

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II) DE INTERESSE  
BIOLÓGICO: AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO  
POTENCIAL ANTITUMORAL E GENOTÓXICO”**

**Andréa Prado Carnizello Souza\***

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de DOUTOR EM  
CIÊNCIAS, área de concentração:  
QUÍMICA INORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Tavares Crispim

\*bolsista CAPES

SÃO CARLOS – SP  
2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S729cr

Souza, Andréa Prado Carnizello.

Complexos de rutênio (II) de interesse biológico :  
avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial antitumoral e  
genotóxico / Andréa Prado Carnizello Souza. -- São Carlos :  
UFSCar, 2014.  
197 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2014.

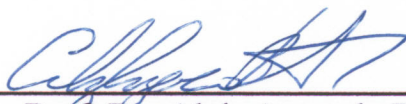
1. Química inorgânica. 2. Complexos de rutênio. 3.  
Complexos carbonílicos de rutênio. 4. Ligantes fosfínicos. 5.  
N-heterocíclicos. 6. Antitumoral. I. Título.

CDD: 546 (20<sup>a</sup>)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Doutorado**

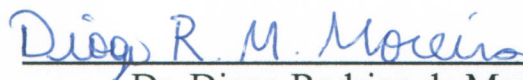
---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de Doutorado da candidata **Andréa Prado Carnizello Souza**, realizada em 23 de abril de 2014:*



---

Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista



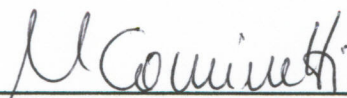
---

Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira



---

Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda



---

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti



---

Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda

Dedico este trabalho de doutorado aos meus filhos  
Abner Carnizello Souza e Alexey Carnizello Souza,  
a fim de que lembrem que o aprendizado e o  
conhecimento não são finitos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser a minha condição oferecendo-me disposição, força, sabedoria, paciência e coragem para enfrentar e transpor todos os obstáculos que se apresentaram durante o andamento deste projeto;

Aos meus pais Antonio Carnizello *in memoriam* (março 1942-dezembro 2012) e Nadir Prado Carnizello pelo carinho e amor imensuráveis e pelo incentivo aos estudos desde pequena;

Ao meu marido Alexandre pelo apoio, carinho e incentivo incondicionais, pois sem isso não concluiria mais esta etapa de minha vida.

Aos meus filhos Abner Carnizello Souza e Alexey Carnizello Souza por suportarem com amor e paciência uma mãe estudando.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, pela estrutura oferecida no curso de doutorado;

A CAPES pela bolsa concedida;

Ao Departamento de Pesquisa em Ciências da Universidade de Franca - UNIFRAN, em especial ao Laboratório de Mutagênese e Antimutagênese pela colaboração;

Ao Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista pela oportunidade, paciência, confiança, orientação e estrutura oferecida do laboratório LERCI, bem como pelo interesse em fazer colaboração com a Universidade de Franca junto à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Tavares Crispim, proporcionando a mim um trabalho diferente e arrojado;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Tavares Crispim por corroborar com a colaboração, pela orientação, paciência, generosidade e estrutura oferecida em seu laboratório. Por aceitar uma química num laboratório de genética, uma missão diferente do habitual e que exige coragem e confiança;

A Prof<sup>a</sup> Geórgia Modé Magalhães pela atenção e presteza ao realizar as análises histopatológicas do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Franca.

Aos amigos do grupo LERCI - UFSCar: Edjane, Melina, Marília, Angélica, Juliana Uema, Monize, Kátia Mara, Legna, Wilmer, João Honorato e Anislay pelo apoio, companheirismo e amizade;

Às secretárias do Departamento de Química da UFSCar: Cristina Motta, Luciane e Ariane pela atenção, cordialidade e presteza em atender aos alunos da pós-graduação;

Aos amigos do Laboratório de Mutagênese – UNIFRAN: Ricardo Furtado, Jacqueline Moraes, Ildercílio Lima, Pollyana Oliveira, Natália Hellen, Jacqueline Campos e Daiane Pereira e pelo apoio no projeto, protocolos dos ensaios biológicos e companheirismo;

À técnica do Biotério – UNIFRAN: Marta Augusto pelo apoio, amizade e dedicação.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>ABREVIATURA/ SÍMBOLO</b>	<b>NOME</b>
<b>AFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i>
<b>A2780</b>	Linhagem celular de carcinoma ovariano humano
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATV</b>	Solução de tripsina 0,2% + versene 0,02%, (Instituto Adolfo Lutz)
<b>ALS</b>	<i>Alkali-Labile Sites</i>
<b>B16-F10</b>	Linhagem celular de melanoma murino
<b>Bipy</b>	2,2'-bipiridina
<b>BMDC</b>	<i>Bone Marrow - Derived Cells</i>
<b>BOD</b>	<i>Biochemical Oxygen Demand</i> - Demanda Bioquímica de Oxigênio
<b>CBNMNs</b>	Células Binucleadas Micronucleadas
<b>C57BL/6</b>	“C57 black 6” ou “black 6” mice, camundongo C57BL/6
<b>COM</b>	<i>Consumer Products and the Environment</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , meio de cultura
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>DNMTs</b>	DNA metiltransferases
<b>dppb</b>	1,4-bis(difenilfosfina)butano
<b>dppe</b>	1,2-bis(difenilfosfina)etano

<b>dppf</b>	1,1–bis(difenilfosfina)metano
<b>dppm</b>	1,1'–bis(difenilfosfina)ferroceno.
<b>dppp</b>	1,4-bis(difenilfosfina)propano
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tetracético
<b>EMEA</b>	<i>European Medicines Agency</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>fen</b>	1,10 - fenantrolina
<b>gly</b>	Glicina
<b>HeLa</b>	Linhagem celular de adenocarcinoma cervical humano
<b>HepG2</b>	Linhagem celular de hepatocarcinoma
<b>Hpic</b>	Ácido picolínico
<b>HATs</b>	Histonas acetiltransferases
<b>HDACs</b>	Histonas deacetilases
<b>HDMs</b>	Histonas demetilases
<b>HMTs</b>	Histonas metiltransferases
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração da droga que é necessária para reduzir 50% do crescimento celular
<b>ICH</b>	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
<b>ICR</b>	[ImH][ <i>trans</i> -RuCl <sub>4</sub> (Im) <sub>2</sub> ] (Im = imidazol)
<b>IFN</b>	interferon
<b>IL-2</b>	interleucina-2
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>KP1019</b>	[indH][ <i>trans</i> -RuCl <sub>4</sub> (ind) <sub>2</sub> ] (ind = indazol)



<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IDN</b>	Índice de Divisão Nuclear
<b>IS</b>	Índice de Seletividade
<b>LERCI</b>	Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos
<b>LMP</b>	<i>Lower Melting Point</i> – agarose de baixo ponto de fusão
<b>MCF7</b>	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano
<b>MGE</b>	Microgel Eletroforesis
<b>4,4'-mebipy</b>	4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina
<b>5-MeC</b>	5-metilcitosina
<b>4-mepy</b>	4-metilpiridina
<b>MDA-MB-231</b>	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
<b>MMS</b>	Metil metanosulfonato
<b>MO59J</b>	Linhagem celular de glioblastoma humano
<b>MTT</b>	3-4, 5-Dimetilthiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio
<b>NAMI</b>	Acrônimo para “ <i>New Anti-tumor Metastasis Inhibitor</i> ”
<b>NCE:</b>	Eritrócito Normocromático
<b>NMEMNs</b>	Eritrócitos Normocromáticos Micronucleados
<b>p.c.</b>	Peso corpóreo
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffer saline</i> , solução tampão fosfato
<b>PEB</b>	Pró-eritroblasto
<b>PEt</b>	Grupamento trietilfosfina
<b>4-Phpy:</b>	4-fenilpiridina

<b>PMS:</b>	Metil sulfato de N-metil dibenzopirazina
<b>PCEMNs:</b>	Eritrócitos Policromáticos Micronucleados
<b>pH :</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>Pic</b>	2-piridina carboxilato
<b>py</b>	Piridina
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b>RMN <sup>31</sup>P</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i> , espécies reativas de oxigênio
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>SAM</b>	S-adenosilmetionina
<b>SAH</b>	S-adenosilhomocistina
<b>s.c.</b>	Subcutâneo
<b>SCGE</b>	<i>Single Cell Gel Eletrophoresis</i>
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SpymMe<sub>2</sub>-N,S</b>	4,6-dimetil-2-mercaptopirimidina
<b>Trp</b>	Triptofano
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>U251</b>	Glioblastoma
<b>V79</b>	Fibroblastos de pulmão de hamster Chinês
<b>XTT</b>	2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5sulfofenil]-2H-tetrazólio-5-carboxanilida
<b>pKa</b>	constante de ionização

## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - Estruturas moleculares dos compostos avaliados neste trabalho.....	46
TABELA 3.2 - Estruturas químicas dos ligantes avaliados referentes aos compostos estudados.....	48
TABELA 4.1 - Valores de IC <sub>50</sub> obtidos dos compostos (1) [Ru(SpymMe <sub>2</sub> -N,S) <sub>2</sub> (dppb)] e (2) [RuCl(SpymMe <sub>2</sub> -N,S) <sub>2</sub> NO] em células V79, HeLa, U251 e MCF7.....	83
TABELA 4.2 - Valores de IC <sub>50</sub> de alguns compostos de rutênio (II) contendo NO como ligante em células MDA-MB-231.....	85
TABELA 4.3 - Valores de IC <sub>50</sub> obtidos do composto (3) [Ru(pic) <sub>2</sub> (dppb)] em células V79, U251, HeLa e MCF7.....	86
TABELA 4.4 – Valores de IC <sub>50</sub> de alguns compostos de rutênio (II) contendo ânion picolinato como ligante em células MDA-MB-231.....	88
TABELA 4.5 - Valores de IC <sub>50</sub> obtidos dos compostos (4) [Ru(Gly)(dppb)(4,4'-mepipy)]PF <sub>6</sub> ; (5) Ru(Gly)(dppb)(fen)]PF <sub>6</sub> ; (6) [Ru(Tyr)(dppb)(4,4'-mepipy)]PF <sub>6</sub> ; (7) [Ru(Tyr)(dppb)(fen)]PF <sub>6</sub> ; (8) [Ru(Trp)(dppb)(fen)]PF <sub>6</sub> em células V79, MCF-7 e HeLa.....	92
TABELA 4.6 – Valores de IC <sub>50</sub> de alguns compostos de rutênio (II) contendo aminoácidos como ligantes em células MDA-MB-231.....	96

TABELA 4.7 – Valores de IC <sub>50</sub> obtidos do composto (9) <i>ct</i> –[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub> em células V79, MCF7, HeLa, HepG2, MO59J, B16-F10.....	98
TABELA 4.8 - Valores de IC <sub>50</sub> de alguns compostos de rutênio (II) contendo CO como ligante em células MDA-MB-231.....	100
TABELA 4.9 – Propriedades do espectro de absorção da interação entre o composto (9) <i>ct</i> –[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub> e o DNAct, onde os valores estão representados por média desvio padrão para K <sub>b</sub> e hipocromismo.....	103
TABELA 4.10 – Parâmetros de interação e de ligação do composto (9) <i>ct</i> –[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub> com o BSA em diferentes temperaturas.....	108
TABELA 4.11 – Parâmetros termodinâmicos da interação do composto (9) <i>ct</i> –[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub> com o BSA em diferentes temperaturas.....	109
TABELA 4.12 – Parâmetros relativos às interações e a termodinâmica entre compostos de Ru (II) com a BSA nas temperaturas de 298,0 e 308,0 K (24,8 e 34,8 °C) obtidos por GANESH PANDIAN et al. (2014).....	110
TABELA 4.13 - Frequências médias de CBNMNs e IDN obtidas nas culturas de células V79 tratadas em diferentes concentrações do composto (9) <i>ct</i> –[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub> e seus respectivos controles.....	113
TABELA 4.14 - Frequências médias de CBNMNs e IDN obtidas nas culturas de células HepG2 tratadas em diferentes concentrações do composto (9) <i>ct</i> –[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub> e seus respectivos controles.....	116

TABELA 4.15 - Frequências médias de PCEMNs e a razão PCE/( PCE + NCE) obtidas em amostras de medula óssea de camundongos Swiss após os tratamentos em diferentes doses do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> e respectivos controles.....123

TABELA 4.16- Frequências médias de danos no DNA obtidos nos diferentes parâmetros em hepatócitos de camundongos Swiss, tratados em diferentes doses do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>.....130

TABELA 4.17 – Aspectos toxicológicos e danos observados em órgãos e tecidos de camundongos C57BL/6 com implante de melanoma (B16F10), nos grupos de tratamento: controle (DMSO 1,0%) e composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>.....140

TABELA 4.18 – Análises histopatológicas em tumores de melanoma (B16F10) implantados em camundongos C57BL/6 nos grupos de tratamentos: controle (DMSO 1,0 %) e composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>.....141

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1- Diagrama ilustrando a evolução clonal do processo de carcinogênese, onde as células tumorais adquirem várias mutações que permitem que elas se tornem malignas e cada vez mais agressivas em suas propriedades proliferativas.....6
- FIGURA 1.2 - Representação esquemática do processo de múltiplas etapas de eventos genéticos e epigenéticos da carcinogênese.....8
- FIGURA 1.3 – **(A)**: Ilustração mostrando um cromossomo, a cromatina, os nucleossomos, as histonas e o DNA. **(B)**: Formação da 5-metilcitosina (5-MeC). Uma enzima DNA metiltransferase catalisa a transferência de um grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) de S-adenosilmetionina (SAM) para (deoxi)citosina, produzindo 5-(deoxi)metilcitosina e S-adenosilhomocistina (SAH) .....13
- FIGURA 1.4 - Ilustração de melanoma cutâneo, onde **(A)**: Ilustração de uma secção de tecido saudável (esquerda), comparada a outra secção com melanoma (direita); **(B)**: Representação da progressão de um melanoma, onde as taxas de recorrência estão aliadas ao estágio em que a doença foi diagnosticada.....16
- FIGURA 1.5 – Ilustração dos diferentes quimioterápicos utilizados no tratamento de melanoma, onde **(A)**: dacarbazina; **(B)**: cisplatina; **(C)**: carmustina; **(D)**: lamustina; **(E)**: vimcristina; **(F)**: vimblatina; **(G)**: etoposídeo e teniposide e **(H)**: taxol.....17
- FIGURA 1.6 – Estrutura molecular da fotemustina.....18

FIGURA 1.7 – (A): Ilustração representando o mecanismo de ação do cisplatina; (B): Diferentes adutos DNA-cisplatina formados por ligações cruzadas - 1,2-intrafita GG: entre guaninas adjacentes; 1,2-interfita GG: entre guaninas de fitas diferentes do DNA; 1,2-intrafita AG: entre adenina adjacente à guanina; 1,3-intrafita GNG: entre purinas separadas por um ou mais intervalos de bases.....21

FIGURA 1.8 – Complexos de Pt(II), onde (A): cisplatina; (B): carboplatina, e (C): oxaliplatina, e de Pt(IV), (D): satraplatina.....24

FIGURA 1.9 – Complexos de Ru (III) que apresentam atividade antitumoral, onde (A):  $\text{Na}\{\text{trans}[\text{RuCl}_4\text{Im}(\text{DMSO})]\}$  (NAMI); (B):  $[\text{ImH}]\{\text{trans}[\text{RuCl}_4(\text{Im})(\text{DMSO})]\}$  (NAMI-A); (C):  $[\text{ImH}]\{\text{trans}[\text{RuCl}_4(\text{Im})_2]\}$  (ICR); (D):  $[\text{IndH}]\{\text{trans}[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]\}$  (KP1019).....27

FIGURA 1.10 - Vias de redução de compostos de Ru(III), dentro e fora da célula.....27

FIGURA 1.11- Estruturas típicas de arenos de Ru(II) de fórmula geral  $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]$ .....29

FIGURA 1.12 - Interações de hidrogênio e estéricas que promovem ligação forte da unidade  $\{(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})\}^{2+}$  à guanina, e ligação fraca com adenina.....30

FIGURA 1.13 - Estrutura do complexo de ouro conhecido como auranofina,  $[(2,3,4,6\text{-tetra- O- acetil-1-tio } \beta\text{-D-glucopiranosato})(\text{trietilfosfina})\text{ouro}(\text{I})]$ .....31

FIGURA 1.14 – Representação das interações metal-ligante, onde 1 = ligação  $\sigma$  e 2 = retrodoação  $\pi$ .....34

FIGURA 1.15 – Alguns ligantes de interesse biológico **(A)**: 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb); **(B)**: bipyridina (bipy); **(C)**: 4,4'-dimetil-2,2'-bipyridina (4,4'-mebipy); **(D)**: 1,10-fenatrolina (fen); **(E)** 4,6-dimetil-2-mercaptopiridina (SpymMe<sub>2</sub>-N,S); **(F)**: ácido picolínico (Hpic); **(G)**: glicina (Gly); **(H)**: tirosina (Tyr) e **(I)**: triptofano (Trp).....36

FIGURA 3.1- Ensaio colorimétrico pela técnica XTT. A formação de formazan é proporcional à quantidade de células viáveis, onde A1 – A9: baixa viabilidade celular; H1 – H9: Células viáveis; B10- B12: Controle negativo, células 100% viáveis; C10 – C12: Controle de solvente (DMSO 1%), células 100% viáveis; D10 – D12: Controle positivo DMSO 25%, baixa viabilidade celular.....58

FIGURA 3.2- Fotomicrografia óptica de uma célula V79 (fibroblasto de pulmão de hamster Chinês) binucleada, contendo um micronúcleo (Giemsa; aumento: 1000 x).....68

FIGURA 3.3- Fotomicrografia óptica de uma célula HepG2 (hepatócito tumoral humano) binucleada, contendo um micronúcleo (Acridina Orange; aumento: 1000 x).....68

FIGURA 3.4 – Eritrócito policromático micronucleado **(A)**, sem micronúcleo **(B)** e eritrócito normocromático sem micronúcleo **(C)** de sangue periférico (aumento: 1000 x; Giemsa).....71

FIGURA 3.5 – Eritrócito policromático micronucleado **(A)**, eritrócito policromático **(B)** e eritrócito normocromático **(C)** de medula óssea (aumento: 1000 x; Giemsa).....73



FIGURA 3.6 - Imagem cometa do programa Comet Imager, demonstrando os parâmetros analisados pelo programa: porcentagem de DNA (%DNA), o *Tail Moment* (TM) e *Tail Length* (TL).....75

FIGURA 3.7- Camundongo C57BL/6 macho com desenvolvimento de melanoma. Na foto observa-se um tumor sólido resultado da indução tumoral pelo implante de células tumorais de melanoma murino B16-F10.....79

FIGURA 4.1- Efeito dos compostos 1 e 2 sobre as viabilidades celulares das linhagens V79, U251 e HeLa, representadas por média e desvio padrão (Média ± DP), onde **(A)**: (1)[Ru(SpymMe<sub>2</sub>-N,S)<sub>2</sub>(dppb)] e **(B)**: (2)[RuCl(SpymMe<sub>2</sub>-N,S)<sub>2</sub>NO].....83

FIGURA 4.2 – Efeito do composto (3) [Ru(Pic)<sub>2</sub>(dppb)] sobre as viabilidades celulares das linhagens V79 , U251, HeLa e MCF7, representadas por média e desvio padrão (Média ± DP).....87

FIGURA 4.3 – Espectro de dicroísmo circular do plasmídeo de DNA ρBR322 livre e o plasmídeo de DNA ρBR322 incubado com o complexo [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> por 24 h, a 37,0 °C nas razões molares 0,1; 0,3 e 0,5.....90

FIGURA 4.4 – Imagem de microscopia de força atômica (AFM), onde **(a)**: plasmídeo de DNA ρBR322 incubado com o complexo [Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> por 24 h, a 37,0 °C e **(b)**: plasmídeo de DNA ρBR322 livre.....90

FIGURA 4.5 – Efeito dos compostos 4, 5, 6, 7 e 8 sobre as viabilidades celulares das linhagens V79, U251 e HeLa, representadas por média e desvio padrão (Média ± DP), onde **(A)**: (4) [Ru(Gly)(dppb)(4,4'-mepipy)]PF<sub>6</sub>; **(B)**: (5) Ru (Gly) (dppb) (fen)]PF<sub>6</sub>; **(C)**: (6) [Ru(Tyr)(dppb)(4,4'-mepipy)]PF<sub>6</sub>; **(D)**: (7) [Ru(Tyr)(dppb)(fen)]PF<sub>6</sub>; e **(E)**: (8) [Ru(Trp)(dppb)(fen)]PF<sub>6</sub>.....93

FIGURA 4.6 – Efeito do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> sobre as viabilidades celulares das linhagens HepG2, B16-F10, MO59J, MCF7 e HeLa, representadas por média e erro padrão (Média ± Erro Padrão) em relação ao logaritmo das concentrações em uma sigmóide de dose-resposta.....98

FIGURA 4.7 – **(A)**: Espectro de absorção do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> na presença de adições sucessivas da solução de DNAct. **(B)**: Representação da constante  $K_b$  por meio da plotagem de  $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  vs.  $[DNA]$ .....104

FIGURA 4.8 – Espectro da supressão da fluorescência em diferentes concentrações do composto (9) *ct*- [RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, à temperatura de 310,15K (37,0 °C).....107

FIGURA 4.9 – Curva de Stern Volmer para o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> com a BSA nas temperaturas de 295,15; 300,15; 305,15 e 310,15 K (22,0; 27,0; 32,0 e 37,0 °C).....107

FIGURA 4.10- Frequências médias de células binucleadas micronucleadas (CBNMNs) obtidas nas culturas de células V79 tratadas nas diferentes concentrações do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> e seus respectivos controles.....114

FIGURA 4.11 - Frequências médias de células binucleadas micronucleadas (CBNMNs) obtidas nas culturas de células HepG2 tratadas nas diferentes concentrações do composto (9)  $ct\text{-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF}_6$  e seus respectivos controles.....117

FIGURA 4.12 – Médias da razão  $PCE/(PCE+NCE)$  obtidas em amostras de sangue periférico (2 animais por grupo de tratamento), após os tratamentos com o composto (9)  $ct\text{-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF}_6$  e cisplatina ( $6 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ p.c}$ ) obtida no ensaio piloto.....121

FIGURA 4.13 - Frequências médias de PCEMNs obtidas em amostras de medula óssea de camundongos Swiss após os tratamentos com diferentes doses do composto (9)  $ct\text{-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF}_6$ , cisplatina e MMS.....124

FIGURA 4.14 - Gráficos ilustrando, (A): porcentagem de DNA (% DNA); (B): momento de cauda Tail Moment (Tail intensity/Total intensity x Tail Length) e (C): comprimento de cauda Tail Length do composto (9)  $ct\text{-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF}_6$  e dos grupos controle.....131

FIGURA 4.15 – Efeito do composto (9)  $ct\text{-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF}_6$  sobre o desenvolvimento tumoral de melanoma em camundongos C57BL/6 nos diferentes grupos de tratamento, controle (DMSO a 1,0 %) e o composto (9)  $ct\text{-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF}_6$  ( $5,0 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c.}$ ), obtidos em 6 animais por grupo de tratamento, durante 5 dias, onde (A): Desenvolvimento tumoral após o implante; (B): Volume médio tumoral durante o período de tratamento; (C): Peso médio tumoral após a eutanásia. Os resultados estão representados por média e desvio padrão.....138

FIGURA 4.16 – Representação do número de mitoses analisados em melanoma (B16F10) implantados em camundongos C57BL/6 nos diferentes tratamentos: controle (DMSO 1,0%) e composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$  (5,0 mg  $kg^{-1}$  p.c.), obtidos em 6 animais por grupo de tratamento. Os resultados estão representados por média e desvio padrão.....142

FIGURA 4.17 – Fotomicrografia das amostras do tecido tumoral de melanoma (B16F10) em camundongos C57BL/6 nos dois grupos de tratamentos, **(A)**: controle (DMSO 1,0 %); e **(B)**: composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$ . Notar área de necrose (\*), células em mitose (seta) e pleomorfismo em A e B.....143

FIGURA 4.18 - Fotomicrografia do tecido tumoral de melanoma do tipo B16-F10 em camundongos C57BL/6 com pleomorfismo celular, variados tamanhos de núcleos em uma neoplasia.....145

FIGURA 4.19 - Fotomicrografia do tecido tumoral de melanoma do tipo B16-F10 em camundongos C57BL/6 com grânulos intracitoplasmáticos.....145

FIGURA 4.20 - Fotomicrografia do tecido tumoral de melanoma do tipo B16-F10 em camundongos C57BL/6 com figuras de mitoses (aumento: 40 x; Hematoxilina e eosina e Tricômico de Gomori).....146

## RESUMO

### “COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II) DE INTERESSE BIOLÓGICO: AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO POTENCIAL ANTITUMORAL E GENOTÓXICO”

O presente trabalho avaliou complexos de rutênio (II) em ensaios biológicos *in vitro* em células tumorais e não tumorais e, *in vivo* em camundongos machos Swiss e C57BL/6, assim como foram avaliadas as interações com o DNA e a BSA. Os compostos (1) [Ru(dppb)(SpyMe<sub>2</sub>-N,S)<sub>2</sub>]; (2) [RuCl(SpyMe<sub>2</sub>-N,S)<sub>2</sub>NO]; (3) [Ru(Pic)<sub>2</sub>(dppb)]; (4) [Ru(Gly)(dppb)(4,4'-mebipy)]PF<sub>6</sub>; (5) Ru(Gly)(dppb)(fen)]PF<sub>6</sub>; (6) [Ru(Tyr)(dppb)(4,4'-mebipy)]PF<sub>6</sub>; (7) [Ru(Tyr)(dppb)(fen)]PF<sub>6</sub>; (8) [Ru(Trp)(dppb)(fen)]PF<sub>6</sub> e (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> (onde, dppb = 1,4-bis(difenilfosfina)butano; pic = picolinato; SpyMe<sub>2</sub> = 4,6-dimetil-2-mercaptopirimidina; 4,4'-mebipy = 4,4'-Dimetil-2,2'-bipiridina; fen = fenantrolina; Gly = glicina; Tyr = tirosina; Trp = triptofano; bipy = 2,2'-bipiridina) passaram por uma triagem na avaliação da atividade citotóxica em diferentes linhagens celulares tumorais U251, HeLa, MCF7, HepG2, MO59J e B16F10, e, não tumoral V79 pelo método XTT. O composto 9 foi selecionado para a avaliação das interações com o DNA e BSA, do potencial genotóxico *in vitro* (células V79 e HepG2) e *in vivo* (camundongos Swiss), bem como para a avaliação do potencial antitumoral *in vivo* (camundongos C57BL/6). Nos experimentos *in vitro*, o composto 9 foi avaliado em diferentes concentrações nos experimentos de interações com o DNA, BSA e de micronúcleo *in vitro*. Nos experimentos *in vivo*, os animais foram tratados via intraperitoneal em diferentes doses do composto 9 nos ensaios de micronúcleo e cometa, e por via subcutânea no ensaio antitumoral. Para ambos os testes, *in vitro* e *in vivo*, os grupos controles negativo (água) e positivo (cisplatina ou metilmetanosulfonato) foram incluídos. Os resultados de citotoxicidade *in vitro* mostraram que as células tumorais HeLa e MCF7 foram sensíveis para a maior parte dos compostos avaliados. Contudo, o composto 9 apresentou citotoxicidade frente a todas as linhagens tumorais avaliadas, apresentando baixos valores de IC<sub>50</sub>. Nos experimentos de interação com o DNA e BSA, o composto 9 apresentou interações fracas com o DNA e interações hidrofóbicas para a BSA. No ensaio de micronúcleo *in vitro*, o composto 9 não foi genotóxico em células V79, porém, em células tumorais HepG2 mostrou efeito genotóxico

na concentração de  $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ . No ensaio de micronúcleo *in vivo*, o composto 9 não foi genotóxico nas diferentes doses avaliadas. Em relação ao ensaio cometa, os resultados mostraram aumento na frequência de danos no DNA em hepatócitos, apenas na dose de  $5,0 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c.}$  No ensaio antitumoral *in vivo*, os animais tratados com  $5,0 \text{ mg kg}^{-1} \text{ p.c.}$  do composto 9, mostraram significativa inibição do desenvolvimento tumoral em relação ao controle sem tratamento. Nas análises histopatológicas, o composto 9 também mostrou significativa inibição das mitoses em relação ao grupo controle. A maioria dos compostos avaliados neste trabalho apresentou atividade citotóxica *in vitro* em células tumorais, principalmente em células MCF7. O composto 9, apresentou resultados promissores nos ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que este composto pode ser potencial candidato a quimioterápico no tratamento do câncer.

## ABSTRACT

### "RUTHENIUM (II) COMPLEXES OF THE BIOLOGICAL INTEREST: EVALUATION *IN VITRO* AND *IN VIVO* OF THE ANTITUMORAL AND GENOTOXIC POTENTIAL"

This work evaluated ruthenium (II) complexes in biological assays *in vitro* on tumor cells and non-tumor, and *in vivo* in male Swiss and C57BL/6 mice, as well as the interactions with DNA and BSA were evaluated. The compounds (1) [Ru(dppb)(SpyMe<sub>2</sub>-N,S)<sub>2</sub>]; (2) [RuCl(SpyMe<sub>2</sub>-N,S)<sub>2</sub>NO]; (3) [Ru(Pic)<sub>2</sub>(dppb)]; (4) [Ru(Gly)(dppb)(4,4'-mebipy)]PF<sub>6</sub>; (5) [Ru(Gly)(dppb)(phen)]PF<sub>6</sub>; (6) [Ru(Tyr)(dppb)(4,4'-mebipy)]PF<sub>6</sub>; (7) [Ru(Tyr)(dppb)(phen)] PF<sub>6</sub>; (8) [Ru(Trp)(dppb)(phen)]PF<sub>6</sub> and (9) ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> (where, dppb = 1,4-bis(diphenylphosphino) butane; pic = picolinate; SpyMe<sub>2</sub> = 4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine, 4,4'-mebipy = 4,4'-dimethyl-2, 2'-bipyridine; phen = phenanthroline; Gly = glycine, Tyr = tyrosine, Trp = tryptophan; bipy = 2,2'-bipyridine) underwent a screening evaluation of cytotoxic activity on different tumor cell lines U251, HeLa, MCF7, HepG2, MO59J and B16F10 and non tumour V79, in different concentrations by XTT method. The compound 9 was selected for the assessment of interactions with DNA and BSA, the genotoxic potential *in vitro* (V79 and HepG2 cells), *in vivo* (Swiss mice), as well as to evaluate the antitumor potential *in vivo* (C57BL/6 mice). *In vitro* experiments, the compound 9 was assessed at various concentrations in the tests of interactions with DNA and BSA and micronucleus test. *In vivo* experiments, animals were treated with different doses of the compound 9 by intraperitoneal route in the micronucleus and comet assays, and subcutaneous route in the evaluating of the antitumoral potential. The micronucleus test in bone marrow and comet in hepatocytes were employed to study the potential genotoxic. For both assays, *in vitro* and *in vivo*, groups negative controls (water) and positive (methyl methanesulfonate and cisplatin) were included. The results of *in vitro* cytotoxicity assays showed that the HeLa and MCF7 tumor cells were sensitive to the majority of the complexes evaluated. However, the compound 9 showed cytotoxicity against all tumor cell lines evaluated, with low IC<sub>50</sub> values. In the experiments of interaction with DNA and BSA, the compound 9 showed weak interactions with DNA and hydrophobic interactions for BSA. The results obtained *in vitro* micronucleus tests for complex 9 showed absence of

genotoxicity in V79 cells and in HepG2 tumor cells showed up genotoxic at a concentration of  $1.25 \mu\text{mol L}^{-1}$ . In experiments *in vivo* micronucleus, the compound 9 was not genotoxic in different doses evaluated. Regarding the comet assay, the results showed an increased frequency of DNA damage in hepatocytes in a dose of  $5.0 \text{ mg kg}^{-1}$  b.w. *In vivo* antitumor test, animals treated with  $5.0 \text{ mg kg}^{-1}$  b.w. of compound 9, showed significant inhibition of tumor growth compared to untreated control. In the histopathological analysis, the compound 9 also showed significant inhibition of mitosis in relation to the control group. Most of the compounds evaluated in this study showed *in vitro* cytotoxic activity on tumor cells, especially in MCF7 cells. The compound 9 showed promising results in biological *in vitro* and *in vivo* assays, suggesting that this compound may be potential candidate for chemotherapy in cancer treatment.



# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Câncer.....	2
1.1.2 Carcinogênese.....	4
1.1.3 A busca por terapias e melanoma.....	14
1.2 Drogas inorgânicas no tratamento do câncer.....	19
1.2.1 Complexos de rutênio.....	25
1.2.2 Complexos metálicos com ligantes fosfínicos.....	31
1.2.3 Ligantes de interesse biológico.....	36
2. OBJETIVOS.....	41
2.1 Objetivos gerais.....	42
2.2 Objetivos específicos.....	42
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	45
3.1 Compostos avaliados.....	45
3.2 SISTEMAS-TESTE <i>IN VITRO</i> .....	49
3.2.1 Linhagem Celular, Condições de Cultivo e Incubação dos Compostos.....	49
3.2.2 Ensaio colorimétrico <i>in vitro</i> .....	56
3.2.3 Estudos de interação com o DNA.....	59
3.2.4 Estudos de interação com a BSA.....	60
3.2.5 Ensaio de micronúcleo <i>in vitro</i> .....	63
3.2.5.1 Células V79.....	64
3.2.5.2 Células HepG2.....	66

3.2.5.3	Análise das lâminas.....	67
3.2.5.4	Análise estatística.....	68
3.3.	SISTEMA-TESTE IN VIVO.....	69
3.3.1	Animais.....	69
3.3.2	Tratamento dos Animais.....	69
3.3.3	Ensaio de micronúcleo <i>in vivo</i> .....	70
3.3.3.1	Sangue periférico.....	71
3.3.3.2	Medula óssea.....	72
3.3.3.3	Análise das lâminas.....	73
3.3.4	Ensaio Cometa.....	74
3.3.5	Ensaio antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de transplante singênico.....	75
3.3.5.1	Avaliação da viabilidade celular.....	77
3.3.5.2	Implante e avaliação tumoral.....	78
3.3.5.3	Análise estatística.....	80
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES – PARTE 1 .....	81
4.1.	PARTE 1- Ensaio colorimétrico <i>in vitro</i> .....	82
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÕES – PARTE 2.....	103
4.2	Estudo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do composto (9) ct- [RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub> .....	103
4.2.1	Estudos de interação com o DNA.....	103
4.2.2	Estudos de interação com a BSA.....	106
4.2.3	Ensaio de micronúcleo <i>in vitro</i> .....	112
4.2.3.1	Micronúcleo em V79.....	112
4.2.3.2	Micronúcleo em HepG2.....	115
4.2.4	SISTEMA TESTE <i>IN VIVO</i> .....	121
4.2.4.1	Ensaio de micronúcleo <i>in vivo</i> .....	121
4.2.4.1.1	Sangue periférico.....	121
4.2.4.1.2	Medula óssea.....	122

4.2.4.2 Ensaio cometa.....	129
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES - Parte 3.....	137
4.3 Parte 3 - Atividade antitumoral do composto (9) <i>ct</i> - [RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub> .....	137
4.3.1 Ensaio antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de transplante singênico.....	137
5 - CONCLUSÕES.....	151
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154
APÊNDICES.....	191
APÊNDICE I.....	192
APÊNDICE II.....	193
APÊNDICE III.....	194
APÊNDICE IV.....	195
APÊNDICE V.....	196
APÊNDICE VI.....	197

# *1.Introdução*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

A origem da palavra câncer é creditada ao médico grego Hipócrates (460-370 aC), que é considerado o "Pai da Medicina". Hipócrates usou os termos *carcinos* e *carcinoma* para descrever a forma não ulcerosa e a forma ulcerosa de tumores. Em grego, essas palavras se referem a um caranguejo, mais provavelmente aplicado à doença devido as projeções do espalhamento de um câncer. O médico romano Celsus (28-50 aC) traduziu o termo grego para *cancer* (de origem do Latim significando caranguejo). Galeno (130-200 dC), outro médico romano, usou a palavra *oncos* (palavra grega que significa inchaço) para descrever tumores. Embora a analogia de caranguejo de Hipócrates e Celsus ainda é usada para descrever os tumores malignos, o termo de Galeno é utilizado atualmente como uma parte do nome para especialistas em câncer, *oncologistas* (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

*Câncer* é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas que se caracteriza pela perda do controle da proliferação celular e ganho de capacidade de invadir tecidos adjacentes, ou de sofrer metástases em tecidos distantes (NOWELL, 1974; PONDER, 2001; STRATTON et al., 2009). Câncer é o termo abrangente para o crescimento celular não contido. Em geral, uma célula cancerosa é uma célula somática com acúmulo de mutações em diferentes genes que, coletivamente, causam a perda do controle da proliferação celular, levando à formação de uma massa de células mutadas chamada de *neoplasia* (em grego, nova formação), ou *tumor*. A velocidade das mutações é afetada não só pela taxa de ocorrência, como também pela eficiência da correção dos erros por sistemas de reparo do DNA. Portanto, o câncer é considerado uma doença genética com influência ambiental. Embora poucos tipos de cânceres sejam hereditários, a maioria dos tumores é causada por mutações somáticas

acumuladas ao longo da vida, sejam fatores ambientais, exposição ocupacional e/ou produtos normais do metabolismo celular (ALEXANDROV et al., 2013; PFEIFER, 2010; WEINBERG, 1996).

A formação de tumores é chamada de *tumorigênese*. As células cancerosas tornam-se mais resistentes aos sinais que normalmente inibem o *ciclo celular*, onde sinais adicionais de crescimento são processados e produzidos. Estes sinais adicionais são características anormais do ciclo celular, pois normalmente desencadeariam a *apoptose* (HEIJINK et al., 2013; PODLAHA et al., 2012). A crescente massa celular (tumor) exige nutrição, oxigênio e nutrientes essenciais para a sua sobrevivência e o seu crescimento, portanto um novo suprimento de sangue deve ser obtido por meio da *angiogênese* (formação de novos vasos sanguíneos). Sinais inibitórios adicionais são vencidos para que o tumor atinja o estado maligno, onde as neoplasias invadem tecidos adjacentes e promovem a *metástase* (propagação) para locais distantes do corpo. Um tumor cujas células permanecem localizadas é denominado tumor *primário*; quando há invasão para outros tecidos, de maneira que as células tumorais tornam-se migratórias dando origem a um tumor maligno por metástase, o tumor é denominado *secundário* (ALEXANDROV et al., 2013; OTROCK et al., 2007; YOO e KWON, 2013; WELTI et al., 2013).

Os diferentes tipos de cânceres são classificados de acordo com seu sítio primário de ocorrência, os quais correspondem aos diversos tipos de células do corpo. Quando o câncer tem início em tecidos epiteliais, como pele ou mucosa é denominado *carcinoma*. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de *sarcoma*. Os *linfomas* e *linfonodos* são derivados de tecidos linfáticos; as *leucemias* são derivadas de células hematopoiéticas, os glóbulos brancos (leucócitos) do sistema sanguíneo. Por sua vez, os cânceres de tecidos glandulares são chamados de *adenocarcinomas*; os cânceres de células não neuronais são chamados de *gliomas* e *astrocitomas*; e os cânceres de plasmócitos são chamados de *mielomas* (BURREL et al., 2013;

NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2014). As células que compõem um tumor são provenientes de uma única célula ancestral, tornando-as clones únicos (monoclonal) (BURRELL e SWANTON, 2014; BENDALL e NOLAN, 2012). Desta maneira, um tumor é composto por bilhões de células, todos provenientes de uma célula inicial que se multiplica clonalmente, inibindo a apoptose e acumulando alterações genéticas e/ou epigenéticas (alteração herdável na expressão gênica sem que haja alteração na sequência do DNA) que convergem para uma célula neoplásica (BURRELL et al., 2013; TROSKO, 2001; WOLFFE e GUSCHIN, 2000).

### **1.1.1 Carcinogênese**

O processo de *carcinogênese* é o processo de formação do câncer. É um processo patológico tipicamente lento e complexo pelo qual células normais tornam-se neoplásicas. As alterações genéticas são base principal deste processo, as quais estão associadas às modificações químicas no DNA (GATENBY e GILLIES, 2008; MAVRI, 2013). A frequência dos eventos genéticos pode ser alterada pela exposição a agentes genotóxicos, os *carcinógenos ambientais*. Desse modo, a carcinogênese tem relação com a *mutagênese* (produção de alterações na sequência do DNA) (HARRIS, 1991; SARASIN, 2003; SINGH et al., 2007; SINGH et al., 2012).

Existem três classes de agentes que estão relacionados à mutagênese: os *carcinógenos químicos*, como as substâncias eletrofílicas (sulfato de dimetila, metilnitrossurêia, sulfato de vinila, aflatoxinas, dimetilnitrosoamina e benzopireno) que causam uma alteração localizada na sequência dos nucleotídeos; os *carcinógenos físicos*, como a luz ultravioleta, a radiação ionizante (raios X e raios gama) e a particulada (partículas alfa, beta, próton e neutron) que causam quebras nos cromossomos (longa sequência de

DNA que contém vários genes) e translocações (quando há a adição em um cromossomo de um segmento proveniente de outro cromossomo); e *carcinógenos biológicos*, como os vírus que introduzem DNA exógeno nas células (PFEIFER, 2010; PODLAHA et al., 2012). Esses eventos genéticos não são transmitidos para gerações futuras se ocorrerem em células somáticas (células dos tecidos), somente serão transmitidos se ocorrerem em células germinativas (óvulo e espermatozoide) (ADAM et al. 2014; PIERCE, 2012; STRATTON et al., 2013).

No caso de cânceres familiares, as mutações que predisõem ao câncer acontecem em células da linhagem germinativa, ou seja, as pessoas herdam mutações em genes específicos os quais são importantes na gênese do câncer de uma geração para outra, gerando famílias que apresentam incidência de determinados tipos de cânceres (cânceres específicos). Os “cânceres familiares”, ou “síndromes de câncer herdado”, embora raros, demonstram que a herança de um gene alterado pode causar câncer (ADAM et al., 2014; BURREL et al., 2013; NADEAU, 2001). Entretanto, os fatores ambientais desempenham um papel importante na carcinogênese, seja câncer familiar ou esporádico, pois o risco de qualquer pessoa desenvolver um tipo de câncer depende de uma combinação de fatores herdados e de componentes ambientais (GREAVES e MALEY, 2012; LYNCH et al., 2014).

Os danos no DNA e mutações podem ser induzidos por produtos normais do metabolismo celular, como espécies reativas de oxigênio, produtos da peroxidação lipídica, agentes alquilantes, estrógenos, espécies reativas de nitrogênio, agentes clorinantes e certos intermediários de algumas vias metabólicas (BURCHAM, 1999; LORD e ASHWORTH, 2012). Portanto, se os produtos químicos são hormônios e seus metabólitos, podem ser considerados *carcinógenos endógenos*, e, se forem provenientes do ambiente são considerados *carcinógenos exógenos* (MAVRI, 2013; PODLAHA et al., 2012).



