$ ) was transferred to a 1.5% agarose horizontal gel, and electrophoresis was performed at  $100 \text{ V cm}^{-1}$  for 90 min. The DNA

in the gels was visualized by ultraviolet transillumination after staining with ethidium bromide ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) using an Omega<sup>®</sup> molecular imaging system (UltraLum Inc., Claremont, CA, USA).

## 2.7. Cell cycle analysis

K562 cells were treated with different concentrations Au LEVO (30, 45, and 100  $\mu\text{M}$ ) for 48 h. Briefly,  $5 \times 10^5$  cells were harvested by centrifugation, washed with PBS, fixed with 70% (v/v) cold aqueous ethanol and stored overnight at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . The fixed cells were washed with PBS, followed by incubation with proteinase K ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  for 60 min. Cells were centrifuged and incubated with propidium iodide (Sigma). Samples were stored at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  in the dark and analyzed by flow cytometry (FACS Calibur, BD Biosciences). The percentage of cells in G1, S, G2 and sub-G1 was analyzed using Cell Quest Pro software (BD Biosciences).

## 2.8. DNA binding studies

The interaction of NOR, LEVO, SPAR and complexes 1–3 with CT DNA has been studied with UV spectroscopy in order to investigate the possible binding modes to CT DNA and to calculate the binding constants to CT DNA ( $K_b$ ). Binding constants,  $K_b$ , of the compounds with CT DNA have been determined using the UV spectra of the complexes recorded for a constant concentration in the absence or presence of CT DNA for diverse  $r$  values.  $K_b$  can be obtained by monitoring the changes in the absorbance at the corresponding  $\lambda_{\text{max}}$  (334, 332, 362, 334, 332 and 362 nm to NOR, LEVO, SPAR, complexes 1, 2 and 3, respectively), with increasing concentrations of CT DNA.  $K_b$  is given by the ratio of slope to the y intercept in plots  $[\text{DNA}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$  versus  $[\text{DNA}]$ , according to the Eq. (1) [10]:

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)_q} + \frac{1}{[K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)]} \quad (\text{Eq. 1})$$

Where  $[\text{DNA}]$  is the concentration of DNA in base pairs,  $\varepsilon_a$ ,  $\varepsilon_f$  and  $\varepsilon_b$  correspond to the apparent absorption coefficient  $A_{\text{obsd}}/[\text{compound}]$ , the extinction coefficient for the free compound and the extinction coefficient for the compound in the fully bound form, respectively.

## 2.9. Bovine serum albumin (BSA) binding studies

The protein-binding study was performed by tryptophan fluorescence quenching experiments using bovine (BSA, 2  $\mu$ M) in universal buffer at pH 7.4. The quenching of the emission intensity of tryptophan residues of BSA at 341 nm was monitored using NOR, LEVO, SPAR or complexes 1–3 as quenchers with increasing concentration. Fluorescence spectra were recorded from 300 to 500 nm at an excitation wavelength of 285 nm. The fluorescence spectra of quenchers in buffer solutions were recorded under the same experimental conditions and exhibited a maximum emission at 341 nm. Therefore, the quantitative studies of the serum albumin fluorescence spectra were performed after their correction by subtracting the spectra of the compounds.

Stern–Volmer analysis is useful in the estimation of the accessibility of tryptophan residues in proteins to the drug (quencher) molecules and may be used to study the interaction of a quencher with serum albumins. According to Stern–Volmer quenching Eq. (2) [10]:

$$\frac{F_0}{F} = k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} \quad (\text{Eq. 2})$$

where  $F_0$  and  $F$  are the steady-state fluorescence intensities in the absence and presence of quencher (FQ and complexes), respectively.  $k_q$  = the bimolecular quenching rate constant of BSA,  $K_{SV}$  = *Stern-Volmer* quenching constant,  $\tau_0$  = the average lifetime of BSA without the quencher,  $[Q]$  = the concentration of quencher. According to Eq. (2), the relation between  $K_{SV}$  and  $k_q$  is [10]:

$$K_{sv} = k_q \tau_0 \quad (\text{Eq. 3})$$

## 2.10. Statistical analysis

Statistical analysis of the results was performed by using one-way ANOVA followed by Dunnett's or Tukey post hoc test for multiple comparisons with a control. All statistical analyses were performed using the statistical software GraphPad Prism, version 4. 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. Results and discussion

#### 3.1. Microanalyses and molar conductivity studies

Microanalyses suggest the formation of  $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}$  (**1**),  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  (**2**),  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  (**3**) in which the fluorquinolones NOR, LEVO and SPAR coordinate as neutral bidentate ligands. The molar conductivity data reveal that the complexes are 1:1 electrolytes, in accordance with the proposed formulations.

#### 3.2. Infrared spectral studies

In the IR spectra of norfloxacin, levofloxacin and sparfloxacin the vibration of the carboxylic stretch  $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{carb}}$  was found in the 1732 and 1716  $\text{cm}^{-1}$  range and the pyridone stretch  $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{p}}$  at 1638 and 1640  $\text{cm}^{-1}$  range [2]. The characterization of fluorquinolones metal complexes can be achieved by studying the most typical vibrations that are characteristic of the coordination type of quinolones. In the majority of the metal complexes with fluoroquinolones related in the literature, the ligands coordinate in a bidentate manner via the carboxylic oxygen and the carbonyl oxygen, where the metal ion forms a stable six membered ring chelate. However, for complexes (**1-3**), reported in this work, no changes were observed for the carboxylic stretch  $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{carb}}$  and the pyridone stretch  $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{p}}$  suggesting that this groups are not involved in coordination.

#### 3.3. $^{13}\text{C}$ NMR measurements

Table 1 lists  $^{13}\text{C}$  NMR assignments for the fluorquinolones and their gold(III) complexes in  $d^6$ -DMSO. The carbon type (C, CH) was determined by using DEPT135 experiments (see atom numbering used for NMR attributions in Fig. 1).