O processo de carcinogênese passa por vários estágios antes de chegar à formação do tumor. Em cada etapa, apenas uma única célula sofre alguma mutação que potencializa a proliferação celular, de modo que sua progênie torna-se o clone dominante do tumor. A proliferação desse clone acelera a ocorrência da próxima etapa da evolução do tumor, pelo aumento no tamanho da população de células que podem sofrer uma nova mutação (FIGURA 1.1). Estes estágios são conhecidos por Iniciação, Promoção e Progressão (BALMAIN e HARRIS, 2000; HARRIS, 1991; GATENBY e GILLIES, 2008).

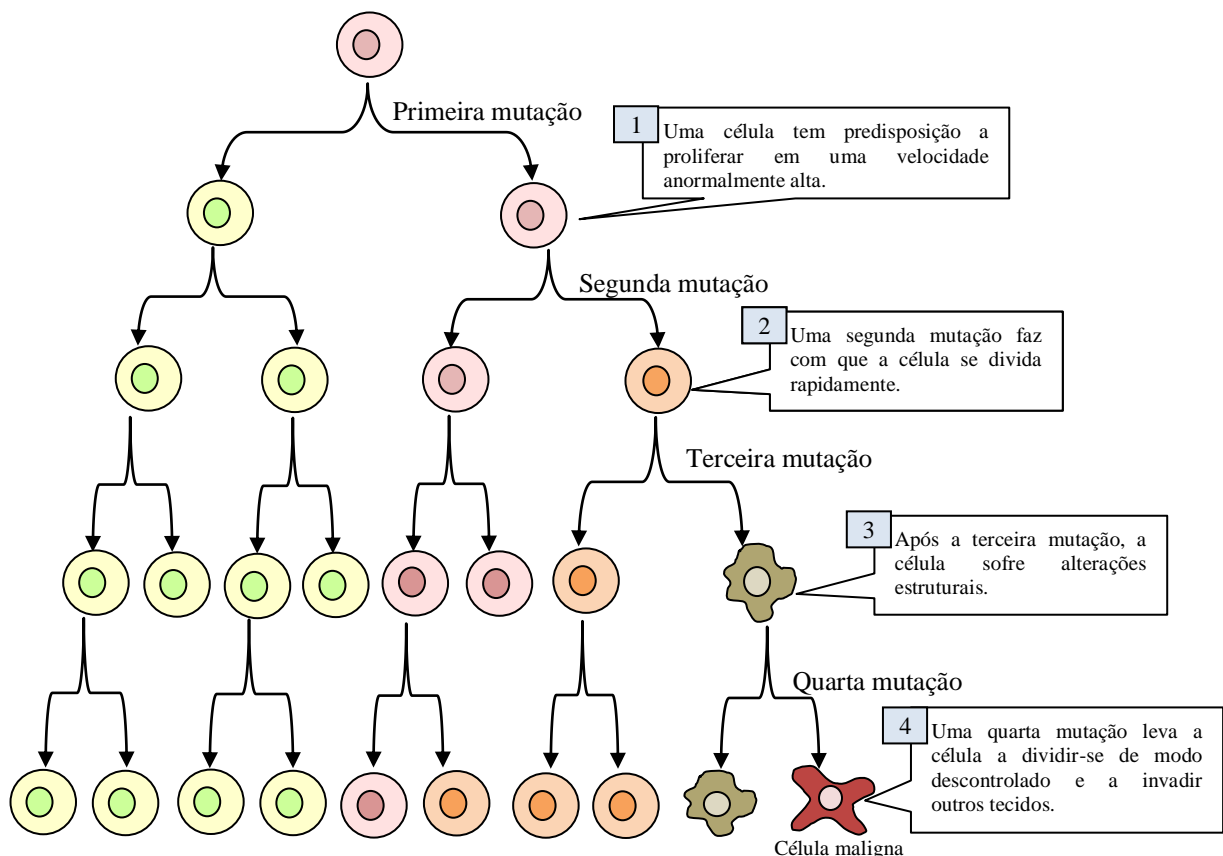


FIGURA 1.1- Diagrama ilustrando a evolução clonal do processo de carcinogênese, onde as células tumorais adquirem várias mutações que permitem que elas se tornem malignas e cada vez mais agressivas em suas propriedades proliferativas (adaptado de PIERCE, 2012).

A *iniciação* é a primeira etapa da carcinogênese e foi rotulada de iniciação em 1947 por BEREMBLUM e SHUBIK (1947). Neste sentido, diversos pesquisadores reportaram experimentos *in vitro* e *in vivo*, cujas conclusões permitiram definir que a iniciação é causada por alterações genéticas irreversíveis, onde estas alterações predispõem células normais à suscetibilidade para a evolução maligna e a imortalidade (BEREMBLUM e SHUBIK, 1947; BUTTERWORTH et al. 1992; DYBING e SANNER 1999; MEHTA, 1995; SHACTER e WEITZMAN, 2002; STENBÄCK et al. 1981; TROSKO, 2001; TROSKO, 2003). Os mecanismos de detoxificação de carcinógenos, como o reparo do DNA e eliminação das células com o DNA modificado, como a apoptose, são importantes para a proteção contra a iniciação do câncer. Porém, quando as alterações no DNA não são reparadas ou eliminadas, elas se tornam irreversíveis. Neste sentido, os carcinógenos geralmente são considerados substâncias eletrofílicas, ou são transformadas para tais durante o processo de detoxificação. Por outro lado, as bases do DNA são moléculas com alta densidade eletrônica, conseqüentemente, as substâncias eletrofílicas são atraídas por moléculas do DNA, onde acabam se ligando e levando à formação de adutos (BARTSCH, 1996; SINGH e FARMER, 2006). A base do DNA mais suscetível a esse tipo de ataque é a guanina, mas já foram relatados adutos formados com todas as bases (DIPPLE, 1995). Assim, para que a iniciação ocorra é necessário que haja não só a modificação no DNA, mas também na replicação e proliferação celular, de modo que a mutação inicial possa se fixar, FIGURA 1.2 (GREAVES e MALEY, 2012; MERLO et al., 2006).

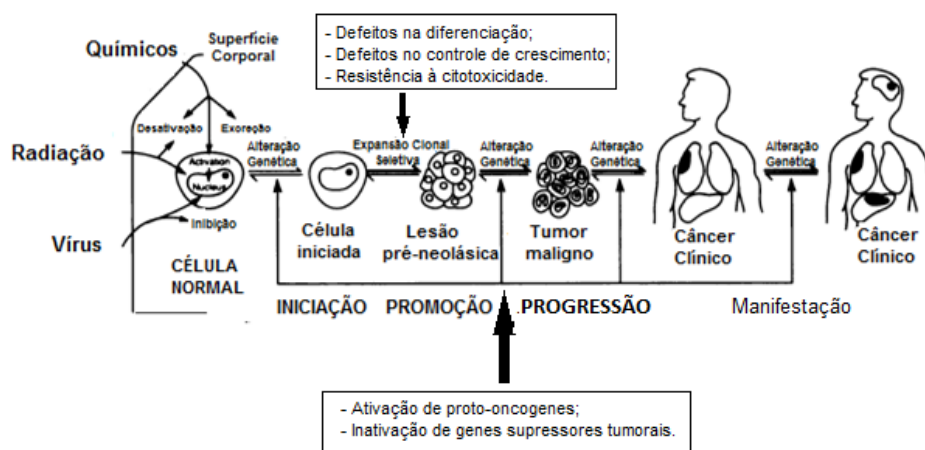


FIGURA 1.2 - Representação esquemática do processo de múltiplas etapas de eventos genéticos e epigenéticos da carcinogênese (adaptado de HARRIS, 1991).

Após a iniciação ocorre a *promoção*. O conceito de promoção foi introduzido quando foram descobertas substâncias com baixa atividade carcinogênica, as quais ainda eram capazes de induzir o desenvolvimento de câncer sob condições experimentais (BEREMBLUM e SHUBIK, 1947). A promoção envolve a seleção e expansão das células da etapa de iniciação, de maneira que pode levar à formação de um tumor primário. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor (carcinógeno), chamado de *agente oncopromotor* (LOEB e HARRIS, 2008; LORD e ASHWORTH, 2012).

Os compostos que agem como agentes promotores não interagem diretamente com o DNA, porém desencadeiam efeitos biológicos sem serem metabolicamente ativados. Estes agentes aumentam a proliferação das células em tecidos sensíveis, contribuindo para a fixação de mutações, aumentando as alterações na expressão genética e causando mudanças no controle do crescimento celular (GOMES-CARNEIRO et al., 1997; GREAVES e MALEY,

2012; LOEB e HARRIS, 2008; MEHTA, 1995). Uma vez alterado o material genético na célula iniciada, ocorre a alteração na expressão dos genes que regulam a diferenciação e o crescimento celular. Assim sendo, os adutos formados no DNA na iniciação por mecanismos específicos, podem levar às mutações em *proto-oncogenes* (grupo de genes que codificam os produtos que controlam o crescimento celular) ou em *genes supressores tumorais* (grupo de genes que codificam proteínas que inibem a divisão celular), desencadeando o processo de carcinogênese. Quando ocorrem mutações nos proto-oncogenes, estes se tornam oncogenes e causam multiplicação celular excessiva (CHIAL, 2008; RIVOIRE et al., 2001; STRATTON et al., 2009; YATES e CAMPBELL, 2012). A célula alterada pode ficar inativa ou, sob circunstâncias específicas, podem proliferar para uma célula pré-neoplásica e finalmente progredir para uma célula neoplásica, ou seja, uma célula maligna, FIGURA 1.1 e 1.2 (LOEB e HARRIS, 2008; LORD e ASHWORTH, 2012).

Muitos carcinógenos em altas doses são tanto iniciadores como promotores, os quais podem levar a alterações irreversíveis da proliferação celular e expressão fenotípica (primeiro estágio de um processo que decodifica a informação contida no DNA de uma célula) (GREAVES e MALEY, 2012; HARRIS, 1991; MERLO et al., 2006). Os níveis de adutos no DNA são um reflexo das velocidades de formação e remoção dos mesmos, uma vez que depende da ativação do carcinógeno, da eficiência de reparo das lesões no organismo, da estabilidade do aduto e da velocidade de renovação do tecido (POIRER et al., 2000). Alguns estudos mostraram associações entre a formação de adutos no DNA com a mutagênese e tumorigênese (CULP et al., 1998; HEMMINKI, 1993; POIRER e BELAND, 1992; PODLAHA et al., 2012; VERNA et al., 1996).

A *progressão* é o estágio final da carcinogênese. Este estágio consiste na progressão de uma lesão primária ou pré-maligna para uma maligna, envolvendo alterações adicionais no DNA, como por exemplo, nos genes

supressores tumorais (BURREL et al., 2013; BURREL e SWANTON, 2014). Uma vez inativados por mutações, os genes supressores tumorais contribuem para o desenvolvimento do câncer, FIGURA 1.2 (HARRIS, 1991; BLANPLAIN, 2013). A perda da ação destes genes supressores pode levar a célula ao crescimento inadequado, ocorrendo assim, a conversão de tumores primários em secundários, que é acompanhada pela perda no controle do crescimento, invasão de tecidos, metástase e instabilidade genética aumentada. Exemplos desta conversão é a progressão de pólipos benignos do cólon para adenocarcinoma, e, de nódulos hepáticos benignos para hepatoma (LYNCH et al., 2014; PODLAHA et al., 2012; SUN, 1990).

Neste contexto, na metástase ocorre a propagação das células tumorais de um sítio primário até um ambiente distante (órgãos distantes) onde se alojam, conhecido por *nicho pré-metastático* (WANING e GUISE, 2014). Ao propagarem na circulação sanguínea, as células tumorais são ativamente recrutadas para o microambiente da medula óssea, onde encontram um santuário de fatores de crescimento, como citocinas e citocinas que promovem o crescimento e proliferação das mesmas (LANGLEY e FIDLER, 2011). Estas células promovem um desbalanço homeostático, transformando o microambiente da medula óssea, onde recrutam células precursoras derivadas da medula óssea, BMDC (Bone Marrow - Derived Cells). Consequentemente, entram na circulação e colonizam o tumor primário, colaborando assim para uma reação inflamatória e formação da vascularização tumoral, possibilitando a transformação maligna, e progressão tumoral. As BMDC formarão os nichos pré-metastáticos em órgãos distantes, atraindo células tumorais circulantes e gerando o desenvolvimento de tumores macroscópicos (CHANTRAIN et al., 2008; COGHLIN e MURRAY, 2010; PSAILA e LYDEN, 2009; WANING e GUISE, 2014). Deste modo, o microambiente da medula óssea tem uma importante contribuição para a metástase na progressão tumoral, e o entendimento do conjunto complexo de moléculas derivadas das diferentes

fontes celulares que compõem o nicho pré-metastático, torna-o um alvo promissor para a intervenção terapêutica (DESCOT e OSKARSSON, 2013).

Da mesma maneira, o processo de angiogênese como resultado de uma ocorrência epigenética, torna-se essencial para a progressão neoplásica, onde a aquisição de um fenótipo angiogênico, antecede o desenvolvimento de características que contribuem para a malignidade e os atrasos de inibição no desenvolvimento neoplásico (GREAVES e MALEY, 2012; HAWIGHORST et al. 2001; TAM e WEINBERG, 2013). Resumindo, o estágio de progressão pode ser caracterizado primeiramente pela instabilidade cariotípica, evolução e irreversibilidade, com posterior instabilidade genética, crescimento rápido, invasão e metastização, além de mudanças das características bioquímicas, metabólicas e morfológicas das células (BUTTERWORTH et al. 1998; DIXON e KOPRAS, 2004; GUTIÉRREZ e SALSAMENDI, 2001; KLAUNIG et al. 2000; LOEB, 1998; PITOT e DRAGAN, 1991).

Em face do exposto, pode-se dizer que a formação do câncer tem origem na instabilidade genética e epigenética. A epigenética está intrínseca à genética, e é definida como a alteração herdável na expressão gênica, sem que haja mudança na sequência primária do DNA (SHARMA et al., 2010; WOLFFE e GUSCHIN, 2000). Falhas no estabelecimento ou manutenção das marcas epigenéticas podem resultar na ativação ou inibição imprópria de vários genes e alterar a fisiologia celular normal, levando ao desenvolvimento do câncer ou outras patologias (BAUER et al., 2002; DE CARVALHO et al., 2012). Um dos fatores epigenéticos mais descritos em todos os passos da carcinogênese é a metilação do DNA e a modificação das histonas (principais proteínas que compõem a cromatina e interferem na regulação dos genes), FIGURA 1.3 (A) e (B). Entre as modificações que as histonas podem sofrer, estão a metilação, fosforilação e acetilação. Entretanto, na molécula de DNA ocorre apenas a metilação (SZYF, 2007; TAM e WEINBERG, 2013).

A metilação do DNA é reconhecida como um mecanismo de silenciamento dos genes, que consiste na adição de um radical metil ( $\text{CH}_3$ ) no carbono 5 da Citosina, geralmente seguida por Guanina (dinucleotídeo CpG), catalisada por enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), gerando a 5-metilcitosina (5-MeC), FIGURA 1.3, B (ATTWOOD et al., 2002; BELL et al., 2012; MCGARVEY et al., 2007). A 5-metilcitosina é quimicamente instável e pode sofrer desaminação espontânea, resultando em timina. Por outro lado, as modificações das histonas atuam na regulação da transcrição gênica (processo de formação do RNA mensageiro a partir de uma molécula molde de DNA), pois interferem na condensação da cromatina (conteúdo interno do núcleo da célula que não está em divisão) que é estritamente relacionada a áreas de acesso ou não do DNA no mecanismo transcricional, (DE CARVALHO et al., 2012; SHARMA et al., 2010). O perfil de modificação da histona é regulado por inúmeras enzimas ativas, que adicionam e removem modificações covalentes nas proteínas histonas. As histonas acetiltransferases (HATs) e, as histonas metiltransferases (HMTs) acrescentam grupos acetil ( $\text{COCH}_3$ ) e metil ( $\text{CH}_3$ ), respectivamente; as histonas deacetilases (HDACs) e as histonas demetilases (HDMs) atuam removendo esses grupos (HABERLAND et al., 2009; SHI, 2007).

Estes mecanismos são extremamente complexos e não foram totalmente elucidados. Sabe-se que, os mecanismos de metilação do DNA e das modificações das histonas atuam simultaneamente para regular a transcrição gênica (JONES e BAYLING, 2007; ZHAO et al., 2011). O padrão de metilação das histonas influencia na metilação do DNA, contribuindo para uma maior ou menor compactação da cromatina. Portanto, as sequências de DNA não devem estar metiladas para serem transcritas, a menos na região promotora (BELL et al., 2012).

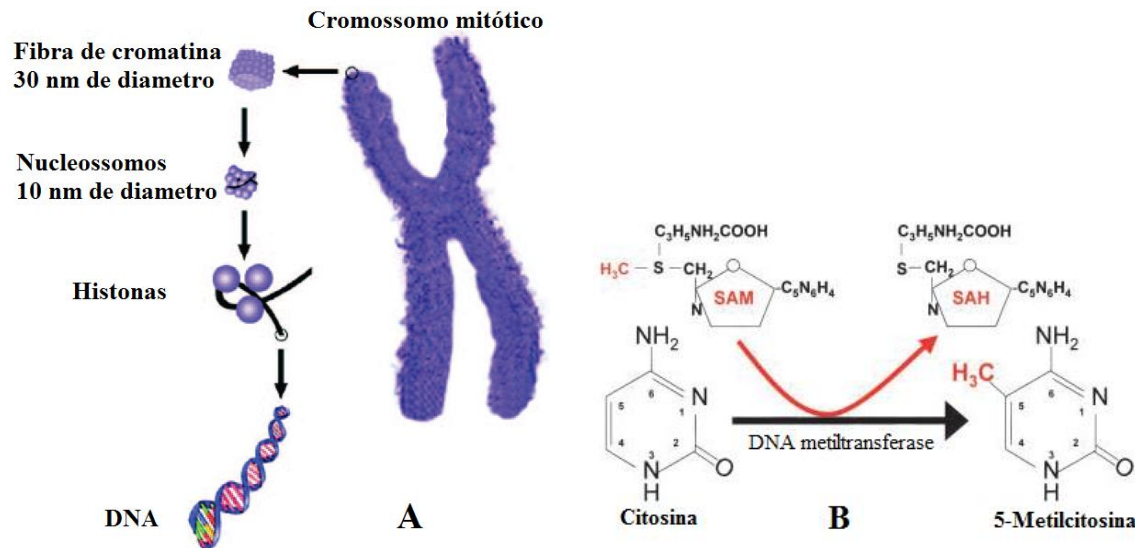


FIGURA 1.3 – (A): Ilustração de um cromossomo, a cromatina, os nucleossomos, as histonas e o DNA. (B): Formação da 5-metilcitosina (5-MeC). Uma enzima DNA metiltransferase catalisa a transferência de um grupo metil (CH<sub>3</sub>) de S-adenosilmetionina (SAM) para (deoxi)citosina, produzindo 5-(deoxi)metilcitosina e S-adenosilhomocistina (SAH) (adaptado de ALMEIDA et al., 2005; ATTWOOD et al., 2002).

A metilação do DNA é essencial durante o desenvolvimento embrionário e em células somáticas nas regiões promotoras, onde os padrões de metilação geralmente são transmitidos com alta fidelidade para as células filhas (DE CARVALHO et al., 2012; DE CARVALHO et al., 2010). Sendo assim, o descontrole nos padrões de metilação está associado a vários tumores humanos, podendo ser encontrado de duas formas, na *hipermetilação* e *hipometilação*. A hipermetilação reprime a transcrição através da região promotora de genes supressores tumorais, e está associada ao silenciamento destes genes. A hipometilação está associada ao desenvolvimento e progressão do câncer pela estimulação dos oncogenes (ATTWOOD et al., 2002; BARTKE et al., 2010; BAUER et al., 2002; DAWSON e KOUZARIDES, 2012).



As pesquisas envolvendo a metilação de DNA têm emergido como um importante papel no estudo de genes relacionados ao desenvolvimento do câncer, assim como nas investigações de desenvolvimento de terapias para o tratamento do mesmo (BESARATINIA e TOMMASI, 2014; CAO et al., 2011; DAWSON e KOUZARIDES, 2012; EASWARAN et al., 2014; KHABELE, 2014; UNOKI et al., 2009).

### **1.1.2 A busca por terapias e melanoma**

É antiga a busca por terapias para o tratamento do cancer. A descrição mais antiga sobre câncer e a tentativa de seu tratatamento data de cerca de 3000 aC, descoberta no Egito em um papiro antigo chamado de “Edwin Smith Papyrus”, parte de um livro antigo sobre cirurgia do trauma. Este papiro relatou sobre o câncer de mama, descrevendo que não existia tratamento. Outro manuscrito que data de cerca de 1500 aC, contém a primeira referência a respeito de tumores em tecidos moles, incluindo a referência de possíveis cânceres de pele, útero, estômago e reto. Os egípcios tratavam a enfermidade com cauterio (ferramenta conhecida por “broca de fogo”), facas, sais e pasta de arsênio que permaneceu em uso até o século XIX, conhecida como “pomada egípcia” (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2012; HAJDU, 2011).

Nas últimas décadas, o câncer ganhou grande dimensão, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que no ano 2030, podem-se esperar 21,4 milhões de casos incidentes de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer (INCA, 2014). No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, também válida para o ano de 2015, aponta uma ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos da doença. Os cânceres mais incidentes na população brasileira no próximo ano serão de pele não melanoma (182 mil), próstata (69 mil); mama (57

mil); cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo de útero (15 mil) (INCA, 2014).

O melanoma representa uma incidência de apenas 7%, de todos os casos de câncer de pele entre homens e mulheres no mundo, porém é responsável por cerca de 80% das mortes relacionadas aos diferentes cânceres cutâneos, apresentando elevada letalidade (PETRELLA et al. 2012). Nas últimas décadas, as taxas de incidência e mortalidade por melanoma maligno cutâneo têm aumentado drasticamente, mais rápido do que os de qualquer outra malignidade. A cada ano são diagnosticados cerca de 200.000 casos novos no mundo. Estima-se que a incidência anual aumenta de 3 a 7% em diferentes países de pele caucasiana, assim a cada 10 ou 20 anos a incidência duplica (MASSARI et al., 2013; VILLALOBOS LEON et al., 2013).

A formação do melanoma é um processo em que os melanócitos, células da epiderme responsáveis pela produção de pigmentação (melanina), sofrem uma transformação maligna (BESARATINIA e TOMMASI, 2014; GRAY-SCHOPFER et al., 2007; LEE et al., 2012). Melanoma é considerado a forma mais perigosa de câncer de pele, causada principalmente como resultado da intensa ou ocasional exposição à radiação da luz ultravioleta, onde os danos no DNA destas células levam à mutações que dão origem à formação de um tumor maligno (MILLER et al., 2006; SKIN CANCER FOUNDATION, 2013).

O tratamento cirúrgico é a principal modalidade terapêutica para doentes com melanoma maligno, no entanto, apesar das melhorias significativas na detecção precoce do melanoma, alguns pacientes permanecem em alto risco de recorrência após a cirurgia definitiva. A taxa de recorrência varia de 30 a 90%, geralmente resultando em morte por melanoma (LEE et al., 2012; PETRELLA et al., 2012). O prognóstico do melanoma pode ser considerado bom se detectado no estágio inicial da doença (INCA, 2013), FIGURA 1.4 (A) e (B).

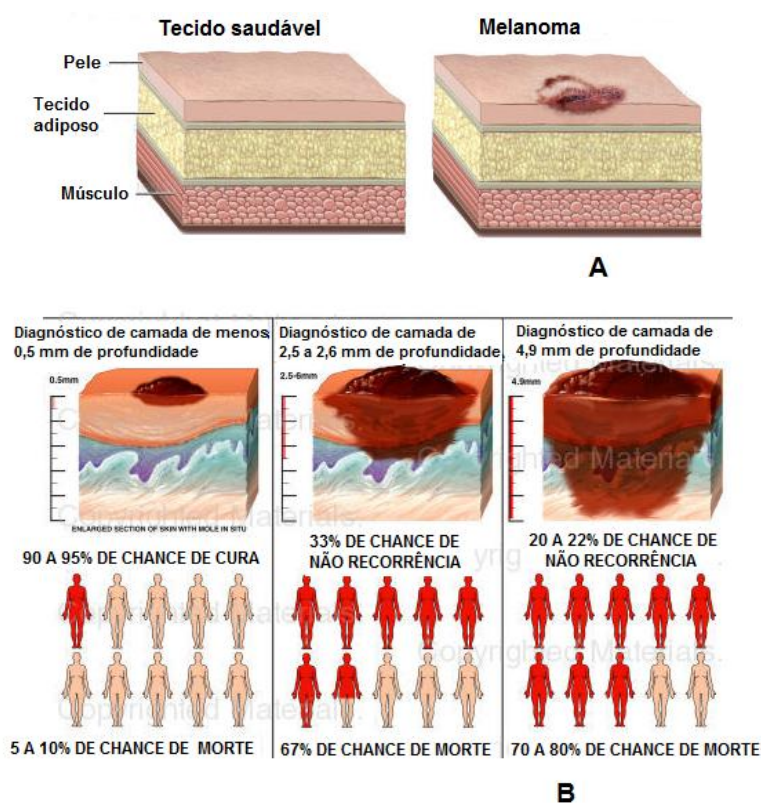


FIGURA 1.4 - Ilustração de melanoma cutâneo, onde **(A)**: Ilustração de uma secção de tecido saudável (esquerda), comparada a outra secção com melanoma (direita); **(B)**: Representação da progressão de um melanoma, onde as taxas de recorrência estão aliadas ao estágio em que a doença foi diagnosticada (adaptado de NUCLEUS MEDICAL ILLUSTRATION).

Atualmente, a modalidade terapêutica baseada na infusão de drogas citotóxicas é ainda a forma primária da abordagem do melanoma metastático. Infelizmente, os resultados encontrados nesta abordagem são bastante decepcionantes na maioria dos casos, apesar do uso disseminado. As drogas mais utilizadas são representadas pela dacarbazina, cisplatina, nitrosuréis (carmustina e lomustina), os alcalóides da vinca (vimcristina e vimblastina) e taxanes (etoposídeo, teniposide e taxol), (GASENT BLESÁ et al., 2011; VELHO, 2012) FIGURA 1.5. O principal e mais ativo quimioterápico no tratamento do melanoma é representado pela dacarbazina. No entanto, estudos

clínicos mostram que, somente 2% dos pacientes que recebem quimioterapia com dacarbazina isolado estarão vivos em seis anos, de maneira que a associação de drogas (poliquimioterapia) não mostrou benefício adicional na taxa de sobrevida (KHATTAK et al., 2013; VILLALOBOS LEON et al., 2013; WAINSTEIN et al., 2004).

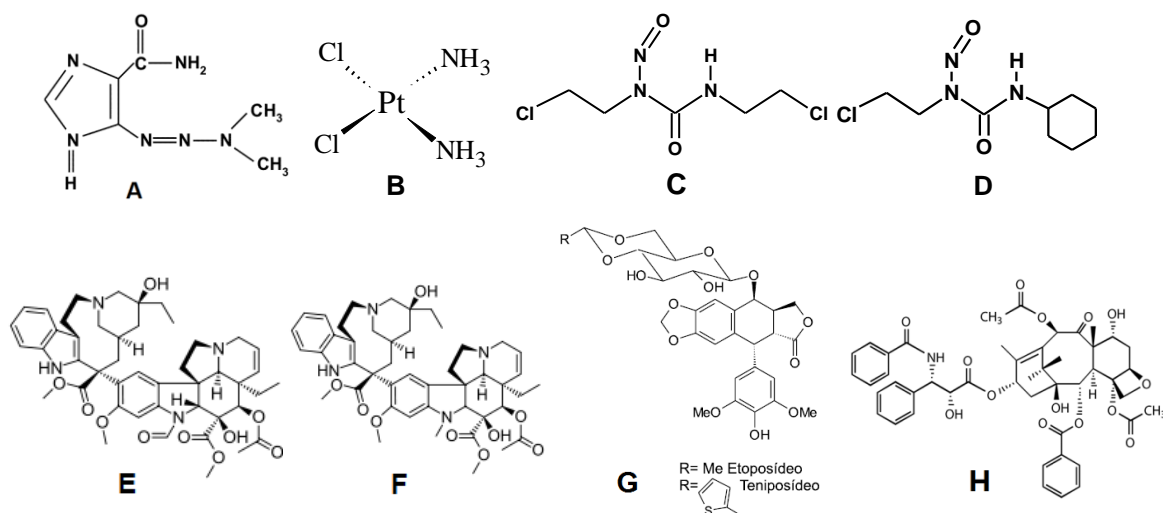


FIGURA 1.5 – Ilustração dos diferentes quimioterápicos utilizados no tratamento de melanoma, onde (A): dacarbazina; (B): cisplatina; (C): carmustina; (D): lamustina; (E): vimcristina; (F): vimblatina; (G): etoposídeo e teniposídeo e (H): taxol.

Nos últimos 40 anos, mesmo com a introdução de novos fármacos em testes clínicos na combinação de quimioterápicos, não houve impacto significativo na sobrevivência de pacientes. Embora as taxas de respostas tenham aumentado com a combinação de quimioterapia e citocinas (grupo diversificado de proteínas não tumorais que agem como mediadoras entre células), como o interferon (IFN) ou interleucina-2 (IL-2), cerca de 30 ensaios clínicos em fase III, em regime de quimioterapia de combinação, com ou sem interferon (IFN) e/ou interleucina-2 (IL-2), mostraram um aumento nas taxas de

toxicidade e resposta, porém não melhorou a sobrevida comparada a monoquimioterapia com dacarbazina (ERRGEMONT e SCHADENDORF, 2009; ERRGEMONT e ROBERT, 2011). Nos EUA, o tratamento com dose elevada de interleucina-2 (IL-2) foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*), em função do número de estudos clínicos de fase II (270 pacientes no total), os quais mostraram respostas positivas e duradouras em 7 % dos mesmos (ATKINS et al., 1999; ERRGEMONT e ROBERT, 2011). No entanto, a dacarbazina é a única droga aprovada nos EUA e no continente europeu (DAPONTE et al., 2013).

Com base nos resultados de ensaios clínicos em fase III, a fotemustina (FIGURA 1.6) foi aprovada apenas em alguns países europeus. Constatou-se que a mesma promove um atraso no início da metástases no cérebro em tratamentos como monoterapia, ou terapia combinada com dacarbazina (AVRIL et al., 2004; DAPONTE et al., 2013). A fotemustina é uma nitrosuréia de terceira geração ativa em melanoma maligno disseminado, especialmente em metástases cerebrais, pela habilidade em atravessar a barreira hematoencefálica (AVRIL et al., 2004; LEE et al., 2012).

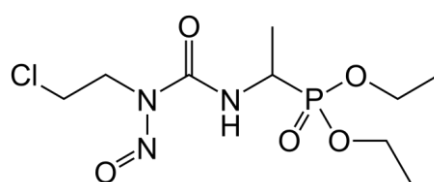


FIGURA 1.6 – Estrutura molecular da fotemustina.

Considerando a complexidade molecular do câncer, com várias anormalidades genéticas e a capacidade de desenvolver resistência às terapias atuais (MASSEY et al., 2010), hoje se faz necessária a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos efetivos no tratamento do câncer que, com seus

diferentes mecanismos ação, atuam de forma não genotóxica aos organismos (CHEN et al., 2010).

## **1.2 Drogas inorgânicas no tratamento do câncer**

Compostos inorgânicos foram usados em medicina por muitos séculos, muitas vezes de uma forma empírica, sem se planejar os compostos a serem utilizados, com pouco ou nenhum conhecimento da sua estrutura molecular e de seu mecanismo de ação (RONCONI e SADLER, 2007). O interesse da busca por novas drogas com centros metálicos, aumentou com a descoberta das propriedades antitumorais do cisplatina, *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], por Rosenberg em 1969. Foi nesta época que se obteve um profundo papel do estabelecimento no campo da química bionorgânica (ROSEMBERG e VANCAMP, 1970; VAN RIJT e SADLER, 2009), a qual se tornou uma ferramenta de crescente importância tanto na medicina terapêutica, como no diagnóstico de doenças. Desta maneira, o potencial dos agentes anticancerígenos a base de metais, passou a ser totalmente explorado após a descoberta da atividade biológica do cisplatina (JUNG e LIPPARD, 2007; THOMPSON e ORVIG, 2006).

A introdução do cisplatina para o tratamento clínico do câncer resultou em melhorias significativas no que diz respeito ao tratamento de diferentes tumores, tais como o carcinoma de ovário e testicular. O cisplatina é considerado um dos agentes mais eficazes no tratamento do câncer testicular, onde a taxa de cura total é de 90%, e cerca de 100% se for tratada no primeiro estágio (MONNERET, 2011). O mesmo é indicado no tratamento de outros tipos de cânceres, como os de esôfago, colorretal, pulmão, linfoma, melanoma, entre outros (WONG e GIANDOMENICO, 1999; VAN RIJT e SADLER, 2009).

As investigações sobre o mecanismo de ação do cisplatina apontam que este reage com várias biomoléculas no nosso organismo, especialmente com aquelas que contêm grupos de nitrogênio, podendo o metal interagir com sítios contendo pares de elétrons livres, especialmente átomos de nitrogênio. Dessa maneira, acredita-se que deve ocorrer a formação de um complexo cíclico com o DNA, o que seria responsável por sua ação como antitumoral (JAMIESON e LIPPARD, 1999).

O cisplatina é administrado por via intravenosa. Enquanto este circula no sangue, onde a concentração de cloretos é alta ( $\sim 100,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), a Pt(II) se mantém coordenada aos ligantes cloretos. Quando o cisplatina entra na célula, onde a concentração de cloretos é baixa ( $\sim 4,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), os ligantes cloretos do complexo são presumivelmente substituídos por moléculas de água, gerando espécies hidrolisadas positivamente carregadas,  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH})_2]^+$  e  $[(\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2)]^{2+}$ , as quais reagem com sítios nucleofílicos de macromoléculas intracelulares, como o RNA e adutos de DNA. A interação com o DNA produz adutos monofuncionais, ligações cruzadas intrafita e interfitas com o átomo de platina, ligado covalentemente na posição N7 da guanina ou adenina. A formação do aduto resulta na inibição da replicação do DNA e da transcrição do RNA na fase G2 do ciclo celular, e/ou morte programada, FIGURA 1.7 (A) (KARTALOU e ESSIGMANN, 2001; MONNERET, 2011).

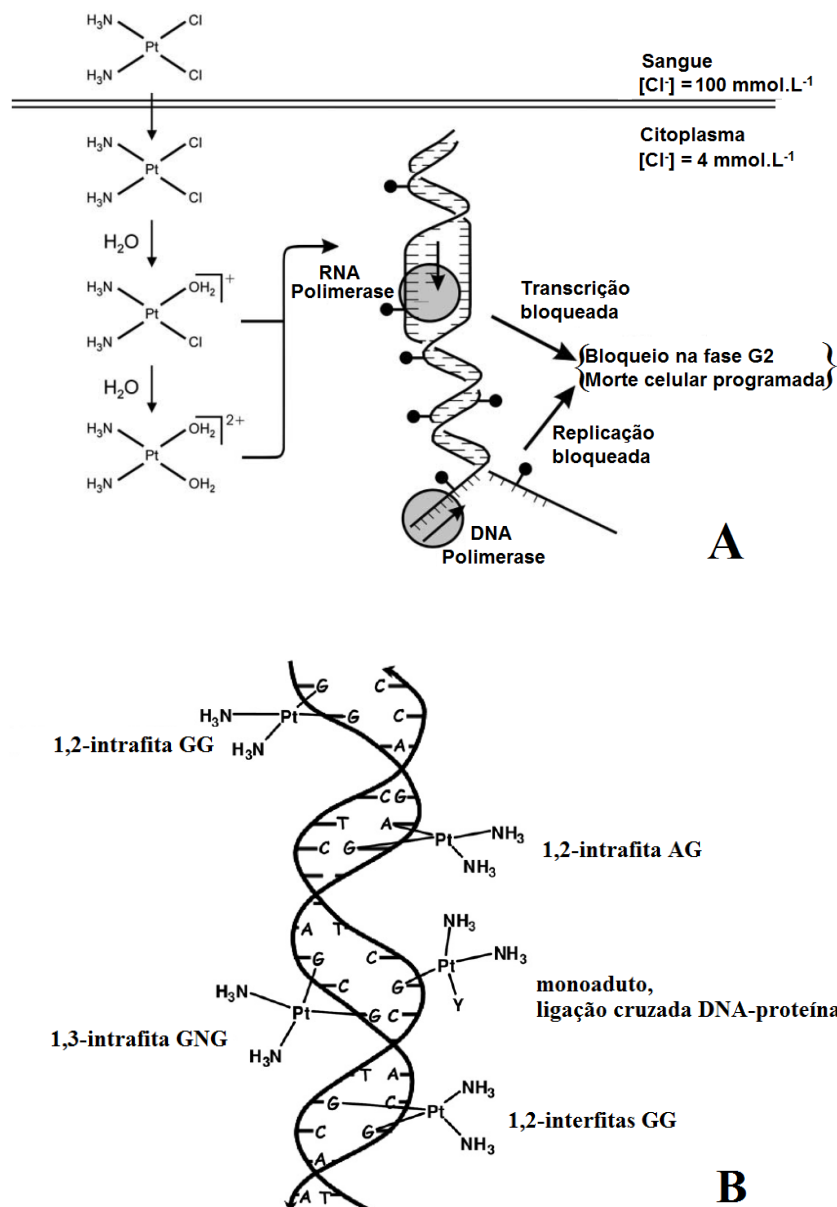


FIGURA 1.7 – **(A)**: Ilustração representando o mecanismo de ação do cisplatina (KARTALOU e ESSIGMANN, 2001). **(B)**: Diferentes adutos DNA-cisplatina formados por ligações cruzadas - 1,2-intrafitas GG: entre guaninas adjacentes; 1,2-interfitas GG: entre guaninas de fitas diferentes do DNA; 1,2-intrafitas AG: entre adenina adjacente à guanina; 1,3-intrafitas GNG: entre purinas separadas por um ou mais intervalos de bases (PIZZARRO e SADLER, 2009).



A coordenação do cisplatina na posição N7 da guanina ou adenina é considerada uma das regiões mais propícias ao ataque nucleofílico pela platina no DNA, pois neles contém sítios de maior acessibilidade e densidade eletrônica. Estes sítios estão expostos no sulco maior da dupla hélice do DNA. Nos últimos anos, muito se tem especulado a respeito das possíveis interações do cisplatina com o DNA. Foi encontrado que as principais formações de adutos com DNA, compreendem cerca de 90% de todos adutos formados em experimentos *in vivo* e *in vitro*, considerando que cerca de 50 a 65% ocorrem como 1,2- intrafita GG; 25% como 1,2-intrafita AG, e menos que 10%, como adutos monofuncionais na guanina (PIZZARRO e SADLER, 2009).

Embora o cisplatina apresente alta eficiência no tratamento de diversos tumores, os efeitos colaterais como ototoxicidade, neurotoxicidade, nefrotoxicidade e mielosupressão, representam uma limitação à sua utilização, além de resistência adquirida à droga após determinado tempo de administração (NUSSBAUMER et al., 2011; RABIK e DOLAN, 2007). Muitos fatores têm sido atribuídos à resistência adquirida do cisplatina, entre eles, a desativação do fármaco por proteínas e peptídeos contendo enxofre no plasma (espécies ricas em aminoácidos como cisteína e metionina que contêm enxofre), ocorrência de reparo no DNA, diminuição do acúmulo do cisplatina na célula e aumento do efluxo (saída do composto para fora da célula) (KELLAND, 2007; ZISOWSKY et al., 2007).

O cisplatina é altamente polar e entra nas células de forma relativamente lenta, quando comparado a outros fármacos de moléculas pequenas. A captação do cisplatina é influenciada por fatores como a concentração de íons sódio e potássio, pH, a presença de agentes redutores, assim como pelos transportadores na difusão passiva (GATELY e HOWELL, 1993). Ainda são motivos de investigação, os mecanismos bioquímicos envolvidos na entrada do cisplatina na célula, mas a difusão passiva tem sido considerada a principal maneira pela qual este composto atravessa a membrana

celular. Estudos mais recentes apontam a importância da difusão ativa, através da participação de transportadores de cobre e transportadores catiônicos orgânicos (TCO) (FUERTES et al., 2003; JUNG e LIPPARD, 2007; KELLAND, 2007).

Com a finalidade de se formarem outros compostos que pudessem diminuir os efeitos adversos, o cisplatina passou por modificações químicas em sua estrutura. Desde então, complexos metálicos com centro de platina tornaram-se alvos de grande interesse na investigação da atividade citotóxica e antitumoral (JAMIESON e LIPPARD, 1999). Neste contexto, o cisplatina [*cis*-diaminadichloroplatina (II)], o carboplatina [diamina(ciclobutano-1,1-dicarboxilato)platina (II)] e o oxaliplatina [(*trans*-L-diaminaciclohexano)oxalatoplatina (II)], FIGURA 1.8, são atualmente os únicos agentes contra o câncer a base de metal em uso clínico mundial (RABIK e DOLAN, 2007; WEXSELBLATT et al., 2012).

Cerca de 40 complexos de platina têm sido investigados em triagem clínica até agora. De todos estes, o satraplatina [bis(acetato-*O*)aminodichloro(ciclo-hexilamina)platina (IV)], um complexo octaédrico de Pt(IV), é considerado no presente, o mais interessante candidato em um avançado estágio clínico fase IV (FIGURA 1.8). A vantagem do satraplatina é que pode ser administrado oralmente em função da sua inércia cinética, diferente dos complexos quadrados planares de Pt(II) clinicamente estabelecidos, os quais são administrados intravenosamente (BERGAMO et al., 2012; JAKUPEC et al., 2008).

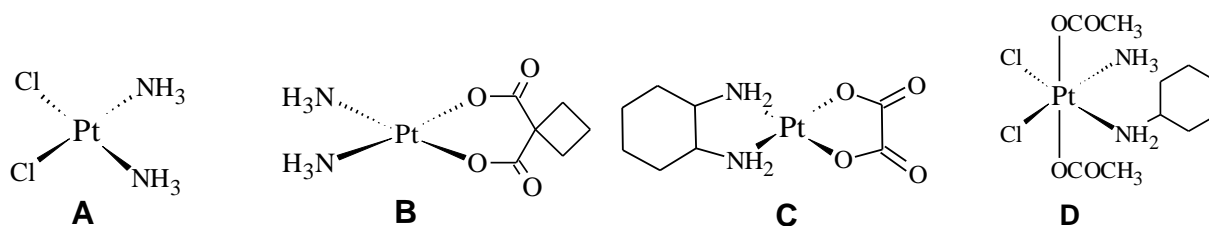


FIGURA 1.8 – Complexos de Pt(II), onde **(A)**: cisplatina; **(B)**: carboplatina, e **(C)**: oxaliplatina; e de Pt(IV), **(D)**: satraplatina.

É estimado que 50-70% dos pacientes com câncer no mundo são tratados com o cisplatina (VACCARO et al., 2009). Estima-se que os compostos de platina, sozinhos ou em combinação com outros fármacos, são usados para tratar de 40 a 80% dos pacientes com câncer, confirmando a importância destes compostos para o tratamento do mesmo, além de encorajar a busca por novos fármacos mais eficientes (NEVES e VARGAS, 2011; THAYER, 2010).

Neste contexto, diversos pesquisadores têm direcionado suas pesquisas para a obtenção de complexos que apresentem atividades antitumorais com outros metais de transição, trazendo possíveis vantagens em relação aos compostos à base de platina. Como a presença de sítios de coordenação adicionais, alterações na afinidade do ligante pelo metal e da cinética de substituição, mudanças no estado de oxidação, possibilidade de utilização na terapia fotodinâmica e, a apresentação de menores ou de nenhum efeito tóxico (BRUIJNINCX e SADLER, 2008; CLARKE, 1999; DYSON e SAVA, 2006; JAKUPEC et al., 2008; MALINA et al., 2001; MCKEAGE et al., 2002; RONCONI e SADLER, 2007; ZHANG e LIPPARD, 2003).

### 1.3 Complexos de rutênio

Muitos metais foram investigados no desenho de novas moléculas como candidatos a fármacos, tais como Au(III), Ti(IV), Ga(III), Cu(II), Rh(III) e Ru(III/II). Alguns já entraram ou terminaram as fases de ensaios clínicos iniciais. Contudo, os mais promissores agentes anticâncer a base de metal, candidatos a quimioterápicos em testes clínicos mais avançados, são os complexos de Ru(III) (SIJA et al., 2014).

A atividade biológica de compostos de rutênio foi reconhecida pela primeira vez na década de 50 (DWYER et al., 1952). Posteriormente, os primeiros relatos sobre a sua atividade anticâncer foi reportada (CLARKE, 1980; DYSON e SAVA, 2006; WONG e GIANDOMENICO, 1999). Inúmeros compostos de rutênio mostraram eficácia em diferentes tumores *in vivo* (BERGAMO et al., 2002), e *in vitro*, os quais mostraram baixa citotoxicidade em relação ao cisplatina em diferentes linhagens celulares tumorais (PLUIM et al., 2004; HARRIS et al., 2009).

Compostos de rutênio exibem inúmeras vantagens, entre elas estão: a geometria octaédrica que oferece possibilidades exclusivas ao ligar-se a ácidos nucleicos; fácil acesso aos estados de oxidações II, III e talvez IV em condições fisiológicas; e a cinética de substituição de ligantes semelhante à platina (FISHER et al, 2014).

Uma série de compostos de Ru(III) possuindo DMSO como ligante, destacam-se na literatura como agentes anticâncer, entre eles está o composto conhecido por NAMI,  $\text{Na}\{\textit{trans}\text{-}[\text{RuCl}_4\text{Im}(\text{DMSO})]\}$ , (acrônimo para *New Anti-tumor Metastasis Inhibitor*), que é ativo em carcinoma de Lewis de pulmão, melanoma B16 e carcinoma mamário MCa, o qual exibe efeito anti-metastático não apresentado pelo cisplatina (BERGAMO et al., 2002; SAVA e BERGAMO, 2000; SAVA et al., 1999). O NAMI-A é derivado do NAMI,  $[\text{ImH}]\{\textit{trans}\text{-}[\text{RuCl}_4(\text{Im})(\text{DMSO})]\}$  (FIGURA 1.9), pela substituição do  $\text{Na}^+$  por

$\text{ImH}^+$ , reportado por MESTRONI et al. (1989) em Trieste na Itália, foi o primeiro complexo de rutênio a entrar em testes clínicos. Estes complexos apresentam baixa toxicidade, não mostrando atividade na inibição do crescimento de tumores primários e nem citotoxicidade em células tumorais *in vitro*, porém exibem efeito antimetastático que afeta a mobilidade das células cancerosas (BERGAMO et al., 2002; SAVA et al., 1999; SAVA e BERGAMO, 2000; SIJA et al., 2014). Observou-se que o NAMI-A não exibe citotoxicidade em células tumorais *in vitro*, mas apresenta atividade *in vivo*. O NAMI-A é um composto que já completou a fase I e II dos testes clínicos (ALESSIO et al., 2004; RADEMAKER-LAKHAI et al., 2004, BARRY e SADLER, 2013).

Estudos de estrutura/atividade demonstraram que, a atividade biológica do NAMI-A está relacionada à liberação progressiva de um ou mais ligantes cloretos. Acredita-se que o centro metálico de Ru(III) sofre redução pela ação de biomoléculas como albumina e/ou transferrina do plasma sanguíneo, como proposto pela clássica hipótese da “ativação por redução”, FIGURA 1.10 (FRAUSIN et al., 2005; GRAF e LIPPARD, 2012). Dessa forma, postula-se que a atividade antitumoral dos compostos de Ru(III) depende da sua redução para Ru(II), de maneira que o aumento da atividade antimetastática do NAMI-A ocorre na presença das biomoléculas que atuam como redutores biológicos (CLARKE, 2003). Ainda não está totalmente esclarecido se estes compostos exercem sua ação através da interação direta com o DNA. Sabe-se, que a alta toxicidade está relacionada com extensiva danificação ao DNA (MURA et al., 2004; NOVAKOVA et al., 2005), e que complexos de Ru(III) que são mais facilmente reduzidos, são mais citotóxicos (JAKUPEC et al., 2005).

O composto de Ru(III) KP1019,  $[\text{IndH}]\{\text{trans}-[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]\}$ , onde ind = indazol, desenvolvido por KEPPLER et al. (1989), em Vienna na Áustria, FIGURA 1.9 (D), está em fase I dos ensaios clínicos. Este composto tem mostrado propriedades antitumorais encorajadoras contra tumores primários (HARTINGER et al., 2006; JUNGWIRTH et al., 2011; FISHER et al., 2014). O

desenvolvimento do composto KP1019 foi baseado em um composto análogo, o ICR,  $[\text{ImH}]\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Im})_2]\}$ , FIGURA 1.9 (C), o qual não mostrou atividade em tumores induzidos em colon de ratos (KEPPLER e RUPP, 1986).

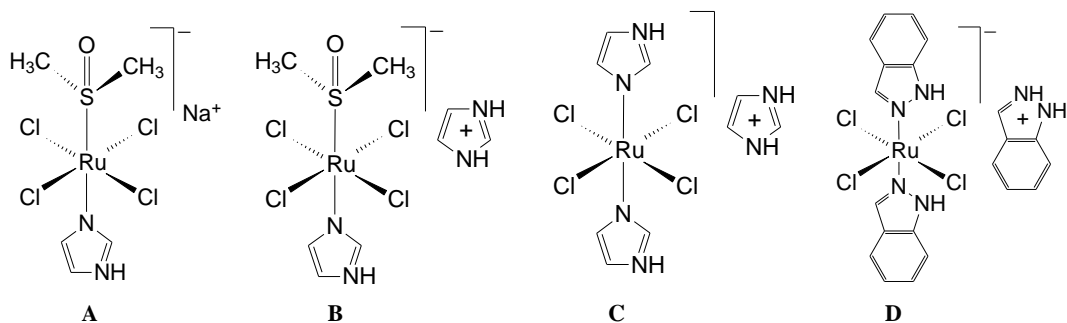


FIGURA 1.9 – Complexos de Ru (III) que apresentam atividade antitumoral, onde (A):  $\text{Na}\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4\text{Im}(\text{DMSO})]\}$  (NAMI); (B):  $[\text{ImH}]\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Im})(\text{DMSO})]\}$  (NAMI-A); (C):  $[\text{ImH}]\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Im})_2]\}$  (ICR); (D):  $[\text{IndH}]\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]\}$  (KP1019).

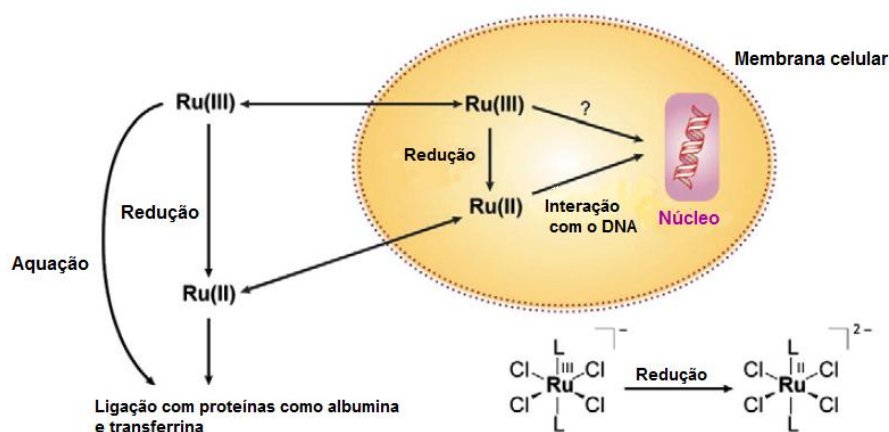


FIGURA 1.10 - Vias de redução de compostos de Ru(III), dentro e fora da célula (GRAF e LIPPARD, 2012).

Estudos da interação do composto KP1019 com o DNA, mostraram que este interage com o DNA de maneira semelhante ao cisplatina, porém com uma intensidade menor em termos de ligações cruzadas DNA-DNA e DNA-proteína, na ordem de 15 vezes menos que as interações apresentadas pelo cisplatina (BERGAMO et al., 2012). Outros autores têm sugerido que o KP1019 sofre ativação *in vivo* por meio da redução de Ru(III) para Ru(II), FIGURA 1.10. Esta redução promove interações com biomoléculas após a aquação da ligação Ru<sup>III</sup>-Cl e a labilização da ligação Ru<sup>II</sup>-Cl (PIZZARRO e SADLER, 2009), permitindo a interação com o DNA, que pode ser por intercalação ou por ligação de hidrogênio. Consequentemente, esta interação induz a apoptose da célula pelo caminho mitocondrial, gerando citotoxicidade por Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), estas interações têm sido investigadas e não estão totalmente esclarecidas (BERGAMO et al., 2009; JAKUPEC et al., 2008; KAPITZA et al., 2005a). Sendo assim, no que diz respeito às interações biológicas e ao mecanismo de ação investigado por Keppler, o composto KP1019 liga-se à transferrina, exibindo maior efeito citotóxico após a redução de Ru (III) para Ru (II), FIGURA 1.10 (BERGAMO et al., 2009). Os compostos de Ru(III) NAMI-A e KP1019, passaram por estudos eletroquímicos de seus potenciais redox (REISNER et al., 2008), de maneira que foi constatado que estes compostos podem ser reduzidos por glutathione e ascorbato em condições fisiológicas (SAVA et al., 2002; SHLUGA et al., 2006).

Complexos de Ru(II) também apresentam potencial atividade anticâncer, particularmente os areno complexos de Ru(II), compostos de fórmula geral  $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]$ . Estes compostos possuem estrutura característica de “piano stool” (FIGURA 1.11), os quais têm sido avaliados quanto às suas propriedades antitumorais. É descrito na literatura que, quando os ligantes Y e Z coordenam como um ligante quelante, ocorre aumento da atividade antitumoral, porém, se os ligantes X, Y e Z são ligantes monodentados, a atividade citotóxica contra a linhagem celular A2780

(carcinoma de ovário) não é observada (YAN et al., 2005). Neste caso, o ligante areno  $\eta^6$  atua como um ligante  $\pi$  acceptor, conferindo estabilidade aos arenos complexos no estado de oxidação II. Somado a isso, a presença de um ligante quelante X-Y parece fornecer uma estabilidade adicional para toda a estrutura molecular. O ligante Z é considerado um “grupo abandonador”, tal como um haleto, proporcionando um sítio de coordenação para biomoléculas (FIGURA 1.11). Sendo assim, pequenas variações nos ligantes X, Y e Z dos arenos complexos, permitem versatilidade à molécula e a possibilidade de “ajuste fino” em suas propriedades farmacológicas (PIZZARRO e SADLER, 2009).

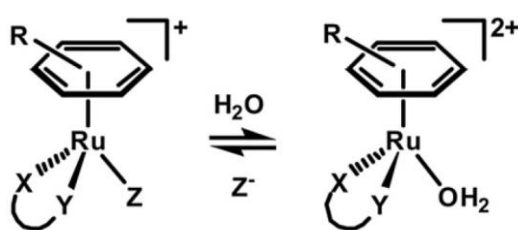


FIGURA 1.11- Estruturas típicas de arenos complexos de Ru(II) de fórmula geral  $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]$  (PIZZARRO e SADLER, 2009).

Outras relações a respeito da estrutura/atividade de areno complexos de Ru(II) têm sido estabelecidas. Quando o ligante é etilenodiamina e o grupo abandonador é cloreto, a citotoxicidade em células de cancer de ovário humano A2780, aumenta proporcionalmente com o aumento do tamanho do areno coordenado. Em geral, areno complexos de Ru(II) mostram potencial atividade contra células tumorais da linhagem A2780. Alguns destes complexos são tão potentes quanto o cisplatina e o carboplatina (AIRD et al., 2002; DOUGAN et al., 2006; MORRIS et al., 2001; ; WANG et al., 2005).

Neste sentido, os arenos complexos de Ru(II) têm sido extensivamente investigados quanto às suas interações com o DNA, mas estas



interações normalmente apresentam caráter monofuncional, onde a base de coordenação do Ru(II) com a molécula de DNA pode acontecer no N7 da guanina, ou por ligação de hidrogênio entre uma amina se tiver etilenodiamina quelada ao rutênio ( LIU et al., 2006), ou por intercalação no C6O da guanina, quando tiver um ligante bifênil ou derivado de antraceno (CHEN et al., 2003) . A FIGURA 1.12 ilustra a forte ligação existente entre a unidade  $\{(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})\}^{2+}$  com um dos nitrogênios da base guanina, assim como a interação do H do  $\text{NH}_2$  no ligante etilenodiamina com o oxigênio da guanina. O mesmo não ocorre com a base adenina, na qual dois grupos  $\text{NH}_2$  se repelem impedindo a aproximação do nitrogênio da base (CHEN et al., 2003; PIZZARRO e SADLER, 2009).

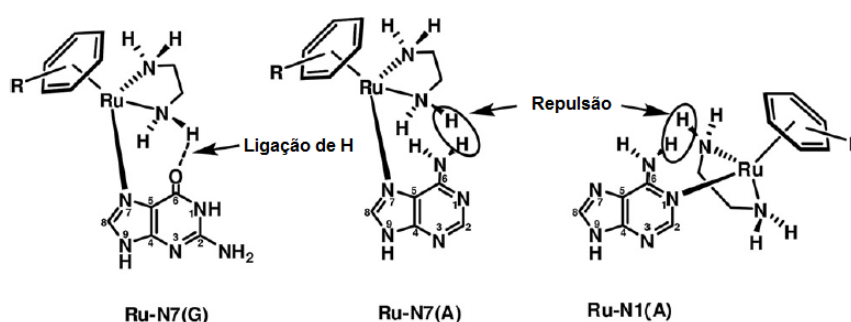


FIGURA 1.12 - Interações de hidrogênio e estéricas que promovem ligação forte da unidade  $\{(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})\}^{2+}$  à guanina, e ligação fraca com adenina (PIZZARRO e SADLER, 2009).

## 1.4 Complexos metálicos com ligantes fosfínicos

A importância do papel de complexos fosfínicos aplicada à medicina recebeu grande impulso após a descoberta da atividade antiartrítica exibida pelo complexo Auranofina,  $[\text{Et}_3\text{PAuSGlu}(\text{Ac})_4]$ , aprovado para uso clínico em 1985 nos Estados Unidos, (FIGURA 1.13). Deste modo, há cerca de 30 anos as atividades antitumorais deste composto passaram a ser exploradas. Seguindo a tendência do cisplatina, que começou a ser utilizado como antitumoral no tratamento ovariano e testicular, SIMON et al. (1979) observaram em seus estudos, que concentrações micromoleculares do auranofina eram capazes de destruir células cancerosas em cultivo (QUEIROZ e BATISTA, 1996). Também foi relatado que o Auranofina, foi capaz de aumentar o tempo de sobrevivência de ratos com leucemia ip P388 (BERNERS-PRICE et al., 1986; SIMON et al., 1981).

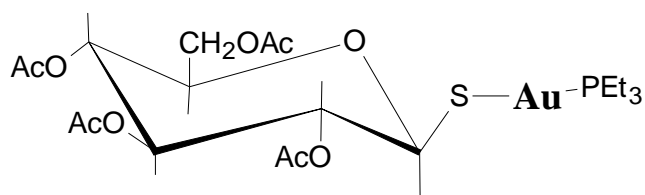


FIGURA 1.13 - Estrutura do complexo de ouro conhecido como auranofina, [(2,3,4,6,-tetra- O- acetil-1-tio  $\beta$ -D-glucopiranosato)(trietilfosfina)ouro(I)].

Estudos posteriores mostraram que, apesar do composto auranofina ser citotóxico para diferentes células cancerosas em culturas, nos experimentos *in vivo* foi ativo contra um único modelo de tumor, leucemia ip P338, somente quando administrado intraperitonealmente (MIRABELLI et al., 1985). Com base nestes resultados, MIRABELLI et al. (1986) passaram a investigar a

relação estrutura/atividade destes compostos. Os resultados mostraram que variações nos ligantes eram capazes de promover mudanças expressivas no potencial citotóxico e na atividade antitumoral de vários compostos, como a remoção do grupamento trietilfosfina, PEt, do complexo auranofina. Este composto sem a trietilfosfina, [AuSGlu(Ac)<sub>4</sub>], apresentou redução do potencial citotóxico em aproximadamente 150 vezes, ficando obvio que a potencial citotoxicidade *in vitro* e a atividade antitumoral *in vivo*, estavam relacionadas à presença do ligante fosfínico no complexo auranofina (MIRABELLI et al., 1986).

BERNERS-PRICE et al. (1986), reportou a avaliação do composto [Au(dppe)<sub>2</sub>]Cl em vários modelos tumorais transplantáveis *in vivo*, como a leucemia ip P388, sarcoma M5075, melanoma B16 e adenocarcinoma mamário 16/C, onde o composto mostrou atividade antitumoral. Nas avaliações *in vitro*, este composto inibiu o crescimento de células B16 e P388. Diversos estudos reportados por BERNERS-PRICE e SADLER (1988), sugeriram que a atividade farmacológica do composto [Au(dppe)<sub>2</sub>]Cl se deve à liberação da fosfina dppe (difenílfosfinaetano), considerando que este deve ser o agente citotóxico no alvo biológico. De tal modo que a labilidade da ligação Au-P se faz necessária para a abertura do anel quelato, possibilitando a extremidade livre da bifosfina para a abertura do anel (BERNERS-PRICE e SADLER, 1988).

Em outras investigações, verificou-se que ao introduzir a propriedade lipofílica nos complexos de ouro por meio da coordenação de um ligante alquil ou fenilfosfina, houve um aumento da citotoxicidade dos complexos fosfínicos, na mesma proporção que aumentava a capacidade de permeação na membrana celular, que é da natureza lipoproteica (BERNERS-PRICE e SADLER, 1988). Adicionalmente, em estudos de RMN <sup>31</sup>P e <sup>1</sup>H, foi observado que ao ser adicionado o auranofina no plasma sanguíneo, este era absorvido imediatamente por células vermelhas, enquanto que outro composto avaliado sem fosfina, apenas “cobria” a superfície dos eritrócitos (unidades

morfológicas da série vermelha do sangue) (OTIKO et al., 1983; MIRABELLI et al., 1986).

Salienta-se aqui, que os ligantes bifosfínicos quando livres também são ativos em culturas de células tumorais, porém mostram menor expressão. Na tentativa de buscar uma relação entre a atividade biológica e as propriedades dos ligantes bifosfínicos, o comportamento de auto-oxidação foi investigado, de maneira que se determinou o pKa destes ligantes (BERTINE, 1994). Os resultados indicaram que os ligantes que sofrem a oxidação mais lentamente, e que apresentam menor pKa, são aqueles cujos complexos são mais ativos, indicando fortes evidências de que a droga ativa seja o ligante bifosfínico (BERNERS-PRICE et al., 1986). Sugeriu-se então, que a complexação do ligante bifosfínico no átomo de ouro o protege da oxidação, entregando-o no alvo biológico na forma não oxidada. Dessa forma, o átomo de ouro atuaria protegendo o ligante da oxidação, uma vez que as fosfinas não apresentariam efeito citotóxico no estado oxidado (JOHNSON et al., 1985).

Os ligantes fosfínicos chamam a atenção porque são ligantes neutros e muito versáteis, apresentando propriedades de ligação  $\sigma$  doadora e  $\pi$  receptora, atribuindo estabilidade nos metais de transição em diferentes estados de oxidação, tanto nos mais baixos, como nos mais altos (MCAULIFFE e MACKIE, 1994). As fosfinas possuem par de elétrons capaz de formar ligações estáveis e orbitais híbridos, do tipo  $3p\sigma^*d\pi$  vazios capazes de receber elétrons, sendo adequadas à retrodoação (FIGURA 1.14). A densidade eletrônica, neste tipo de ligação química, fica sinergisticamente compartilhada entre o ligante e o metal, gerando ligações mais estáveis (VALLE et al., 2008).

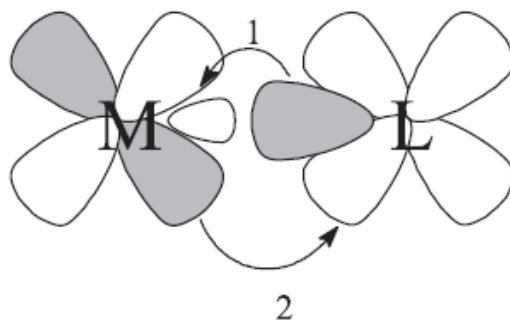


FIGURA 1.14 – Representação das interações metal-ligante, onde 1 = ligação  $\sigma$  e 2 = retrodoação  $\pi$  (VALLE et al., 2008).

Baseados nos estudos da auranofina, pesquisadores têm investigado diversos complexos fosfínicos com centros metálicos diferentes do ouro. Estes compostos têm sido submetidos à avaliação da atividade citotóxica, em diversas linhagens de células tumorais, os quais mostraram atividade expressiva. Salienta-se aqui os complexos de Ru-areno-fosfina, de fórmula geral  $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-areno})\text{L}]$ , (areno =  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}$ ,  $\text{C}_7\text{H}_8$ ,  $\text{C}_6\text{H}_6$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_2\text{Im}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2\text{Et}$ ,  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}$  e  $\text{L} = 1,3,5\text{-triazol-7-fosfaadamantano}$  e  $1,3,5\text{-triazol-N-metil-7-fosfaadamantane}$ ), os quais mostraram atividade citotóxica *in vitro* contra a linhagem tumoral de adenocarcinoma TS/A, enquanto que para a linhagem não tumoral de mama HBL-100 não foi observada citotoxicidade, de modo que exibiu seletividade para células tumorais. Em ensaios *in vivo*, dois dos compostos mostraram efeito antimetástico no pulmão de camundongos com implante de carcinoma mamário MCa, onde os mesmos não mostraram atividade na inibição no tumor primário (SCOLARO et al., 2005). Outros complexos organometálicos de Pd(II) contendo dppp, dppb e dppf, de fórmula geral  $\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-dmba})_2(\text{N}_3)_2(\mu\text{-dppb})$ ,  $[\text{Pd}(\text{C}^2\text{-dmba})(\text{N}_3)(\text{dppp})]$  e  $[\text{Pd}_2(\text{C}^2, \text{N-dmba})_2(\text{N}_3)_2(\mu\text{-dppp})]$ , dmba = N,N-dimetilbenzilamina, apresentaram atividade em células tumorais de colon do útero (HeLa), orofaringe (Hep-2) e glioma cerebral (C6), e *in vivo*, mostraram atividade em ratos com implante de carcinoma mamário (Walker-256), onde

constatou-se uma inibição de 90% no desenvolvimento tumoral (BINCOLETTO et al., 2005).

Nos últimos anos, o grupo de pesquisa LERCI (Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos) tem investigado diversos complexos contendo fosfinas como ligantes. Complexos do tipo  $[\text{RuCl}_3(\text{dppb})(\text{H}_2\text{O})]$ , onde  $\text{dppb} = 1,4$  bis(difenilfosfina)butano, foi ativo contra células tumorais humanas de melanoma (UACC-62), carcinoma renal (TK-10) e adenocarcinoma de mama (MCF-7), e os compostos de fórmula geral  $[\text{RuCl}_3(\text{dppb})\text{L}]\text{Cl}$  ( $\text{dppb} = 1,4$  bis(difenilfosfina)butano) e  $\text{L} = 2$ -benzoilpiridina tiossemicarbazona ( $\text{H}_2\text{Bz}_4\text{DH}$ );  $N(4)$ -metil ( $\text{H}_2\text{Bz}_4\text{M}$ ) e  $N(4)$ -fenil ( $\text{H}_2\text{Bz}_4\text{Ph}$ ), apresentaram atividade citocida seletiva em células tumorais de melanoma UACC-62 (GRAMINHA et al., 2008). Outros complexos de fórmula geral  $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{L})]\text{PF}_6$  [ $\text{dppp} = 1,3$ -bis(diphenilfosfina)propano;  $\text{L} =$ piridina, 4-methylpyridine, 4-phenylpyridine and dimethyl sulfoxide] foram avaliados em células de câncer de mama MDA-MB231, mostrando potencial atividade frente a estas células (GOLFETO et al., 2010). Os complexos de fórmula geral  $[\text{RuCl}_2(\text{P})_2(\text{N}-\text{N})]$ , onde  $(\text{P})_2 = (\text{PPh}_3)_2$ ;  $\text{dppb} = 1,4$ -bis(difenilfosfina)butano;  $\text{dppp} = 1,3$ -bis(difenilfosfina)propano;  $\text{N}-\text{N} = 5,5'$ -dimetil-2,2' dipiridil(5,5'-metilbipiridina) ou 4,4'-dimetil-2,2' dipiridil (4,4'-metilbipiridina)], mostraram atividade citotóxica em células de câncer de mama MDA-MB231 (SANTOS et al., 2013).

Neste sentido, tem-se verificado que a fosfina associada a outros ligantes com propriedades biológicas de interesse, mostra grande influência nas características dos complexos em diferentes ensaios biológicos já investigados, de modo que tais resultados se mostram relevantes quando se trata de um candidato a quimioterápico para o tratamento do câncer.

## 1.5 Ligantes de interesse biológico

Muitas moléculas, com propriedades biológicas interessantes têm sido investigadas e reportadas na literatura quando coordenados a um centro metálico. Entre estas moléculas, conhecidas como ligantes, estão as mercaptopirimidinas, os ligantes N-heterocíclicos, o ácido picolínico na forma de íon picolinato, os aminoácidos (FIGURA 1.15), o óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono (CO). Desta maneira, o grupo LERCI tem procurado estudá-los, associados ou não aos ligantes fosfínicos, como o 1,4-bis(difenilfosfina)butano (FIGURA 1.15), na esfera de coordenação do centro metálico de rutênio, com o propósito de investigar a relação estrutura/atividade destes complexos, quando são avaliados em ensaio biológicos, sejam *in vitro* ou *in vivo*.

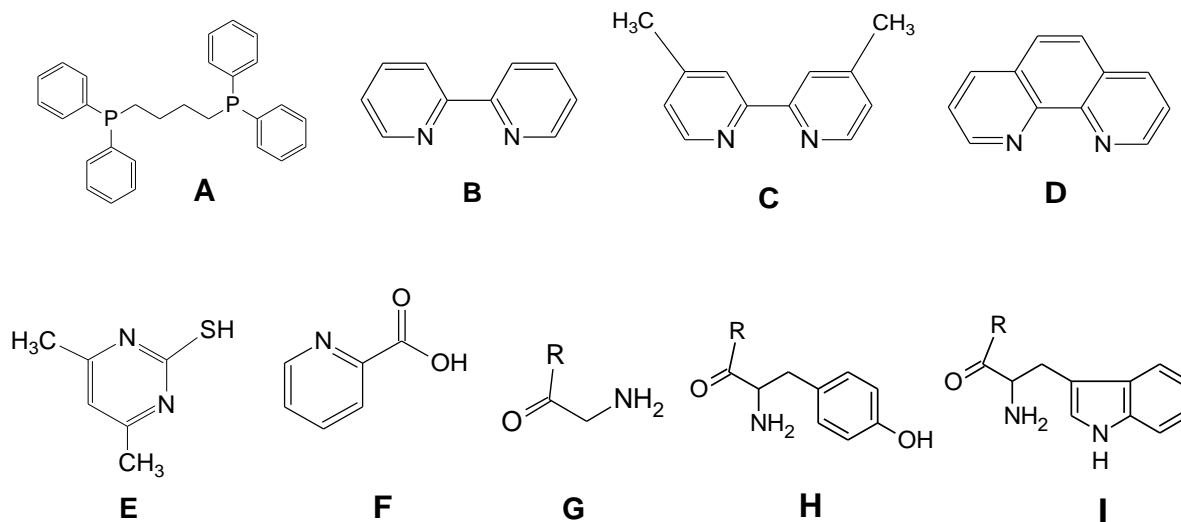


FIGURA 1.15 – Alguns ligantes de interesse biológico (A): 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb); (B): biperidina (bipy); (C): 4,4'-dimetil-2,2'-biperidina (4,4'-mebipy); (D): 1,10-fenatrolina (fen); (E) 4,6-dimetil-2-mercaptopiridina (SpymMe<sub>2</sub>-N,S); (F): ácido picolínico (Hpic); (G): glicina (Gly); (H): tirosina (Tyr) e (I): triptofano (Trp).

De acordo com a literatura, os ligantes N-heterocíclicos (como a biperidina, 4,4'-dimetil-2,2'-biperidina e fen), possuem a característica de mimetizar estruturas de moléculas biológicas, como ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, entre outras que apresentam propriedades particulares no metabolismo humano (SANTIAGO, 2004). Complexos de rutênio contendo ligantes N-heterocíclicos têm sido bastante pesquisados, pois estes ligantes são muito versáteis, apresentando propriedades químicas e físicas como as fosfinas, descritas anteriormente (CUNHA et al., 1999; MEYER e MCCLEVERTY, 2003).

As mercaptopirimidinas têm sido muito estudadas nos últimos anos, em função das suas estruturas apresentarem semelhanças com as nucleobases dos ácidos nucleicos, como citosina, timina e uracilo. Neste sentido, receberam atenção por suas propriedades bioquímicas interessantes, pois são substâncias que mostram várias propriedades farmacológicas, tais como analgésicas, antiinflamatórias e anticancerígenas (PARVEN et al, 2010).

Quanto ao ácido picolínico, é descrito na literatura que apresenta a propriedade de estimular a apoptose em células cancerosas (FERNANDEZ-POL et al, 2001; OGATA et al., 2001), assim como tem um papel fisiológico na absorção de zinco, de modo que interfere no crescimento celular (EVANS et al., 1980). Em estudos *in vivo*, onde ratos receberam implante de células tumorais, mostraram que os animais tratados com o ácido picolínico em combinação com o macrófago ativado, tiveram significativo aumento do tempo de vida comparado ao controle que não recebeu tratamento (RUFFMAN et al., 1987).

Os aminoácidos são moléculas orgânicas disponíveis em nosso organismo. No entanto, as células tumorais exibem um aumento na procura de uma variedade de nutrientes, devido ao seu rápido crescimento. Entre estes nutrientes, os aminoácidos são particularmente importantes, não apenas como



blocos de construção para a síntese de proteína, mas também como ativadores nas vias de sinalização de nutrientes, uma vez que regula a sobrevivência das células que estão hiperativas em muitos tipos de câncer (CHRISTIE et al., 2002). Portanto, a disponibilidade dos aminoácidos pode ser um fator-chave para a sobrevivência de células em tecidos tumorais, pois a atividade das vias de sinalização é muitas vezes regulada para absorver mais nutrientes em cânceres humanos (BJORNSTI e HOUGHTON, 2004; FAN et al., 2010). Neste contexto, a coordenação de aminoácidos complexados ao centro metálico de rutênio têm sido investigados, a fim de conferir a sua citotoxicidade em células tumorais (MAJUMDER e BHATTACHARYA, 1999; WU e ZHOU, 2010), de modo que atuem com menor toxicidade em células saudáveis.

O óxido nítrico (NO) é a menor e mais simples molécula biologicamente ativa. Este é considerado uma molécula endógena que cumpre variadas funções no organismo, como neurotransmissor, molécula citoprotetora e citotóxica, entre outras. O NO também está envolvido em diversas atividades realizadas pelo sistema imunológico, assim como atua em diversos órgãos como cérebro, pulmões, pâncreas, útero entre outros, como também é considerado um vasodilatador (IGNARRO, 2000). O estudo das propriedades de complexos de rutênio coordenados à molécula de NO tem despertado grande interesse, pois estes complexos atuam como “consumidores”, e/ou provedores de óxido nítrico. Neste contexto, muitos pesquisadores têm investigado as atividades biológicas destes nitrocomplexos, inclusive como antitumoral, os quais têm apresentado resultados promissores em relação ao cisplatina (BATISTA et al., 1997; BATISTA et al., 2001; KARIDI et al., 2005).

Aparentemente a toxicidade do monóxido de carbono (CO) parece ser incompatível para o papel terapêutico. Enquanto a toxicidade do CO já era conhecida desde os tempos dos gregos e romanos, seus efeitos benéficos foram descobertos apenas no século XX. Verificou-se que o CO é produzido endogenamente, sendo gerado durante a degradação do grupo heme pelas

enzimas heme oxigenase (HO-2) e (HO-1) (MAINES, 1998; ROMÃO et al. 2012). A partir da descoberta da produção endógena do monóxido de carbono, vários estudos foram efetuados, baseando-se na utilização do CO em aplicações terapêuticas (WANG, 1998). Com base nas propriedades do CO, complexos carbonílicos de metais de transição estão surgindo como uma ferramenta biológica, no sentido de imitar a bioatividade da geração de CO endogênico, no transporte e liberação de CO. Desse modo, investigar a atuação do CO coordenado a complexos metálicos no meio biológico, confere perspectivas para aplicações terapêuticas (FORESTI et al., 2004; WU e WANG, 2005). Muitos estudos têm mostrado que os carbonilos complexos apresentam diversas atividades, entre elas estão, a vasodilatação, a supressão da inflamação e cardiomiopatia (FORESTI e MOTTERLINE, 2010), como também têm sido investigada a citotoxicidade destes complexos frente às células tumorais de mama MDA-MB231 (BARBOSA, 2007).

As áreas fundamentais na criação de compostos ativos são o controle de toxicidade, dos efeitos colaterais e o direcionamento do metal para tecidos específicos, órgãos ou células em que a atividade é necessária (RONCONI e SADLER, 2007). Para tanto, o uso de ligantes de origem orgânica não é em vão, não se limitando a compostos orgânicos que se ligam a íons metálicos, modificando as propriedades físicas e/ou químicas destes íons. Estes podem ser introduzidos em um sistema para limitar os efeitos adversos da sobrecarga dos íons metálicos, inibir metaloenzimas selecionadas, ou mesmo facilitar a redistribuição do íon metálico. Alguns dos efeitos colaterais podem incluir a modificação de reatividade e lipofilicidade, estabilizando estados de oxidação específicos, no entanto na atualidade, a arquitetura molecular intencional pode ir muito além destes efeitos (STORR et al., 2005).

Mencionando a toxicidade, relata-se aqui o principal problema associado à administração de medicamentos anti-câncer, em que a droga é distribuída em todo o corpo causando efeitos secundários indesejáveis. Neste

sentido, torna-se de fundamental importância na aplicação de novos quimioterápicos, minimizar os efeitos colaterais adversos da quimioterapia, tendo como alvo apenas o tumor, não os demais tecidos do organismo (HUSSEINIA et al., 2013). Em face do exposto, estudos relacionados à avaliação de novos compostos em ensaios pré-clínicos, como a atividade citotóxica em células tumorais e saudáveis, bem como os estudos relacionados à genética toxicológica e atividade antitumoral, são de extrema importância na avaliação e consequente administração de uma dose segura de um candidato a fármaco.

## *2.Objetivos*

## 2- OBJETIVOS

### 2.1- Objetivos gerais

Avaliar complexos de rutênio (II) por meio de triagem em ensaios biológicos *in vitro* com o propósito de seleção e encaminhamento aos ensaios biológicos *in vivo*.

### 2.2 - Objetivos específicos

- 1) Avaliar os compostos de rutênio (II): (1)  $[\text{Ru}(\text{Pic})_2(\text{dppb})]$ ; (2)  $\text{Ru}(\text{SpyMe}_2)_2(\text{dppb})$ ; (3)  $[\text{RuCl}(\text{SpyMe}_2)_2\text{NO}]$ ; (4)  $[\text{Ru}(\text{Gly})(\text{dppb})(4,4'\text{-mebipy})]\text{PF}_6$ ; (5)  $\text{Ru}(\text{Gly})(\text{dppb})(\text{fen})\text{PF}_6$ ; (6)  $[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(4,4'\text{-mebipy})]\text{PF}_6$ ; (7)  $[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$ ; (8)  $[\text{Ru}(\text{Trp})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$  e (9)  $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  sintetizados e caracterizados pelo grupo de pesquisa LERCI, por meio de triagem em ensaios biológicos *in vitro*, na avaliação da citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e não tumoral;
- 2) Avaliar da interação do composto (9)  $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  com o DNAct (DNA calf thymus) e a BSA (Albumina - Bovine serum Albumine);
- 3) Avaliar o potencial citotóxico e genotóxico do composto (9)  $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  em diferentes concentrações, por meio do teste do micronúcleo *in vitro*, nas linhagens celulares V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês) e HepG2 (hepatocarcionoma humano);
- 4) Avaliar o potencial citotóxico e genotóxico em diferentes doses do composto (9)  $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  no teste do micronúcleo em sangue periférico e medula óssea de camundongos machos Swiss;

- 5) Avaliar o potencial genotóxico do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> por meio da análise das frequências de danos no DNA pelo ensaio cometa em hepatócitos de camundongos machos Swiss;
- 6) Avaliar do potencial antitumoral *in vivo* do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, por meio da análise do volume tumoral em camundongos machos C57BL/6 com implante tumoral de melanoma com células do tipo B16-F10.
- 7) Avaliar do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> em análises histopatológicas

## *3. Parte experimental*

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Compostos avaliados

Os compostos avaliados neste trabalho foram sintetizados e caracterizados por alunos de mestrado e doutorado do grupo de pesquisa LERCI (Laboratório de Estrutura e reatividade de Compostos Inorgânicos). A escolha dos compostos foi realizada considerando o histórico da atividade biológica e antitumoral dos ligantes (moléculas de interesse biológico) coordenados ao centro metálico de rutênio. Na avaliação do potencial citotóxico *in vitro* dos diferentes compostos de rutênio, frente às diferentes linhagens celulares tumorais, seguiu-se o critério para triagem *in vitro* proposto pelo NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI, 2014). O composto (droga) foi testado primeiramente em uma pré-triagem em pelo menos três linhagens tumorais humanas, sendo o composto ativo em uma ou mais linhagens tumorais na pré-triagem, seguiu-se com a triagem em outras células neoplásicas em diferentes doses. Posteriormente à triagem *in vitro*, foi dado seguimento aos ensaios biológicos *in vivo*, onde utilizo-se diferentes modelos experimentais (NCI, 2014).

Na TABELA 3.1 estão representadas as fórmulas moleculares e estruturas químicas dos compostos avaliados neste trabalho, com a respectiva referência. Adicionalmente, alguns ligantes estão representados na TABELA 3.2.



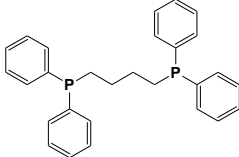
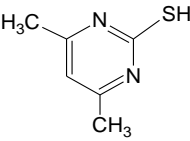
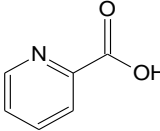
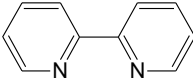
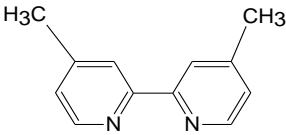
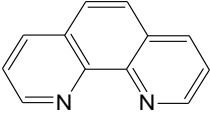
TABELA 3.1 – Estruturas moleculares dos compostos avaliados neste trabalho

Compostos	Fórmula molecular	Estrutura química	Referências
1	$[\text{Ru}(\text{dppb})(\text{SpymMe}_2\text{-N,S})_2]$		MONDELLI et al., 2014
2	$[\text{RuCl}(\text{SpymMe}_2\text{-N,S})_2(\text{NO})]$		MONDELLI et al., 2014
3	$[\text{Ru}(\text{pic})_2(\text{dppb})]$		MONDELLI FLEITAS, 2011
4	$[\text{Ru}(\text{Gly})(\text{dppb})(4,4'\text{-mebipy})]\text{PF}_6$		SANTOS, 2011
5	$[\text{Ru}(\text{Gly})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$		SANTOS, 2011
6	$[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(4,4'\text{-mebipy})]\text{PF}_6$		SANTOS, 2011

TABELA 3.1 – Continuação. Estruturas moleculares dos compostos avaliados neste trabalho

Compostos	Fórmula molecular	Estrutura química	Referências
7	$[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$		SANTOS, 2011
8	$[\text{Ru}(\text{Trp})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$		SANTOS, 2011
9	$ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$		BARBOSA, 2007
<b>Controle positivo</b>	$cis\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ Cisplatina		Metalofármaco de referência

TABELA 3.2 – Estruturas químicas dos ligantes avaliados referentes aos compostos estudados

Ligantes	Abreviatura e nomenclatura	Estrutura química	Referente ao composto
1	<b>dppb</b> 1,4-bis(difenilfosfina)butano		1,3,4,5,6,7,8 e 9
2	<b>SpymMe<sub>2</sub>-N,S</b> 4,6-dimetil-2-mercaptopirimidina		2
3	<b>HPic</b> ácido picolínico		3
4	<b>Bipy</b> 2-2'-bipiridina		9
5	<b>4,4'-mebipy</b> 4,4'-Dimetil-2,2'-bipiridina		4 e 6
6	<b>fen</b> 1,10-fenatrolina		8

## **3.2 SISTEMAS-TESTE *IN VITRO***

### **3.2.1 Linhagem celular, condições de cultivo e incubação dos compostos**

As linhagens celulares empregadas foram: fibroblastos de pulmão de hãmsler Chinês (V79), gentilmente cedida pela Universidade Estadual de Londrina - UEL; adenocarcinoma de mamário humano (MCF-7) gentilmente cedida pela Universidade Estadual Paulista - UNESP; glioblastoma humano (MO59J) gentilmente cedida pelo Laboratório de oncologia pediátrica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto; carcinoma cervical de colo uterino (HeLa); glioblastoma (U251); hepatocarcinoma (HepG2) e melanoma murino (B16-F10), compradas diretamente do Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ/UFRJ. Estas linhagens encontram-se estocadas em nitrogênio líquido (-195°C), em alíquotas de  $1,0 \cdot 10^6$  células mL<sup>-1</sup> em uma solução de congelamento composta de 50% de meio de cultura (Ham F10 + DMEM, na proporção 1:1, Sigma-Aldrich), 40 % de soro bovino fetal (Nutricell) e 10% de DMSO (Sigma-Aldrich).

Para a realização dos experimentos, as células foram descongeladas e colocadas em cultivo em meio de cultura (Ham F10 + DMEM, na proporção 1:1, Sigma-Aldrich) para as linhagens V79 e MCF-7; e DMEM, Sigma-Aldrich, para as demais linhagens celulares. Todas as culturas celulares foram suplementadas com 10,0 % de soro bovino fetal (Nutricell),  $1,2 \text{ g mL}^{-1}$  de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich),  $0,1 \text{ g mL}^{-1}$  de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e  $0,06 \text{ g mL}^{-1}$  penicilina (Sigma-Aldrich).