Table 1:  $^{13}\text{C}$  NMR signals (d) for the norfloxacin, levofloxacin, sparfloxacin and their gold(III) complexes  $d^6$ -DMSO

	$C(1),C(3)$	$C(2),C(4)$	$C(5)$	$C(6)=O$	$C(7)OOH$
Norfloxacin (NOR)	50.71 50.80	45.35	146.00	176.09	166.11
$[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ (1)	46.47 46.56	42.70	144.30	176.08	165.97
Levofloxacin (LEVO)	50.63 50.71	55.85	132.64	176.93	166.61
$[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$ (2)	47.53	53.98	130.28	176.32	165.86
Sparfloxacin (SPAR)	57.59	50.90	136.36	165.67	-
$[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ (3)	53.07	51.73	135.75	165.30	179.64

In the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the free fluorquinolones NOR, LEVO and SPAR the carbonyl.  $C(6)=O$ , and carboxylate,  $C(7)OOH$ , signals appears in the  $\delta 165.67 - \delta 176.93$  and  $\delta 166.1 - \delta 166.61$  range, respectively. Upon complexation these carbon signals undergo insignificant shifts, indicating that these groups are not involved in coordination as normally occur for metal quinolones chelates.

The signs at  $\delta 45.4 - \delta 50.7$  and  $\delta 50.7 - \delta 63.8$  range were attributed to the  $C(1)$  and  $C(3)$  atoms, and the singlet at  $\delta 146.0 - \delta 136,8$  range to the  $C(5)$  atom, in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the NOR, LEVO and SPAR. In the spectra of gold(III) complexes these carbon signals undergo significant shifts, indicating that the coordination of the ligand to the metal occurs via the nitrogen atoms of the piperazine ring. This mode of coordination is rare when compared to data presented in the literature. When this type of coordination occurs, the piperazine ring has to assume the boat conformation which is stabilized by chelation to the gold(III) [2] (Fig. 2).

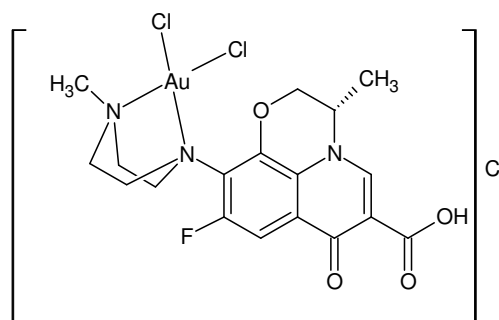


Fig.2: Proposed structure for  $[\text{AuCl}_2(\text{LLEVO})]\text{Cl}$

### 3.4. Cytotoxic activity

Table 2 lists the compound concentration ( $\mu\text{M}$ ) that produces a 50% reduction in cellular viability ( $\text{IC}_{50}$ ) for gold(III) complexes against the A20 (murine lymphoma), and K562 (human myeloid leukemia) tumor cell lines, along with the corresponding values of  $\text{IC}_{50}$  for the normal cell lines MCR-5 (human lung fibroblasts) for comparison.

Table 2: Compound concentration ( $\mu\text{M}$ ) that produces of 50% reduction in cellular viability ( $\text{IC}_{50}$ ) gold(III) complexes.

Compounds	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )		
	Normal cell	Tumor cells	
	MRC-5	A20	K562
$[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ (1)	65.1	24.9	55.0
$[\text{AuCl}_2(\text{LLEVO})]\text{Cl}$ (2)	52.8	48.9	50.0
$[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ (3)	104.0	48.3	61.2

The free fluorquinolones don't show significant active ( $\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{M}$ ) in the three tumor cell lines as well as in the normal cell lines (dates not showed). Upon complexation to gold(III) the  $\text{IC}_{50}$  values decreases indicating that the complexes are more activity than the free ligands. Among the three complexes  $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})_2]\text{Cl}$  proved to be the most promising showing  $\text{IC}_{50}$  values of 24.9 and 55.0  $\mu\text{M}$  for A20 and K562 tumor cell lines, respectively. For the normal cell lines MCR-5, complex (1)

exhibit  $IC_{50}$  values of 65.1  $\mu\text{M}$ . So, this complex is significantly more toxic for tumor cells than for normal cells becoming promising as an antitumor agent.

### 3.5. DNA fragmentation analysis

The DNA fragmentation pattern is an important biochemical sign of apoptosis, representing DNA cleavage into oligonucleosomal fragments through activation of the cysteine protease caspase-3, which is involved in the proteolytic cleavage of key downstream proteins such as poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) [14]. This process ultimately results in DNA fragmentation and apoptotic death [15]. To investigate if  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  complex is involved apoptotic cell death, we examined DNA fragmentation using agarose gel electrophoresis. As shown, K562 cells cultured in the presence of  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  did not presented DNA fragmentation pattern in all of the concentration tested (Fig. 3). However, reduction of K562 DNA concentration was observed when treated with  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  different and higher concentrations.

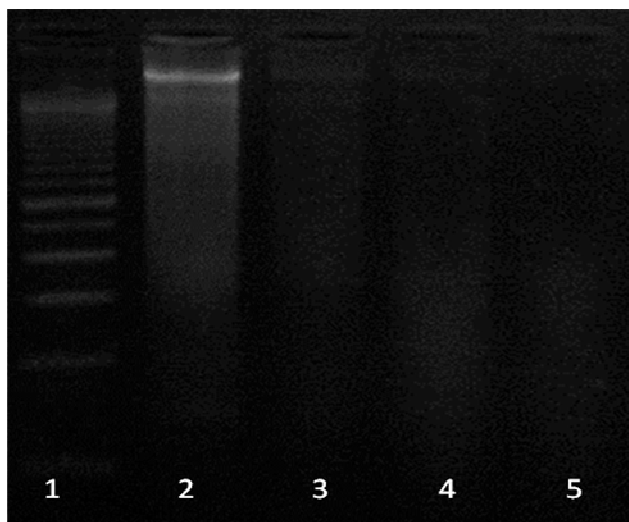


Fig.3: DNA agarose gel electrophoresis profile of K562 cells cultured in the presence of  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  compound.  $2 \times 10^6$  K562 cells were cultured with different concentrations of  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  (25 – 75  $\mu\text{M}$ ) for 48h. Samples were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis. Gels were stained with ethidium bromide and visualized by ultraviolet transillumination (1 = Ladder; 2 = C- (Cells and medium); 3 =  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  25  $\mu\text{M}$ ; 4 =  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  50  $\mu\text{M}$ ; 5 =  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  75  $\mu\text{M}$ ).

### 3.6. Cell Cycle

Cell cycle is a fundamental process to comprehend the mechanisms of tumor growth. The results derived from cell cycle tests revealed the compound  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  interfered with cell kinetics, leading to an increase of the number of cell on phase G0/G1 and decreasing the number of cells on G2/M phase when compared with the negative control. Moreover, a increased number of cells on sub-G1 was also observed and is an indicative of apoptosis (Fig. 4). Due to  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  interference on tumor cell cycle phases can elucidate the compound is acting as a cell cycle-specific drugs.

Apoptosis, or programmed cell death, is an essential process for the maintenance of living beings, because it has the function to eliminate defective cells. A important characteristic of tumor cells is the resistance to apoptosis natural mechanisms [16]. Studies suggest that induction of apoptosis is an desirable mechanism of action of antitumor drugs and different research groups aims to develop drugs with activity in chemotherapy [17]. As noted by the compound  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  presents significant apoptotic activity on K562 cells and whereas its action is concentration-dependent leading to an increment in apoptosis as far as  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  concentration grow. Treatment with  $\text{IC}_{50}$  concentration ( $50\mu\text{M}$ ) caused an apoptosis increase of 53% approximately.

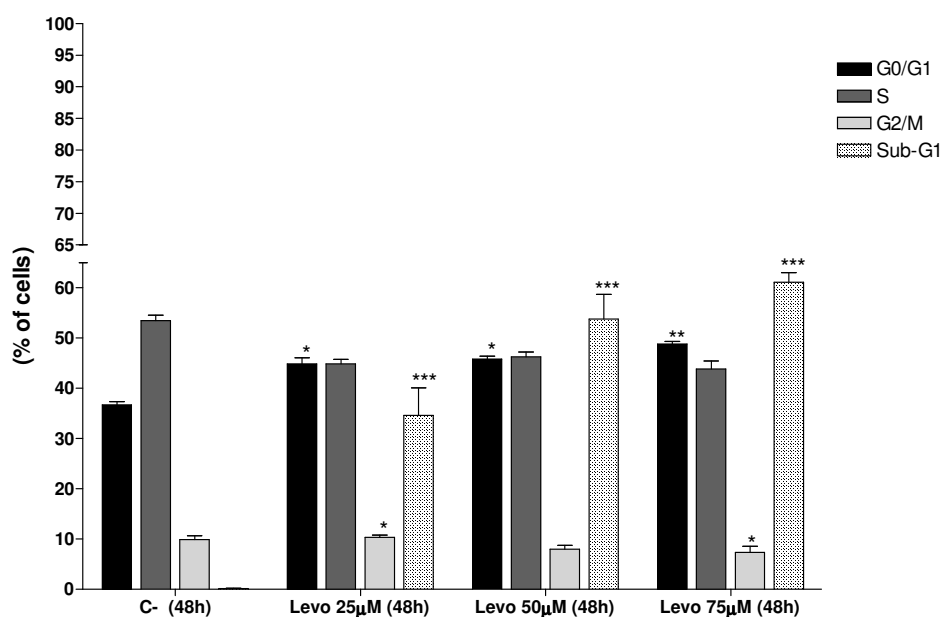
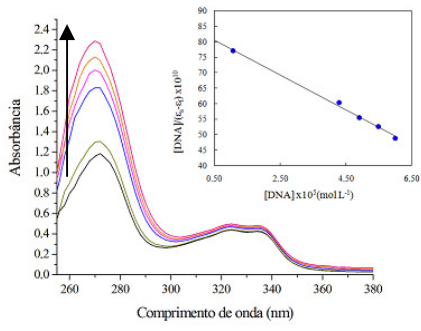


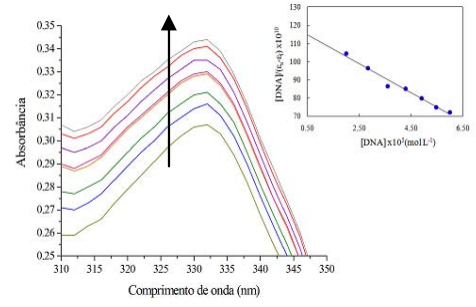
Fig.4: Cell cycle profile of K562 cells cultured with different concentrations of  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  (25 –  $75\mu\text{M}$ ) for 48 hours. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.5. Interaction with DNA

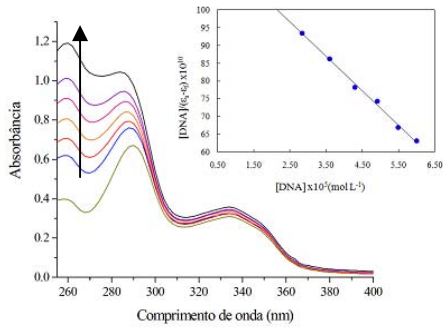
Electronic absorption spectroscopy is an effective method to examine the binding mode of DNA with metal complexes [11]. The absorption spectra of the interaction of CT DNA with complexes de Au(III) (Fig. 5) have been recorded to calculate the binding constants to CT DNA ( $K_b$ ). The intensity of observed bands in the presence of CT DNA results in hyperchromism.