As células foram cultivadas em monocamadas com 10 mL de meio de cultura utilizando-se frascos descartáveis de 25 cm<sup>2</sup> de área (Corning) a 37°C em estufa de B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio - Fanem) para a linhagem V79, e, em estufa de CO<sub>2</sub> (Sanyo), para as linhagens HeLa, U251,

HepG2 e B16-F10. A cada dois ou três dias as células foram sub-cultivadas, utilizando-se PBS para lavá-las e ATV (solução de tripsina 0,2 % + versene 0,02 %, Instituto Adolfo Lutz) na proporção de 1 ATV: 1 PBS, para desprender as células da superfície interna do frasco de cultura. Após o desprendimento das células, aproximadamente 1,5 mL de meio de cultura completo foi adicionado ao frasco de cultivo de tecido para a inativação do ATV, sendo homogeneizado em seguida. Um volume de 100,0 µL de solução contendo células foi utilizado para semear frascos de cultivo de tecido contendo 10,0 mL de meio de cultura, sendo incubado a 37°C, o ciclo celular foi de 12 a 24 h sob as condições de cultivo.

Para o “screening” dos compostos candidatos a fármacos, inicialmente foram preparadas duas soluções estoques, onde 1,0 mg de cada composto foi solubilizado em DMSO e, em seguida, diluído de 1,0 a 5,0 mL de meio de cultura. Considerando que a concentração final de DMSO junto às células não deve ultrapassar 1,0 % e que o volume de meio de cultura em cada poço é 100,0 µL. Deste modo, as diluições dos complexos e de alguns de seus ligantes foram feitas como descritas a seguir:

### **Compostos:**

- (1) **[Ru(dppb)(SpymMe<sub>2</sub>-N,S)<sub>2</sub>]**

$$MM = 805,9 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se as soluções estoques nas seguintes concentrações:

$$\text{Solução 1: } 624,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \qquad \text{Solução 2: } 62,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1 adicionou-se 32,0; 16,0 e 8,0 µL para as respectivas concentrações de 200,0; 100,0 e 50,0 µmol.L<sup>-1</sup>.

Da solução 2 adicionou-se 40,0; 20,0; 10,0; 5,0; e 2,5 µL para as respectivas concentrações 25,0; 12,5, 6,25; 3,0 e 1,5 µmol L<sup>-1</sup>.

- **(2) [RuCl(SpymMe<sub>2</sub>-N,S)<sub>2</sub>NO]**

$$MM = 444,9 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se as soluções estoque nas seguintes concentrações:

$$\text{Solução 1: } 749,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \quad \text{Solução 2: } 74,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1, adicionou-se 26,7; 13,5; 6,7 e 3,3  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 200,0; 100,0; 50,0 e 25,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Da solução 2, adicionou-se 17,0; 8,5; 4,2 e 1,3  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 12,5; 6,25; 3,12 e 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

- **(3) [Ru(pic)<sub>2</sub>(dppb)]**

$$MM = 771,7 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se as soluções estoques nas seguintes concentrações:

$$\text{Solução 1: } 645,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \quad \text{Solução 2: } 62,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1, adicionou-se 31,0; 15,5; 7,7 e 3,8  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 200,0; 100,0; 50,0 e 25,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Da solução 2, adicionou-se 20,0; 10,0; 5,0 e 1,6  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 12,5; 6,25; 3,12 e 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

- **(4) [Ru(Gly)(dppb)(4,4'-mebipy)]PF<sub>6</sub>**

$$MM = 930,8 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se as soluções estoques nas seguintes concentrações:

$$\text{Solução 1: } 1074,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \quad \text{Solução 2: } 107,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1, adicionou-se as alíquotas de 18,6; 9,3 e 4,6  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações: 200,0; 100,0 e 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Da solução 2, adicionou-se as alíquotas de 23,3; 11,6; 6,0; 3,0 e 1,0 para as respectivas concentrações: 25,0; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

- **(5) [Ru(Gly)(dppb)(fen)]**

$$MM = 926,9 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se as soluções estoques nas seguintes concentrações:

$$\text{Solução 1: } 1079,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \qquad \text{Solução 2: } 107,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1, adicionou-se as alíquotas de 18,5; 9,3 e 4,6  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações: 200,0; 100,0 e 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Da solução 2, adicionou-se as alíquotas de 23,2; 12,0; 6,0; 3,0 e 1,0 para as respectivas concentrações: 25,0; 12,5; 6,25; 3,12 e  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

- **(6) [Ru(Tyr)(dppb)(4,4'-mebipy)]PF<sub>6</sub>**

$$MM = 1036,9 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se as soluções estoques nas seguintes concentrações:

$$\text{Solução 1: } 964,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \qquad \text{Solução 2: } 96,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1, adicionou-se as alíquotas de 20,7; 10,4 e 5,2  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações: 200,0; 100,0 e 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Da solução 2, adicionou-se as alíquotas de 26,0; 13,0; 6,5; 3,25 e 1,0 para as respectivas concentrações: 25,0; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

- **(7) [Ru(Tyr)(dppb)(fen)]PF<sub>6</sub>**

$$MM = 1032,9 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se as soluções estoques nas seguintes concentrações:

$$\text{Solução 1: } 968,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \qquad \text{Solução 2: } 96,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1, adicionou-se as alíquotas de 20,7; 10,3 e 5,2  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações: 200,0; 100,0; e 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Da solução 2, adicionou-se as alíquotas de 26,0; 13,0; 6,5; 3,25 e 1,0 para as respectivas concentrações: 25,0; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

- **(8) [Ru(Trp)(dppb)(fen)]PF<sub>6</sub>**

$$MM = 1041,9 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se as soluções estoques nas seguintes concentrações:

$$\text{Solução 1: } 959,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \quad \text{Solução 2: } 96,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1, adicionou-se as alíquotas de 20,8; 10,4 e 5,2  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações: 200,0; 100,0; e 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Da solução 2, adicionou-se as alíquotas de 26,0; 13,0; 6,5; 3,25 e 1,0 para as respectivas concentrações: 25,0; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

- **(9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>**

$$MM = 892,1 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se as soluções estoque nas seguintes concentrações:

$$\text{Solução 1: } 560,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \quad \text{Solução 2: } 56,05 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1 adicionou-se as alíquotas de 36,0; 18,0 e 9,0  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 200,0; 100,0 e 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Da solução 2, adicionou-se 44,5; 22,0; 11,0; 5,5 e 2,0  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações: 25,0; 12,5; 6,25; 3,0 e 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

- **Cisplatina, *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] - Controle positivo.**

$$MM = 300,1 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se as soluções estoques nas seguintes concentrações:

$$\text{Solução 1: } 833,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \quad \text{Solução 2: } 83,31 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1 adicionou-se 24,0; 12,0 e 6,0  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 200,0; 100,0 e 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Da solução 2 adicionou-se 30,0; 15,0; 7,5; 4,0 e 2,5 para as respectivas concentrações de 25,0; 12,5; 6,25; 3,0 e 2,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .



## Ligantes:

- **(1) dppb**

$$MM = 426,48 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se as soluções estoques nas seguintes concentrações:

$$\text{Solução 1: } 1.172,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \quad \text{Solução 2: } 117,23 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1, adicionou-se 25,6; 17,0; 8,5 e 4,25  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 300,0; 200,0; 100,0 e 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Da solução 2, adicionou-se 21,3; 10,7; 5,5  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 25,0; 12,5; e 6,25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

- **(2) SpymMe<sub>2</sub>-N,S**

$$MM = 140,2 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se a solução estoque na seguinte concentração:

$$\text{Solução 1: } 566,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1 adicionou-se 44,2; 35,0; 18,0; 9,0; 4,5; 2,0 e 1,0  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 300,0; 200,0; 100,0; 50,0; 25,0; 12,5 e 6,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

- **(3) HPic**

$$MM = 123,1 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se as soluções estoques nas seguintes concentrações:

$$\text{Solução 1: } 812,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \quad \text{Solução 2: } 81,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1, adicionou-se 37,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,1 e 1,6  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 300,0; 200,0; 100,0; 50,0; 25,0 e 12,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Da solução 2, adicionou-se 8,0; 3,7 e 1,2  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 6,25; 3,0 e 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

- **(4) bipy**

$$MM = 158,2 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se as soluções estoques nas seguintes concentrações:

$$\text{Solução 1: } 1.264,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \quad \text{Solução 2: } 126,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1, adicionou-se 24,0; 16,0; 8,0; 4,0 e 2,0  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 300,0; 200,0; 100,0; 50,0 e 25,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Da solução 2, adicionou-se 10,0; 5,0; 2,5 e 1,0  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 12,5; 6,25; 3,0 e 1,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

- **(5) 4,4'-mebipy**

$$MM = 184,2 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se as soluções estoques nas seguintes concentrações:

$$\text{Solução 1: } 1.085,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \quad \text{Solução 2: } 108,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1, adicionou-se 28,0; 18,0; 9,0; 4,6 e 2,3  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 300,0; 200,0; 100,0; 50,0 e 25,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Da solução 2, adicionou-se 11,5; 6,0; 2,8 e 1,0  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 12,5; 6,25; 3,0 e 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

- **(6) fen**

$$MM = 180,3 \text{ g mol}^{-1}$$

Prepararam-se as soluções estoques nas seguintes concentrações:

$$\text{Solução 1: } 1.098,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \quad \text{Solução 2: } 109,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$$

Da solução 1, adicionou-se 27,0; 18,0; 9,0; 4,5 e 2,3  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 300,0; 200,0; 100,0; 50,0 e 25,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Da solução 2, adicionou-se 11,4; 5,7; 2,7 e 1,0  $\mu\text{L}$  para as respectivas concentrações de 12,5; 6,25; 3,0 e 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Partindo das alíquotas das soluções dos compostos citados acima, os volumes de meio de cultura foram previamente calculados e adicionados em

cada poço da placa de microcultivo (96 poços), de forma que completassem um volume final de 100,0  $\mu\text{L}$ , com as concentrações finais desejadas.

### 3.2.2 Ensaio colorimétrico *in vitro*

Os compostos de 1-9, cisplatina e os ligantes foram testados nas diferentes linhagens celulares: V79 (não tumoral); U251, MCF-7, HeLa, HepG2 e B16-F10 (tumerais), utilizando a metodologia do ensaio *in vitro* do kit XTT (ROCHE), de acordo com o fabricante; kit 1: reagente labilizante XTT, 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5sulfofenil]-2H-tetrazólio-5-carboxanilida, 1,0 mg  $\text{mL}^{-1}$  estéril sem vermelho de fenol; e kit 2: reagente acoplador de elétrons PMS (metil sulfato de N-metil dibenzopirazina), 0,383 mg  $\text{mL}^{-1}$  (1,25 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) em solução tampão fosfato (PBS) estéril.

Para o ensaio foi realizada a contagem das células com auxílio da câmara de Neubauer, de tal forma que fosse possível a pipetagem de aproximadamente 10.000 células em 20,0  $\mu\text{L}$  de suspensão celular. As células foram expostas a diferentes concentrações dos compostos em placa de 96 poços para microcultivo de tecido (estéril), de maneira que completassem um volume final de 100,0  $\mu\text{L}$  em cada poço. Os compostos foram adicionados em triplicatas na placa de microcultivo de tecido em diferentes concentrações, em seguida a placa de microcultivo foi armazenada em estufa (37°C /5%  $\text{CO}_2$ ) por 24 horas. Protocolo seguido de acordo com NG et al. (2006) e ASHIDI et al. (2010), com modificações. Após este período, o meio de cultura contendo os compostos foi removido, onde adicionou-se 100,0  $\mu\text{L}$  do meio HAM-F10 sem vermelho de fenol e 50,0  $\mu\text{L}$  de solução do kit XTT (ROCHE, 2011). A placa de microcultivo vai novamente para a estufa de B.O.D. (Marconi) permanecendo por um período de 17 horas.

Após o período de 17 horas, uma solução formazan de cor laranja foi formada, a qual foi espectrofotometricamente quantificada por absorbância, utilizando um leitor de multi-placas, (ELISA - Tecan - SW Magalhães vs 5,03 DST 2PC) no comprimento de onda de referência entre 450,0 a 620,0 nm. A quantidade de produto solúvel formado (formazan) foi proporcional ao número de células viáveis, FIGURA 3.1 (SHROTEROVÁ et al., 2009; BERRIDGE et al., 2005). O grupo controle negativo foi considerado como 100,0%, de maneira que os resultados foram expressos em relação a porcentagem do controle negativo. Os resultados obtidos na forma de viabilidade celular foram calculados para serem expressos em valores de IC<sub>50</sub> (concentração da droga que é necessária para reduzir 50,0 % do crescimento celular), foram estimados graficamente a partir da curva de dose-resposta de cada composto e do cisplatina (controle positivo), utilizando o programa Graphpad Prism Software, versão 4,0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram avaliados levando em consideração todos os controles, positivo (cisplatina e DMSO 25,0 %) e negativo (controle sem tratamento), FIGURA 3.1. Para verificar o efeito do solvente DMSO (dimetilsulfóxido), testes de controle de solvente foram adicionados, uma vez que os compostos foram dissolvidos em uma solução ≤ 1,0 % de DMSO.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{O}_D \text{ teste} / \text{O}_D \text{ controle}) \times 100,$$

onde: O<sub>D</sub> teste = densidade ótica dos compostos testados e

O<sub>D</sub> controle = densidade ótica do controle.

Valores de índice de seletividade (IS) foram adicionados, os quais foram determinados pela razão entre os valores de IC<sub>50</sub> das células não tumorais em relação aos valores de IC<sub>50</sub> das células tumorais:

$$\text{IS} = \text{IC}_{50(\text{células não tumorais})} / \text{IC}_{50(\text{células tumorais})}$$

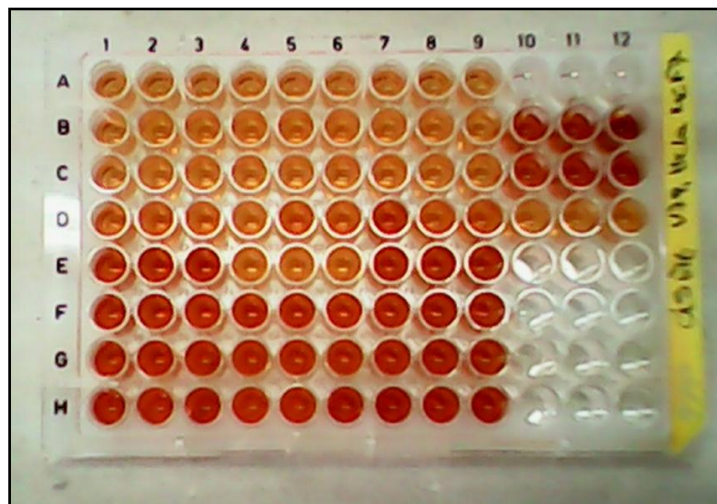


FIGURA 3.1- Ensaio colorimétrico pela técnica XTT. A formação de formazan é proporcional à quantidade de células viáveis, onde A1 – A9: baixa viabilidade celular; H1 – H9: Células viáveis; B10- B12: Controle negativo, células 100,0 % viáveis; C10 – C12: Controle de solvente (DMSO 1,0 %), células 100,0 % viáveis; D10 – D12: Controle positivo DMSO 25,0 %, baixa viabilidade celular.

### 3.2.3 Estudos de interação com o DNA

Preparou-se uma solução de DNA com a adição de aproximadamente 40,0 mg de DNAct (Deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus - Tipo 1, Sigma Aldrich) em 20,0 mL de tampão trizma-HCl (4,5 mM de Trizma HCl, 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de Trizma base e 50,0 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl) a um pH de 7,1. A concentração exata do DNAct foi determinada por espectroscopia na região do UV-vis. Em uma cubeta contendo apenas a solução tampão em um volume de 2.000,0 µL, foram adicionados 80,0 µL da solução de DNAct e, na sequência foi realizada a medida. Sabe-se que a absorvidade molar do DNAct em 260,0 nm é 6.600,0 mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> L. Desta modo, conhecendo-se a absorbância e a absorvidade molar em 260,0 nm e o caminho óptico (b = 1,0 cm), determinou-se a concentração do DNAct por meio da lei de Lambert Beer:

$$A_{260} = \epsilon_{260} \times b \times C$$

As titulações foram realizadas utilizando-se duas cubetas: na cubeta 1 foi adicionado 1.800,0 µL de tampão trizma e 200,0 µL de DMSO, correspondendo ao branco e, na cubeta 2 foi adicionado 1.800,0 µL de tampão trizma e 200,0 µL da solução do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> previamente preparado em DMSO (concentração que não ultrapasse a Lei de Lambert-Beer; concentração encontrada: 100,0 µmol L<sup>-1</sup>). Conseqüentemente, foram feitas adições sucessivas de 20,0 µL de DNAct em solução (concentração de 4.280,0 µmol L<sup>-1</sup>). As soluções foram homogêneas por cerca de 1 minuto, e, em seguida, registrado o espectro por espectroscopia na região do ultravioleta/visível.

O DNAct em solução foi adicionado tanto no branco como na amostra, com o propósito de garantir que toda variação espectral observada fosse oriunda da interação do complexo com o DNAct. Adicionalmente, o DMSO foi acrescentado ao branco para descontar qualquer possível interação que este apresente com o DNAct. Na ordem de se obter quantitativamente as afinidades intrínsecas de ligação, a constante  $K_b$  foi calculada utilizando a seguinte equação (RAMAN et al., 2010):

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

Onde :

[DNA]: concentração de DNAct;

$\varepsilon_a$  e  $\varepsilon_b$ : absorvidade molar correspondente a  $A_{\text{obs}}/[\text{complexo}]$ ;

$\varepsilon_f$ : absorvidade molar final da titulação do composto com o DNAct.

A constante  $K_b$  é encontrada plotando um gráfico  $[\text{DNA}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$  vs.  $[\text{DNA}]$ , onde é encontrado pela relação entre a inclinação e a intersecção da reta.

### 3.2.4 Estudos de interação com a BSA

O estudo de interação do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> com a albumina bovina, BSA (Bovine Serum Albumine, A2153, Sigma-Aldrich), foi realizado por meio da medida de supressão da fluorescência dos resíduos triptofano. Para tanto, foi empregado uma solução 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de BSA em tampão trizma pH 7,4. A extinção da intensidade de emissão dos resíduos triptofano em 340,0 nm (comprimento de

onda de excitação 280,0 nm) foi monitorada utilizando composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> como supressor em diferentes concentrações (1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 μmol L<sup>-1</sup>), solubilizados em DMSO.

Os experimentos foram realizados em triplicatas empregando uma placa opaca para cultivo de tecido (96 poços). Em cada poço foram adicionados 180,0 μL de BSA e 20,0 μL de solução do complexo, onde as diferentes concentrações do composto foram avaliadas. As medidas foram efetuadas em um fluorímetro SpectraMax M3 nas seguintes temperaturas: 295,15; 300,15; 305,15 e 310,15 K (22,0; 27,0; 32,0 e 37,0 °C).

Para o cálculo da constante extinção de Stern-Volmer, K<sub>sv</sub>, utilizou-se a equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q]$$

Onde:

F<sub>0</sub> e F: fluorescência da BSA na ausência e na presença do composto respectivamente;

[Q]: concentração do composto;

O valor de K<sub>sv</sub> é obtido plotando um gráfico F<sub>0</sub>/F vs [Q].

Para a avaliação dos parâmetros de ligação e interação com a BSA utilizou-se a equação de Scatchard:

$$\text{Log} \frac{(F_0 - F)}{F} = \text{log } K_b + n \text{log}[Q]$$

Onde:

K<sub>b</sub>: constante de interação para a ligação do complexo com a BSA;

n: número de sítios de ligação entre o composto e a BSA;



$F_0$  e  $F$ : fluorescência da BSA na ausência e na presença do composto respectivamente;

$[Q]$ : é a concentração do composto;

O valor de  $K_b$  foi obtido plotando um gráfico  $\log(F_0 - F)/F$  vs  $\log[Q]$ , calculando o antilogarítmo de  $n$ .

Com o propósito de se avaliar o tipo de interação, incluindo interação hidrofóbica, vários parâmetros termodinâmicos como energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ), variação de entalpia ( $\Delta H^\circ$ ) e variações de entropia ( $\Delta S^\circ$ ) foram calculados com base na equação:

$$\Delta G^\circ = - RT \ln K = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$$

Onde:

$R$  = constante dos gases ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

$K$  = constante de interação com a BSA ( $K_b$ )

A variação da entalpia ( $\Delta H^\circ$ ) e a variação da entropia ( $\Delta S^\circ$ ) foram obtidos a partir da inclinação e da intersecção pelo fator de van 't Hoff, plotando um gráfico com  $\ln K_b$  vs  $1/T$ :

$$\ln K_b = - \frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

### 3.2.5 Ensaio de Micronúcleo *In Vitro*

No teste de micronúcleo *in vitro* foi utilizado o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, selecionado por apresentar boa reprodutibilidade em síntese e por ter apresentado potencial atividade citotóxica *in vitro* em diferentes linhagens tumorais. Neste experimento, este composto foi testado em duas linhagens celulares: V79 (fibroblastos de pulmão de hamster Chinês) e HepG2 (hepatocarcinoma humano), com o propósito de se averiguar a citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* frente às duas linhagens, uma linhagem saudável e outra tumoral. Neste sentido, diferentes concentrações do composto foram previamente determinadas por um teste piloto em células da linhagem V79. Neste ensaio foram avaliadas concentrações de 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  do composto, de modo que foram consideradas citotóxicas as concentrações  $\geq 2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Para tanto, as concentrações estabelecidas foram de 0,32; 0,63 e 1,25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para as duas linhagens celulares. A concentração do cisplatina foi determinada por triagem nas concentrações de 0,33 (0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); 3,33 (1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 33,33  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (10,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A concentração estabelecida de cisplatina foi de 3,33  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , a qual foi genotóxica, porém com ausência de citotoxicidade. A concentração de MMS (metilmetanosulfonato), utilizada como controle positivo foi baseada na literatura, de acordo com FRANKE et al. (2005).

As concentrações de 0,32; 0,62; 1,25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foram preparadas a partir de uma solução estoque de 20,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . O cisplatina, *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (droga de referência), foi utilizada como controle positivo na concentração de 3,33  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , assim como o MMS (metilmetanosulfonato) em solução tampão fosfato na concentração de 400,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (FRANKE et al, 2005).

### 3.2.5.1 Células V79

Para a realização do ensaio do micronúcleo *in vitro*, 500.000 células foram previamente semeadas em frascos de cultivo de tecido e incubadas por 25 horas em estufa B.O.D. a 36,5°C anteriormente aos tratamentos. Passadas 25 horas, o meio de cultura completo foi retirado e então foram adicionados 5,0 mL de meio de cultura sem soro bovino fetal. As culturas celulares foram submetidas aos diferentes tratamentos: complexo em teste, controle positivo e controle negativo, as quais foram incubadas por 3 horas a 36,5°C em estufa B.O.D., segundo FENECH (2000).

Terminado o período de tratamento, as culturas celulares foram lavadas com PBS. Após o descarte do PBS foram adicionados aos frascos de cultivo de tecido, 5,0 mL de meio de cultura completo e citocalasina B (Ctb: 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), substância que age inibindo a actina no final da divisão celular, bloqueando assim a citocinese. A citocalasina B impedirá a separação das células-filhas, resultando em células binucleadas para análise no experimento. Após as 17 horas de incubação, as preparações das células binucleadas para a análise convencional de micronúcleos foram obtidas e preparadas de acordo com MENOLI et al., 2001, segundo os procedimentos a seguir:

- a) Transfere-se o meio de cultura para tubos de centrífuga identificados e lava-se cada frasco de cultura com 5,0 mL de PBS, descartando o mesmo após a lavagem;
- b) Adiciona-se 0,5 mL de uma solução 1 PBS:1 ATV em cada frasco para desprender as células do frasco de cultivo;
- c) Coloca-se 5,0 mL do meio de cultura + PBS que estava no tubo de centrífuga, no frasco de cultivo para inativação do ATV e logo após, o meio deve ser devolvido para seu respectivo tubo de centrífuga;

- d) Centrifuga-se a 900 rpm por 5 minutos, despreza-se o sobrenadante até restar 1,5 mL e desfaz-se o *pellet*;
- e) Adiciona-se 1,5 mL de solução hipotônica (citrato de sódio) pela parede do tubo, divulsionando suavemente;
- f) Centrifuga-se novamente a 900 rpm por 5 minutos, descarta-se o sobrenadante e homogeneiza-se o sedimento;
- g) Acrescenta-se 5,0 mL de fixador recém-preparado (3 metanol:1 ácido acético) por 24 horas;
- h) Após 24 horas, centrifuga-se a 900 rpm por 5 minutos;
- i) Retira-se o sobrenadante utilizando uma pipeta Pasteur, deixando a quantidade suficiente para a confecção das lâminas (aproximadamente 0,5 a 0,3 mL).

As lâminas de microscopia foram previamente limpas e imersas em água destilada gelada. Duas a três gotas da suspensão celular foram gotejadas na lâmina inclinada. Após um período para a secagem das lâminas, à temperatura ambiente, foi procedida a coloração das mesmas em solução de Giemsa a 3,0 % diluída em tampão fosfato (pH 6,8) por 5 minutos, lavadas na sequência com água destiladas e secas ao ar. A análise das células foi feita por microscopia óptica sob objetiva de imersão (aumento:1000 X).

### 3.2.5.2 Células HepG2

Para a realização do ensaio do micronúcleo em células HepG2, 500.000 células foram previamente semeadas em frascos de cultivo de tecido e incubadas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> (5,0 %) a 37 °C e 96,0 % de umidade relativa, anteriormente aos tratamentos. Após 24 horas, o meio de cultura completo foi retirado. Em seguida, foram adicionados 5,0 mL de meio de cultura, onde as culturas celulares foram submetidas aos diferentes tratamentos; estas foram novamente colocadas em estufa a 37°C com 5,0 % de CO<sub>2</sub> por mais 24 horas. Terminado o período de tratamento, as culturas celulares foram lavadas com PBS e, em seguida, foram adicionados aos frascos de cultivo celular 5,0 mL de meio de cultura completo e 50,0 µL da solução de citocalasina B (Ctb: 3,0 µg mL<sup>-1</sup>), substância que age inibindo a actina no final da divisão celular, bloqueando assim a citocinese. Passadas mais 24 horas, as preparações das células binucleadas para a análise convencional de micronúcleos foram obtidas e preparadas segundo MENOLI et al. (2001), os procedimentos de preparação das lâminas foram os mesmos realizados para a linhagem V79.

Para proceder com a coloração, uma solução trabalho de Acridina Orange foi preparada na concentração de 40,0 µg mL<sup>-1</sup>, diluída em água destilada. Para a leitura da lâmina, aplicou-se aproximadamente 2,0 mL desta solução trabalho na lâmina (com pipeta Pasteur) no momento da leitura, deixando por 2 minutos. Com a lâmina ainda molhada, uma lamínula foi colocada sobre a mesma, onde a parte superior foi limpa. Em seguida foi procedida a leitura em microscopia de fluorescência, combinando luz azul (488,0 nm) e filtro amarelo (575,0 nm).

### 3.2.5.3 Análise das lâminas

Nas diferentes concentrações do complexo (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> testadas em células das linhagens V79 e HepG2, foram analisadas as frequências de micronúcleos em células binucleadas (CBNMN's) e o Índice de Divisão Nuclear (IDN) em microscópio.

Para a análise da genotoxicidade em células V79 e HepG2, foram contabilizadas 1.000 células binucleadas para cada cultura a um total de 3.000 células por tratamento. A frequência de células binucleadas micronucleadas (CBNMNs) foi distribuída de acordo com a quantidade de micronúcleos, 0, 1, 2 e 3 ou mais micronúcleos (FENECH, 2000).

A citotoxicidade foi mensurada pelo índice de divisão nuclear (IDN), calculado de acordo com EASTMOND e TUCKER (1989) utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{IDN} = \frac{[\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})]}{\text{N}}$$

Onde:

M1 – M4 é o número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente;

N é o número total de células contabilizadas.

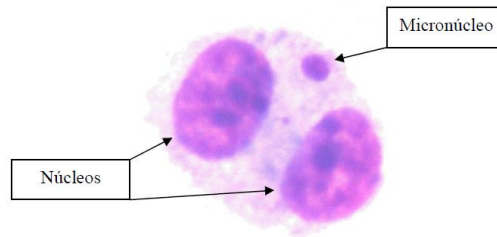


FIGURA 3.2- Fotomicrografia óptica de uma célula V79 (fibroblasto de pulmão de hamster Chinês) binucleada, contendo um micronúcleo (Giemsa; aumento: 1000 x. Fonte: Acervo do Laboratório de Mutagênese e Antimutagênese).



FIGURA 3.3- Fotomicrografia óptica de uma célula HepG2 (hepatócito tumoral humano) binucleada, contendo um micronúcleo (Acridina Orange; aumento: 1000 x).

#### 3.2.5.4 Análise estatística

Em todos os experimentos de genotoxicidade *in vitro*, os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância para experimentos inteiramente aleatorizados, com o cálculo da estatística F e de seu respectivo “*p-value*”. Nos casos em que  $p < 0,05$ , as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para  $\alpha = 0,05$ .

### 3.3. SISTEMA-TESTE *IN VIVO*

#### 3.3.1 Animais

Para realização dos experimentos, foram utilizados camundongos machos Swiss *mus musculus* e camundongos C57BL/6 com aproximadamente 25 g p.c. (peso corpóreo), provenientes do biotério do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em caixas plásticas em uma sala experimental, sob condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2$  °C), umidade ( $50 \pm 10$  %), em ciclo claro-escuro de 12 horas e com acesso *ad libitum* a ração e água. Os protocolos de tratamentos em animais realizados neste trabalho foram submetidos à Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Franca (UNIFRAN), estando de acordo com a Lei Federal nº 11.794 de 08/10/2008 e com as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), processo nº 001/11 e processo nº 023/13.

#### 3.3.2 Tratamento dos Animais

Os ensaios de micronúcleo em sangue periférico e medula óssea e cometa em hepatócitos foram realizados com camundongos machos Swiss, onde foi avaliado o composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$ . As diferentes doses deste composto foram determinadas por um ensaio piloto de micronúcleo em sangue periférico, onde foram utilizados diferentes grupos de tratamento contendo 2 animais por grupo. A via de administração foi intraperitoneal (i.p.) (0,3 mL/animal), nas doses de 7,5; 15,0; 30,0 e 60,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c. (peso corpóreo) e o cisplatina na dose de 6,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c (a definir como controle positivo) e água (controle negativo).



Para o ensaio de micronúcleo em medula óssea e de cometa em hepatócitos, os animais foram divididos em grupos de tratamentos contendo 6 animais, onde as diferentes doses do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, (0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c.), dos grupos controles negativo (água) e positivo (cisplatina, 1,5 mg kg<sup>-1</sup> p.c.; metilmetanosulfonato 40,0 mg kg<sup>-1</sup>) foram incluídas. A dose do cisplatina foi definida por meio de uma triagem, a fim de que se encontrasse uma dose que demonstrasse efeito genotóxico, porém com ausência de citotoxicidade.

O experimento antitumoral *in vivo* foi realizado com camundongos C57BL/6, onde o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> foi avaliado. Para este experimento os animais foram divididos em grupos de tratamentos contendo 6 animais, onde os grupos de tratamento utilizados foram:

- a) controle negativo (sem implante tumoral, sem tratamento);
- b) controle solvente (com implante tumoral, tratamento com solução de DMSO a 1,0 %);
- c) composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> nas dose de 5,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c. (com implante tumoral e tratamento com o complexo diluído em DMSO a 1,0 %);

### **3.3.3 Ensaio de Micronúcleo *In Vivo***

O teste de micronúcleo foi realizado de acordo com a OECD 474 de 1997 e HAYASHI et al., (2000). Para tanto, foram utilizados os sistemas-teste em amostras de sangue periférico e medula óssea de camundongos Swiss num ensaio agudo, extraídas 24 h após a administração da droga, com posterior análise das lâminas em microscópio. A diluição do complexo (9) *ct*-

[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> foi feita em água destilada, na forma de diluição seriada nas diferentes doses utilizadas (0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c.).

### 3.3.3.1 Sangue periférico

Para obtenção de PCEMNs, FIGURA 3.4, utilizou-se a técnica de MACGREGOR et al. (1980), a qual consiste nos seguintes procedimentos:

- a) Corta-se a ponta da cauda dos animais e goteja-se o sangue diretamente sobre as laminas secas;
- b) Faz-se o esfregão do material;
- c) Após a secagem do material, fixa-se em metanol por cinco minutos;
- d) Após 24 h, cora-se com Giemsa diluído em solução tampão fosfato pH 6,8 na proporção de 1:10 por vinte minutos.

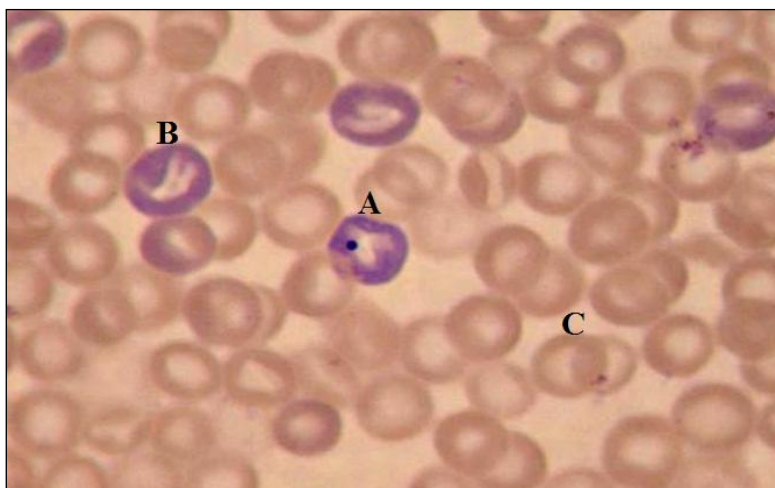


FIGURA 3.4 – Eritrócito policromático micronucleado (A), sem micronúcleo (B) e eritrócito normocromático sem micronúcleo (C) de sangue periférico (aumento: 1000 x; Giemsa. Fonte: Acervo do Laboratório de Mutagênese e Antimutagênese).

### 3.3.3.2 Medula óssea

Para obtenção de eritrócito policromático micronucleado (PCEMNs; FIGURA 3.5) foi utilizada a técnica de MACGREGOR et al. (1987), cujos procedimentos são:

- a) Após a eutanásia dos animais por Tiopental sódico ( $0,84 \text{ g kg}^{-1} \text{ p.c.}$ ), retira-se os fêmures, limpa-se com gazes e corta-se as epífises;
- b) Introduce-se a agulha da seringa contendo 0,5 ml de soro bovino fetal no canal medular, onde lava-se dentro de um tubo de centrifuga contendo 2,0 ml de soro. Homogeneiza-se o material;
- c) Centrifugar-se a 900 rpm por 5 minutos, despreza-se o sobrenadante e diluiciona-se o “pellet” com uma pipeta Pasteur;
- d) Coloca-se uma gota de material sobre as lamíνας secas;
- e) Realiza-se o esfregação com uma lamínula;
- f) Seca-se e se fixa em metanol por cinco minutos;
- g) Após 24 h, cora-se com Giemsa diluído em tampão fosfato pH 6,8 na proporção 1:30 por cinco minutos.

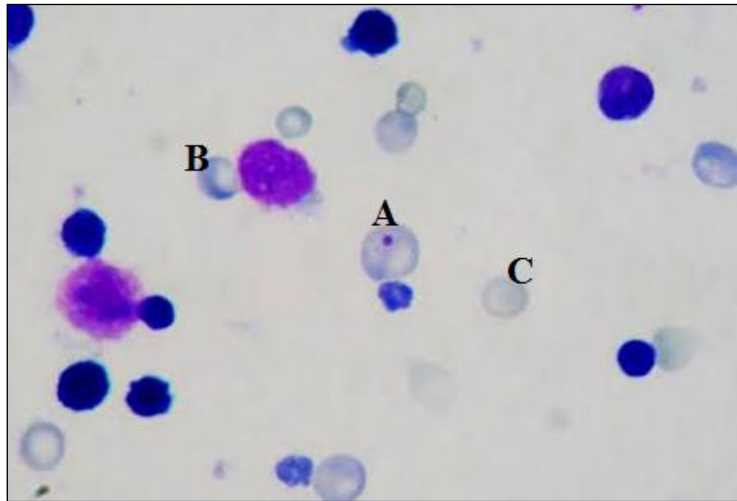


FIGURA 3.5 – Eritrócito policromático micronucleado (A), eritrócito policromático (B) e eritrócito normocromático (C) de medula óssea (aumento: 1000 x; Giemsa).

### 3.3.3.3 Análise das lâminas

As frequências de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados – PCEMNs, foram obtidas por meio da análise de 2000 Eritrócitos Policromáticos - PCEs por animal, nas amostras de medula óssea coletadas 24 h após os tratamentos, em microscopia de luz sob imersão (HAYASHI et al., 2000).

A citotoxicidade foi calculada pela análise de 400 eritrócitos por animal conforme descrito a seguir (MERSCH-SUNDERMANN et al., 2004).

$$\text{PCE} / (\text{PCE} + \text{NCE})$$

Nas análises de micronúcleo 2000 células (Eritrócitos Policromáticos- PCEs) foram analisadas por animal, destas 2000 células contabilizou-se quantas apresentaram micronúcleo. Como foram utilizados 6 animais por grupo de tratamento, como requerem os guidelines (HAYASHI et

al., 2000; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011), foram analisadas 12.000 células por tratamento.

### 3.3.4 Ensaio Cometa

A obtenção dos hepatócitos de camundongos Swiss para a análise de danos no DNA, foi realizada de acordo com protocolo proposto por SINGH *et al.* (1988), cujos procedimentos são:

- a) Após a eutanásia dos animais por Tiopental sódio ( $0,84 \text{ g kg}^{-1}$  p.c.), retira-se o fígado;
- b) Picotam-se aproximadamente 0,4 g de tecido em 1800 uL de solução de Hanks (mistura de sais enriquecida com aminoácidos, vitaminas e outros componentes) + 200 uL de DMSO;
- c) Filtra-se através de gase e recolhe-se o filtrado;
- d) Preparam-se as lâminas.

As lâminas com agarose normal 1,5% (CAS:9012-36-6, Invitrogen) são previamente preparadas para sua utilização no experimento. Transferiu-se 20,0  $\mu\text{L}$  do material homogeneizado para um microtubo; misturou-se com 120,0  $\mu\text{L}$  de agarose 0,5 % (CAS:9012-36-6, Invitrogen) de baixo ponto de fusão (LMP); cobriu-se com lamínulas onde foram mantidas em geladeira durante 20 minutos. Após este período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em cuba horizontal com solução de lise ( $2,5 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl, 100,0 mM EDTA, 10,0 mmol  $\text{L}^{-1}$  Tris, 1% Lauril sarcosinato de sódio, água deionizada, 1,0 mL Triton X-100, 10 mL DMSO) por 24 h, na geladeira.

Após este período, as lâminas da solução de lise foram retiradas e transferidas para a cuba de eletroforese. Adicionou-se tampão de eletroforese

(300,0 mmol.L<sup>-1</sup> NaOH, 1mmol.L<sup>-1</sup> EDTA, água deionizada), onde as lâminas permaneceram descansando por 20 minutos permitindo o desenrolamento do DNA, em seguida uma corrente foi aplicada (300,0 mA e 25,0 V); por 20 minutos permitindo a migração dos fragmentos de DNA. Após este tempo as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas em tampão de neutralização (0,4 mmol.L<sup>-1</sup> Tris, água deionizada) por 15 minutos. Após secar ao ar, procedeu-se a fixação em etanol absoluto por 10 minutos.

A análise das lâminas foi feita após coloração com *Syber green* (20,0 µL.mL<sup>-1</sup>), em microscópio de epi-fluorescência Zeiss (Germany), usando um filtro de excitação de 515,0 – 560,0 nm e um filtro de emissão de 590,0 nm e objetiva de 40 X sob imersão. Foram capturadas aleatoriamente 50 imagens de nucleóides íntegros e em forma de cometa, FIGURA 3.6. As imagens foram analisadas pelo programa Comet Imager 2.2. Os parâmetros considerados foram: a porcentagem de DNA na cauda do cometa (% DNA), o *Tail Moment* (TM), e *Tail Length* (TL).

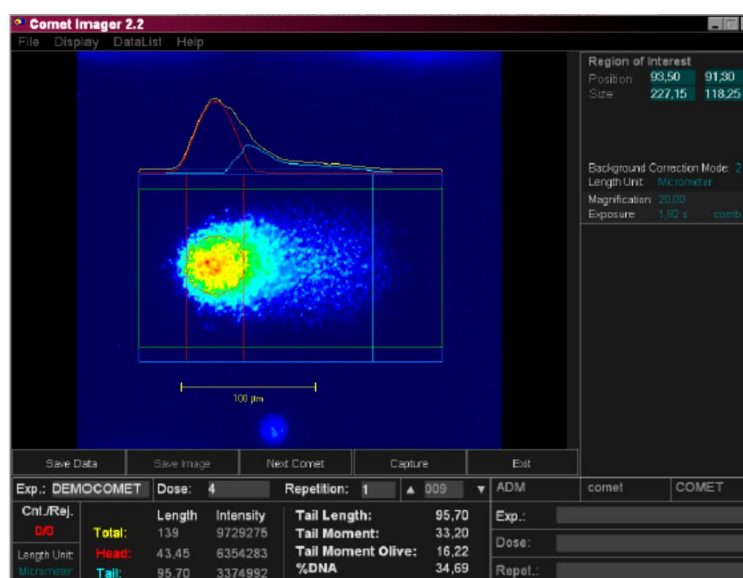


FIGURA 3.6 - Imagem cometa do programa Comet Imager, demonstrando os parâmetros analisados pelo programa: porcentagem de DNA (% DNA), o *Tail Moment* (TM) e *Tail Length* (TL).

Dos parâmetros *Tail Moment* (TM) e *Tail Length* (TL) mencionados na FIGURA 3.6, calculados pelo programa Comet Imager 2.2, foram feitas as seguintes correlações para cada nucleóide de cada hepatócito:

- *Tail Moment* (TM) = 
$$\frac{\text{Intensidade da cauda} \times \text{Comprimento da cauda}}{\text{Intensidade total}}$$

- *Tail Length* (TL) = (Posição final da cauda – Posição final da cabeça).

### **3.3.5 Ensaio antitumoral *in vivo* em modelo de transplante singênico**

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a linhagem celular de melanoma murino (B16-F10), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Cláudio Costa Neto do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto. As células encontram-se estocadas em nitrogênio líquido (-195°C), em alíquotas de  $1,0 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> em uma solução de congelamento composta de 50,0 % de meio de cultura (Ham F10 + DMEM, na proporção 1:1, Sigma-Aldrich), 40,0 % de soro bovino fetal (Nutricell) e 10% de DMSO (Sigma-Aldrich).

Para a realização dos experimentos as células foram descongeladas e colocadas em cultivo em meio de cultura (Ham F10 + DMEM, na proporção 1:1, Sigma-Aldrich), suplementado com 10,0 % de soro bovino fetal (Nutricell), 1,2 g mL<sup>-1</sup> de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), 0,1 g mL<sup>-1</sup> de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 0,06 g mL<sup>-1</sup> penicilina (Sigma-Aldrich).