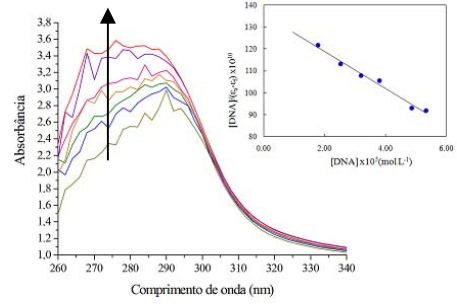
(a)



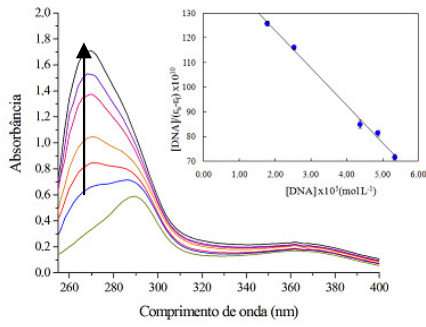
(e)



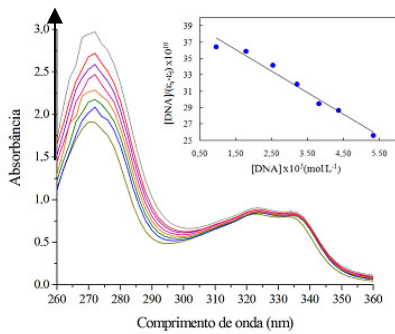
(b)



(f)



(c)



(d)

Fig.5: Plots of (a) NOR, (b) LEV, (c) SPAR, (d)  $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ , (e)  $[\text{AuCl}_2(\text{LEV})]\text{Cl}$ , (f)  $[\text{AuCl}_2(\text{SPA})]\text{Cl}$  in the presence of CT DNA at increasing amounts. The arrows show the changes upon increasing amounts of CT DNA.  $[\text{Compound}] = 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  at pH 7.4.

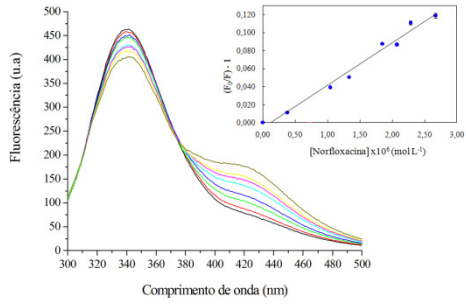
The binding constants  $K_b$  of Au(III) complexes and fluoroquinolones to DNA were calculated from Eq. (1). The calculated  $K_b$  values are given in Table 3 and suggest a moderate binding of the complexes of Au(III) to CT DNA. The  $K_b$  values of fluoroquinolones and complexes are similar. The hyperchromic effect observed might be ascribed to external contact (electrostatic binding) or that the complex could uncoil the helix structure of DNA and made more bases embedding in DNA exposed.

Table 3 – The binding constants ( $K_b$ ) derived for FQ and Complexes de Au(III).

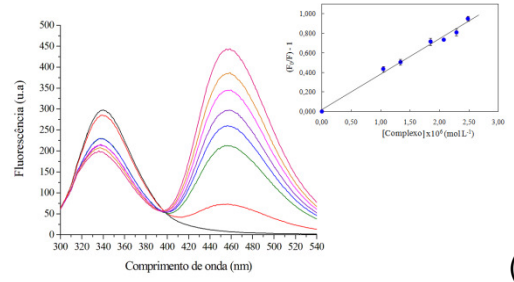
	$K_b(\text{M}^{-1})$	$R^2$	Hyperchromism (%)
Norfloxacin	$6,7 \times 10^3$	1,00	12
Levofloxacin	$8,1 \times 10^3$	0,99	15
Sparfloxacin	$9,8 \times 10^3$	0,99	29
$[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ ( <b>1</b> )	$6,3 \times 10^3$	0,97	8
$[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$ ( <b>2</b> )	$6,9 \times 10^3$	0,98	11
$[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ ( <b>3</b> )	$6,5 \times 10^3$	0,98	5

### 3.6. Interaction with BSA

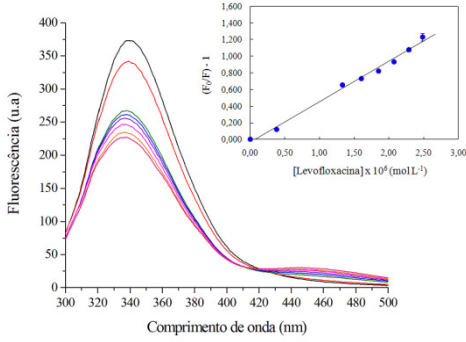
Serum albumins are proteins involved in the transport of metal ions and metal complexes with drugs in the circulatory system [11]. The interaction of fluoroquinolones (norfloxacin - NOR, levofloxacin - LEV and sparfloxacin - SPAR) and complexes of Au(III) with BSA has been studied from tryptophan emission-quenching experiments. Fluorescence spectra of BSA in the presence of increasing amounts of FQ and complexes de Au(III) are shown in Fig. 6.



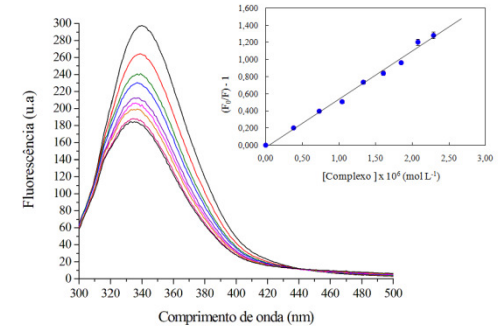
(a)



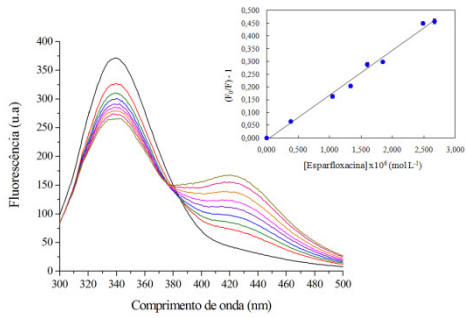
(e)



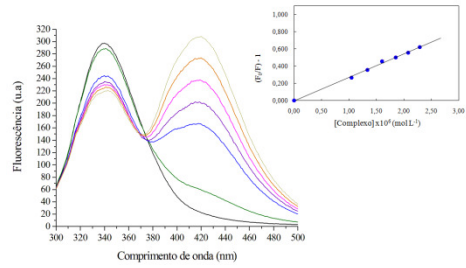
(b)



(f)



(c)



(d)

Fig. 6. Fluorescence spectra of BSA (2  $\mu$ M) in the presence of (a) NOR, (b) LEV, (c) SPAR, (d)  $[\text{AuCl}_2(\text{NOR})]\text{Cl}$ , (e)  $[\text{AuCl}_2(\text{LEV})]\text{Cl}$ , (f)  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$ . The solutions were prepared in 8  $\mu$ M universal buffer in pH 7.4. Inset: Stern–Volmer plot.

Quenching mechanism can also be predicted from the curvature in the Stern–Volmer plots. Normally, a presence of static quenching and the formation of dark complexes lead to upward curvature in the Stern–Volmer plots. While on the other hand, linear Stern–Volmer plots may either reveal the occurrence of just one binding site for quencher in the proximity of the fluorophore, or indicate the existence of a single type of quenching. As static quenching does not require diffusion through the medium, the quenching is more efficient and the observed fluorescence intensity is lower.

Taking as fluorescence lifetime ( $\tau_0$ ) of tryptophan in albumina at around  $10^{-8}$  s, the dynamic quenching constant ( $K_{SV}$ ,  $\text{M}^{-1}$ ) can be obtained by the slope of the diagram  $F_0/F$  versus  $[Q]$ , and subsequently the approximate quenching constant ( $k_q$ ,  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) may be calculated from Eq. (2). Binding constants of fluoroquinolones with human serum albumins were determined in various works. The values of  $K_{sv}$  (to 298K) for the interaction of NOR, ofloxacin and SPA with BSA were  $3,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  [11],  $4,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  [12] and  $1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  [10], respectively.

The calculated values of  $K_{sv}$  and  $k_q$  for the interaction of FQ and complexes with BSA as given in Table 4 indicate good binding. Complex  $[\text{AuCl}_2(\text{LEV})]\text{Cl}$  exhibits the strongest protein-binding ability.  $k_q$  depends on the probability of a collision between fluorophore and quencher and is a measure of the exposure of tryptophan residues to the drug. The upper limit of  $k_q$  expected for a diffusion-controlled bimolecular process is  $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [9]. The magnitude of  $k_q$  in the present study ( $10^{12}$  -  $10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) shows that the process is not entirely diffusion controlled, specific drug-protein interactions are also involved which make  $k_q$  larger.

Table 4 – The binding constants and parameters ( $K_{SV}$ ,  $k_q$ ) obtained for the fluorquinolones and gold(III) complexes

	$K_{SV}(M^{-1})$	$k_q(M^{-1} s^{-1})$	$R^2$ (linear regression)
Norfloxacin	$4.7 \times 10^4$	$\sim 10^{12}$	0.982
Levofloxacin	$4.9 \times 10^5$	$\sim 10^{13}$	0.991
Sparfloxacin	$1.8 \times 10^5$	$\sim 10^{13}$	0.991
[AuCl <sub>2</sub> (NOR)]Cl	$2.7 \times 10^5$	$\sim 10^{13}$	0.997
[AuCl <sub>2</sub> (LEV)]Cl	$2.7 \times 10^5$	$\sim 10^{13}$	0.994
[AuCl <sub>2</sub> (SPA)]Cl	$5.7 \times 10^5$	$\sim 10^{13}$	0.990

## References

- [1] Y.S. Kim, K. M. Kim, R. Song, M.J. Jun, Y.S.Sohna, J. Inorg. Biochem. 87 (2001) 157.
- [2] L.M.M. Vieira, M.V. de Almeida, H.A. de Abreu, H.A. Duarte, R.M. Grazul, A.P.S. Fontes, Inorg. Chim. Acta. 362 (2009) 2060.
- [3] M.S. Refat, Spectroch. Acta Part A. 68 (2007) 1393.
- [4] F. Gao, P. Yang, J. Xie, H. Wang. J. Inorg. Biochem. 60 (1995) 61.
- [5] S.A. Sadeek, J. Molec. Struct. 753 (2005) 1.
- [6] A. Casini, C. Hartinger, C. Gabbiani, E. Mini, P.J. Dyson, B.K. Keppler, L. Messori, J. Inorg. Biochem. 102 (2008) 564.
- [7] T. Mosmann, J. Immunol. Methods. 65 (1983) 55.
- [8] S.A. Sadeek, J. Molec. Struct. 753 (2005) 1.
- [9] E.K. Efthimiadou, Y. Sanakis, C.P. Raptopoulou, A. Karaliota, N. Katsarosa, G. Psomasa, Bioorg. Med. Chem.Letters. 16 (2006) 3864.
- [10] K.C. Skyrianou, E.K. Efthimiadou, V. Psycharis, A. Terzis, D.P. Kessissoglou, G. Psomas. J. Inorg. Biochem. 103 (2009) 1617.
- [11] B.P. Kamat. J. Pharm. Biom. Anal. 39 (2005) 1046.
- [12] Y. Ni, X. Zhang, S. Koko. Spect. Acta A, 75 (2010) 547.
- [13] D.D. Perrin and B.Dempsey. Buffers for pH and Metal Ion Control. Chapman & Hall, London, 1974.
- [14] C.D. Bortner, N.B. Oldenburg, J.A. Cidowski. Trends in Cell Biology, 5 (1995), 21.