As células foram cultivadas em monocamada em 10 mL de meio de cultura utilizando-se frascos descartáveis de 25,0 cm<sup>2</sup> de área (Corning) a 36,5°C em estufa de B.O.D. (Fanem). A cada dois ou três dias, as células foram subcultivadas, usando-se PBS (*Phosphate Buffered Saline*) para lavá-las e ATV (solução de tripsina 0,2 % mais versene 0,02 %, Instituto Adolfo Lutz) na proporção de 1 ATV: 1 PBS, para desprender as células da superfície interna do frasco de cultura. Após o desprendimento das células, aproximadamente 1,5 mL de meio de cultura completo (10,0 % de soro bovino fetal) foi adicionado ao frasco, como propósito de inativar o ATV e em seguida a solução contendo as células é homogeneizada.

### **3.2.5.1 Avaliação de viabilidade celular**

Anteriormente ao implante das células tumorais B16-F10, foi realizada a avaliação da viabilidade celular. Para tanto, o método de exclusão por *Trypan blue* foi utilizado. As células B16-F10 foram lavadas com PBS e tripsinizadas das garrafas por ação da solução ATV, mantidas então por 3 minutos a 37,0 °C, e em seguida, a solução foi neutralizada com meio de cultura (Ham F10 + DMEM, na proporção 1:1, Sigma-Aldrich). Em seguida, foram utilizados 10,0 µL de uma solução recém-preparada de corante *Trypan blue* diluído em água destilada (0,4 %). Esta solução foi misturada com 10,0 µL da suspensão de células B16-F10 sobre uma lâmina de microscopia, na sequência a mistura foi recoberta com uma lamínula. As células não-viáveis ficaram coradas em azul e as viáveis permaneceram translúcidas. Para serem consideradas viáveis, as amostras celulares utilizadas nos implantes tiveram que apresentar uma viabilidade celular  $\geq 85,0$  % (TSUBOY et al., 2007).



### 3.3.5.2 Implante e avaliação tumoral

Para indução do tumor, aproximadamente  $1,0 \cdot 10^6$  de células foram suspensas em 100,0  $\mu\text{L}$  de meio de cultura foram implantadas, aplicadas via subcutânea (s.b.) no dorso lateral direito dos camundongos C57BL/6. Para tanto, os camundongos foram depilados previamente na região do dorso, de forma que foi possível acompanhar o desenvolvimento tumoral no local onde as células foram implantadas (WORKMAN et al., 2010). Quando o tumor atingiu aproximadamente 100,0  $\text{mm}^3$ , que ocorreu cerca de 20 dias após o implante celular, os animais receberam os diferentes tratamentos em um volume de 100,0  $\mu\text{L}$ /animal a 1,0 cm do tumor, durante cinco dias consecutivos, uma vez ao dia. A dose do complexo (9)  $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  utilizada neste experimento, foi escolhida por meio dos ensaios de micronúcleo em medula óssea e cometa em hepatócitos de camundongos Swiss.

O peso corpóreo, consumo de água e tamanho do tumor dos animais foram avaliados diariamente, durante todo o experimento. Para medir o tamanho do tumor foi utilizado um paquímetro, FIGURA 3.7. O volume do tumor ( $\text{mm}^3$ ) foi calculado de acordo com a seguinte equação (MORINAGA et al., 2002):

$$V (\text{mm}^3) = \frac{[\text{comprimento (mm)} \times \text{largura (mm)}]^2}{2}$$



FIGURA 3.7- Camundongo C57BL/6 macho com desenvolvimento de melanoma. Na foto observa-se um tumor sólido resultado da indução tumoral por implante de células tumorais de melanoma murino B16-F10.

Para a entanásia foi utilizado Tiopental sódico ( $0,84 \text{ g kg}^{-1} \text{ p.c.}$ ) 24 h após o último tratamento. Realizada a eutanásia, tumor, rins, baço, fígado e o cérebro de cada animal foram coletados, pesados e encaminhados para o setor de histologia da Universidade de Franca para a preparação das lâminas dos tecidos. A análise histopatológica foi realizada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geórgia Modé Magalhães. Para a análise histopatológica, os tecidos foram colhidos, fixados em formol tamponado e, posteriormente, adicionados em solução de álcool a 70,0 %, clarificados em xilol e incluídas em parafina. Foram utilizados cortes de 5,0  $\mu\text{m}$  de espessura corados com hematoxilina e eosina e tricômico de Gomori para proceder as análises das lâminas (BANCROFT e COOK, 1994). As lâminas foram analisadas qualitativamente e as estruturas dos tecidos quantificadas através de estereologia.

De cada tecido foram retirados cinco cortes com 5,0  $\mu\text{m}$  de espessura de diferentes partes, analisando cinco campos aleatórios em aumento de 40x, perfazendo um total de 25 áreas analisadas nos tecidos de cada grupo

(OLIVEIRA et al., 2007). Foram consideradas células necrosadas, pleomórficas, hipercromáticas, exibindo bi-nucleação, anisocariose, áreas de necrose e áreas com coagulação (PAULA et al., 2008).

### **3.3.6 Análise estatística**

Em todos os experimentos de genotoxicidade *in vivo* e ensaio antitumoral *in vivo*, os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância para experimentos inteiramente aleatorizados, com o cálculo da estatística F e de seu respectivo “*p-value*”. Nos casos em que  $p < 0,05$ , as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para  $\alpha = 0,05$ .

## *4. Resultados e discussões*

### *Parte 1*

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Parte 1- Ensaio colorimétrico *in vitro*

A avaliação dos compostos de rutênio em experimentos de citotoxicidade em linhagens tumorais de glioblastoma (U251 e MO59J), carcinoma cervical de colo uterino (HeLa), adenocarcinoma mamário humano (MCF7), hepatocarcinoma (HepG2), e melanoma murino (B16-F10), e não tumoral fibroblasto de pulmão de Hâmster Chinês (V79), consistiu na primeira etapa experimental deste trabalho de doutorado. Desta maneira, os critérios da atividade destes complexos foram estabelecidos considerando os resultados promissores para a triagem, aqueles que em menores concentrações pudessem inibir 50,0 % da viabilidade celular ( $IC_{50}$ ) em linhagens tumorais disponíveis e, conseqüentemente, que exercessem menor efeito citotóxico em células não tumorais V79 (exibindo um valor de  $IC_{50}$  inferior aos obtidos nas linhagens tumorais). Os resultados obtidos para todos os complexos de rutênio foram avaliados primeiramente em células tumorais U251, HeLa e MCF7 e não tumoral V79. Assim, de acordo com os resultados obtidos nas três primeiras linhagens tumorais, foi dado seguimento aos experimentos nas demais linhagens disponíveis. Os resultados obtidos para todos os complexos foram comparados em relação ao cisplatina, uma vez que o cisplatina é um quimioterápico inorgânico de referência no tratamento do câncer. Adicionalmente, valores de índice de seletividade (IS) foram analisados.

Os compostos de rutênio (1)  $[Ru(SpymMe_2-N,S)_2(dppb)]$  e (2)  $[RuCl(SpymMe_2-N,S)_2NO]$ , passaram por avaliação do potencial citotóxico pelo método XTT em linhagens celulares tumorais U251, HeLa e MCF7 e não tumoral V79. Na TABELA 4.1 os resultados estão representados por valores de  $IC_{50}$  e de índice de seletividade (IS). Na FIGURA 4.1, os gráficos ilustram a viabilidade celular em relação às concentrações dos compostos avaliadas.

TABELA 4.1 - Valores de IC<sub>50</sub> obtidos dos compostos (1) [Ru(SpymMe<sub>2</sub>-N,S)<sub>2</sub>(dppb)] e (2) [RuCl(SpymMe<sub>2</sub>-N,S)<sub>2</sub>NO] em células V79, HeLa, U251 e MCF7

Compostos	IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> ± Erro padrão) (IS)			
	V79	U251	HeLa	MCF7
<b>SpymMe<sub>2</sub>-N,S</b>	>200,00	> 200,00	> 200,00	>200,00
<b>dppb</b>	>200,00	> 200,00	> 200,00	>200,00
<b>1</b>	75,0 ± 0,00	> 200,00(-)	> 200,00 (-)	91,65 ± 0,64 (0,8)
<b>2</b>	22,35 ± 0,28	>200,00(-)	18,73 ± 0,38 (1,2)	5,20 ± 0,72 (4,3)
<b>Cisplatina</b>	10,40 ± 0,08	25,51 ± 1,59 (0,4)	31,43 ± 0,35 (0,3)	79,19 ± 0,23 (0,1)

IC<sub>50</sub>: concentração da droga que inibe 50 % a viabilidade celular; SpymMe<sub>2</sub>-N,S:4,6-dimetil-2-mercaptopirimidina; Cisplatina: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]; SEM: Média ± erro padrão;

IS = IC<sub>50</sub>(células não tumorais)/IC<sub>50</sub>(células tumorais);

Período de incubação: 24 h.

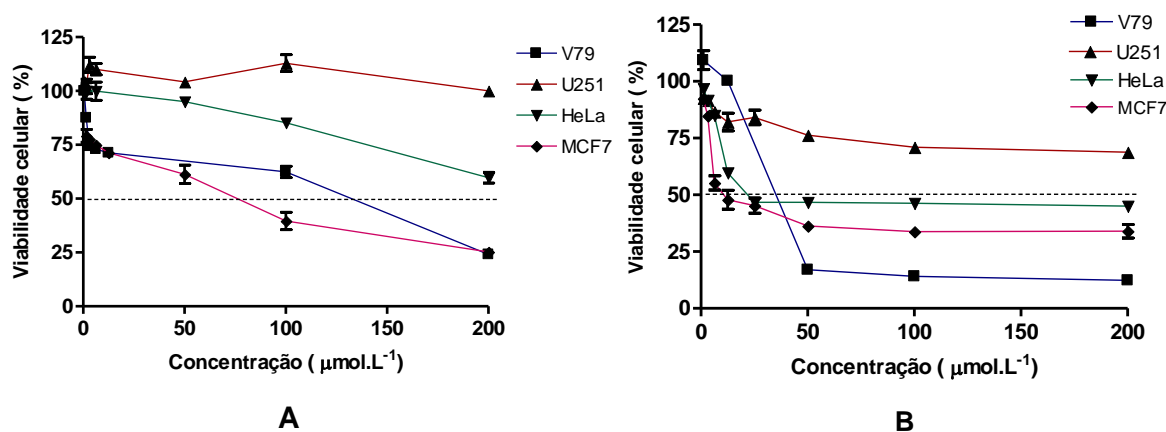


FIGURA 4.1- Efeito dos compostos 1 e 2 sobre a viabilidade celular das linhagens V79 , U251 e HeLa, onde as viabilidades estão representadas por média e desvio padrão (Média ± DP); (A): (1) [Ru(SpymMe<sub>2</sub>-N,S)<sub>2</sub>(dppb)] e (B): (2)[RuCl(SpymMe<sub>2</sub>-N,S)<sub>2</sub>NO].

Como pode ser observado na TABELA 4.1, FIGURA 4.1, o composto (1)  $[\text{Ru}(\text{SpymMe}_2\text{-N,S})_2(\text{dppb})]$  não exibiu citotoxicidade em células tumorais U251 e HeLa, porém foi citotóxico em células não tumorais V79. Em relação ao ligante  $\text{SpymMe}_2\text{-N,S}$ , este não mostrou citotoxicidade nas células tumorais avaliadas. O composto (1)  $[\text{Ru}(\text{SpymMe}_2\text{-N,S})_2(\text{dppb})]$  exibiu maior atividade na linhagem MCF7 em relação ao seu ligante e às outras linhagens celulares, não mostrando um índice de seletividade expressivo em relação às células V79. O cisplatina apresentou valores de  $\text{IC}_{50}$  menores quando comparado a este composto, porém os valores de índice de seletividade em relação às células V79 não foram expressivos.

No que se refere aos resultados do composto (2)  $[\text{RuCl}(\text{SpymMe}_2\text{-N,S})_2\text{NO}]$  que contém o mesmo ligante ( $\text{SpymMe}_2\text{-N,S}$ ) que o composto (1)  $[\text{Ru}(\text{SpymMe}_2\text{-N,S})_2(\text{dppb})]$ , mas acrescido de NO em sua esfera de coordenação, observou-se que o mesmo apresenta maior citotoxicidade em células HeLa e MCF-7, com valores de  $\text{IC}_{50}$  de 18,73 e 5,20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  respectivamente. Estes valores de  $\text{IC}_{50}$  foram menores em relação a linhagem não tumoral V79 ( $\text{IC}_{50}$  de 22,35  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Os valores de índice de seletividade apresentados pelo composto (2)  $[\text{RuCl}(\text{SpymMe}_2\text{-N,S})_2\text{NO}]$  indicaram que o mesmo apresentou citotoxicidade seletiva em células HeLa e MCF7, com IS = 1,2 e 4,3 respectivamente, exibindo vantagens em relação ao cisplatina. O cisplatina exibiu maior citotoxicidade em células saudáveis V79 ( $\text{IC}_{50} = 10,40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) comparada às células tumorais HeLa e MCF-7 ( $\text{IC}_{50}$  de 31,43 e 79,19  $\mu\text{mol L}^{-1}$  respectivamente), onde os valores de IS em células tumorais não foram expressivos.

Estes resultados podem estar em concordância com o que tem sido descrito na literatura, que complexos de rutênio são menos tóxicos em tecidos não tumorais que as drogas a base de platina, apresentando boa atividade em

células tumorais (BERGAMO et al., 2012; JAKUPEC et al., 2008; YAW et al., 2005). Um complexo de rutênio contendo NO como ligante, o  $[\text{RuCl}_2\text{NO}(\text{BPA})]$  reportado pelo grupo LERCI em outro trabalho, mostrou interação com a molécula de DNA de células tumorais, levando a fragmentação do DNA e posterior apoptose destas células (HEINRICH et al., 2011). Outra série de complexos contendo NO foi avaliada pelo grupo de pesquisa LERCI, mostrando resultados promissores em células de adenocarcinoma de mama de outra linhagem, a MDA-MB-231, onde se acredita que estes complexos podem ligar-se ao DNA por intercalação ou, podem causar a apoptose das células tumorais quando o grupo NO é liberado do complexo (GOLFETO et al., 2010), vide TABELA 4.2.

TABELA 4.2 - Valores de  $\text{IC}_{50}$  de alguns compostos de rutênio (II) contendo NO como ligante em células MDA-MB-231 (GOLFETO et al., 2010)

COMPOSTOS	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{mol L}^{-1} \pm$ Erro padrão)
<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{py})]\text{PF}_6$	19,00 $\pm$ 3,00
<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(4\text{-Mepy})]\text{PF}_6$	7,40 $\pm$ 3,70
<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(4\text{-Phpy})]\text{PF}_6$	7,10 $\pm$ 1,20
<i>cis</i> - $[\text{RuCl}_2(\text{NO})(\text{dppp})(\text{dmsO})]\text{PF}_6$	12,10 $\pm$ 1,40
<b>Cisplatina</b>	63,00 $\pm$ 5,00

$\text{IC}_{50}$ : concentração da droga que inibe 50 % a viabilidade celular;

MDA-MB-231: adenocarcinoma de mama; py:piridina; 4-mepy: 4-metilpiridina; 4-Phpy: 4-fenilpiridina; Cisplatina: *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ .  $\text{IS} = \text{IC}_{50}(\text{células não tumorais})/\text{IC}_{50}(\text{células tumorais})$ ;

Em relação às células tumorais U251 (glioblastoma), estas não apresentaram sensibilidade aos compostos. Esta linhagem de tumor cerebral é considerada muito resistente, considerando que a maioria dos tumores cerebrais é insensível a tratamentos como quimioterapia e radioterapia (MILANO et al.,



2009). Em publicação recente foi reportado que as células cerebrais não fazem divisão e expressam apenas pequenas quantidades de receptores de proteínas (KRATZ e ELSADEK, 2012). LI et al. (2009) publicaram um composto avaliado em células U251 que induziu a autofagia, além da apoptose, e esta autofagia não exercia efeitos citotóxicos, mas sim efeito neuroprotetor nestas células.

O composto (3) [Ru(pic)<sub>2</sub>(dppb)] também foi avaliado quanto ao seu potencial citotóxico *in vitro* em linhagens tumorais U251, HeLa e MCF7 e não tumoral V79, os resultados estão representados na TABELA 4.3 por valores de IC<sub>50</sub> e índice de seletividade (IS), e na FIGURA 4.2 por gráfico de viabilidade celular em relação às concentrações avaliadas.

TABELA 4.3 - Valores de IC<sub>50</sub> obtidos do composto (3) [Ru(pic)<sub>2</sub>(dppb)] em células V79, U251, HeLa e MCF7

COMPOSTOS	IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> ± Erro padrão) (IS)			
	V79	U251	HeLa	MCF7
<b>HPic</b>	102,0 ± 3,72	>200,00	>200,00	>200,00
<b>dppb</b>	>200,00	>200,00	>200,00	>200,00
<b>3</b>	21,16 ± 0,52	170,00 ± 0,10 (-)	20,04 ± 0,34 (1,0)	4,79 ± 0,12 (4,4)
<b>Cisplatina</b>	10,40 ± 0,08	25,51 ± 1,59 (0,4)	31,43 ± 0,35 (0,3)	79,19 ± 0,24 (0,1)

IC<sub>50</sub>: concentração da droga que inibe 50 % a viabilidade celular;

Hpic: ácido picolínico; Cisplatina: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>];

IS = IC<sub>50</sub>(células não tumorais)/IC<sub>50</sub>(células tumorais);

Período de incubação: 24 h.

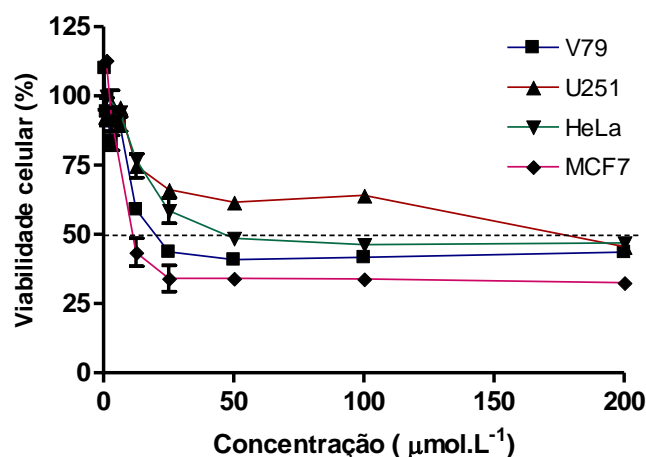


FIGURA 4.2 – Efeito do composto (3) [Ru(Pic)<sub>2</sub>(dppb)] sobre a viabilidade celular das linhagens V79, U251, HeLa e MCF7, onde as viabilidades estão representadas por média e desvio padrão (Média ± DP).

Pode-se observar na TABELA 4.3 e FIGURA 4.2 que o composto (3) [Ru(pic)<sub>2</sub>(dppb)] mostrou efeito citotóxico promissor em células tumorais MCF7, onde o valor de IC<sub>50</sub> = 4,79 µmol L<sup>-1</sup> foi significativamente menor que para a linhagem de células não tumorais V79 (IC<sub>50</sub> = 21,16 µmol L<sup>-1</sup>), mostrando um valor de índice de seletividade bastante expressivo, IS = 4,4 . Estes resultados mostraram vantagens em relação ao cisplatina, visto que o composto (3) [Ru(pic)<sub>2</sub>(dppb)] foi mais ativo em células MCF7 do que o cisplatina. Este composto também mostrou efeito citotóxico nas linhagens V79 e HeLa, onde os valores de IC<sub>50</sub> nestas duas linhagens foram bem próximos, 21,16 e 20,04 µmol L<sup>-1</sup> respectivamente, não mostrando seletividade significativa.

Nas células tumorais U251, o composto (3) [Ru(pic)<sub>2</sub>(dppb)] apresentou um valor de IC<sub>50</sub> menor que de seu respectivo ligante, porém este valor não foi expressivo em relação ao cisplatina. O valor de IC<sub>50</sub> = 170,00 µmol L<sup>-1</sup> apresentado pelo composto foi maior do que o exibido pelo cisplatina, IC<sub>50</sub> de 25,51 µmol L<sup>-1</sup>, contudo o cisplatina não mostrou seletividade em células

tumorais. Nestes experimentos, espera-se obter um baixo valor de IC<sub>50</sub> em células tumorais, menor que em células não tumorais.

O composto (3) [Ru(pic)<sub>2</sub>(dppb)] foi avaliado em outro trabalho do grupo, juntamente com outros compostos contendo o ânion picolinato como ligante. Estes compostos mostraram atividade citotóxica promissora em células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231, TABELA 4.4. (LIMA, 2010; SOUZA et al., 2007; VON POELHSITZ et al., 2007).

TABELA 4.4 – Valores de IC<sub>50</sub> de alguns compostos de rutênio (II) contendo ânion picolinato como ligante em células MDA-MB-231

COMPOSTOS	IC <sub>50</sub> (µmol L <sup>-1</sup> ) ± Erro padrão
	MDA-MB-231
<b>Hpic</b>	>200,00 <sup>a</sup>
<b>(3) [Ru(Pic)<sub>2</sub>(dppb)]</b>	2,5 ± 1,40
<b>[Ru(pic)(bipy)(dppf)]PF<sub>6</sub></b>	0,40 ± 0,10 <sup>a</sup>
<b>[Ru(pic)(bipy)(dppp)]PF<sub>6</sub></b>	3,30 ± 0,20 <sup>a</sup>
<b>[Ru(pic)(bipy)(dppe)]PF<sub>6</sub></b>	7,60 ± 0,10 <sup>a</sup>
<b>[Ru(pic)(bipy)(dppm)]PF<sub>6</sub></b>	14,58 ± 4,47 <sup>a</sup>
<b>[Ru(pic)(bipy)(dppb)]PF<sub>6</sub></b>	4,20 ± 1,50 <sup>b</sup>
<b>[Ru(pic)(Me-bipy)(dppb)]PF<sub>6</sub></b>	1,20 ± 0,10 <sup>b</sup>
<b>[Ru(pic)(Cl-bipy)(dppb)]PF<sub>6</sub></b>	4,40 ± 0,60 <sup>b</sup>
<b>cis- [Ru(pic)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub></b>	0,48 ± 0,13 <sup>c</sup>
<b>cis- [Ru(pic)(dppe)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub></b>	0,53 ± 0,16 <sup>c</sup>
<b>Cisplatina</b>	87,50 ± 12,60 <sup>c</sup>

IC<sub>50</sub>: concentração da droga que inibe 50 % a viabilidade celular; MDA-MB-231: adenocarcinoma de mama; pic: ânion picolinato; Cisplatina: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]; Período de incubação: 48h; <sup>a</sup>LIMA, 2010; <sup>b</sup>SOUZA et al., 2007; <sup>c</sup>VON POELHSITZ et al., 2007.

Como pode ser observado na TABELA 4.4, os compostos nela apresentados mostraram potencial atividade citotóxica *in vitro* para a linhagem tumoral de mama, MDA-MB-231, novamente exibindo vantagens em relação ao cisplatina, assim como o composto (3)  $[\text{Ru}(\text{pic})_2(\text{dppb})]$  mostrou-se ativo em células MCF7. Esta citotoxicidade seletiva em células tumorais de mama pode ser explorada em experimentos futuros, no que se refere à atividade destes complexos sobre a expressão de proteínas e genes específicos destas células, no campo da biologia molecular.

Um composto semelhante ao composto (3)  $[\text{Ru}(\text{pic})_2(\text{dppb})]$ , o composto  $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  representado na TABELA 4.4, foi investigado pelo grupo LERCI e colaboradores em outro trabalho. Foram realizados experimentos de interação com o DNA, explorado pelas técnicas de dicroísmo circular (FIGURA 4.3), microscopia de força atômica (AFM) (FIGURA 4.4) e medidas de viscosidade, reportado por PAVAN et al., (2011). De acordo com o que foi descrito, o DNA foi incubado com o complexo durante 24 h, a 37 °C, onde foi observado alterações na elipticidade molar do DNA e no comprimento de onda, indicando que houveram alterações na estrutura secundária do DNA, hipoteticamente em consequência de interações fracas deste complexo com a molécula do DNA, interações estas que podem ocorrer por ligação de hidrogênio. Quanto as medidas de viscosidade, o resultado mostrou um decréscimo na viscosidade, significando que não houve interação por ligação covalente entre o complexo e os pares de bases do DNA, como acontece com o cisplatina, confirmando a hipótese de interações fracas, sejam por ligação de hidrogênio ou por interações eletrostáticas.

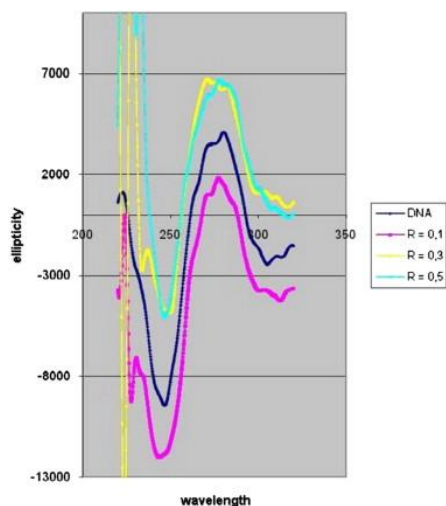


FIGURA 4.3 – Espectro de dicroísmo circular do plasmídeo de DNA  $\rho$ BR322 livre e o plasmídeo de DNA  $\rho$ BR322 incubado com o complexo  $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  por 24 h, a  $37,0\text{ }^\circ\text{C}$  nas razões molares 0,1; 0,3 e 0,5 ((PAVAN et al., 2011).

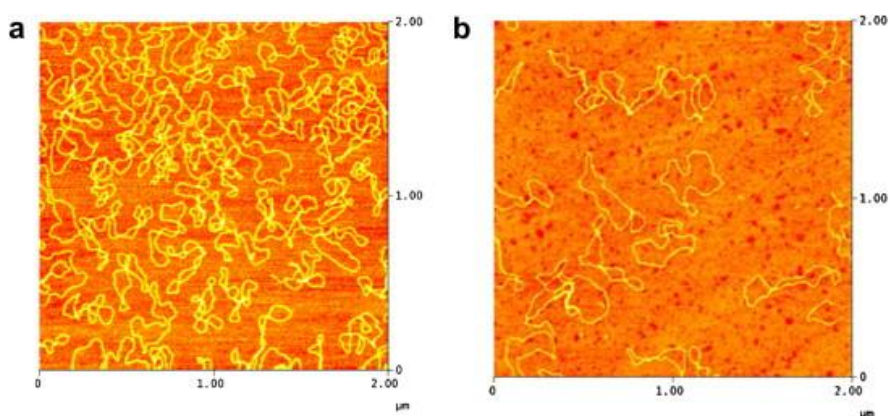


FIGURA 4.4 – Imagem de microscopia de força atômica (AFM), onde (a): plasmídeo de DNA  $\rho$ BR322 incubado com o complexo  $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  por 24 h, a  $37,0\text{ }^\circ\text{C}$  e (b): plasmídeo de DNA  $\rho$ BR322 livre (PAVAN et al., 2011).

Pode-se dizer que complexos contendo ligante picolinato e fosfínico como o composto (3)  $[\text{Ru}(\text{pic})_2(\text{dppb})]$ , podem interagir com o DNA por interações fracas. Mesmo assim, não se descarta a possibilidade de intercalação com o DNA por interações desta ordem, já que para constatar isso, experimentos complementares e mais específicos devem ser realizados. Segundo a literatura é descrito que existem três tipos principais de interação com o DNA: intercalação (inserção entre as hélices da dupla fita do DNA) (SATHYARAJ et al., 2010; ZHAO et al., 2012), ligação covalente (como se propõe para o cisplatina) (PIZARRO e SADLER, 2009) e interação eletrostática (como acontece com complexos catiônicos) (HADJILIADIS e SLETTEN, 2009). Sendo assim, dependendo das características dos ligantes na esfera de coordenação do rutênio e de seu potencial redox, a capacidade de interagir com o DNA é alterada, bem como a atividade em células de origem e/ou tecidos diferentes (BERGAMO et al., 2012).

Os compostos (4)  $[\text{Ru}(\text{Gly})(\text{dppb})(4,4'\text{-mebipy})]\text{PF}_6$ ; (5)  $[\text{Ru}(\text{Gly})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$ ; (6)  $[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(4,4'\text{-mebipy})]\text{PF}_6$ ; (7)  $[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$ ; (8)  $[\text{Ru}(\text{Trp})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$  contendo aminoácidos como ligantes, passaram por avaliação de seus potenciais citotóxicos em linhagens tumorais MCF-7 e HeLa e não tumoral V79, onde os resultados estão representados na Tabela 4.5 por valores de  $\text{IC}_{50}$  e de índice de seletividade (IS) e na FIGURA 4.5, por gráficos de viabilidade celular em relação às concentrações avaliadas.

TABELA 4.5 - Valores de IC<sub>50</sub> obtidos dos compostos (4) [Ru(Gly)(dppb)(4,4'-mebipy)]PF<sub>6</sub>; (5) Ru(Gly)(dppb)(fen)]PF<sub>6</sub>; (6) [Ru(Tyr)(dppb)(4,4'-mebipy)]PF<sub>6</sub>; (7) [Ru(Tyr)(dppb)(fen)]PF<sub>6</sub>; (8) [Ru(Trp)(dppb)(fen)]PF<sub>6</sub> nas linhagens celulares V79, MCF-7 e HeLa

COMPOSTOS	IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> ± Erro padrão) (IS)		
	V79	HeLa	MCF-7
<b>fen</b>	>200,00	> 200,00	> 200,00
<b>4,4'-mebipy</b>	>200,00	> 200,00	> 200,00
<b>4</b>	17,20 ± 1,43	150,00 (-)	6,14 ± 0,36 (2,8)
<b>5</b>	~100,00	>200,00 (-)	>150,00 (-)
<b>6</b>	44,11 ± 1,59	33,14 ± 0,72 (1,3)	13,78 ± 0,41(3,2)
<b>7</b>	22,31 ± 0,37	66,30 ± 2,08 (0,3)	33,41 ± 0,77 (0,6)
<b>8</b>	30,62 ± 5,79	83,17 ± 1,24 (0,4)	14,01 ± 0,51(2,2)
<b>Cisplatina</b>	10,40 ± 0,08	31,43 ± 0,35 (0,3)	79,19 ± 0,24 (0,1)

IC<sub>50</sub>: concentração da droga que inibe 50 % a viabilidade celular;

Cisplatina: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]; IS = IC<sub>50</sub>(células não tumorais)/IC<sub>50</sub>(células tumorais);

Período de incubação: 24 h.

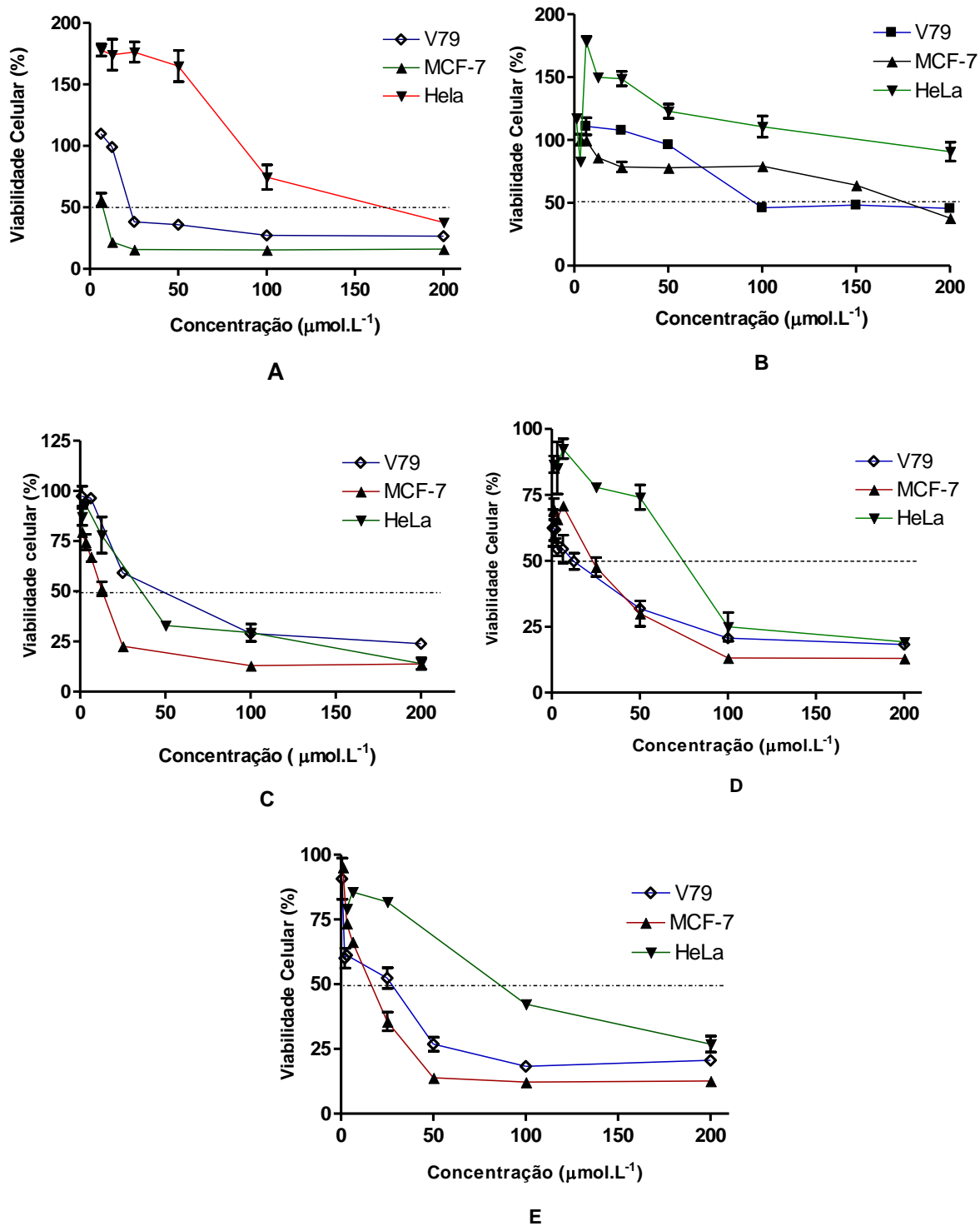


FIGURA 4.5 – Efeito dos compostos 4, 5, 6, 7 e 8 sobre as viabilidades celulares das linhagens V79, U251 e HeLa, representadas por média e desvio padrão (Média  $\pm$  DP), onde (A): (4)  $[\text{Ru}(\text{Gly})(\text{dppb})(4,4'\text{-mepiby})]\text{PF}_6$ ; (B): (5)  $\text{Ru}(\text{Gly})(\text{dppb})(\text{fen})\text{PF}_6$ ; (C): (6)  $[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(4,4'\text{-mepiby})]\text{PF}_6$ ; (D): (7)  $[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$ ; e (E): (8)  $[\text{Ru}(\text{Trp})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$ .



Como pode ser observado na TABELA 4.5 e nos gráficos da FIGURA 4.5, as células tumorais MCF-7 se mostraram mais sensíveis aos compostos (4)  $[\text{Ru}(\text{Gly})(\text{dppb})(4,4'\text{-mebipy})]\text{PF}_6$ ; (6)  $[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(4,4'\text{-mebipy})]\text{PF}_6$ ; e (8)  $[\text{Ru}(\text{Trp})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$ , do que as células não tumorais V79. Isso significa que estes compostos foram mais citotóxicos para a linhagem tumoral do que para a linhagem não tumoral, mostrando seletividade para células MCF7,  $\text{IS} = 2,8$ ;  $3,2$  e  $2,2$  respectivamente. Os valores de índice de seletividade foram bastante expressivos, exibindo vantagem em relação ao cisplatina. Sendo assim, estes compostos se mostraram promissores nas condições avaliadas neste experimento.

Para a linhagem tumoral HeLa, os compostos (6)  $[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(4,4'\text{-mebipy})]\text{PF}_6$ ; (7)  $[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$  e (8)  $[\text{Ru}(\text{Trp})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$  foram mais ativos (TABELA 4.5, Gráficos C, D e E da FIGURA 4.5). Contudo, o composto (6)  $[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(4,4'\text{-mebipy})]\text{PF}_6$  apresentou expressiva seletividade, onde o valor de  $\text{IC}_{50}$  para a linhagem tumoral HeLa ( $33,14 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi menor do que para a linhagem não tumoral V79 ( $44,11 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), respectivamente, indicando um resultado promissor de  $\text{IS} = 3,2$ . O valor de  $\text{IS}$  para este composto, nesta linhagem tumoral, mostrou vantagem em relação ao obtido para o cisplatina ( $\text{IS} = 0,1$ ).

Pode-se considerar que os valores de  $\text{IC}_{50}$  do cisplatina para as linhagens tumorais são baixos, e, que isso é desejado quando avaliamos a citotoxicidade nestas células. Porém, quando comparamos estes valores com os valores de  $\text{IC}_{50}$  na linhagem não tumoral V79, observou-se que o cisplatina foi muito citotóxico ( $\text{IC}_{50}$  de  $10,40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), de modo que os valores de  $\text{IS}$  não foram significativos em células tumorais HeLa e MCF-7,  $\text{IS} = 0,3$  e  $0,1$  respectivamente.

Sabe-se que os aminoácidos são moléculas orgânicas disponíveis em nosso organismo. No entanto, as células tumorais exibem um aumento na procura de uma variedade de nutrientes, devido ao seu rápido crescimento.

Desta maneira, os aminoácidos são particularmente importantes para algumas vias de sinalização de nutrientes destas células que estão hiperativas (CHRISTIE et al., 2002). Assim, os aminoácidos são capazes de permear as membranas celulares, por meio de transporte ativo, podendo atuar como transportadores de íons metálicos. É descrito na literatura, que as células saudáveis podem suportar quantidades de aminoácidos maiores que a necessária, porém são capazes de utilizá-los ou retirá-los a fim de evitar a introdução de substâncias estranhas no sistema biológico, diferentes das células tumorais (LAU e SARCKAR, 1971). Considerando o exposto, pode-se inferir que os diferentes aminoácidos complexados ao centro metálico de rutênio, podem desempenhar o papel de carreadores do complexo para o interior das células tumorais, transformando-os em espécies citotóxicas, podendo ser reconhecido por bases de DNA, levando assim à apoptose destas células.

Dos cinco complexos testados, os complexos (5)  $\text{Ru}(\text{Gly})(\text{dppb})(\text{fen})\text{PF}_6$ ; (7)  $[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$  e (8)  $[\text{Ru}(\text{Trp})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$  possuem fenantrolina como ligante, este ligante confere boa planaridade e pode oferecer uma característica de interação intercalante no “groove” da dupla hélice do DNA a estes complexos (HADJILIADIS e SLETTEN, 2009; NAVARRO et al., 2006; THORP e PECORARO, 1995).

NAKABAYASHI et al. (2004), reportaram que complexos contendo aminoácidos como ligantes, do tipo  $[\text{Ru}(\text{AA})(\text{phen}_2)]^+$ , podem interagir por intercalação nas bases pares do DNA, de maneira que a intercalação do DNA pode ocorrer devido a boa planaridade do ligante orgânico 1,10-fenatrolina, mesmo que parcialmente, induzindo a morte celular por apoptose. De acordo com a literatura citada, complexos de rutênio contendo aminoácidos podem interagir com o DNA via interações eletrostáticas ou por intercalação via hidrogênio do grupo amina do aminoácido e o oxigênio da guanina através de ligação de hidrogênio (NAKABAYASHI et al, 2004), estas características

também dependem da natureza dos demais ligantes no complexo. Estes aspectos indicam que complexos de rutênio contendo aminoácidos, apresentam um mecanismo de ação diferente do cisplatina, com a vantagem de serem menos citotóxicos em tecidos saudáveis, já que os aminoácidos utilizados como ligantes, não são estruturas estranhas ao organismo.

Em outro estudo realizado pelo grupo, TABELA 4.6, complexos de rutênio contendo aminoácidos foram avaliados, onde foram encontrados valores promissores para a linhagem tumoral de mama MDA-MB231 (ALMEIDA, 2009).

TABELA 4.6 – Valores de IC<sub>50</sub> de alguns compostos de rutênio (II) contendo aminoácidos como ligantes em células MDA-MB-231 (ALMEIDA, 2009)

COMPOSTOS	IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> ± Erro padrão)
	MDA-MB-231
[Ru(L-Met)(bipy)(dppb)]PF <sub>6</sub>	5,0 ± 1,5
[Ru(L-Leu)(bipy)(dppb)]PF <sub>6</sub>	7,1 ± 0,6
[Ru(L-Gly)(bipy)(dppb)]PF <sub>6</sub>	14,5 ± 0,4
[Ru(L-Lis)(bipy)(dppb)]PF <sub>6</sub>	16,2 ± 1,6
[Ru(L-Try)(bipy)(dppb)]PF <sub>6</sub>	21,3 ± 2,5
[Ru(L-Ser)(bipy)(dppb)]PF <sub>6</sub>	24,1 ± 3,6
[Ru(L-Val)(bipy)(dppb)]PF <sub>6</sub>	26,2 ± 4,0
[Ru(L-Trp)(bipy)(dppb)]PF <sub>6</sub>	28,2 ± 1,5
[Ru(L-Ala)(bipy)(dppb)]PF <sub>6</sub>	28,5 ± 5,2
Cisplatina	87,5 ± 12,6

MDA-MB-231: adenocarcinoma de mama; Cislatina: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]; L-Met: L-Metionina; L-Leu: L-Leucina; L-Gly: L-Glicina; L-Lis: L-Lisina; L-Try: L-Tirosina; L-Ser: L-Serina; L-Val: L-Valina; L-Trp: Triptofano; L-Ala: L-Alanina. Período de incubação: 48 h.

Dos compostos avaliados nos experimentos de citotoxicidade *in vitro* neste trabalho, foi possível observar que os compostos (2) [RuCl(SpymMe<sub>2</sub>-N,S)<sub>2</sub>NO], (3) [Ru(pic)<sub>2</sub>(dppb)], (4) [Ru(Gly)(dppb)(4,4'-mebipy)]PF<sub>6</sub>; (6) [Ru(Tyr)(dppb)(4,4'-mebipy)]PF<sub>6</sub> e (8) [Ru(Trp)(dppb)(fen)]PF<sub>6</sub> mostraram seletividade para células tumorais de mama MCF7. Como foi abordado anteriormente, a seletividade para células tumorais de mama pode ser explorada em outros experimentos específicos, referente à atividade destes complexos em relação à expressão de proteínas e genes específicos destas células no campo da biologia molecular. É descrito na literatura, que células tumorais sofrem mutações, e, conseqüentemente nelas ocorrem a amplificação ou inibição de genes específicos, assim como a expressão ou inibição de determinadas proteínas (LACROIX et al., 2006). No caso de células de câncer de mama, o estrogênio causa fenômenos distintos no desenvolvimento da impressão genômica e dos genes, resultando em alterações persistentes na expressão gênica (MCLACHLAN et al., 2001; SPINK). Oncogenes específicos têm sido identificados em tumores esporádicos, ou seja, numerosos genes que codificam proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular são amplificados, superexpressos ou ativados, como *c-MYC*, ciclina *DI*, *MDM2*, *HER-2*, como reportado por LACROIX et al. (2006). Desta maneira, existe a possibilidade destes compostos interferirem na expressão ou inibição de algum(s) gene(s) específico(s), que podem ser investigados em outros ensaios.

Outro composto foi avaliado neste trabalho, o composto *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, um complexo de rutênio que possui CO como ligante. Este composto foi avaliado quanto a sua atividade citotóxica em células tumorais MCF7, HeLa, HepG2, B16-F10 e não tumoral V79. Os resultados estão demonstrados na TABELA 4.7 por valores de IC<sub>50</sub> e índice de seletividade (IS), e na FIGURA 4.6, por gráficos de viabilidade celular em relação às concentrações avaliadas.

TABELA 4.7 – Valores de IC<sub>50</sub> obtidos do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> em células V79, MCF7, HeLa, HepG2, MO59J e B16-F10

Linhagens celulares	dppb	bipy	IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> ± Erro padrão) (IS)	
			Composto 9	Cisplatina
V79	>200	>200	6,74 ± 1,06	10,40 ± 0,008
HeLa	>200	>200	4,78 ± 0,39 (1,4)	31,43 ± 0,35 (0,3)
MCF7	> 200	> 200	6,50 ± 1,12(1,0)	79,19 ± 0,20 (0,1)
HepG2	>200	>200	3,93 ± 1,74 (1,7)	10,11 ± 0,71 (1,0)
MO59J	> 200	> 200	4,34 ± 0,13 (1,5)	19,67 ± 0,65 (0,5)
B16-F10	>200	>200	2,84 ± 0,64 (2,4)	26,51 ± 0,64 (0,4)

IC<sub>50</sub>: concentração da droga que inibe 50 % a viabilidade celular; Cisplatina: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]; IS = IC<sub>50</sub>(células não tumorais)/IC<sub>50</sub>(células tumorais); Período de incubação: 24 h.

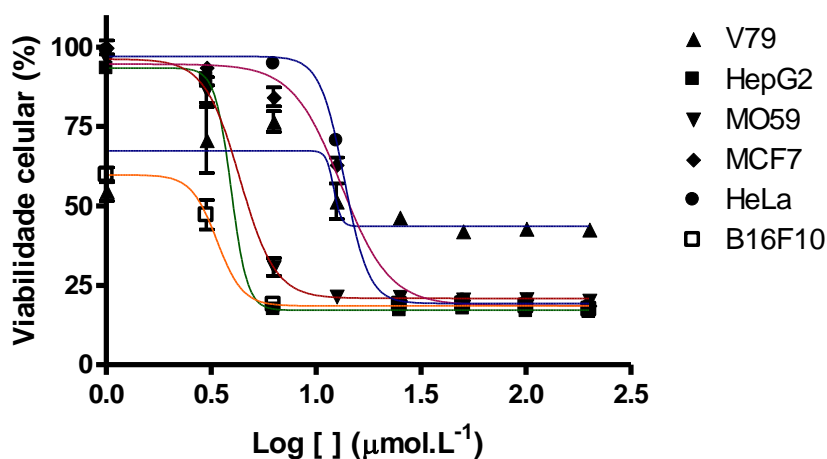


FIGURA 4.6 – Efeito do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> sobre as viabilidades celulares das linhagens HepG2, B16-F10, MO59J, MCF7 e HeLa, representadas por média e erro padrão (Média ± Erro Padrão) em relação ao logaritmo das concentrações em uma sigmóide de dose-resposta.

Como pode ser observado na TABELA 4.7 e FIGURA 4.6, o composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$  mostrou-se muito ativo em todas as linhagens tumorais, exibindo baixos valores de  $IC_{50}$  com vantagens em relação aos resultados obtidos para o cisplatina, quimioterápico inorgânico de referência. Este composto mostrou seletividade para as células tumorais HeLa, HepG2, MO59J e B16-F10, com valores de  $IC_{50}$  de 5,11; 3,93; 4,34; 2,84  $\mu mol L^{-1}$  respectivamente, os quais foram menores que o valor de  $IC_{50}$  obtido para a linhagem não tumoral V79. Os valores de índice de seletividade em células tumorais mostraram-se expressivos para as linhagens HeLa, HepG2, MO59J e B16-F10, onde os mesmos foram superiores aos encontrados para o cisplatina. O maior índice de seletividade apresentado pelo composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$  foi em relação às células de melanoma, B16-F10, onde  $IS = 2,4$ . Estes resultados mostraram vantagens em relação ao cisplatina, o qual não mostrou valores de índice de seletividade expressivos.

RAJA et al. (2012) reportaram resultados da atividade antitumoral *in vitro* para HeLa, onde obtiveram o resultado de  $IC_{50} = 31,6 \mu mol L^{-1}$  para o complexo  $[RuCl(CO)(PPh_3)L]$  (onde, L= base de Schiff tridentada monobásica) em um período de incubação de 48 h. Se compararmos os resultados para HeLa da literatura citada com os resultados apresentados neste trabalho, podemos dizer que o composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$  apresentou melhor atividade para esta linhagem celular com um valor de  $IC_{50} = 5,11 \mu mol L^{-1}$ , significativamente menor num período de 24 h. Isso pode estar relacionado à natureza dos ligantes na esfera de coordenação do composto que são diferentes, de forma que estas características podem contribuir para uma melhor atividade citotóxica do composto frente às células tumorais.

Em outro trabalho do grupo LERCI, compostos com estruturas semelhantes à do composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$ , passaram por avaliação do potencial citotóxico *in vitro* para a linhagem tumoral MDA-MB-231, como pode ser observado na TABELA 4.8.

TABELA 4.8 - Valores de IC<sub>50</sub> de alguns compostos de rutênio (II) contendo CO como ligante em células MDA-MB-231 (BARBOSA, 2007)

COMPLEXOS	MDA-MB-231 IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> ± Erro padrão)
<i>tc</i> -[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub>	2,50
<i>cc</i> -[ RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub>	1,90
[RuCl(CO)(dcpe)(Me-bipy)]PF <sub>6</sub>	0,70
[RuCl(CO)(dcpe)(fen)]PF <sub>6</sub>	0,25
* <i>cis</i> -[RuCl <sub>2</sub> (dppb)(bipy)	31,30
Cisplatina	63,00

MDA-MB-231: adenocarcinoma de mama; bipy: bipyridina; dcpe: diciclohexilfosfinaetano; Cisplatina: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]; \*Precursor do complexo carbonílico de rutênio; Período de incubação: 48 h.

Na TABELA 4.8 pode-se notar que os complexos carbonílicos de rutênio são bem mais ativos do que o seu precursor (sem o CO como ligante) e o cisplatina. Sugere-se que o monóxido de carbono como ligante no complexo, contribui para uma melhor atividade antitumoral em relação a outros complexos que não o possuem coordenado ao rutênio. Os complexos [RuCl(CO)(dcpe)(Me-bipy)]PF<sub>6</sub> [RuCl(CO)(dcpe)(fen)]PF<sub>6</sub> do trabalho citado (BARBOSA, 2007), apresentam valores de IC<sub>50</sub> menores que os demais avaliados, os quais podem estar relacionados a natureza da fosfina, como a dcpe que apresenta maior basicidade que a dppb (pK<sub>a</sub><sub>dppb</sub> = 4 e pK<sub>a</sub><sub>dcpe</sub> = 10) (VON POELHSITZ, 2005).

Muitos estudos vêm relatando na literatura a respeito de complexos carbonílicos de metais de transição como o [Ru(CO)<sub>3</sub>Cl-glicinato], que podem liberar o CO em condições fisiológicas (FORESTI et al., 2004; MOTTERLINI et al., 2003). O uso de monóxido de carbono (CO) como um agente terapêutico já foi testado em ensaios clínicos em humanos. A administração pré-clínica de

gás de CO, provou benefício em modelos animais sobre várias doenças humanas. No entanto, a utilização de CO gasoso enfrenta sérios obstáculos, como a sua conhecida toxicidade. A possibilidade da utilização de CO como um agente terapêutico é a chave para encontrar novas vias para entrega do CO em tecidos doentes que necessitam de tratamento, sem a formação concomitante de carboxihemoglobina (COHb) em elevados níveis tóxicos no sangue. Moléculas do tipo CO-RMs (CO coordenado a um metal) têm o potencial para tratamentos seguros, se a liberação de CO *in vivo* puder ser controlada de um modo espacial e temporal. Vários experimentos com moléculas CO-RMs confirmaram os efeitos benéficos frente à liberação do gás CO em diferentes modelos animais em diferentes doenças, imitando os efeitos terapêuticos do CO gasoso. Ao demonstrar o princípio do tratamento com CO-RMs, estes compostos de primeira geração ainda não são adequados para o uso humano. A utilização de moléculas (CO-RMs) que liberam CO, como pró-drogas capazes de fornecer CO para células e tecidos *in vivo*, constituem uma estratégia válida para reconhecer o potencial terapêutico do mesmo. O comportamento biológico e químico de CO liberado destas moléculas (CO-RM), tem sido motivo de extensas investigações, no sentido de avaliar se moléculas causam efeitos tóxicos secundários após a sua administração (ROMÃO et al., 2012; FORESTI et al., 2004).

Em face do exposto, o interesse na investigação de complexos como o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, tem o propósito de esclarecer alguns aspectos de sua estrutura/atividade em diferentes condições experimentais. Neste sentido, os resultados obtidos para este composto foram considerados promissores, pois para todas as linhagens tumorais o composto mostrou-se muito ativo, de maneira que o mesmo foi selecionado para a avaliação em outros experimentos *in vitro* e *in vivo* descritos a seguir neste trabalho.



## *4.2 Resultados e discussões*

### *Parte 2*

## 4.2 Estudo *in vitro* e *in vivo* do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>

### 4.2.1 Estudos de interação com o DNA

O composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> foi avaliado quanto a sua interação com o DNA (100,0 μmol L<sup>-1</sup>) com a solução de DNAct (Deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus - Tipo 1, Sigma Aldrich). A TABELA 4.9 mostra as propriedades do espectro de absorção da interação entre o composto e o DNAct, assim como a constante  $K_b$ , porcentagem de hipocromismo em relação à solução do composto sem DNAct e o  $\lambda_{\max}$  (comprimento de onda utilizado nos cálculos de absorvidade molar,  $\epsilon_a$  e  $\epsilon_f$ ). A FIGURA 4.7 representa o espectro UV-Vis da titulação do composto em estudo com o DNAct, onde foi calculada a constante de interação  $K_b$ , plotando um gráfico de  $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  vs.  $[DNA]$ .

TABELA 4.9 – Propriedades do espectro de absorção da interação entre o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> e o DNAct, onde os valores estão representados por média desvio padrão para  $K_b$  e hipocromismo

Composto	$K_b$ (10 <sup>4</sup> L mol <sup>-1</sup> )	Hipocromismo (%)	$\lambda_{\max}$ (nm)
<i>ct</i> -[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub>	3,78 ± 0,36	26,91 ± 1,99	322,00

$\lambda_{\max}$  = comprimento de onda utilizado para medir a absorbância durante a titulação.

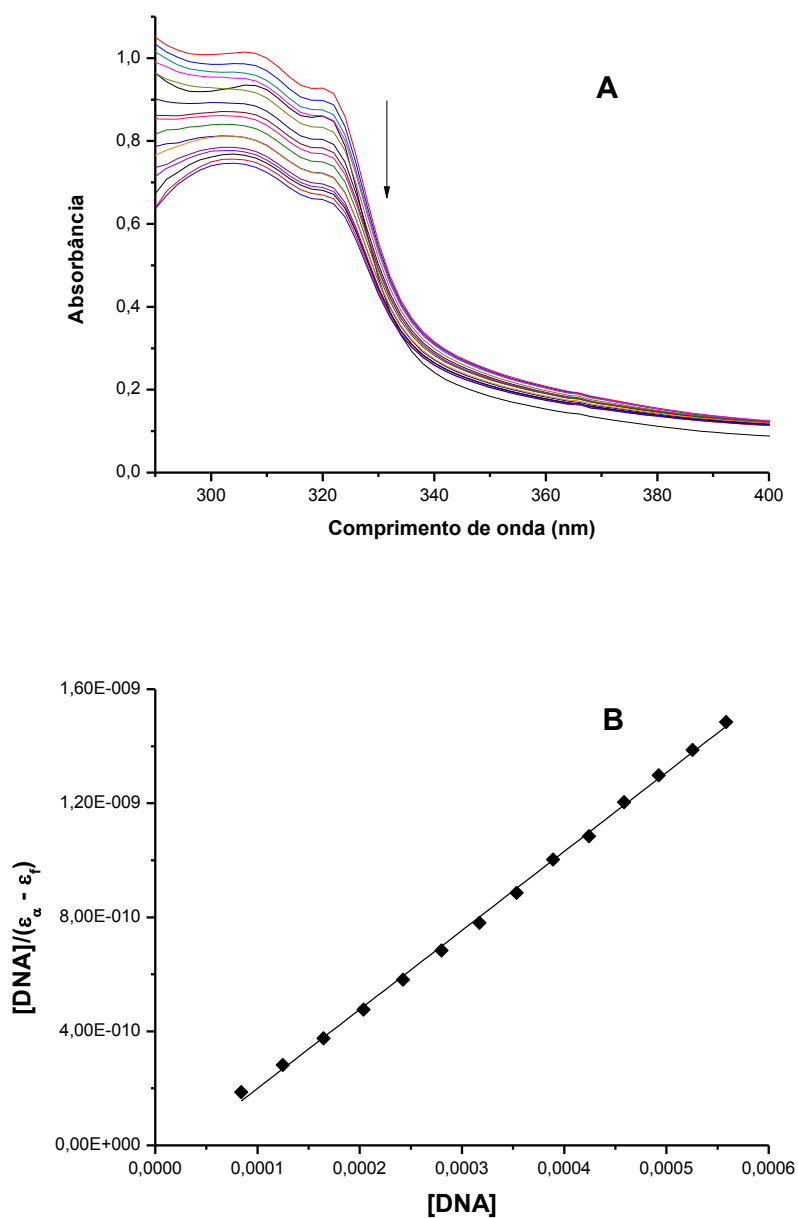


FIGURA 4.7 – (A): Espectro de absorção do composto (9) *ct*- $[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$  na presença de adições sucessivas da solução de DNAct. (B): Representação da constante  $K_b$  por meio da plotagem de  $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  vs.  $[DNA]$ .

Pode ser observado na TABELA 4.9 e na FIGURA 4.7, que os resultados encontrados mostram que o acréscimo da solução de DNAct resultou na diminuição da absorvância em 322,0 nm, exibindo uma característica de hipocromismo com um valor de 26,91 % em relação à titulação do composto com a solução tampão sem o DNAct em solução. Sugere-se que o composto interage com o DNAct por interações fracas do tipo eletrostáticas, pois é descrito na literatura que valores de hipocromismo inferiores a 37,0 % correspondem a este tipo de interação. Sendo assim, o percentual de hipocromismo é comumente associado à força de ligação da interação entre o complexo e o DNAct (GANESHPIANDIAN et al., 2014; RAJENDIRAN et al., 2008a; RAJENDIRAN et al., 2008b).

No sentido de comparar quantitativamente as afinidades de ligação com o DNA, a constante de ligação ( $K_b$ ) foi calculada. O valor de  $K_b$  encontrado para o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> foi de  $3,78 \cdot 10^4$  L mol<sup>-1</sup>, indicando que o mesmo interage por interações fracas com o DNAct, sugerindo interações do tipo eletrostáticas com o DNAct. Considera-se uma interação forte, quando a constante de interação ( $K_b$ ) é da ordem de  $10^5$  a  $10^7$ , como reportado na literatura GANESHPIANDIAN et al. (2014) e CHAUHAN e ARJMAND (2007) respectivamente, reforçando o resultado encontrado de hipocromismo na hipótese de interações eletrostáticas.

Vários complexos metálicos de rutênio foram reportados na literatura quanto as suas possíveis interações com o DNA. Os areno complexos de Ru(II), compostos de fórmula geral  $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]$  têm sido extensivamente investigados quanto às suas interações com o DNA, mas estas interações normalmente apresentam caráter monofuncional, onde a base de coordenação do Ru(II) com a molécula de DNA, pode acontecer no N7 da guanina, ou por ligação de hidrogênio entre uma amina se tiver etilenodiamina quelada ao rutênio ( LIU et al., 2006).

RAJA et al. (2012) reportaram as interações com o DNA de uma série de complexos contendo CO como ligante, os complexos de fórmula geral  $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{B})\text{L}]$  (onde, B=  $\text{PPh}_3$  ou  $\text{AsPh}_3$  ou py; L= base de Schiff tridentada monobásica), onde observaram que os mesmos apresentaram interações envolvendo os fosfatos do DNA via atrações eletrostáticas. No estudo citado, apenas o complexo  $[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{PPh}_3)\text{L}]$  (onde L= base de Schiff tridentada monobásica, derivada de 4-aminoantipirina e salicilaldeído) apresentou maior afinidade com o DNA, mesmo assim, os autores relataram que a interação com o DNAct no experimento apresentou valor de  $K_b = 2,47 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ , um valor menor que a constante de ligação de  $10^7$  encontrada para o brometo de etídeo, um intercalador clássico (CHAUHAN e ARJMAND, 2007).

Considerando que o composto (9)  $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  é um complexo carbonílico de rutênio com estrutura similar a dos compostos citados, sugere-se que este pode interagir por interações fracas com o DNA do tipo eletrostáticas, dado os valores de hipocromismo de 26,91 % e de constante de interação,  $K_b = 3,78 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ , encontrados.

#### 4.2.2 Estudos de interação com a BSA

O composto (9)  $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  foi avaliado quanto a sua interação com a albumina bovina, BSA (Bovine Serum Albumine, A2153, Sigma-Aldrich). Com o propósito de determinar a afinidade de ligação do composto com a BSA em solução tampão ( $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), o composto foi avaliado em diferentes concentrações ( $1,56$  a  $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em DMSO), em relação às medidas de supressão da fluorescência dos resíduos triptofano. A FIGURA 4.8 representa o decréscimo da fluorescência com o aumento da concentração do composto (9)  $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ . Na FIGURA 4.9, o gráfico ilustra dados da supressão da fluorescência, plotando a relação de

intensidade de fluorescência pela concentração do composto,  $F_0/F$  vs [composto], determinados pela equação de Stern Volmer.

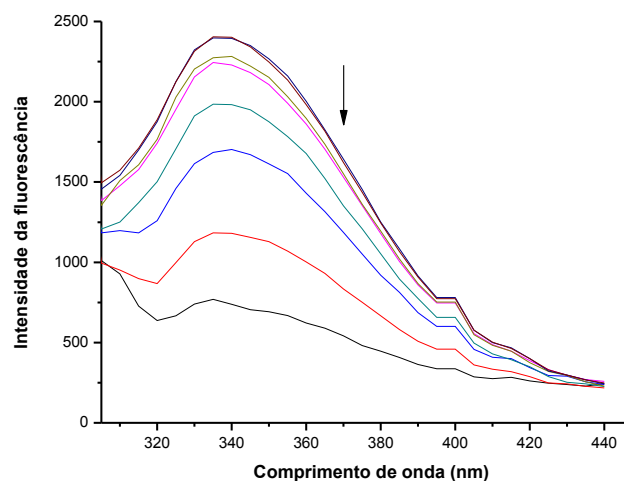


FIGURA 4.8 – Espectro da supressão da fluorescência em diferentes concentrações do composto (9) *ct*- [RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, à temperatura de 310,15K (37,0 °C).

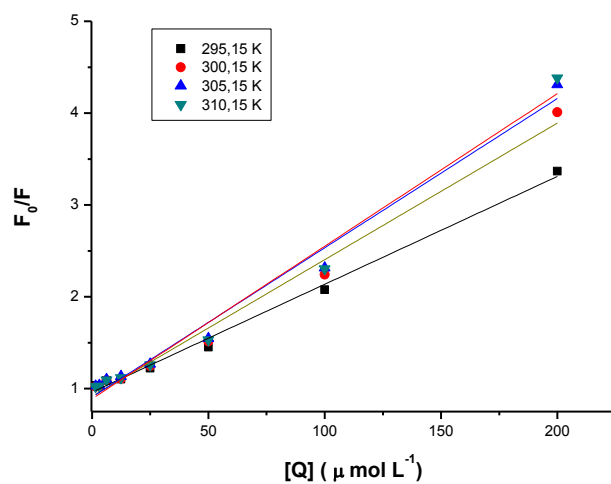


FIGURA 4.9 – Curva de Stern Volmer para o composto (9) *ct*- [RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> com a BSA nas temperaturas de 295,15; 300,15; 305,15 e 310,15 K (22,0; 27,0; 32,0 e 37,0 °C).

Na TABELA 4.10 estão representados os valores da constante  $K_{sv}$ ,  $K_b$  e de  $n$  obtidos neste experimento de interação do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> com a BSA em diferentes temperaturas. A constante  $K_{sv}$  representa a constante extinção de Stern-Volmer, a constante  $K_b$  representa a constante de interação para a ligação do composto com a BSA e  $n$  representa o número de sítios de ligação entre o composto e a BSA.

TABELA 4.10 – Parâmetros de interação e de ligação do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> com o BSA em diferentes temperaturas

<b>Composto</b>	<b>T</b>	<b><math>K_{sv}</math></b>	<b><math>K_b</math></b>	<b><math>n</math></b>
	<b>(K)</b>	<b>(10<sup>6</sup> L mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>(10<sup>5</sup>)</b>	
(9) <i>ct</i> - [RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF <sub>6</sub>	295,15	1,00 ± 0,00	4,67 ± 1,96	0,94
	300,15	1,67 ± 0,00	18,30 ± 1,40	1,02
	305,15	2,00 ± 0,50	9,81 ± 1,85	0,97
	310,15	2,00 ± 0,00	23,3 ± 6,40	1,03

Na TABELA 4.10 os valores de  $K_{sv}$  representam a relativa afinidade do composto (9) *ct*- [RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> com o BSA. Observa-se que os valores de  $K_{sv}$  obtidos, aumentaram com o aumento temperatura, indicando que houve um processo dinâmico. No processo dinâmico, o número de colisões entre o supressor e o fluoróforo no estado excitado, aumentam com o acréscimo da temperatura, levando a um aumento na extinção da fluorescência (ASADI et al., 2014). Os valores de  $K_b$  apresentam certa variabilidade, porém, observa-se que estes valores aumentaram apenas nas temperaturas de 300,15 e 310,15 K. Como o valor de  $n$  se manteve constante, esta característica pode indicar a existência de interação molecular entre o

composto (9) *ct*- [RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> e a BSA, de acordo com a estequiometria 1:1, formando um complexo estável (ASADI et al., 2014; TABASSUM et al., 2012). Os valores de *n* mostram que o sítio de ligação na BSA é único, e que o ambiente hidrofóbico do resíduo triptofano está facilmente acessível para o composto (GANESHPIANDIAN et al., 2014).

A TABELA 4.11 mostra os diferentes parâmetros termodinâmicos  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  da interação do composto (9) *ct*- [RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> com a BSA nas temperaturas, 295,15; 300,15; 305,15 e 310,15 K (22,0; 27,0; 32,0 e 37,0 °C).

TABELA 4.11 – Parâmetros termodinâmicos da interação do composto (9) *ct*- [RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> com o BSA em diferentes temperaturas

Composto	$\Delta G^\circ$				$\Delta H^\circ$	$\Delta S^\circ$
	(kJ mol <sup>-1</sup> )				(kJ mol <sup>-1</sup> )	(J mol <sup>-1</sup> )
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>		
9	- 31,71	- 33,61	- 35,50	- 37,40	79,92	378,23

T<sub>1</sub> = 295,15 K; T<sub>2</sub> = 300,15 K; T<sub>3</sub> = 305,15 K; T<sub>4</sub> = 310,15K

Na TABELA 4.11 pode ser observado que os valores de  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  obtidos para o composto (9) *ct*- [RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, os quais foram  $\Delta H^\circ = 79,92$  kJ mol<sup>-1</sup> e  $\Delta S^\circ = 378,22$  kJ mol<sup>-1</sup>, mostrando valores positivos,  $\Delta H^\circ > 0$  e  $\Delta S^\circ > 0$ . Resultados positivos correspondem ao envolvimento de forças hidrofóbicas na interação com a proteína (ASADI et al., 2014; TABASSUM et al., 2012). Por outro lado, o  $\Delta G^\circ$  apresentou valores negativos, - 31,71; - 33,61; - 35,50 e - 37,40 kJ mol<sup>-1</sup> nas diferentes temperaturas,  $\Delta G^\circ < 0$ . Estes resultados confirmam a espontaneidade da ligação do composto (9) *ct*-



[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> com a BSA, onde o equilíbrio do sistema favorece os produtos (GANESHPANDIAN et al., 2014; TIEDEMAN, 2014).

GANESHPANDIAN et al. (2014) reportaram compostos de formula geral [Ru(η<sup>6</sup>-benzene)(L)Cl]<sup>+</sup> (onde, areno = benzene ou p-cymene e L = N-methylhomopiperazine ou 1-(anthracen-10-ylmethyl)-4-methylhomopiperazine), dos quais obtiveram parâmetros de interação com a BSA (K<sub>sv</sub>, K<sub>b</sub> e *n*) e parâmetros termodinâmicos (ΔG°, ΔH° e ΔS°) similares aos encontrados neste trabalho, TABELA 4.12.

TABELA 4.12 – Parâmetros relativos às interações e a termodinâmica entre complexos de Ru (II) com a BSA nas temperaturas de 298,0 e 308,0 K (24,85 e 34,85 °C) obtidos por GANESHPANDIAN et al. (2014)

<b>Compostos</b>	<b>T (K)</b>	<b>K<sub>b</sub> (10<sup>4</sup> dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>)</b>	<b><i>n</i></b>	<b>ΔG° (kJ mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>ΔH° (kJ mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>ΔS° (J mol<sup>-1</sup>)</b>
[Ru(η <sup>6</sup> -benzene)(L <sub>1</sub> )Cl] <sup>+</sup>	298	1,70	1,20	-24,13	333,12	75,14
	308	1,46	1,11	-24,55	323,66	
[Ru(η <sup>6</sup> -benzene)(L <sub>2</sub> )Cl] <sup>+</sup>	298	3,72	1,09	-26,07	336,71	74,27
	308	2,77	1,06	-26,19	326,16	
[Ru(η <sup>6</sup> - <i>p</i> -cymene)(L <sub>1</sub> )Cl] <sup>+</sup>	298	2,14	1,02	-24,70	334,32	74,93
	308	1,78	1,01	-25,06	324,64	
[Ru(η <sup>6</sup> - <i>p</i> -cymene)(L <sub>2</sub> )Cl] <sup>+</sup>	298	4,48	1,18	-26,53	341,30	75,18
	308	3,79	1,16	-26,99	331,17	

A albumina é a proteína mais abundante e altamente solúvel no plasma sanguíneo do sistema circulatório em mamíferos (CARTER e HO, 1994; KRAGH-HANSEN, 1990). É capaz de se ligar à vários compostos transportando-os, como os ácidos graxos, bilirrubina, triptofano, esteróides e muitos medicamentos (HE et al., 2005). A albumina desempenha um importante

papel no transporte de metabólitos e fármacos, através do sistema vascular, como também, na manutenção do pH e da pressão osmótica no plasma (IKEGUCHI et al., 1992). Neste sentido, os complexos de rutênio (II) chamam a atenção, pois a promissora atividade como antitumorais, pode estar relacionada à interação do composto de Ru(II) com proteínas, como a albumina e outras biomoléculas, podendo facilitar seu transporte para dentro das células tumorais (BERGAMO et al, 2012; BABU et al., 2014; KAPITZA et al., 2005a; SATHYADEVI et al., 2012; YAW et al., 2005;). Assim, experimentos como a interação do composto com a albumina BSA são bastante relevantes, no sentido de atribuir e esclarecer alguns aspectos do mecanismo de ação dos compostos de rutênio sintetizados pelo grupo LERCI.

### 4.2.3 Ensaio de Micronúcleo *In Vitro*

Neste experimento, o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> foi avaliado quanto aos seu potencial citotóxico e genotóxico pelo teste de micronúcleo *in vitro*. Este composto foi selecionado por ter apresentado promissora atividade citotóxica em várias linhagens de células tumorais como MCF7, HeLa, HepG2, MO59J e B16-F10, em experimentos de citotoxicidade *in vitro*. No ensaio do micronúcleo *in vitro*, o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> foi avaliado em células não tumorais V79 (fibroblastos de pulmão de hãhamster Chinês) e tumorais HepG2 (hepatocarcinoma), com o propósito de averiguar se o composto exibe seletividade em tecidos tumorais, em condições diferentes dos experimentos anteriores.

#### 4.2.3.1 Micronúcleo em V79

As frequências de micronúcleos (CBMNs) e índice de divisão nuclear (IDN) obtidos das culturas de células da linhagem V79, tratadas nas concentrações de 0,321; 0,625 e 1,25 µmol L<sup>-1</sup> do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, estão representados na TABELA 4.13 por médias e desvio padrão para cada tratamento. A FIGURA 4.10 ilustra as CBNMNs obtidas em culturas de células V79 tratadas nas diferentes concentrações do composto avaliado e seus respectivos controles.

TABELA 4.13 - Frequências médias de CBNMNs e IDN obtidas nas culturas de células V79 tratadas em diferentes concentrações do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> e seus respectivos controles

<b>Tratamentos</b> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<b>CBNMNs<sup>a</sup></b> (Média $\pm$ D.P.)	<b>IDN<sup>b</sup></b> (Média $\pm$ D.P.)
<b>Controle</b>	4,67 $\pm$ 1,53	1,75 $\pm$ 0,11
<b>Controle Solvente (DMSO)</b>	1,67 $\pm$ 0,58	1,76 $\pm$ 0,15
<b>0,321</b>	3,33 $\pm$ 0,58	1,71 $\pm$ 0,14
<b>0,625</b>	7,67 $\pm$ 1,15	1,66 $\pm$ 0,07
<b>1,25</b>	8,33 $\pm$ 3,79	1,67 $\pm$ 0,05
<b>Cisplatina</b>	19,67 $\pm$ 6,03 <sup>c</sup>	1,77 $\pm$ 0,14
<b>MMS</b>	41,33 $\pm$ 3,79 <sup>c</sup>	1,75 $\pm$ 0,05

CBNMNs: Células Binucleadas Micronucleadas; MN: Micronúcleos; IDN: Índice de Divisão Nuclear; D.P.: Desvio Padrão; DMSO: dimetilsulfóxido; Cisplatina: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (3,33  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); MMS: metil metanosulfonato (400,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); <sup>a</sup>1000 células binucleadas analisadas por cultura a um total de 3000 células por tratamento; <sup>b</sup>500 células analisadas por cultura a um total de 1500 células por tratamento; <sup>c</sup>Significativamente diferente do grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ).

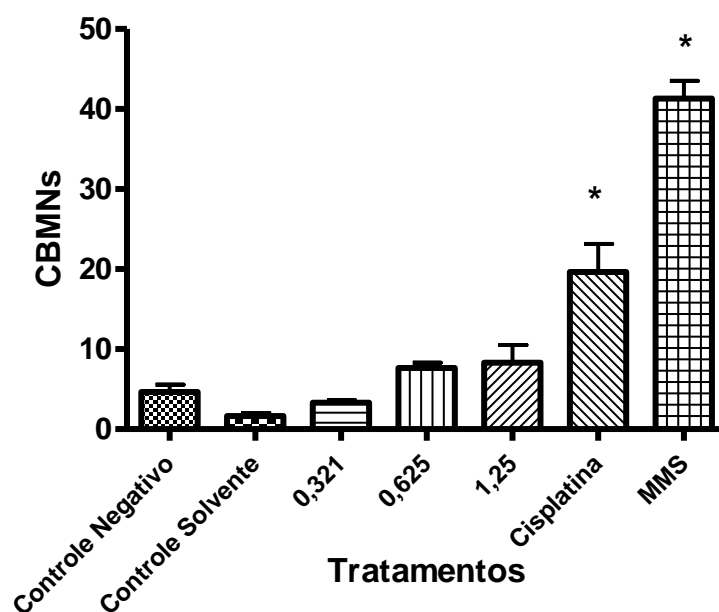


FIGURA 4.10- Frequências médias de células binucleadas micronucleadas (CBNMNs) obtidas nas culturas de células V79 tratadas nas diferentes concentrações do composto (9)  $ct$ -[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> e seus respectivos controles. \*Significativamente diferente do grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ), comparado pelo teste de Turkey.

Os resultados obtidos mostram que os grupos tratados com as diferentes concentrações do composto (9)  $ct$ -[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, assim como o grupo controle solvente, apresentaram frequências de CBNMNs que não diferiram estatisticamente do grupo controle negativo ( $p > 0,05$ ) em células V79. Esses dados indicaram ausência de genotoxicidade do composto nas diferentes concentrações avaliadas (TABELA 4.13). O MMS (400,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), utilizado como controle positivo, demonstra sensibilidade ao ensaio, produzindo efeito genotóxico. O cisplatina (3,33  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), também utilizado como controle positivo, exibiu genotoxicidade, apresentando frequências de CBNMNs que diferiram significativamente do grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ). O aumento gradual da concentração do composto (9)  $ct$ -[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> não

resultou em um aumento proporcional de CBNMNs estatisticamente significativo. Um aumento estatisticamente significativo nas frequências de CBNMNs é indicativo de genotoxicidade.

Os resultados de IDN para o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> mostraram valores que não diferiram estatisticamente em relação ao grupo controle negativo ( $p > 0,05$ ), indicando a ausência de citotoxicidade nos diferentes tratamentos, nas condições experimentais avaliadas em células V79 (TABELA 4.13). Na TABELA 4.13 e FIGURA 4.10, pode ser observado que não houve um aumento na frequência de CBNMNs, não resultando em variações significativas em todos os tratamentos.

#### **4.2.3.2 Micronúcleo em HepG2**

As frequências de micronúcleos (CBNMNs) e índice de divisão nuclear (IDN) obtidos das culturas de células da linhagem HepG2, tratadas nas concentrações de 0,321; 0,625 e 1,25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, estão representados na TABELA 4.14 por médias e desvio padrão para cada tratamento. A FIGURA 4.11 ilustra as CBNMNs obtidas em culturas de células HepG2 tratadas nas diferentes concentrações do composto avaliado e seus respectivos controles.

TABELA 4.14 - Frequências médias de CBNMNs e IDN obtidas nas culturas de células HepG2 tratadas em diferentes concentrações do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> e seus respectivos controles

<b>Tratamentos</b> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	<b>CBNMNs<sup>a</sup></b> (Média $\pm$ D.P.)	<b>IDN<sup>b</sup></b> (Média $\pm$ D.P.)
<b>Controle</b>	4,00 $\pm$ 1,73	1,77 $\pm$ 0,05
<b>Controle Solvente (DMSO)</b>	2,67 $\pm$ 0,58	1,56 $\pm$ 0,30
<b>0,321</b>	7,00 $\pm$ 2,64	1,58 $\pm$ 0,32
<b>0,625</b>	2,33 $\pm$ 1,53	1,65 $\pm$ 0,23
<b>1,25</b>	10,67 $\pm$ 1,53 <sup>c</sup>	1,62 $\pm$ 0,07
<b>Cisplatina</b>	26,33 $\pm$ 1,53 <sup>c</sup>	1,41 $\pm$ 0,04
<b>MMS</b>	22,67 $\pm$ 2,52 <sup>c</sup>	1,69 $\pm$ 0,07

CBNMNs: Células Binucleadas cotendo Micronucleadas; MN: Micronúcleos; IDN: Índice de Divisão Nuclear; DP: Desvio Padrão; DMSO: dimetilsulfóxido; Cisplatina: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (3,33  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); MMS: metil metanosulfonato (400,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); <sup>a</sup>1000 células binucleadas analisadas por cultura a um total de 3000 células por tratamento; <sup>b</sup>500 células analisadas por cultura a um total de 1500 células por tratamento. <sup>c</sup>Significativamente diferente do grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ), comparado pelo teste de Turkey.

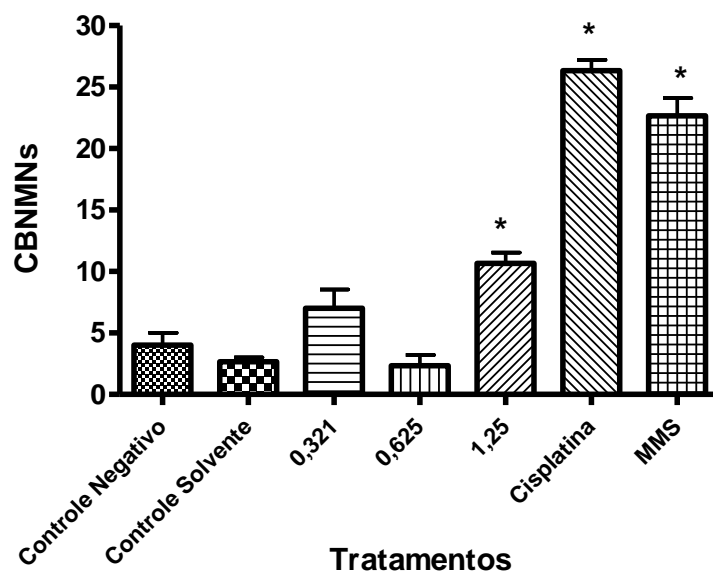


FIGURA 4.11 - Frequências médias de células binucleadas micronucleadas (CBNMNs) obtidas nas culturas de células HepG2 tratadas nas diferentes concentrações do composto (9)  $ct$ -[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> e seus respectivos controles. \*Significativamente diferente do grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ), comparado pelo teste de Turkey.

Os resultados obtidos mostram que os grupos tratados nas concentrações de 0,321; 0,625  $\mu\text{mol L}^{-1}$  do composto (9)  $ct$ -[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, assim como o grupo controle solvente, apresentaram frequências de CBNMNs que não diferiram estatisticamente do grupo controle negativo ( $p > 0,05$ ). Esses dados indicaram ausência de genotoxicidade do complexo, nas concentrações de 0,321; 0,625  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em células HepG2, TABELA 4.14. Em contrapartida, a concentração de 1,25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  exibiu um aumento na frequência de CBNMNs que diferiram estatisticamente do grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ), indicando a presença de genotoxicidade na maior concentração testada em células HepG2 (TABELA 4.14, FIGURA 4.11).



O MMS (400,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), usado como controle positivo, demonstra a sensibilidade ao ensaio, produzindo efeito genotóxico. O cisplatina (3,33  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), também utilizado como controle positivo, mostrou genotoxicidade, apresentando frequências de CBNMNs que diferiram significativamente do grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ). O aumento da concentração do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> resultou em um aumento na frequência de CBNMNs na maior dose avaliada em células HepG2. Este resultado indica a presença de uma relação dose-resposta, uma vez que o composto mostrou efeito genotóxico em células tumorais HepG2.

Os resultados de IDN mostraram valores que não diferiram estatisticamente em relação ao grupo controle negativo em todos os tratamentos, indicando ausência de citotoxicidade nos diferentes tratamentos neste experimento em células HepG2 (TABELA 4.14). Neste sentido, pode ser observado que um aumento na frequência de CBNMNs não resultou em variações significativas nos valores de IDN em todos os tratamentos.

Os resultados de micronúcleo *in vitro* mostraram que o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> não exibiu efeito genotóxico em células não tumorais V79 e, no entanto, mostrou-se genotóxico na maior concentração avaliada em células tumorais HepG2 (hepatocarcinoma). Estes resultados mostraram que, o composto em estudo mostrou efeito genotóxico em células tumorais de maneira seletiva, interagindo com material genético das células tumorais e conseqüentemente com o DNA, de forma mais intensa do que em células de tecidos saudáveis, células não tumorais V79.

A linhagem de células HepG2 possui uma morfologia semelhante ao epitélio e ao parênquima hepático, além de conservar a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das proteínas plasmáticas, características das células normais do fígado humano (KNASMULLER et al., 1998). Essas células mantêm as atividades das enzimas de fase I, tais como as do citocromo P450 CYP1A1, CYP1A2, CYP2B e CYP2E1, assim como as enzimas de fase II,

incluindo glutathiona-S-transferases, sulfotransferases, N-acetiltransferases e glucuranosiltransferases, estando essas enzimas envolvidas no metabolismo de carcinógenos reativos de DNA (MAJER et al., 1999; UHL et al., 1999).

O metabolismo de drogas e outros xenobióticos é realizado principalmente no fígado, por enzimas classificadas como enzimas de fase I e de fase II. A fase I inclui reações de oxidação, redução e hidrólise mediadas por enzimas do citocromo P450 ou monooxigenases CYPs (NELSON et al., 1993), as quais catalisam de 70 a 80% das reações. Por meio dessas reações são produzidos metabólitos eletrofílicos altamente reativos, os quais podem ser mutagênicos ou carcinogênicos, além de interagirem com proteínas ou DNA, formando adutos. Sendo assim, a toxicidade de um fármaco pode ser causada não só pela molécula-mãe, mas também por seus metabólitos. De maneira que o metabolismo pode resultar no fenômeno de bioativação. Inúmeros fármacos, com diferentes estruturas e mecanismos de ação, têm sido desenvolvidos para sofrer ativação metabólica pelas enzimas de metabolização (TOLOSA et al., 2011).

No presente trabalho, utilizou-se uma linhagem celular (HepG2) possuidora de sistema enzimático capaz de metabolizar compostos xenobióticos, assim como utilizou-se outra linhagem que não apresenta esse sistema de biotransformação (V79). Neste sentido, observou-se que a maior concentração utilizada do composto ( $1,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) desencadeou efeito genotóxico em células HepG2, sendo que o mesmo efeito não foi observado em células V79, quando essas foram submetidas à mesma concentração do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>. A partir destes resultados, pode-se sugerir que o complexo carbonílico de rutênio exerce uma ação genotóxica, onde o mesmo pode ser biotransformado por enzimas de metabolização das células hepáticas. Assim, podem ser os metabólitos formados nessas células os responsáveis pela genotoxicidade resultante. Essa sugestão pode ser reforçada pela teoria de UHL et al. (2000) e VALENTIN-SEVERIN et al. (2003) onde afirmam que os ensaios

com células HepG2, refletem mais adequadamente os danos causados por mutágenos que os testes *in vitro* feitos com bactérias ou outras células de mamíferos, os quais requerem a adição de misturas de ativação exógenas para mimetizar o metabolismo de compostos de ação indireta.

Considerando que o composto de rutênio utilizado no presente trabalho possui CO como ligante, ressalta-se que muitos estudos têm investigado sobre a sua produção endógena em funções fisiológicas nas últimas décadas (DAVIDGE et al., 2009). Alguns estudos, relataram que o CO possui seletividade para interação com proteínas estruturais e funcionais, a qual é exemplificada pela interação do CO com o ferro e proteínas heme-dependentes (TENHUNEM et al. 1968; WILKINSON et al., 2011). Entretanto, sistemas contendo metais de transição podem vir a potencializar preferencialmente a molécula de CO (FORESTI et al., 2004).

## 4.2.4 Sistema teste *in vivo*

### 4.2.4.1 Ensaio do micronúcleo *in vivo*

#### 4.2.4.1.1 Sangue periférico

Os resultados de micronúcleo em amostras de sangue periférico de camundongos Swiss foram obtidos nas doses de 7,5; 15,0; 30,0 e 60,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>; na dose de 6,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c para o cisplatina (a definir como controle positivo) e água (controle negativo). Estas doses foram utilizadas como um ensaio piloto na avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade, como representado no gráfico da FIGURA 4.12.