[15] L.I. Huschtscha, J.R. Noble, A. A. Neumann, E. L. Moy, P. Barry, J. R. Melki, S.J. Clark, R.R. Reddel. *Cancer Research*. 58 (1998), 3508.

[16] I. Grivicich<sup>1</sup>, A. Regner, A. B. da Rocha. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 53 (2007), 335.

[17] S. W. Lowe, A. W. Lin. *Carcinogenesis*. 21 (2000), 485.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo, foi possível concluir que:

- ✓ Os compostos de ouro testados apresentaram potencial citotóxico sobre as linhagens tumorais B16-F10, K562, A20 e baixo potencial citotóxico sobre as linhagens normais MRC-5 e L-929;
- ✓ O composto  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  demonstrou citotoxicidade frente à linhagem B16-F10 ( $45\mu\text{M}$ ). O composto não apresentou atividade sobre a cinética celular;
- ✓ O composto  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  apresentou atividade apoptótica observada através de citometria fluxo e pelo ensaio de desidrogenase láctica verificou-se que há dano na membrana das células B16-F10 após 48 h de tratamento quando comparado com o controle negativo;
- ✓ No ensaio cometa podê-se observar que o composto  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  não apresentou atividade genotóxica, visto que não se verificou dano no DNA das células da linhagem B16-F10 e L-929;
- ✓ Sobre a linhagem K562, o composto  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  ( $50\mu\text{M}$ ) apresentou atividade citotóxica. O composto alterou a distribuição do ciclo celular, aumentando o percentual de células na fase G1 e diminuindo na fase S e conseqüentemente houve o aumento do percentual de células em Sub-G1 que é indicativo de apoptose.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos *in vitro* são de grande importância na pesquisa para o desenvolvimento de novas drogas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis potenciais citotóxicos de três complexos de ouro(III) de antibióticos da família fluorquinolonas e os mecanismos envolvidos no processo de morte celular.

Como observado nesse estudo os complexos de ouro(III) apresentaram promissores resultados sobre linhagens tumorais. No entanto, os mecanismos de ação são diferentes, pois na linhagem K562 nota-se que o composto  $[\text{AuCl}_2(\text{LEVO})]\text{Cl}$  tem ação nas fases do ciclo celular se comportando como drogas de CCS devido à capacidade de apresentar alterações na distribuição no ciclo celular. Já o composto  $[\text{AuCl}_2(\text{SPAR})]\text{Cl}$  sobre a linhagem B16-F10 age como droga CCNS, pois não observou alteração na cinética celular. Além disso, o composto não apresenta ter interação com o DNA como observado no ensaio cometa.

Diante disso, diversos mecanismos tem sido propostos como: complexos de ouro agem como pró-drogas que coordenam biomoléculas, ou que agem como cátions grandes que tem a capacidade de atravessar a membrana e se ligar a biomoléculas, e complexos que reagem quimicamente com biomoléculas através de reações de oxirredução e causam dano oxidativo nas células levando-as a morte.

Dessa forma, estudos adicionais envolvendo a formação de radicais livres e avaliações de alguns fatores moleculares determinantes no mecanismo de morte celular devem ser realizados para contribuir para o entendimento do mecanismo de ação dos compostos de ouro (III) avaliados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artemed, 2004. 1463 p.
2. ANAZETTI, M. C. & MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp pesquisa**. v.1, n.1, p.37-58. 2007.
3. BEIRITH, A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BONETTI, V.R.; KONZEN, M.; SEIFRIZ, I.; PAULA, M.M.S.; FRANCO, C.V.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties and nitric oxide synthase inhibitory action of new ruthenium complexes. **Eur. J. Pharmacol.** p. 289-297, 1999.
4. BERGAMO, A.; GAGLIARDI, R.; SCARCIA, V.; FURLANI, A.; ALESSIO, E. MESTRONI, G. SAVA, G. In vitro Cell Cycle arrest, In Vivo Action on Solid Metastasizing Tumors, and Host Toxicity of the Antimetastatic Drug NAMI-A and Cisplatin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 289, n. 1. p. 559-564. 1999.
5. BERNERS-PRICE, S.J; SADLER, P.J. **Coord. Chem. Rev.** v. 151. p. 1-40, 1196.
6. BRIGHTY, K. E.; GOOTZ, T. D. Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials. **J Antimicrob Chemother.** v.45: p. 437-46, 2000.
7. BUDIHARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v. 15. p. 269-90, 1999.
8. CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**; Goodman, L. S.; Gilman, A., eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, 1995, p. 903-949.
9. CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals **Coord. Chem. Rev.** v. 236. p. 209–233. 2003.

10. de ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Quim. Nova**. v. 28. p. 118-129, 2005.
11. DEBATIN, K. M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunol Immunother**. v. 53. p. 153-59, 2004.
12. DIFFLEY, J. F. X.; EVAN, G. Oncogenes and cell proliferation. Cell cycle, genome integrity and cancer – a millennial review. **Current Opinion in Genetics & Development** 10, 13-16, 1999.
13. DOBBIN, J.A.; GADELHA, M. I.P. Mesilato de imatinibe para tratamento da leucemia mielóide crônica. **Rev Bras Cancerol**. v.;48. p.429-38, 2002 .
14. ENZINE ARTICLES, disponível em <http://ezinearticles.com/?Fluoroquinolone-Antibiotics-Classification,-Uses-and-Side-Effects&id=347625> , acessado em 25.10.11.
15. FONTES, A. P. S.; ALMEIDA, S. G. Compostos de platina na quimioterapia do câncer. **Química Nova**. v. 20. p. 398-406, 1996.
16. FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. n. 6. p. 13-18, 2005.
17. GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. A multiplicity of cell death pathways. Symposium on Apoptotic and Non-Apoptotic Cell Death Pathways. **European molecular biology organization reports**. v.8. p. 829–833, 2007.
18. GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do Cometa para a Detecção de Dano no DNA e Reparo em Células Individualizadas. In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. 1º ed. Canoas: Ulbra. 2003. p.247-279.
19. GRIFFITHS, A. J. F; LILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Genética Moderna**. First Edition., Editora Guanabara Koogan. p. 420-440, 2001.

20. GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 53. p. 335, 2007.
21. HARTINGER, C.G.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; JAKUPEC, M. A.; KYNAST, B.; ZORBAS, H.; KEPPLER, B. K. 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**. v.100. p. 891-904. 2006.
22. HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**. v. 407. p. 770-76, 2000.
23. HYUN, U.; LEE, D. H.; LEE, C.; SHIN, C. G. Apoptosis induced by enniatins H and MK 1688 isolated from *Fusarium oxysporum* FB1501. **Toxicon**. v. 53. p.723-728, 2009.
24. HUXHAM, L. A.; CHEU, E.L.S.; PATRICK, B.O.; JAMES, B.R. The synthesis, structural characterization, and in vitro anti-cancer activity of chloro(*p*-cymene) complexes of Ruthenium(II) containing disulfoxide ligand. **Inorganica Chimica Acta**. v. 352. p. 238-246, 2003.
25. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2012.
26. Instituto Nacional de Cancer (INCA), disponível de <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=335](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335)>, acessado em 14.10.11.
27. Instituto Nacional de Cancer (INCA), disponível de <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=101#topo](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=101#topo)>, acessado em 16.10.11.
28. KAPITZA, S.; JAKUPEC, M. A.; UHL, M.; KEPPLER, B. K.; MARIAN, B. The heterocyclic ruthenium(III) complex KP1019 (FFC14A) causes DNA damage and oxidative stress in colorectal tumor cells. **Cancer Letters**. v. 226. p.115-121. 2005.
29. KATSAROS, N & ANAGNOSTOPOULOU, A. Rhodium and its compounds as potential agents in câncer treatment. **Oncology Hematology** 42, p. 297-308,

- 2002.
30. KAUFMANN, S. H.; EARNSHAW, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Experimental Cell Research**. v. 256. p.42-49, 2000.
31. KEAN, W.F.; HART, L.; BUCHANAN, W.W. Br. **J. Rheumatol.** v.36, p. 560, 1997.
32. KELEKAR, A. Autophagy. **Ann NY Acad Sci**. v.1066. p. 259-71, 2005.
33. KESKIN, O.; BAHAR, I.; JERINGAN, R. L.; BEUTLER, J. A.; SHOEMAKER, R. H.; SAUSVILLE, E. A.; COVELL, D. G. **Anti-Cancer Drug Des**. v. 15. p. 79, 2000.
34. KOWALSKI, L. P. Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia. 2. ed. São Paulo: Âmbito; 2002.
35. LAURENCE, D. R.; BENNETT, P. J.; BROWN, M. J. **Clinical Pharmacology**, 8ª ed. Chuechill Livingstone, Ednburgh. p. 710, 1997.
36. LIU, J.; LI, Y.; REN, W.; HU, W. X. Apoptosis of HL-60 cells induced by extracts from *Narcissus tazetta* var. chinensis. **Cancer Letters**. v. 242. p. 133-140, 2006.
37. LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. **Biologia Celular e Molecular**. 5 ed. Porto Alegre: Artemed, 2005. 1054p.
38. LOKISH, J.; ANDERSON, N. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. **Annals of Oncology**. v. 9. p. 13-21, 1998.
39. LONGO, D. L. Oncology and haematology. In: BRAUNWALD, E.; FAUCI, A. S.; KASPER, D. L.; HAUSER, S. L.; LONGO, D. L.; JAMESON, J. L.; editors. **Harrison's - Principles of internal medicine**. New York: McGraw-Hill. p. 43-58, 2001.
40. LOWE, S. W.; LIN, A. W. Apoptosis in Cancer. **Carcinogenesis**. v.21. p. 485, 2000.
41. MACHADO, A. E. D. **Quim. Nova**. v. 23. p.237, 2000.

42. MCKEAGE, M. J., MAHARAJ, L., BERNERS-PRICE, S. J. Mechanisms of cytotoxicity and antitumor activity of gold(I) phosphine complexes: the possible role of mitochondria, **Coord Chem. Rev.** v. 232, p. 127–135, 2002.
43. MENEZES, C. S. R.; GEBRIM, L. C.; ÁVILA, V. M. R.; FERREIRA, M. J.; VIEIRA, C. U.; PAVANIN, L. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. Analysis *in vivo* of antitumor activity, Cytotoxicity and Interaction between plasmid DNA and the *cis*-dichlorotetramineruthenium (III) chloride. **Chemico-Biological Interactions.** v.167. p.116-124. 2007.
44. Ministério da Saúde (BR). Instituto Nacional do Câncer. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 2ª ed. Rio de Janeiro (RJ): INCA; 2002.
45. MIRABELLI, C. J.; JOHNSON, R. K.; HILL, D. T.; FAUCETTE, L.; GIRARD, G. R.; KUO, G. Y.; SUNG, C. M.; CROOKE, S. T. **J. Med. Chem.** V.29, p.218-223, 1986.
46. MIRABELLI, C. J.; JOHNSON, R. K.; SUNG, C. M.; FAUCETTE, L.; MUIRHEAD, K.; CROOKE, S. T. **Cancer Res.** v.45, p. 32-39, 1985.
47. MOOI, W. J.; PEEPER, D. S. Oncogene-induced cell senescence - halting on the road to cancer. **N Engl J Med.** v. 355. P. 1037-1046, 2006.
48. MURAD, A. M.; KATZ, A. Oncologia Bases Clínicas do Tratamento; **Guanabara**; Rio de Janeiro, p. 41.
49. NAISMITH, J. H.; SPRANG, S. R. Modularity in the TNF-receptor family. **Trends Biochem Sci.** v. 23. p. 74-79, 1998.
50. NICHOLSON, D. W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature.** v. 407. p.810-16, 2000.
51. NOBILI, S.; MINI, E.; LANDINI, I.; GABBIANI, C.; CASINI, A.; MESSORI, L. Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies. **Medicinal Research Reviews.** v. 30. p. 550-580, 2009.