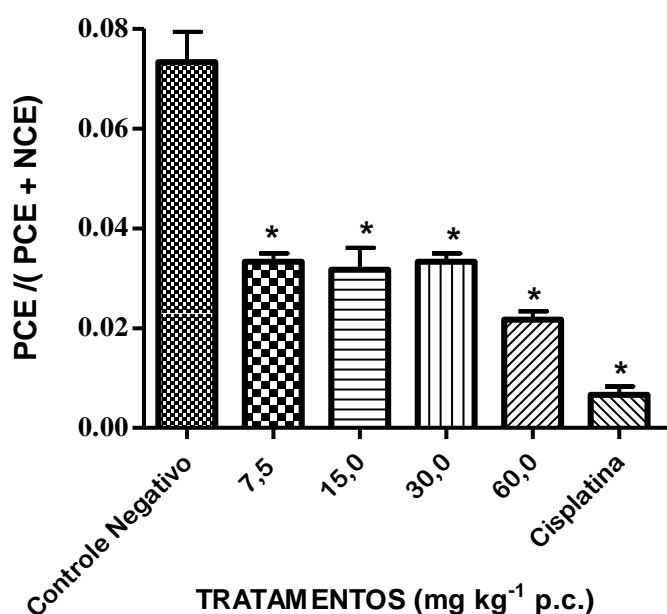


FIGURA 4.12 – Médias da razão PCE/(PCE+NCE) obtidas em amostras de sangue periférico (2 animais por grupo de tratamento), após os tratamentos com o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> e cisplatina (6 mg.kg<sup>-1</sup> p.c) obtida no ensaio piloto. \*Doses consideradas citotóxicas

As doses do composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$  e do cisplatina, avaliadas neste ensaio piloto, onde foram consideradas muito citotóxicas. Desta maneira, doses menores foram estabelecidas para o teste de micronúcleo em medula óssea, a fim de que pudesse ser averiguada uma dose segura, com ausência de citotoxicidade e o possível aparecimento de efeito genotóxico nas mesmas. Quanto a dose do cisplatina foi estabelecida numa triagem para que mostrasse genotoxicidade, porém com ausência de citotoxicidade, como abordado na parte experimental.

#### 4.2.4.1.2 Medula óssea

Para o experimento de micronúcleo em amostras de medula óssea de camundongos Swiss, utilizou-se o sistema teste em amostras extraídas 24h após a administração da droga, com posterior análise das lâminas em microscópio.

Os resultados obtidos por meio da análise da frequência de PCEMNs e da citotoxicidade pela razão  $PCE/(PCE + NCE)$  em medula óssea de camundongos Swiss, submetidos aos tratamentos nas doses de 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0  $mg\ kg^{-1}$  p.c. do composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$ , como também dos seus respectivos controles: MMS (40,0  $mg\ kg^{-1}$  p.c., controle positivo); cisplatina (1,5  $mg\ kg^{-1}$  p.c., controle positivo) e água (controle negativo), para a avaliação do potencial citotóxico e genotóxico, estão representados na TABELA 4.15 e FIGURA 4.13 por médias e desvio padrão.

TABELA 4.15 - Frequências médias de PCEMNs e a razão PCE/( PCE + NCE) obtidas em amostras de medula óssea de camundongos Swiss após os tratamentos em diferentes concentrações do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> e respectivos controles

<b>Tratamentos</b> (mg kg <sup>-1</sup> p. c.)	<b>PCEMNs<sup>a</sup></b> <b>(Média ± D.P.)</b>	<b>PCE / ( PCE + NCE)<sup>b</sup></b> <b>(Média ± D.P.)</b>
<b>Controle</b>	2,67 ± 0,52	0,67 ± 0,0
<b>0,625</b>	4,67 ± 1,75	0,54 ± 0,10
<b>1,25</b>	3,00 ± 1,26	0,59 ± 0,08
<b>2,5</b>	3,83 ± 1,47	0,57 ± 0,08
<b>5,0</b>	4,50 ± 2,07	0,61 ± 0,11
<b>Cisplatina</b>	59,50 ± 9,18 <sup>c</sup>	0,52 ± 0,08
<b>MMS</b>	29,33 ± 3,83 <sup>c</sup>	0,55 ± 0,09

Cisplatina: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (1,5mg kg<sup>-1</sup>p.c.); MMS: metilmetanosulfonato (40,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c.); PCEMN's: Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (total de micronúcleos); <sup>a</sup>2000 eritrócitos analisados por animal a um total de 12.000 células por tratamento; <sup>b</sup>400 eritrócitos por animal a um total de 1.200 eritrócitos por tratamento. <sup>c</sup>Significativamente diferente do grupo controle ( $p < 0,05$ ).

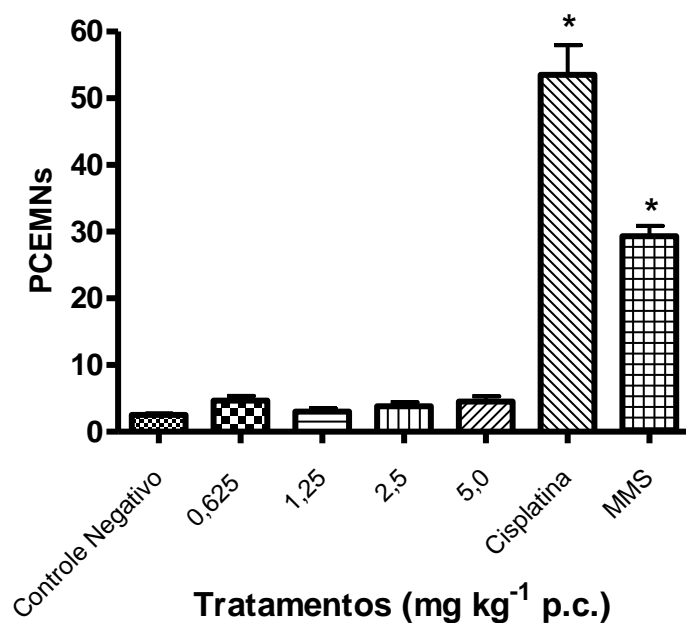


FIGURA 4.13 - Frequências médias de PCEMNs em medula óssea de camundongos Swiss após os tratamentos com diferentes doses do composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$ , cisplatina e MMS. \*Significativamente diferente do grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ), comparado pelo teste de Turkey.

Os resultados obtidos por meio da frequência de PCEMNs em medula óssea de camundongos Swiss, submetidos ao tratamento nas diferentes doses do composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$  estão representados na TABELA 4.15 e FIGURA 4.13. Estes resultados mostraram que os grupos tratados com as diferentes doses do composto em estudo, não apresentaram aumento nas frequências de PCEMNs, ou seja, não diferiram estatisticamente do grupo controle negativo ( $p > 0,05$ ). Esses dados indicaram a ausência de genotoxicidade nas doses diferentes doses avaliadas do complexo (TABELA 4.15, FIGURA 4.13).

O MMS (40,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c.), usado como controle positivo, apresentou efeito genotóxico. O cisplatina (1,5 mg kg<sup>-1</sup> p.c.), também utilizado como controle positivo, apresentou genotoxicidade, exibindo frequências de

PCEMNs que diferiram estatisticamente do grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ). O aumento gradual da concentração do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> não resultou em um aumento proporcional de PCEMNs estatisticamente significativo.

Os resultados de (PCE/(PCE + NCE) representando a citotoxicidade dos grupos tratados nas diferentes doses do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> (TABELAS 4.15), não apresentaram valores estatisticamente significativos, quando comparados ao grupo controle negativo ( $p > 0,05$ ).

O cisplatina utilizado como controle positivo neste experimento, um quimioterápico largamente utilizado no tratamento de tumores sólidos com bons resultados, apresenta diversos efeitos colaterais como a nefrotoxicidade, ototoxicidade, supressão medular e a neuropatia periférica (SALEH et al., 2005; SCHWEITZER, 1993). Neste contexto, o cisplatina avaliado neste experimento de micronúcleo em medula óssea, exibiu um aumento nas frequências de micronúcleos estatisticamente significativo em relação ao controle negativo, indicando uma expressiva atividade genotóxica, com uma dose bastante inferior às utilizadas pelo composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>.

De acordo com a literatura, alguns complexos de rutênio demonstraram ter um efeito antitumoral como as drogas à base de platina (II), entretanto, apresentaram menor toxicidade (BRABEC e NOVAKOVA, 2006). Isso se deve ao fato, dos complexos de rutênio apresentarem alta seletividade por células cancerígenas (CARBALLO et al., 1997). Também é descrito, que o estudo da coordenação de CO em complexos metálicos e a tradução de sua função citoprotéica, podem ser a oportunidade para iniciar terapias baseadas na entrada de CO no interior de tecidos específicos (ROCHA-FILHO, 1999). Por este motivo, complexos carbonílicos de metais de transição vêm surgindo como uma classe importante de compostos, com propriedades químicas que podem ser cuidadosamente exploradas na elaboração de novos fármacos, os quais podem ser



utilizados terapeuticamente (ROMÃO et al. 2012). Neste sentido, a avaliação de aspectos referentes à genética toxicológica são extrema importância para um candidato à fármaco.

Os micronúcleos, um ou vários por células, resultam de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos que se atrasam em relação aos demais em sua migração para os pólos da célula durante a anáfase. Os micronúcleos aparecem nas células filhas em decorrência de danos induzidos nas células parentais (HAYASHI et al., 2000; YAMAMOTO e KIKUCHI, 1980). Inúmeras hipóteses abordam os caminhos que levam a formação do micronúcleo, um deles é a indução de estresse oxidativo. A indução de espécies reativas de oxigênio (ROS - Reative Oxygen Species) foi encontrada em uma grande parcela de células expostas a metais pesados e/ou semimetais tóxicos, como arsênio, cádmio, cobre, chumbo, manganês, mercúrio, níquel e zinco, em células de mamíferos e seres humanos (KNASMÜLLER et al., 1998a; KNASMÜLLER et al., 1998b; KNASMÜLLER et al., 2008; STEINKELLNER et al., 1998) citado por (PEREIRA et al., 2009). ROS atacam as bases purínicas e pirimidínicas, assim como o açúcar desoxirribose, que levam às rupturas no filamento de DNA, aumentando a probabilidade de fragmentação cromossômica, amplificando assim a taxa de formação de micronúcleo (YI et al., 2007). Fenômenos celulares também podem dar origem aos micronúcleos, como consequência da instabilidade de genes que controlam o ciclo celular e eventos de hipometilação de sequências repetidas no DNA centromérico e pericentromérico (FENECH et al., 2005). Dessa maneira, a formação do micronúcleo também pode acontecer de forma espontânea, como mecanismo de defesa celular (FENECH et al., 2011).

Tem sido descrito que o conhecido composto de Ru(III), o KP1019-*trans*-[RuCl<sub>4</sub>(Ind)<sub>2</sub>]IndH (Ind = indazole) sofre ativação *in vivo* por meio da redução de Ru(III) para Ru(II), a redução promove interações com biomoléculas após a aquação da ligação Ru<sup>III</sup>-Cl e a labilização da ligação Ru<sup>II</sup>-Cl

(PIZZARRO e SADLER, 2009), permitindo a interação com o DNA, induzindo conseqüentemente a apoptose da célula pelo caminho mitocondrial. Este mecanismo gera citotoxicidade por ROS, estas interações têm sido investigadas mas não estão totalmente esclarecidas (BERGAMO et al., 2009; JAKUPEC et al., 2008; KAPITZA et al., 2005a).

Os testes referentes à genética toxicológica, como o teste do micronúcleo, são um componente básico para a avaliação da segurança pré-clínica de compostos candidatos a drogas, tendo como propósito identificar substâncias que possuem um potencial de risco de induzir mutações e carcinogenicidade (WITTE et al., 2007). O teste do micronúcleo proporciona relevância toxicológica, uma vez que apresenta capacidade de mostrar danos no material genético causados por agentes clastogênicos (promovem quebras nos cromossomos, conseqüentemente no DNA) ou aneugênico (lesões nas proteínas do fuso mitótico) (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). No roedor, a medula óssea atua como um órgão base da eritropoiese (processo relacionado à formação dos eritrócitos conhecidos como hemácias ou glóbulos brancos) com diferentes estágios de proliferação e maturação (JAGETIA e NAYAK, 1996). Durante a proliferação, as células continuam a se dividir, de modo que ao administrar um determinado agente teste, este pode causar danos cromossômicos como quebras e trocas, ou agir sobre a tubulina provocando perda cromossômica. Durante a maturação, o eritroblasto se desenvolve em um eritrócito policromático (PCE), que por ser eritrócito jovem, ainda contém RNA, sendo facilmente corado de azul com Giemsa. Estes eritrócitos têm um tempo de vida curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele apresente pode ser gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente. Como o núcleo principal é expulso neste processo, a visualização de qualquer micronúcleo no citoplasma é facilitada. Os PCEs com o tempo perdem RNA e tornam-se eritrócitos normocromáticos (NCEs) (KRISHNA e HAYASHI, 2000).

O teste de micronúcleo em roedores é internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado (RIBEIRO e SALVADORI, 2003). A Conferência Internacional em Harmonização (*International Conference in Harmonization*, 1999) recomendou o teste de micronúcleo e forneceu as diretrizes de análise genotóxica *in vivo*, de maneira que não deve ser descartada a necessidade do controle positivo (HAYASHI et al., 1989). O composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> avaliado neste experimento de micronúcleo em medula óssea de camundongos Swiss, apresentou ausência de citotoxicidade e genotoxicidade nas doses avaliadas. Diferente do resultado obtido para o cisplatina que mostrou efeito genotóxico, confirmando o que vem sendo descrito na literatura, que complexos de rutênio apresentam menores efeitos tóxicos que o cisplatina, utilizado atualmente como quimioterápico no tratamento do câncer, possivelmente porque interagem com o DNA de maneira diferente do cisplatina (PIZZARRO e SADLER, 2009; VAN RIJT e SADLER, 2009). Com base no exposto, pode-se inferir que os resultados obtidos neste experimento são relevantes para dar sequência a outros experimentos como o ensaio cometa e, na investigação do seu efeito como antitumoral *in vivo* em doses seguras.

#### 4.2.4.2 Ensaio cometa

No atual trabalho foram analisadas células do fígado, por meio do ensaio cometa, coletadas 24 h após os tratamentos, a fim de se obter a taxa máxima de danos no DNA em animais tratados com a substância-teste (FENECH, 2000; GARRY et al, 2003).

Os resultados obtidos no ensaio cometa em hepatócitos de camundongos Swiss avaliados nas doses de 0,625; 1,25; 2,5; 5,0 e  $\text{mg kg}^{-1}$  p.c. do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, como também dos respectivos controles: MMS (40,0  $\text{mg kg}^{-1}$  p.c. controle positivo); cisplatina (1,5  $\text{mg kg}^{-1}$  p.c. controle positivo) e água (controle negativo), na avaliação do potencial genotóxico, estão representados na TABELA 4.16 e FIGURA 4.14 por médias e desvio padrão. As diferentes doses do complexo e dos controles foram administradas via intraperitoneal nos animais.

As análises dos nucleóides foram realizadas em microscópio com o auxílio do programa Comet Imager 2.2, onde foram considerados os seguintes parâmetros: a porcentagem de DNA na cauda do cometa (% DNA); o *Tail Moment* (TM) – momento de cauda = (Intensidade da cauda/Intensidade total) x comprimento de cauda; e *Tail Length* (TL) - comprimento da cauda = Posição final da cauda – Posição final da cabeça.

TABELA 4.16- Frequências médias de danos no DNA obtidos nos diferentes parâmetros obtidos em hepatócitos de camundongos Swiss, tratados em diferentes doses do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>

<b>Tratamentos</b> <b>(mg kg<sup>-1</sup> p.c.)</b>	<b>% DNA</b> <b>(Média ± D.P.)</b>	<b>TM</b> <b>(Média ± D.P.)</b>	<b>TL</b> <b>(Média ± D.P.)</b>
<b>Controle Negativo</b>	19,69 ± 3,29	2,38 ± 0,69	8,81 ± 2,01
<b>0,625</b>	19,86 ± 4,32	2,76 ± 1,01	9,63 ± 2,41
<b>1,25</b>	21,82 ± 3,59	3,23 ± 0,77	9,89 ± 2,58
<b>2,50</b>	20,53 ± 3,00	3,29 ± 1,47	10,63 ± 1,79
<b>5,00</b>	28,21 ± 5,13 <sup>c*</sup>	7,01 ± 3,15 <sup>c*</sup>	15,80 ± 5,51 <sup>c*</sup>
<b>Cisplatina</b>	39,28 ± 4,52 <sup>c</sup>	12,09 ± 2,74 <sup>c</sup>	23,47 ± 3,86 <sup>c</sup>
<b>MMS</b>	41,01 ± 3,42 <sup>c</sup>	14,30 ± 4,41 <sup>c</sup>	27,09 ± 5,99 <sup>c</sup>

% DNA: porcentagem de DNA na cauda do cometa; Tail Moment (TM): momento de cauda; Tail Length (TL): comprimento da cauda; Cisplatina: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (1,5 mg kg<sup>-1</sup> p.c.); MMS: metil metanosulfonato (40,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c.). Os valores estão representados por média e desvio padrão. Foram analisados 300 cometas por tratamento. <sup>c</sup> Significativamente diferente do grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ). <sup>\*</sup>Significativamente diferente do grupo controle positivo, cisplatina e MMS ( $p < 0,05$ ).

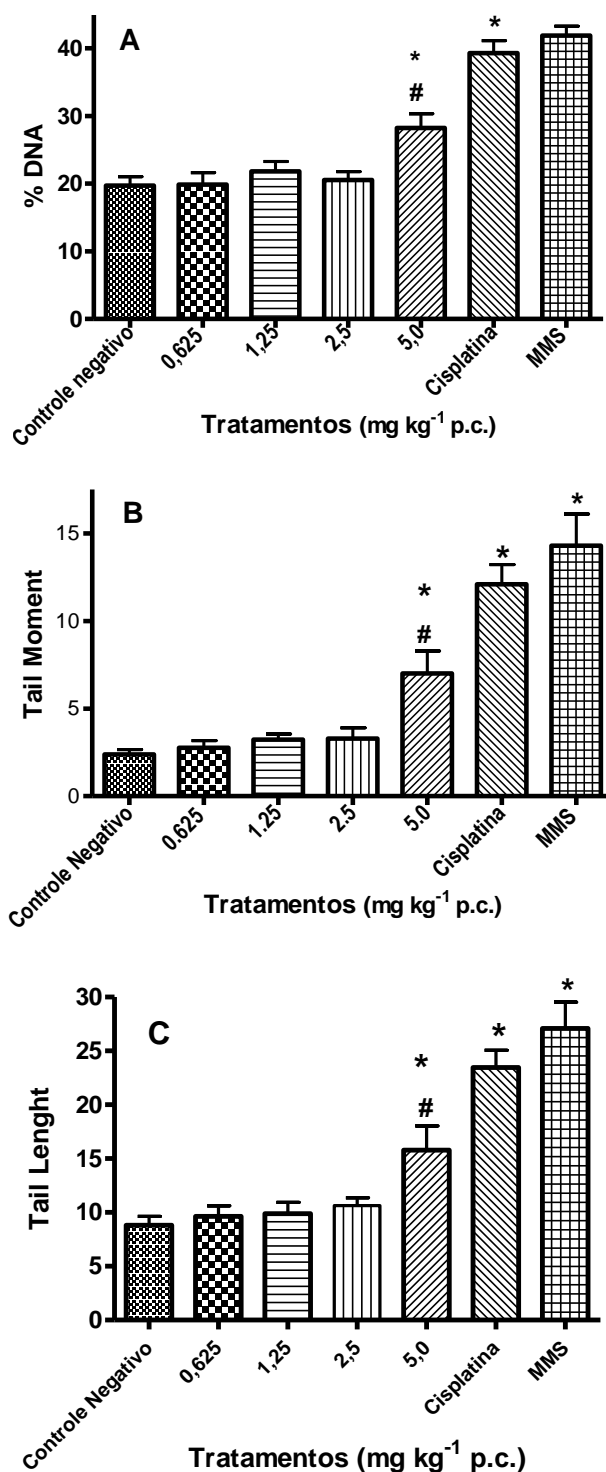


FIGURA 4.14 - Gráficos ilustrando, (A): porcentagem e DNA (% DNA); (B): momento de cauda Tail Moment (Tail intensity/Total intensity x Tail Length); e (C): comprimento de cauda Tail Length do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> e dos grupo controle. \*Significativamente diferente do grupo controle ( $p < 0,05$ ); #Significativamente diferente do grupo controle positivo, cisplatina e MMS ( $p < 0,05$ ) comparado pelo teste de Turkey.

As extensões dos danos ao DNA em hepatócitos de camundongos Swiss tratados com o composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$  estão demonstrados na TABELA 4.16 e FIGURA 4.14. Os resultados mostraram que para as doses de 0,625; 1,25; 2,5 mg kg<sup>-1</sup> p.c. não houveram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo ( $p > 0,05$ ) nos três parâmetros analisados (% DNA, TM e TL). Para dose 5,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c. do composto, os resultados apresentaram um aumento na frequência de danos no DNA estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros avaliados. Estes resultados indicaram que houve um aumento nas taxas de migração de fragmentos do DNA, sugerindo quebras nas fitas do mesmo.

Como era esperado, os animais tratados com MMS (40,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c.) e cisplatina (1,5 mg kg<sup>-1</sup> p.c.) exibiram um aumento frequências de danos no DNA, significativamente maiores quando comparados ao controle negativo ( $p < 0,05$ ), indicando que houve um aumento nas taxas de migração de fragmentos do DNA, sugerindo quebras nas fitas do mesmo.

O cisplatina é um agente antineoplásico que interage com o DNA produzindo adutos monofuncionais, ligações cruzadas intrafita e interfitas do tipo DNA-DNA e DNA-PROTEÍNA com o fragmento “Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>”, ligado covalentemente na posição N7 da guanina ou adenina (MONNERET, 2011).

O MMS é um agente alquilante que causa danos no DNA, facilitando a formação de monoadutos e ligações cruzadas no mesmo, onde são expressas mutações de substituição das bases. O MMS apresenta alta reatividade SN<sub>2</sub>, causando N-alkilação nas purinas (N7-metilguanossina e N3-metiladenina). Isto sugere que os eventos N-metilação são responsáveis pelos efeitos clastogênicos causados pelo MMS (KAINA, 2004).

Segundo TICE et al. (2000), a versão alcalina do ensaio cometa (pH > 13), (versão utilizada neste trabalho) é capaz de detectar uma vasta extensão

de danos no material genético como quebras simples e duplas, sítios alcalilábeis, ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína. As ligações cruzadas ou pontes, como as ligações cruzadas DNA-proteína e DNA-DNA, ao contrário das alterações ocorridas neste experimento, podem diminuir a migração do DNA, sendo detectadas quando há uma diminuição na migração em relação ao controle negativo. Neste experimento, houveram aumentos nas taxas de migração do DNA em relação ao controle negativo, sugerindo quebras de fita e/ou sítios álcali lábeis, ALS (BURRLISSON et al., 2007; MERK e SPEIT, 1999). As lesões visualizadas pelo ensaio cometa, como quebras de fitas têm um importante papel, como as modificações das bases do DNA abrangendo sítios apurínicos e/ou apirimidínicos. Contudo, essas lesões são consideradas primárias e passíveis de reparo, podendo não resultar na formação de mutações gênicas ou cromossômicas (BRENDLER-SHAWAAB et al., 2005).

É importante salientar que apenas a maior dose testada para o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> apresentou efeito genotóxico, entretanto, numa proporção significativamente menor que a encontrada para cisplatina e o MMS. Os resultados obtidos neste experimento em relação ao composto em estudo pode estar relacionado a interações moderadas, confirmado pelos resultados obtidos nos estudos de interação entre o composto e o DNAct abordado anteriormente, onde a constante de interação da ordem  $3,78 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}$  indicou interações fracas. Uma constante de interação considerada forte entre o composto e o DNA seria da ordem de  $10^5$  a  $10^7$ , como reportada na literatura para o brometo de etídeo, um intercalador clássico (CHAUHAN e ARJMAND, 2007).

Com base no exposto, experimentos como o ensaio cometa se fazem necessários para a avaliação de possíveis candidatos a fármacos, no sentido de avaliar com maior sensibilidade os possíveis danos no material genético das células. Dependendo da extensão destes danos, os mesmos podem trazer danos futuros (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005; SINGH et al.,



1988). As lesões detectadas pelo ensaio cometa para o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> na dose de 5,0 mg kg<sup>-1</sup>, foram consideradas menores que os danos encontrados pelo cisplatina e MMS. Adicionalmente, pode-se constatar que diferente das mutações, os danos no DNA encontrados neste experimento são passíveis de reparo, isso é confirmado pelo teste de micronúcleo que não mostrou genotoxicidade na dose de 5,0 mg.kg<sup>-1</sup> p.c., considerando que danos no DNA ocorrem frequentemente em células de tecido específicos, hepatócitos no caso deste experimento. Esta metodologia permite a detecção de danos em uma única célula, e conseqüentemente, em determinada sub-população celular, sendo de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos (GONTIJO et al., 2003).

Neste sentido, as agências reguladoras e os comitês científicos tais como a Comissão de Mutagenicidade de Produtos Químicos em Alimentos, Produtos para o Consumidor e Meio Ambiente (COM), a Food and Drug Administration Center dos EUA para a Avaliação e Pesquisa de Drogas (CDER), a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AFSA), a Conferência Internacional sobre Harmonização dos Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH), e a Agência Europeia de Medicamentos (EMEA) têm recomendado o uso do ensaio cometa *in vivo*, para desenvolver a importância da evidência na avaliação dos resultados de ensaios *in vitro* ou em ensaios *in vivo* de genotoxicidade (VASQUEZ, 2012).

A versão *in vivo* do teste do cometa tem sido amplamente utilizada em testes de genotoxicidade, análise de pacientes com câncer, antes e depois da quimioterapia para verificar os danos no DNA, assim como no biomonitoramento de pessoas expostas ocupacionalmente ou acidentalmente a algum tipo de agente genotóxico, como a exposição à radiação, agentes químicos, etc (ANDERSON e PLEWA, 1998; ALBERTINI et al., 2001).

As vantagens da realização deste experimento em animais incluem a aplicabilidade de vários tecidos, ou seja, é possível a verificação de possíveis

danos no DNA em diferentes órgãos do animal, sendo sensível à detecção de níveis baixos de lesões. No ensaio cometa avaliado em nosso estudo, utilizou-se células do fígado, hepatócitos. Os hepatócitos são os tipos celulares mais abundantes, os quais desempenham muitas atividades, incluindo o metabolismo de xenobióticos (BANDELE et al, 2012). Geralmente os ensaios de genotoxicidade *in vivo*, como o cometa, se concentram no fígado para a detecção dos efeitos genotóxicos, uma vez que é o principal órgão para a ativação metabólica de substâncias após a exposição sistêmica (ROTHFUSS et al. 2010).

Pode-se inferir que o resultado de genotoxicidade na maior dose testada, indicou que houve a metabolização do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> na dose de de 5,0 mg kg<sup>-1</sup> por hepatócitos de camundongos Swiss, pois o fígado é um órgão de metabolização. Como abordado anteriormente, a toxicidade de fármacos pode ser causada tanto pela molécula-mãe, como por seus metabólitos. De fato, o metabolismo pode resultar em um fenômeno chamado de bioativação. Neste sentido, diversos fármacos com variadas estruturas e mecanismos de ação, têm sido desenvolvidos para sofrer ativação metabólica por enzimas de metabolização (TOLOSA et al., 2011). Assim, pode ser verificada futuramente, a possibilidade de avaliar atividade dos metabólitos secundários deste composto.

Muitos pesquisadores têm investigado a obtenção de complexos que apresentem atividades antitumorais com outros metais de transição (CLARKE et al., 1999), que possam trazer vantagens em relação aos compostos de platina, entre elas, a efetividade no tratamento do câncer com menores ou de nenhum efeito tóxico e/ou genotóxico. Neste sentido, o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> avaliado em nossos estudos, em doses maiores que o cisplatina, apresentou genotoxicidade apenas na dose de 5,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c., mostrando valores de frequências de danos significativamente menores em relação ao cisplatina (1,5 mg kg<sup>-1</sup> p.c.) e MMS (40,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c.) nas condições experimentais avaliadas.

## *4.3 Resultados e discussões*

### *Parte 3*

### 4.3 – Parte 3 - Atividade antitumoral do composto (9) *ct*- [RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>

#### 4.3.1 Ensaio antitumoral *in vivo* em modelo de transplante singênico

O ensaio antitumoral *in vivo* em modelo de transplante singênico foi realizado com o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>. Destaca-se que este composto foi muito ativo em ensaios de citotoxicidade em células tumorais, especificamente em células B16-F10, exibindo um valor de IC<sub>50</sub> = 2,84 μmol L<sup>-1</sup> e de IS = 2,4, mostrando vantagens em relação ao cisplatina (IC<sub>50</sub> = 26,51 μmol L<sup>-1</sup> e IS = 0,4).

O experimento de atividade antitumoral *in vivo*, foi realizada injetando-se uma dose de 5,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c. do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, a uma distância de 1,0 cm do tumor, durante cinco 5 dias, quando o tumor passou a apresentar um volume de aproximadamente 100,0 mm<sup>3</sup>. O mesmo procedimento foi realizado no grupo controle (DMSO 1,0 %), porém sem o composto em estudo. A FIGURA 4.15 (A, B e C) ilustra o efeito dos diferentes tratamentos no desenvolvimento tumoral de melanoma em camundongos C57BL/6.

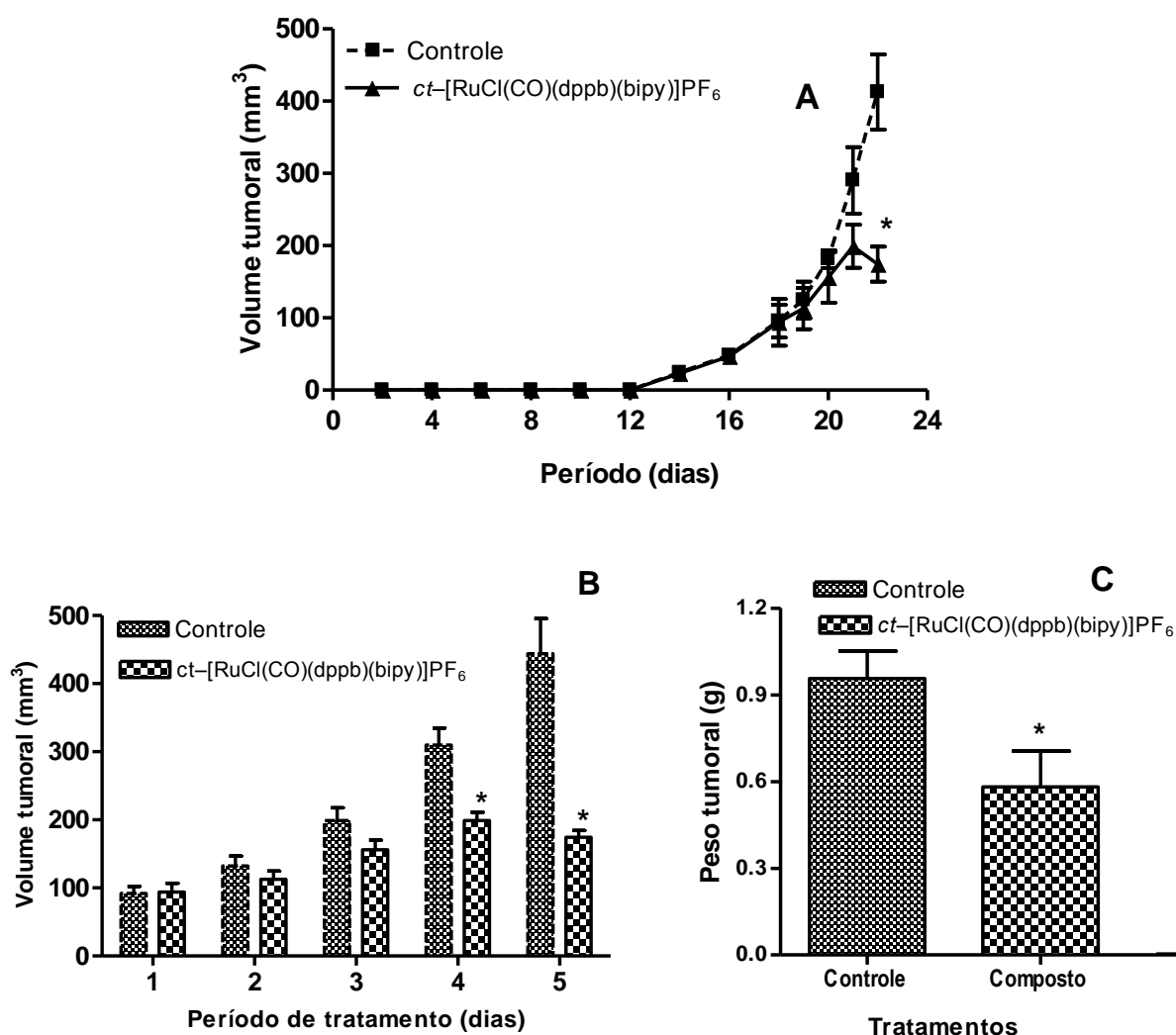


FIGURA 4.15 – Efeito do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> sobre o desenvolvimento tumoral de melanoma em camundongos C57BL/6 nos diferentes grupos de tratamento, controle (DMSO a 1,0 %) e o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> (5,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c.), obtidos em 6 animais por grupo de tratamento, durante 5 dias, onde (A): Desenvolvimento tumoral após o implante; (B): Volume médio tumoral durante o período de tratamento; (C): Peso médio tumoral após a eutanásia. Os resultados estão representados por Média ± Desvio Padrão. \*Significativamente diferente do grupo controle ( $p < 0,05$ ), comparado pelo teste de Turkey.

Os resultados apresentados nos gráficos A, B e C da FIGURA 4.15, mostram claramente que o composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$  foi eficiente como antitumoral. O composto de rutênio avaliado neste experimento, inibiu significativamente o desenvolvimento tumoral de melanoma (B16F10) em camundongos C57BL/6, quando comparado ao grupo controle (DMSO 1,0 %), durante a avaliação diária de volume tumoral. Ao verificar os pesos dos tumores após eutanásia, que aconteceu 24 h após o 5º dia de tratamento, a inibição do crescimento tumoral pelo composto é confirmada, mostrando um peso significativamente menor em relação ao controle que não recebeu tratamento com o composto em estudo.

Observando o gráfico B da FIGURA 4.15, nota-se que o grupo que recebeu o tratamento com o composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$ , apresentou uma redução do volume tumoral do 4º para o 5º dia de tratamento. Sugere-se que poderia haver uma maior redução do volume tumoral, ou até mesmo o seu desaparecimento se a eutanásia dos animais não ocorresse 24 h após o 5º dia de tratamento.

Na TABELA 4.17 estão representados alguns aspectos toxicológicos e danos observados macroscopicamente em órgãos e tecidos, após a eutanásia dos camundongos C57BL/6 com implante de melanoma (B16F10). Estes dados estão apresentados em relação aos dois grupos de tratamento, grupo controle (DMSO 1,0%) e composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$ .

TABELA 4.17 – Aspectos toxicológicos e danos observados em órgãos e tecidos de camundongos C57BL/6 com implante de melanoma (B16F10), no s grupos de tratamento: composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$  e controle (DMSO 1,0%)

TRATAMENTOS	OBSERVAÇÕES GERAIS
<b>Controle</b> (DMSO 1,0 %)	- Tumor vascularizado; - Fígado apático com rugosidade; - Intestino amarelado.
<b>Composto 9</b>	- Tumor não vascularizado ou pouco vascularizado; - Fígado e rins levemente pálidos.

Observa-se na TABELA 4.17 que os animais do grupo controle (DMSO 1,0 %), apresentaram vascularização tumoral, fígado apático e indícios de processo inflamatório nos intestinos. No entanto, os animais que receberam o tratamento com o composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$ , exibiram pouca ou nenhuma vascularização tumoral, assim como não perderam peso (APÊNDICE IV), apenas apresentaram rins e fígado levemente apáticos, que podem estar relacionados ao tumor induzido.

Sugere-se que o composto (9)  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$  pode inibir a vascularização tumoral, ou seja, que este composto pode inibir angiogênese tumoral. A angiogênese é o processo pelo qual os tumores desenvolvem novos vasos capilares sanguíneos. Este processo é fundamental para que haja progressão do tumor, estando fortemente relacionado à formação de metástases. De acordo com a literatura, a inibição da angiogênese é uma estratégia potencial no desenvolvimento de fármacos antitumorais (GALEANO et al., 1992; BERGER et al., 1989). Neste sentido, tem sido reportado que o composto de Ru(III) conhecido por NAMI-A,  $[ImH]\{trans-$

[RuCl<sub>4</sub>(Im)(DMSO)], foi o primeiro complexo de rutênio a entrar em testes clínicos. Este composto apresenta baixa toxicidade, mostrando efeito antimetastático que afetar a mobilidade das células cancerosas para outros tecidos (BERGAMO et al., 2002; SAVA et al., 1999; SAVA e BERGAMO, 2000; SIJA et al., 2014). Considera-se que a atividade antimetastática ocorre devido a capacidade do NAMI-A controlar a angiogênese (VACCA et al., 2002), possivelmente regulada pelo metabolismo do Óxido Nítrico Sintase (NOS), uma vez que há aumento dos níveis de NO correlato ao crescimento do tumor e seu espalhamento, como observado em diferentes tipos de cânceres humanos e experimentais (MORBIDELLI et al., 2003).

A TABELA 4.18 mostra as análises histopatológicas dos tumores implantados em camundongos C57BL/6, onde estão descritas as frequências de células pleomórficas, binucleações, mitoses, necroses e hemorragias.

TABELA 4.18 – Análises histopatológicas em tumores de melanoma (B16F10) implantados em camundongos C57BL/6 nos grupos de tratamentos: controle (DMSO 1,0 %) e composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>

Tumor	Animais	Pleomorfismo	Binucleação	Mitoses	Necrose	Hemorragia
<b>Controle</b> (DMSO 1%)	1	+++	+++	39	++	++
	2	++	+	46	+++	++
	3	+++	++	26	+++	+++
	4	+++	++	25	+++	+++
	5	+++	++	36	+++	+++
	6	+++	++	43	+++	+++
<b>Composto 9</b>	1	+++	++	6	++	++
	2	+++	+	10	++	++
	3	+++	+	17	+++	+++
	4	++	0	6	+++	+++
	5	+++	++	21	++	++
	6	+++	++	18	+++	++



Na TABELA 4.18, pode ser observado que as frequências de pleomorfismo, binucleação e necrose (características mostradas também nas FIGURAS de 4.17 - 4.20) não apresentaram variabilidade significativa nos dois grupos de tratamentos, avaliados em tumores do tipo melanoma (B16F10) em camundongos C57BL/6. No que diz respeito ao número de mitoses, verificou-se que o grupo que recebeu a administração do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, apresentou número de mitoses estatisticamente inferior ao grupo controle (DMSO 1,0 %), mostrando que o composto em estudo inibiu o processo de mitose no tecido tumoral de melanoma em camundongos avaliados neste experimento, FIGURA 4.16 e 4.17.

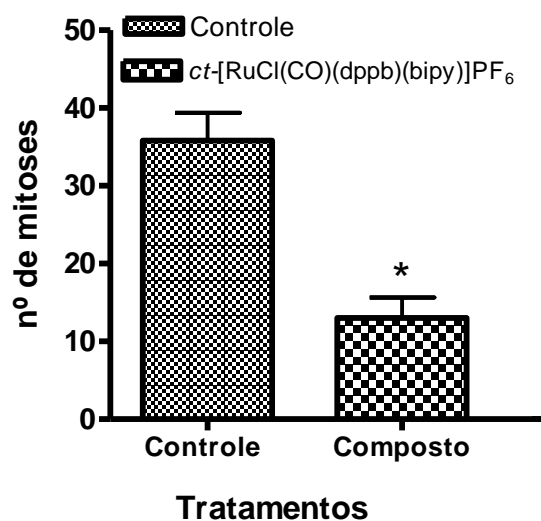


FIGURA 4.16 – Representação do número de mitoses analisados em melanoma (B16F10) implantados em camundongos C57BL/6 nos diferentes tratamentos: controle (DMSO 1,0 %) e composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> (5,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c.), obtidos em 6 animais por grupo de tratamento. Os resultados estão representados por média e desvio padrão (Média ± DP). \*Significativamente diferente do grupo controle ( $p < 0,05$ ), comparado pelo teste de Turkey.

A FIGURA 4.17 (A) e (B) exibe duas fotomicrografias de tecido tumoral de melanoma (B16F10) em camundongos C57BL/6, resultado da histopatologia tumoral, onde uma amostra é respectiva ao grupo controle (DMSO 1,0%) e a outra, respectiva ao tumor que recebeu tratamento com o composto (9)  $ct$ -[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>.

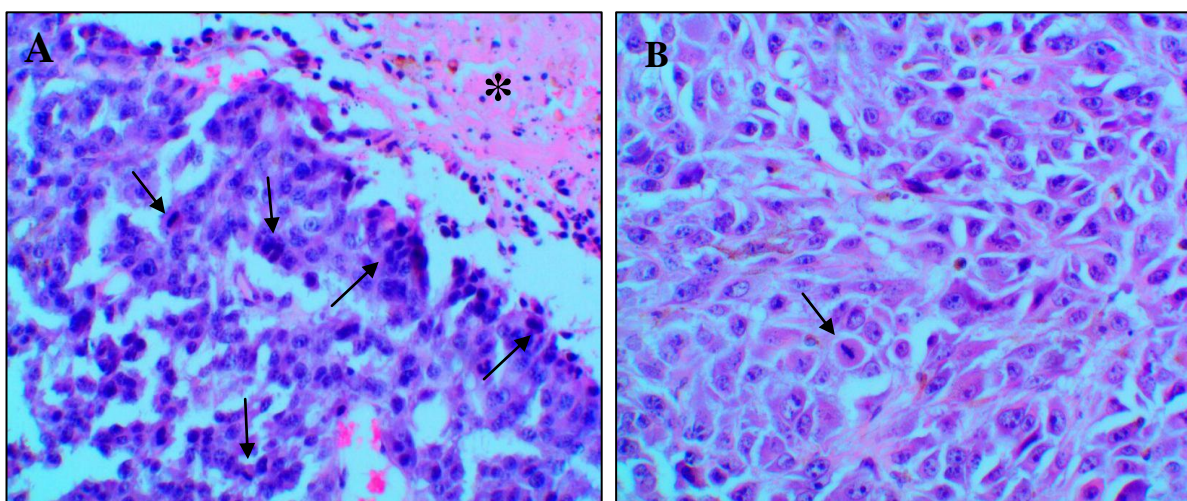


FIGURA 4.17 – Fotomicrografia das amostras do tecido tumoral de melanoma (B16F10) em camundongos C57BL/6 nos dois grupos de tratamentos, (A): controle (DMSO 1,0 %); e (B): composto (9)  $ct$ -[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>. Notar área de necrose (\*), células em mitose (seta) e pleomorfismo em A e B (aumento: 40 x; Hematoxilina, Eosina e Tricômico de Gomori).