52. O'SULLIVAN, B. & WALDRON, J. Princípios da Radioterapia Oncológica. In: POLLOCK, R. E.; DOROSHOW, J. H.; KHAYAT, D.; NAKAO, A.; SULLIVAN, B. O. **UICC Manual de Oncologia Clínica**. 8 ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo. p. 226-242, 2006.
53. OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**. v.4. p. 592-603, 2004.
54. OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. **Quim. Nova**. v. 25. p. 976, 2002.
55. PACOR, S.; ZORZET, S.; COCCHIETTO, M.; BACAC, M.; VADORI, M.; TURRIN, C.; GAVA, B.; CASTELLARIN, A.; SAVA, G. Intratumoral NAMI-A Treatment Triggers Metastasis Reduction, Which Correlates to CD44 Regulation and Tumor Infiltrating Lymphocyte Recruitment. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.310, n. 2. p. 737-744. 2004.
56. PEREIRA, F. C. **Avaliação do Potencial Citotóxico, Genotóxico e Antitumoral do Ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio(III) em diferentes Linhagens Celulares**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás, Goiás.
57. PSOMAS, G.; DENDRINOUSAMARA, C.; PHILIPPAKOPOULOS, P.; TANGOULIS, V.; RAPTOPOULOU, C. P.; SAMARAS, E.; KESSISSOGLU, D. P.; **Inorg. Chim. Acta**, v. 272, p 24, 1998
58. RADEMAKER-LAKAHAI, J. M.; BONGARD, D. V. D.; PLUIM, D.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent. **Clinical Cancer Research**. v. 10. p. 3717-3727. 2004.
59. RAJSKI, S. R.; WILLIAMS, R. M. **Chem Rev**. v. 98. p. 2723, 1998.
60. REEDIJK, J.; FICHTINGER-SCHEPMAN, A. M. J.; VAN OOSTEROM, A. T.; VAN DER PUTTE, P.; **Structure and Bonding**. v. 67. p. 53, 1987.
61. RIBEIRO, A. S. B. B.; SILVA, C.C.; PEREIRA, F. C.; LIMA, A. P.; VILANOVA, C. A. S. T.; AGUIAR, S. S.; PAVANIN, L. A.; CRUZ, A. D.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. Mutagenic and Genotoxic Effects of *cis*-(Dichloro)

- tetraammineruthenium(III) Chloride on Human Peripheral Blood Lymphocytes. **Biol Trace Elem Res.** 2009. DOI 10.1007/s12011-009-8334-9.
62. ROCHA, D. P.; PINTO, G. F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C. A.; GUERRA, W.; FONTES, A. P. S.; TAVARES, T. T.; MARZANO, I. M.; PEREIRA-MAIA, E. C. Coordenação de metais e antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Quim. Nova.** v. XY, n. 00, p.1-8, 2010.
63. SAKURAI, Y.; JUNG, H.S.; SHIMANOUCI, T.; INOBUCHI, T.; MORITA, S.; KUBOI, R.; NATSUKAWA, K. Novel array-type gas sensors using conducting polymers, and their performance for gas identification. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 83. n.1-3. p.270-5, 2002.
64. SALMON, S.E. Em Farmacología Básica & Clínica, Katzung, B.G., ed.; **Guanabara Koogan S.A.**: Rio de Janeiro. p. 629-655, 1998,.
65. SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res.** v. 45. p. 528-37, 2000.
66. SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med.** v.340. p. 1330-40, 1999.
67. SHAPIRO, D. L.; MASCI, J. R. **J. Rheumatol.**, v.23, p.1818-1820, **1996**.
68. SHAW, C. F. Gold-based therapeutic agents. **Chem Rev.** 1999; 99: 2589-600.
69. SHAW, C. F., III In **Metal Compounds in Cancer Therapy**; Fricker, S. P., Ed.; Chapman and Hall: London, 1994; pp 46-64.
70. SILVEIRA-LACERDA, E. P, VILANOVA-COSTA C.A.S.T.; HAMAGUCHI, A.; PAVANIN, L.A.; GOULART, L.R.; HOMSI-BRANDENBURGO, M. I.; SANTOS, W.B.; SOARES, A. M.; NOMIZO, A. 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. **Biol Trace Elem Res.** 2009 doi:

10.1007/s12011-009-8498-3.

71. SILVEIRA-LACERDA, E. P. **Avaliação da Atividade Antitumoral do *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]Cl sobre linhagens tumorais humanas e de camundongos.** 2003. 67 f. Tese de Doutorado – Universidade Federal Uberlândia, Uberlândia.
72. SIMON, T. M.; KUNISHIMA, D. H.; VIBERT, G. J.; LORBER, A. **Cancer.** v.44, p.1965-1975. ,1979.
73. SIMON, T. M.; KUNISHIMA, D.H.; VIBERT, G. J.; LORBER, A. **Cancer Res.** v. 41, p. 94-97, 1981.
74. SPENCE, R. A. J.; JONHSTON, P. G. Em Oncology; Jonhston, P. G., ed; Oxford University Press: Oxford, 2001, p. 1-14, 121-132; Chabner, B. A.; Longo, D. L. Em Cancer chemotherapy and biotherapy; 2a. ed., Lippincott-Raven: Filadélfia, 1996.
75. World Health Organization. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. *Rev Panam Salud Publica.* 2002 Nov;12(5):366-70.
76. YU, S.P.; CHOI, D.W. Ions, cell volume, and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 97:p. 9360-362, 2000.
77. ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci.* v. 19. p. 124-28, 2004.