Com base nestes resultados, sugere-se que o composto em estudo atua na inibição da divisão celular de melanoma murino (B16F10), uma vez que os números de mitoses são significativamente menores nos tumores dos animais tratados com o composto (9)  $ct$ -[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>. Sabendo que os

cânceres são resultado da divisão celular descontrolada, pode-se inferir que o composto mostra toxicidade *in vivo* nas células tumorais em divisão, reduzindo o número de mitoses e conseqüentemente da divisão celular em tecidos tumorais de melanoma (B16F10) em camundongos C57BL/6. Esse argumento é reforçado pelos resultados obtidos nos ensaio de citotoxicidade pela técnica XTT e micronúcleo *in vitro*, onde este composto atuou seletivamente em células tumorais B16F10, e exerceu efeito genotóxico em células tumorais HepG2, não exercendo efeito genotóxico em células de tecidos saudáveis V79.

Nas análises histopatológicas dos tumores de camundongos C57BL/6, implantados via subcutânea com células de melanoma (B16F10), foram observadas várias características tumorais. As lâminas analisadas por microscopia mostraram a presença de uma massa composta por células neoplásicas iniciando após o tecido adiposo, delimitada por uma fina camada de tecido conjuntivo. As células se distribuem em um manto, inseridas em um estroma pré-existente. A morfologia das células varia de redondas a ovaladas e pleomórficas (FIGURA 4.18), medindo aproximadamente quatro vezes o tamanho de uma hemácia. Os núcleos são pleomórficos em localização central no citoplasma. Os nucléolos são de tamanhos variados, bem evidentes e numerosos. O citoplasma é eosinofílico, bem delimitado, com presença de grânulos amarronzados em algumas células (FIGURA 4.19). Observa-se um grande número de figuras de mitoses (FIGURA 4.20).

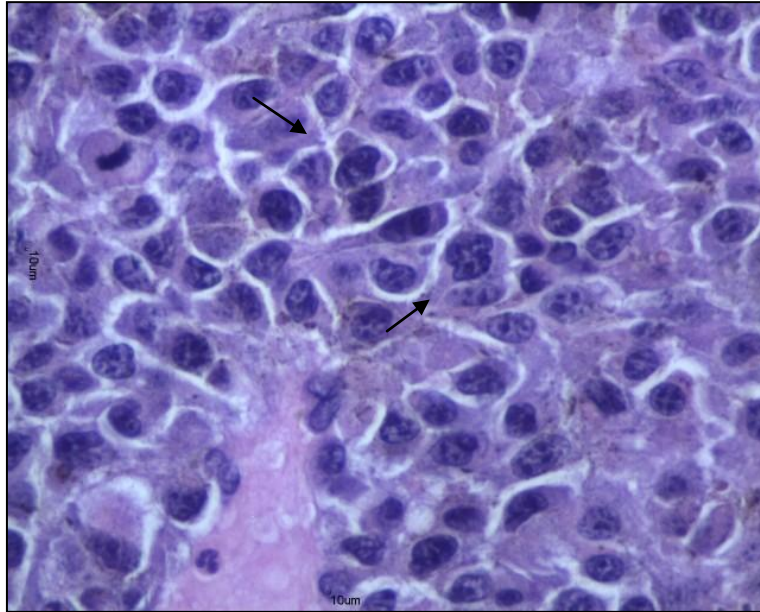


FIGURA 4.18 - Fotomicrografia do tecido tumoral de melanoma do tipo B16-F10 em camundongos C57BL/6 com pleomorfismo celular, tamanhos variados de núcleos em uma neoplasia (aumento: 40 x; Hematoxilina, Eosina e Tricômico de Gomori).

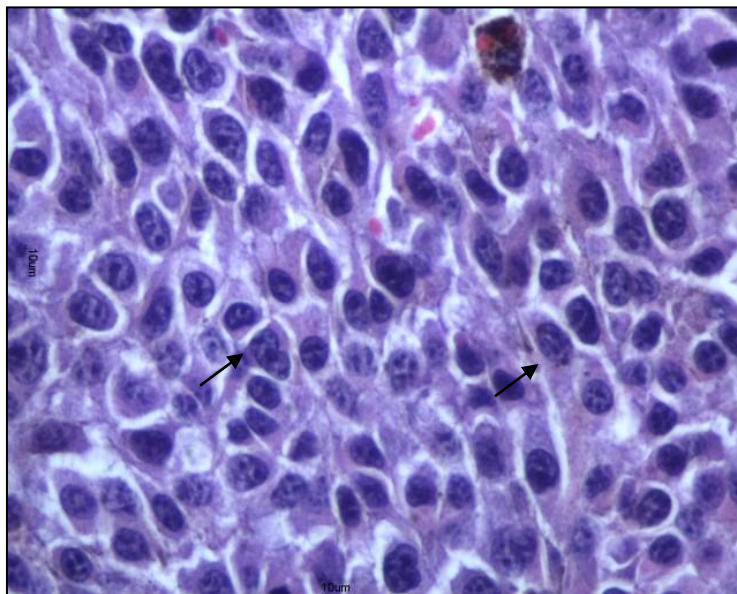


FIGURA 4.19 - Fotomicrografia do tecido tumoral de melanoma do tipo B16-F10 em camundongos C57BL/6 com grânulos intracitoplasmáticos (aumento: 40 x; Hematoxilina , Eosina e Tricômico de Gomori).

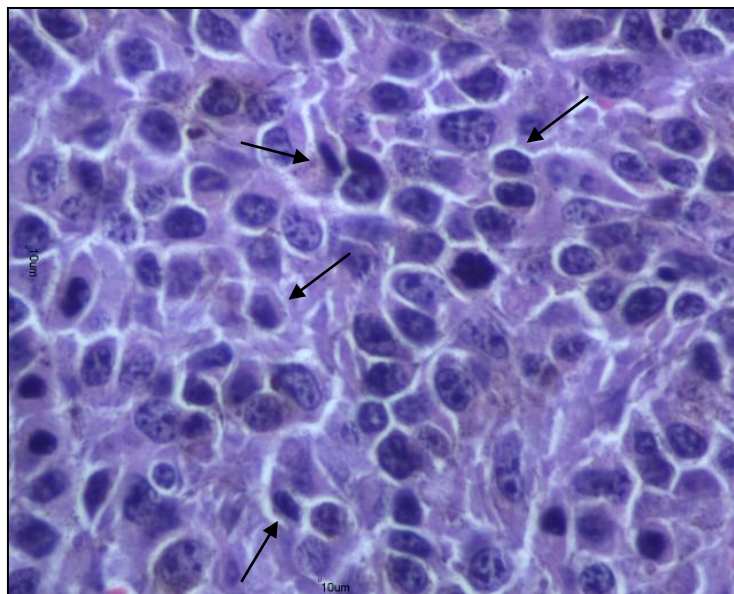


FIGURA 4.20- Fotomicrografia do tecido tumoral de melanoma do tipo B16-F10 em camundongos C57BL/6 com figuras de mitoses (aumento: 40 x; Hematoxilina, Eosina e Tricômico de Gomori).

Adicionalmente, sugere-se que o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> apresenta atividade antitumoral *in vivo* em uma dose segura, atuando seletivamente em tecidos tumorais, não causando efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos em tecidos saudáveis, como apresentado anteriormente nos resultados de micronúcleo em medula óssea e cometa em hepatócitos de camundongos Swiss.

Neste contexto, PEREIRA et al. (2009) reportou estudos de índice mitótico para um composto de rutênio de fórmula geral *cis*-[Ru(C<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>O<sub>6</sub>), sobre as células do bulbo *Allium cepa*. Este composto mostrou notável capacidade de inibir a mitose, que pode ser atribuída à inibição da síntese de DNA ou bloqueio na fase G2 do ciclo celular. Adicionalmente, o composto apontado neste estudo não induziu efeitos tóxicos semelhantes às drogas antitumorais a base de metal, como o cisplatina.

Atualmente, complexos de rutênio têm atraído a atenção de pesquisadores, de maneira que têm sido descrito na literatura, que a atividade destes complexos em tecidos tumorais pode estar relacionada ao fato do rutênio interagir com várias biomoléculas como albumina e outras proteínas, podendo facilitar seu transporte para dentro das células tumorais (KAPITZA et al., 2005a). Sabe-se que células tumorais exibem intenso metabolismo para a sua rápida proliferação e necessitam de mais nutrientes que as células saudáveis, o que causaria a superexpressão de receptores de proteínas e enzimas (HARTINGER et al., 2008; KAPITZA et al., 2005b). Desta maneira, infere-se que o elevado transporte e distribuição de complexos de rutênio em tecidos tumorais, podem ocorrer pela manutenção de biomoléculas, como as proteínas (BABU et al., 2014; BARRY e SADLER, 2013; SATHYADEVI et al., 2012). Em nossos estudos, realizou-se o experimento de interação do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> com a albumina (BSA), onde foi observada a afinidade do composto pela BSA, indicando um processo dinâmico, sugerindo, uma interação do composto com a BSA de acordo com a estequiometria 1:1, formando um complexo estável. Este experimento indicou que o ambiente hidrofóbico da proteína (resíduo triptofano) está facilmente acessível para o composto. Os resultados termodinâmicos deste experimento, reforçaram que a interação do composto com a BSA, ocorre por forças hidrofóbicas ( $\Delta H^\circ > 0$  e  $\Delta S^\circ > 0$ ) na interação com a proteína, de maneira espontânea ( $\Delta G^\circ < 0$ ).

Salienta-se aqui, que o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> apresenta vários ligantes que exibem efeito antitumoral quando coordenados a um centro metálico, como a dppb (difenílfosfinabutano) e a bipy (bipiridina). No caso de complexos fosfínicos, MIRABELLI et al. (1986) investigou extensivamente a relação estrutura/atividade de compostos contendo fosfina como ligantes. Os resultados mostraram que, variações nos ligantes na esfera de coordenação do centro metálico eram capazes de promover mudanças expressivas no potencial

citotóxico e na atividade antitumoral dos compostos. Como foi o caso da remoção do grupamento trietilfosfina, PEt, do complexo auranofina. O composto estudado sem fosfina, [AuSGlu(Ac)<sub>4</sub>], apresentou redução do potencial citotóxico em aproximadamente 150 vezes, indicando que a potencial citotoxicidade *in vitro* e a atividade antitumoral *in vivo*, estavam relacionadas à presença do ligante fosfínico no complexo auranofina.

No caso dos ligantes N-heterocíclicos como a bipyridina, é descrito na literatura que apresentam a característica de mimetizar estruturas de moléculas biológicas, como ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, entre outras que apresentam propriedades particulares no metabolismo humano (SANTIAGO, 2004). Estes ligantes apresentam propriedades químicas e físicas semelhante às fosfinas (CUNHA et al., 1999; MEYER e MCCLEVERTY, 2003).

Complexos carbonílicos de metal de transição, como o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, têm sido investigados quanto a sua atuação no meio biológico. Sabe-se que a molécula de CO é produzida endogenamente, sendo gerada durante a degradação do grupo heme, pelas enzimas heme oxigenase (HO-2) e (HO-1) (MAINES, 1998; ROMÃO et al. 2012). A partir da descoberta da produção endógena do monóxido de carbono, vários estudos foram efetuados baseando-se na utilização do CO em aplicações terapêuticas (WANG, 1998). Como é o caso da utilização de moléculas do tipo CO-RMs, que liberam CO como pró-drogas, capazes de fornecer CO em tecidos específicos *in vivo*, constituindo uma estratégia válida para reconhecer o potencial terapêutico destas moléculas. Sendo assim, o comportamento biológico e químico do CO liberado de moléculas do tipo CO-RMs, tem sido motivo de extensas investigações, no sentido de avaliar se estas moléculas causam efeitos tóxicos secundários após a sua administração (ROMÃO et al., 2012; FORESTI et al., 2004). Desta maneira, investigar a atuação do complexo

carbonílico de rutênio no meio biológico, confere perspectivas para aplicações terapêuticas (WU e WANG, 2005; FORESTI et al., 2004).

Neste trabalho não foi investigada a liberação do CO do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, mas a sua atuação em diversos ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*. Em nossos estudos, foram investigados diversos aspectos toxicológicos, além da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* deste composto, como um candidato a quimioterápico no tratamento do câncer. Os resultados obtidos neste trabalho podem indicar a realização de novos experimentos complementares, com o propósito de se averiguar outros aspectos do mecanismo de ação deste composto, inclusive mesmo se há a liberação do CO em tecidos específicos.

Em face do exposto, pode-se dizer que o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> se mostra um potencial candidato como agente antitumoral no tratamento de câncer do tipo melanoma, onde apresentou atividade antitumoral bastante significativa nas condições experimentais avaliadas, mostrando baixa toxicidade em tecidos não tumorais e, significativamente ativo em tecidos tumorais.



## *5. Conclusões*

## 5. CONCLUSÕES

Todos os compostos avaliados neste trabalho passaram por uma triagem em experimentos de atividade citotóxica pela metodologia XTT. O composto (1)  $[\text{Ru}(\text{SpyMe}_2)_2(\text{dppb})]$  não mostrou atividade citotóxica nas linhagens tumorais avaliadas. Os compostos (2)  $[\text{RuCl}(\text{SpyMe}_2)_2\text{NO}]$  e (3)  $[\text{Ru}(\text{Pic})_2(\text{dppb})]$  mostraram citotoxicidade seletiva em células tumorais HeLa e MCF7. Os compostos contendo aminoácidos como ligantes (4)  $[\text{Ru}(\text{Gly})(\text{dppb})(4,4'\text{-mebipy})]\text{PF}_6$ ; (6)  $[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(4,4'\text{-mebipy})]\text{PF}_6$ ; (8)  $[\text{Ru}(\text{Trp})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$ , apresentaram efeito citotóxico em células MCF7, mostrando baixa citotoxicidade em células V79, sendo que os compostos (6)  $[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(4,4'\text{-mebipy})]\text{PF}_6$  e (7)  $[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$  mostraram-se mais citotóxicos para HeLa. O composto (9)  $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  mostrou citotoxicidade em todas as células tumorais avaliadas. Observou-se que os compostos (2)  $[\text{Ru}(\text{SpyMe}_2)_2(\text{dppb})]$ ; (3)  $[\text{RuCl}(\text{SpyMe}_2)_2\text{NO}]$ ; (4)  $[\text{Ru}(\text{Gly})(\text{dppb})(4,4'\text{-mebipy})]\text{PF}_6$ ; (6)  $[\text{Ru}(\text{Tyr})(\text{dppb})(4,4'\text{-mebipy})]\text{PF}_6$  e (8)  $[\text{Ru}(\text{Trp})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$  mostraram atividade seletiva em células tumorais MCF7, comparado às células não tumorais (V79), mostrando vantagens em relação ao cisplatina.

O composto (9)  $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  foi avaliado quanto às interações com o DNA. Os resultados de interação com o DNA mostraram que este composto interage por interações fracas, exibindo hipocromismo com o acréscimo da solução de DNA na amostra.

Em relação aos estudos de interação com a BSA, a constante  $K_{sv}$  que representa a relativa afinidade do composto (9)  $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  com a proteína (BSA), mostrou que houve um processo dinâmico com o aumento da temperatura. Quanto aos parâmetros termodinâmicos avaliados  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$ , a interação do composto (9)  $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$  com a BSA nas diferentes temperaturas, indicou

que o composto interage por forças hidrofóbicas na interação com a proteína, onde a interação do composto com a proteína acontece de forma espontânea.

Na avaliação citotóxica e genotóxica *in vitro* em testes de micronúcleo em células V79 e HepG2, o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>, mostrou ausência de citotoxicidade e genotoxicidade em células V79 nas diferentes concentrações avaliadas. Quando este composto foi avaliado frente às células HepG2, o mesmo apresentou ausência de citotoxicidade nas concentrações de 0,312 e 0,625 μmol L<sup>-1</sup>, porém mostrou efeito genotóxico na concentração de 1,25 μmol L<sup>-1</sup>.

Na avaliação citotóxica e genotóxica *in vivo*, o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> foi avaliado em ensaios de micronúcleo em medula óssea e cometa em hepatócitos de camundongos Swiss. Os resultados de micronúcleo em medula óssea mostraram que o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> não foi citotóxico e nem genotóxico nas diferentes doses avaliadas. No ensaio cometa em hepatócitos o composto mostrou aumento nas frequências de danos do DNA na maior dose avaliada, 5,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c. Neste sentido, infere-se que os danos no DNA apresentados na maior dose avaliada foram reparados, quando foram observados os resultados encontrados no ensaio de micronúcleo em medula óssea.

No ensaio antitumoral *in vivo* em modelo de transplante singênico, onde camundongos C57BL/6 receberam implante tumoral de melanoma (B16-F10), o composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> mostrou atividade antitumoral inibindo o desenvolvimento tumoral significativamente em relação ao controle sem tratamento. Sugere-se que o composto também foi capaz de inibir o processo de angiogênese, pois foi observada indícios de inibição da vascularização tumoral em análise macroscópica. Esta inibição deve ser investigada mais detalhadamente em experimentos mais específicos futuramente.

Nos resultados das análises histopatológicas, observou-se a inibição das mitoses em células dos tumores de melanoma (B16F10) tratados com o

composto (9)  $ct\text{-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF}_6$ , exibindo valores de mitoses significativamente inferiores em relação ao grupo controle (DMSO 1,0%).

Os resultados obtidos neste trabalho foram bastante promissores, uma vez que a maioria dos compostos avaliados apresentou algum tipo de atividade *in vitro* em células tumorais, principalmente em células tumorais de mama, MCF7. O composto (9)  $ct\text{-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF}_6$ , avaliado em experimentos *in vitro* e *in vivo*, mostrou-se um promissor candidato a quimioterápico, apresentando resultados encorajadores, uma vez que foi ativo *in vitro* em todas células tumorais avaliada e, *in vivo* apresentou atividade antitumoral em camundongos C57BL/6 com implante de melanoma (B16F10), porém com baixa toxicidade em tecidos saudáveis. Haja vista os resultados encontrados para este composto nos ensaios de micronúcleo em medula óssea e cometa em hepatócitos em camundongos Swiss.

## *6. Referências bibliográficas*

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, J.; YANG, M.; SOGA, T.; POLLARD, P.J. “Rare insights into cancer biology”. *Oncogene*, 33 (20):2547, 2014.

AIRD, R.E.; CUMMINGS, J.; RITCHIE, A.A.; MUIR, M.; MORRIS, R.E.; CHEN, H.; SADLER, P.J.; JODRELL, D.I. “In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer”. *Br. J. Cancer*, 86 (10):1652, 2002.

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.; TICE, R. WATERS, M.D.; AITIO, A. “IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety”. *Mutat. Res.*, 463 (2):111, 2001.

ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; BERGAMO, A. SAVA, G. “Ruthenium antimetastatic agents”. *Curr. Top. Med. Chem.*, 4 (15):1525, 2004.

ALEXANDROV, L.B.; NIK-ZAINAL, S.; WEDGE, D.C. et al. “Signatures of mutational processes in human cancer”. *Nature*, 500 (7463):415, 2013.

ALMEIDA, M.A.P. “Complexos de rutênio contendo aminoácidos com propriedades citotóxicas em células tumorais”. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química - UFSCar, 2009. Dissertação de Mestrado, 130 p.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C. B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. “Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução”. *Quim. Nova*, 28 (1):18, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY.

<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/>, acessado em dezembro de 2013.

ANDERSON, D.; PLEWA, M. J. “The international Comet Assay Whorkshop”. *Mutagenesis*, 13 (1):67, 1998.

ASADI, M.; ASADI, Z.; SADI, S.B.; ZAREI, L.; BAIGI, F.M., AMIRGHOFAN, Z. “Synthesis, characterization and the interaction of some new water soluble metal Schiff base complexes with human serum albumin”. *Spectrochim. Acta Part A*. 122:118, 2014.

ASHIDIA, J.S.; HOUGHTON, P.J.; HYLANDS, P.J.; EFFERTH, T. "Ethnobotanical survey and cytotoxicity testing of plants of South-western Nigeria used to treat cancer, with isolation of cytotoxic constituents from *Cajanus cajan* Millsp. leaves". *J. Ethnopharmacol*, 128 (2):501, 2010.

ATKINS, M.B.; LOTZE, M.T.; DUTCHER, J.P.; FISHER, R.I.; WEISS, G.; MARGOLIN, K.; ABRAMS, J.; SZNOL, M.; PARKINSON, D.; HAWKINS M.; PARADISE, C.; KUNKEL, L.; ROSENBERG, S.A. "High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993". *J. Clin. Oncol.*, 17 (7):2105, 1999.

ATTWOOD, J.T.; YUNG, R.L.; RICHARDSON, B.C. "DNA methylation and the regulation of gene transcription". *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 59 (2):241, 2002.

AVRIL, M.F., AAMDAL, S.; GROB, J.J.; HAUSCHILD, A.; MOHR, P.; BONERANDI, J. J.; WEICHENTHAL, M.; NEUBER, K.; BIEBER, T.; GILDE, K.; GUILLEM PORTA, V.; FRA, J.; BONNETERRE, J.; SAI'AG, P.; KAMANABROU, D.; PEHAMBERGER, H.; SUFLIARSKY, J.; GONZALEZ LARRIBA, J.L.; SCHERRER, A.; MENU, Y. "Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study". *J. Clin. Oncol.*, 22 (6):1118, 2004.

BABU, E.; MAREESWARAN, P.M; SINGARAVADIVEL, S.; BHUVANESWARI, S.; RAJAGOPAL, S. "A selective, long-lived deep-red emissive ruthenium(II) polypyridine complexes for the detection of BSA" *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 130:561, 2014.

BAKHTIAR, R.; OCHIAI, E.I. "Pharmacological applications of inorganic complexes". *Gen. Pharmacol.*, 32 (5):525, 1999.

BALMAIN, A.; HARRIS, C.C. "Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes". *Carcinogen.*, 21 (3):371, 2000.

BANCROFT, J.D.; COOK, H.C. "Manual of histological techniques and their diagnostic application". Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.

BANDELE, O.J.; SANTILLO, M. F.; FERGUSON, M.; WIESENFELD, P.L. "In vitro toxicity screening of chemical mixtures using HepG2/C3A cells". *Food Chem. Toxicol.*, 50 (5):1653, 2012.

BARBOSA, M.I.F. “Complexos carbonílicos de rutênio. De um gás tóxico a uma droga com potencial agente citotóxico”. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar, 2007. Dissertação de Mestrado, 105 p.

BARRY, N.P.; SADLER, P.J. “Exploration of the medical periodic table: towards new targets”. *Chem. Commun. (Camb)*. 49 (45):5106, 2013.

BARTKE, T.; VERMEULEN, M.; XHEMALCE, B.; ROBSON, S.C.; MANN, M.; KOUZARIDES, T. “Nucleosome-Interacting Proteins Regulated by DNA and Histone Methylation”. *Cell*, 143 (3):470, 2010.

BARTSCH, H. “DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship”. *Mutat. Res.*, 340 (2-3):67, 1996.

BATISTA, A.; QUEIROZ, S.; DE OLIVEIRA, L.; SANTOS, R.; GAMBARDELLA, M. “Nitrosil ruthenium complexes with general formula  $[\text{RuCl}_3(\text{NO})(\text{P-P})]$  (P-P =  $\{\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_n\text{PPh}_2\}$ ,  $n = 1-3$  and  $\{\text{PPh}_2\text{-CH} = \text{CH-PPh}_2\}$ ). X-ray structure of  $[\text{RuCl}_3(\text{NO})\{\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_3\text{PPh}_2\}]$ ”. *Polyhedron*, 16:927, 1997.

BATISTA, A.; QUEIROZ, S.; HEALYUCLEY, P.; BUCLEY, R.; BOYD, S.; BERNERS, S.; CASTELLANO, E.; ELLENA, J. “A novel coordination mode for a pyridylphosphine ligand. X-ray structures of  $[\text{RuCl}_2(\text{NO})\text{L}]$  (I) and  $[\text{RuCl}_2(\text{NO})\text{L}]$  cener dot DMSO(II) (L= $[(2\text{-py})_2\text{PC}_2\text{H}_4\text{POO}(2\text{-py})_2]$ )”. *Canadian J. Chem.*, 79:1030, 2001.

BAUER, U.M.; DAUJAT, S.; NIELSEN, S.J.; NIGHTINGALE, K.; KOUZARIDES, T. “Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation”. *Embo Rep.*, 3 (1):39, 2002.

BELL, J.T.; PAI, A.A.; PICKRELL, J. K.; GAFFNEY, D.J.; PIQUE-REGI, D.; DEGNER, J.F.; GILAD, Y.; PRITCHARD, J.K. “DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines”. *Genome Biol.*, 12 (6):405, 2011.

BENDALL, S.C.; NOLAN, G.P. “From single cells to deep phenotypes in cancer”. *Nat. Biotechnol.*, 30 (7):639, 2012.

BEREMBLUM, I.; SHUBIK, P. “The role of croton oil applications, associated with a single painting of a carcinogen, in tumor induction of the mouse’s skin”. *Br. J. Cance*, 1 (4):379, 1947.



BERGAMO, A.; GAVA, B.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; SERLI, B.; COCCHIETTO, M.; ZORZET, S.; SAVA, G. "Ruthenium-based NAMI-A type complexes with *in vivo* selective metastasis reduction and *in vitro* invasion inhibition unrelated to cell cytotoxicity". *Int. J. Oncol.*, 21 (6):1331, 2002.

BERGAMO, A.; MASI, A.; JAKUPEC, M.A.; KEPPLER, B. K.; SAVA, G. "Inhibitory Effects of the Ruthenium Complex KP1019 in Models of Mammary Cancer Cell Migration and Invasion". *Metal-Based Drugs.*, 2009:1, 2009.

BERGAMO, A.; GAIDDON, C.; SCHELLENS, J.H.M.; BEIJNEN, J.H.; SAVA, G. "Approaching tumour therapy beyond platinum drugs. Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidat". *J. Inorg. Biochem.*, 106 (1):90, 2012.

BERGER, M.R.; GARZON, F.T.; KEPPLER, B. K.; SCHMAHL, D. "Efficacy of new ruthenium complexes against chemically induced autochthonous colorectal carcinoma in rats". *Anticancer Res.*, 9 (3):761, 1989.

BERNAS, T.; DOBRUCKI, J. "Reduction of a tetrazolium salt, CTC, by intact HepG2 human hepatoma cells: subcellular localisation of reducing systems". *Biochim. Biophys. Acta.*, 1451(1):73, 1999.

BERNERS-PRICE, S.J.; MIRABELLI, C. K.; JOHNSON, R.K.; MATTERN, M. R.; McCABE, L.; FAUCETTE, F.; SUNG, C. M.; MONG, S.M.; SADLER, P.J.; CROOKE, S.T. "*In vivo* antitumor-activity and *in vitro* cytotoxic properties of bis[1,2-bis(diphenylphosphino)ethane]gold(I) chloride". *Cancer Res.*, 46 (11):5486, 1986.

BERNERS-PRICE, S.J.; SADLER, P.J. "Phosphines and metal phosphine complexes: Relationship of chemistry to anticancer and other biological activity". *Struct. Bond. (Berlin)*, 70:27, 1988.

BERRIDGE, M.V.; HERST, P. M.; TAN, A.S. "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction". *Biotechnol. Annu. Rev.*, 11:127, 2005.

BESARATINIA, A.; TOMMASI, S. "Epigenetics of human melanoma: promises and challenges". *J. Mol. Cell Biol.*, pii:mju027, 2014.

BERGAMO, A.; GAVA, B.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; SERLI, B.; COCCHIETTO, M.; ZORZET, S.; SAVA, G. "Ruthenium-based NAMI-A type complexes with *in vivo* selective metastasis reduction and *in vitro* invasion inhibition unrelated to cell cytotoxicity". *Int. J. Oncol.*, 21 (6):1331, 2002.

BERTINE, I.; GRAY, H.B., LIPPARD, S., VALENTINE, J. *Bioinorganic Chemistry* (textbook). University Science Books, Mill Valley, California, 1994.

BINCOLETTO, C.; TERSARIOL, I.L.S.; OLIVEIRA, C. R.; DREHER, S.; FAUSTO, D. M.; SOUFEN, M. A.; NASCIMENTO, F. D.; CAIRES, A. C. F. "Chiral cyclopalladated complexes derived from N,N-dimethyl-1-phenethylamine with bridging bis(diphenylphosphine)ferrocene ligand as inhibitors of the cathepsin B activity and as antitumoral agents". *Bioorg.Med. Chem.*, 13 (8):3047, 2005.

BJORNSTI, M-A.; HOUGHTON, P.J. "The TOR pathway: a target for cancer therapy". *Nat. Rev. Cancer.*, 4 (5):335, 2004.

BLANPLAIN, C. "Tracing the cellular origin of cancer". *Nat. Cell Biol.*, 15 (2):126, 2013.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. "The *in vivo* comet assay: use and status genotoxicity testing". *Mutagenesis*, 20 (4):245, 2005.

BRODERICK, J.B.; COUCOUVANIS, D. "Bionorganic chemistry". *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7 (2):157, 2003.

BRUIJNINCX, P.C.A.; SADLER, P. "New trends for metal complexes with anticancer activity", *J. Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12 (2):197, 2008.

BURCHAM, P.C. "Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism". *Mutat. Res.*, 443 (1-2):11, 1999.

BURRELL, R.A. e SWANTON, C. "The evolution of the unstable cancer genome". *Curr. Opin.Genet. Dev.*, 24C:61, 2014.

BURRELL, R.A.; MCGRANAHAN, N.; BARTEK, J.; SWANTON, C. "The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution". *Nature*, 501(7467):338, 2013.

BURRLISSON, B.; TICE, R.R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S.Y.; COLLINS A.R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T. S.; NAKAJIMA, M; SASAKI, Y. F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. "Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the *in vivo* Comet assay workgroup". *Mutat. Res.*, 627 (1):31, 2007.

BUTTERWORTH, B.E.; POPP, J.A.; CONOLLY, R.B.; GOLDSWORTHY, T.L. "Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis". *IARC Sci Publ.*, (116):279, 1992.

BUTTERWORTH, B.E.; TEMPLIN, M.V.; CONSTAN, A.A.; SPRANKLE, C.S.; WONG, B.A.; PLUTA L.J.; EVERITT, J.I.; RECIO, L. "Long-term mutagenicity studies with chloroform and dimethylnitrosamine in female lacI transgenic B6C3F1 mice". *Environ. Mol. Mutagen.*, 31 (3):248, 1998.

CAIRES, A.C.F.; ALMEIDA, E.T.; MAURO, A.E.; HEMERLY, J.P.; VALENTINI, S.R. "Síntese e atividade citotóxica de alguns azidociclopaladados estabilizados com ligantes bifosfínicos". *Quím. Nova*, 22 (3):329, 1999.

CAO, Y.; DEPINHO, R.A.; ERNST, M.; VOUSDEN, K. "Cancer research: past, present and future". *Nat. Rev. Cancer*, 11 (10):749, 2011.

CARTER, D.C.; HO, J.X. "The structure of serum albumin". *Adv. Protein Chem.* 45:153, 1994.

CHANTRAIN, C.F.; FERON, O.; MARBAIX, E.; DECLERCK, Y.A. "Bone Marrow Microenvironment and Tumor Progression". *Cancer Microenviron.* 1(1): 23, 2008.

CHEN, H.M.; PARKINSON, J.A.; MORRIS, R.E.; SADLER, P.J. "Highly selective binding of organometallic ruthenium ethylenediamine complexes to nucleic acids: Novel recognition mechanisms". *J. Amer. Chem. Soc.*, 125 (1):173, 2003.

CHEN, T.; LIU, Y; ZHENG, W-J; LIU, J; WONG, Y-S. "Ruthenium Polypyridyl complexes That Induce Mitochondria-Mediated Apoptosis in Cancer Cells". *Inorg. Chem.*, 49 (14):6366, 2010.

CHIAL, H. "Proto-oncogenes to oncogenes to cancer". *Nature Educ.*, 1 (1):33, 2008.

CHRISTIE, G.R.; HAJDUCH, E.; HUNDAL, H.S.; PROUD, C.G.; TAYLOR, P.M. "Intracellular sensing of amino acids in *Xenopus laevis* oocytes stimulates p70 S6 kinase in a target of rapamycin-dependent manner". *J. Biol. Chem.*, 277 (12):9952, 2002.

CLARKE, M.J. "Oncological implications of the chemistry of ruthenium", IN: SIGEL, H. (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems*, Marcel Dekker, 1980, p. 231–283.

CLARKE, M.J. "Ruthenium metallopharmaceuticals". *Coord. Chem. Rev.*, 232 (1-2):69, 2002.

CLARKE, M.J. "Ruthenium metallopharmaceuticals". *Coord. Chem. Rev.*, 236 (1):209, 2003.

CLARKE, M.J.; BITLER, S.; RENNERT, D.; BUCHBINDER, M.; KELMAN, A.D. "Reduction and Subsequent Binding of Ruthenium Ions Catalyzed by Subcellular Components". *J. Inorg. Biochem.*, 12 (1):79, 1980.

CLARKE, M.J.; ZHU, F.; FRASCA, D.R. "Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals". *Chem. Rev.*, 99 (9):2511, 1999.

COGHLIN, C.; MURRAY, G.I. "Current and emerging concepts in tumour metastasis". *J. Pathol.*, 222 (1):1, 2010.

CULP, S.J.; GAYLOR, D.W.; SHELDON, W.G.; GOLDSTEIN, L.S.; BELAND, F. A. "A comparison of the tumors induced by coal tar and benzo[a]pyrene in a 2-year bioassay". *Carcinogenesis*, 19 (1):117, 1998.

CUNHA, C.; DODSWORTH, E.; MONTEIRO, M.; LEVER, A. "Bis(2,2'-bipyridine)(1,2-diimino-9,10-anthraquinone)ruthenium(II) derivatives: A ZINDO analysis of a redox serie involving coupled proton and aletron transfers", *Inorg.Chem.*, 38 (23):5299, 1999.

DAPONTE, A.; SIGNORIELLO, S.; MAIORINO, L.; MASSIDDA, B.; SIMEONE, E.; GRIMALDI, A. M.; CARACO, C.; PALMIERI, G.; COSSU, A.; BOTTI, G.; PETRILLO, A.; LASTORIA, S.; CAVALCANTI, E.; APREA, P.; MOZZILLO, N.; GALLO, C.; COMELLA, G.; ASCIERTO, P.A. "Phase III randomized study of fotemustine and dacarbazine versus dacarbazine with or without interferon- $\alpha$  in advanced malignant melanoma". *J. Transl. Med.*, 11 (38):1, 2013.

DAVIDGE, K. S.; MOTTERLINI, R.; MANN, B. E.; WILSON J. L. e POOLE R. K. "Carbon monoxide in biology and microbiology: surprising roles for the 'Detroit perfume' ". *Adv. Microb. Physiol.*, 56:85, 2009.

DAWSON, M.A.; KOUZARIDES, T. "Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy". *Cell*, 150 (1):12, 2012.

DE CARVALHO, D.D.; SHARMA, S.; YOU, J.S.; SU, S.F.; TABERLAY, P.C.; KELLY, T.K.; YANG, X.; LIANG, G.; JONES, P.A. "DNA methylation screening identifies driver epigenetic events of cancer cell survival". *Cancer Cell*, 21(5):655, 2012.

DE CARVALHO, D.D.; YOU, J.S.; JONES, P.A. "DNA methylation and cellular reprogramming". *Trends Cell Biol.*, 20 (10):609, 2010.

DESCOT, A.; OSKARSSON, T. "The molecular composition of the metastatic niche". *Exp. Cell Res.*, 319 (11):1679, 2013.

DIPPLE, A. "DNA adducts of chemical carcinogens" *Carcinogen*. 16 (3):437, 1995.

DIXON, K.; KOPRAS, E. "Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis". *Semin. Cancer Biol.*, 14 (6):441, 2004.

DOUGAN, S.J.; MELCHART, M.; HABTEMARIAM, A.; PARSONS, S.; SADLER, P.J. "Phenylazopyridine and phenylazo-pyrazole chlorido ruthenium(II) arene complexes: arene loss, aquation, and cancer cell cytotoxicity". *Inorg. Chem.*, 45 (26):10882, 2006.

DUNCAN, K.; HEALD, P. "Cutaneous T-cell lymphoma: centuries of controversy". *Semin. Cutan Med. Surg.*, 17 (2):133, 1998.

DYBING, E.; SANNER, T. "Species differences in chemical carcinogenesis of the thyroid gland, kidney and urinary bladder". *IARC Sci. Publ.*, 147:15, 1999.

DYSON, P.J.; SAVA, G. "Metal-based anti-tumour drugs in the post genomic era", *Dalton Trans.*, (16):1929, 2006.

DWYER, F.P.; GYARFAS, E.C.; ROGERS, W.P.; KOCH, J.H. "Biological activity of complex ions", *Nature*, 170 (4318):190, 1952.

EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D. "Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody". *Environ. Mol. Mutagen.*, 13 (1):34, 1989.

EASWARAN, H.; TSAI, H.C.; BAYLIN, S.B. "Cancer Epigenetics: Tumor Heterogeneity, Plasticity of Stem-like States, and Drug Resistance". *Mol. Cell*, 54(5):716, 2014.

EGGERMONT, A.M.M.; ROBERT, C. “New drugs in melanoma: It’s a whole new world”. *Eur. J. Cancer*, 47 (14):2150, 2011.

EGGERMONT, A.M.M.; SCHADENDORF, D. “Melanoma and immunotherapy”. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, 23 (3):547, 2009.

ESTIMATIVA 2014: INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, *Coordenação de Prevenção e Vigilância.*– Rio de Janeiro : INCA, 2014, 124p.

EVANS, G.W. “Normal and abnormal zinc absorption in man and animals: The tryptophan connection”. *Nutr. Rev.*, 38 (4):137, 1980.

FAN, X.; ROSS, D.D.; ARAKAWA, H.; GANAPATHY, V.; TAMAI, I.; NAKANISHI, T. “Impact of system L amino acid transporter 1 (LAT1) on proliferation of human ovarian cancer cells: A possible target for combination therapy with anti-proliferative aminopeptidase inhibitors”. *Biochem. Pharmacol.*, 80 (6):811, 2010.

FARRELL, N. “Biomedical uses and applications of inorganic chemistry”. An overview. *Coord. Chem. Rev.*, 232 (1-2):1, 2002.

FEARON, E.R. “Human Cancer Syndromes: Clues to the Origin and Nature of Cancer”. *Science*, 278 (5340):1043, 1997.

FENECH, M. “The in vitro micronucleus technique”. *Mutat. Res.*, 455 (1-2):81, 2000.

FENECH, M.; BAGHURST, P.; LUDERER, W.; TURNER, J.; RECORD, S.; CEPPI, M.; BONASSI, S. “Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, b-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability—results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia”. *Carcinog.*, 26 (5):991, 2005.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; SURRALLES, J.; CROTT, J.W.; PARRY, J. ; NORPPA, H.; EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D.; THOMAS, P. “Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells”. *Mutagen.*, 26 (1):125, 2011.

FERNANDEZ-POL, J.A.; KLOS D.J.; HAMILTON P.D.; “Antiviral, cytotoxic and apoptotic activities of picolinic acid on human immunodeficiency virus-1 and human herpes simplex virus-2 infected cells”. *Anticancer Res.*, 21(6A):3773, 2001.

FISHER, B.; HEFFETER, P.; KRYEZIU, K.; GILLE, L.; MEIER, S.M.; BERGER, W.; KOWOL, C.R.; KEPPLER, B.K. “Poly(lactic acid) nanoparticles of the lead anticancer ruthenium compound KP1019 and its surfactant-mediated activation”. *Dalton Trans.*, 43 (3):1096, 2014.

FORESTI, R.; MOTTERLINI, R. “Interaction of carbon monoxide with transition metals: evolutionary insights into drug target discovery”. *Curr. Drug Targets*, 11 (12):1595, 2010.

FORESTI, R.; HAMMAD, J.; CLARK, J.E.; JOHNSON, R.A.; MANN, B.E.; FRIEBE, A. GREEN, C.J.; MOTTERLINI, R. “Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule”. *J. Pharmacol*, 142 (3):453, 2004.

FRANKE, S.I.R.; PRA, D.; SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. “Possible repair action of vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO<sub>4</sub> in mouse blood cells in vivo”. *Mutat. Res.*, 583 (1):75, 2005.

FRAUSIN, F.; SCARCIA, V.; COCCHIETTO, M.; FURLANI, A.; SERLI, B.; ALESSIO, E. e SAVA, G. “Free exchange across cells, and Echistatin-sensitive membrane target for the metastasis inhibitor NAMI-A (imidazolium trans-Imidazole Dimethyl Sulfoxide Tetrachlororuthenate) on KB tumor cells”. *J. Pharm. Exp. Therap.*, 313 (1):227, 2005.

FRÜHAUF, S.; ZELLER, W.J. “New Platinum, Titanium, and Ruthenium Complexes with different Patterns of DNA Damage in Rat Ovarian Tumor Cells”. *Canc. Res.*, 51 (11):2943, 1991.

FUERTES, M.A.; ALONSO, C.; PÉREZ, J.M. “Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance”. *Chem. Rev.* 103(3):645, 2003.

GALEANO, A; BERGER, M.R.; AND KEPPLER, B.K. “Antitumor activity of some ruthenium derivatives in human colon cancer cell lines in vitro”. *Arzneim-Forsch.*, 42 (6):821, 1992.

GANESHPIANDIAN, M.; LOGANATHAN, R.; SURESH, E.; RIYASDEEN, A.; AKBARSHA, M.A.; PALANIANDAVAR, M. "New ruthenium(II) arene complexes of anthracenylappended diazacycloalkanes: effect of ligand intercalation and hydrophobicity on DNA and protein binding and cleavage and cytotoxicity". *Dalton Trans.*, 43 (3):1203, 2014.

GATELY, D.P., HOWELL, S.B. "Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review". *Br. J. Cancer*, 67 (6):1171, 1993.

GATENBY, R.A.; GILLIES, R.J. "A microenvironmental model of carcinogenesis". *Nat. Rev. Cancer*, 8 (1):56, 2008.

GARRIOTT, M.L.; PHELPS, J. B.; HOFFMAN, W.P. "A protocol for the in vitro micronucleus test I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity". *Mutat. Res.*, 517 (1-2):123, 2002.

GASENT BLESAS, J.M.; GRANDE PULIDO, E.; ALBEROLA CANDEL, V.; PROVENÇIO PULLA, M. "Melanoma from darkness to promise". *Am. J. Clin. Oncol.*, 34 (2):179, 2011.

GOLFETO, C.C. POELHSITZ, G.V.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; ARAUJO, M.P.; ELLENA, J; CASTELLANO, E.E.; LOPES, L.G.L.; MOREIRA, I.S.; BATISTA, A.A. "Synthesis, characterization and cytotoxic activities of the [RuCl<sub>2</sub>(NO)(dppp)(L)]PF<sub>6</sub> complexes". *J. Inorg. Biochem.*, 104 (5):489, 2010.

GOMES, C.A.; JUNIOR, C.S., DO VALLE J.A., DE ASSIS LOPES, C.T.; BARRA, A.; GOMES, C.C.; DO CARMO, T.H.L.; GOMES, F.C. "Cancer Metastasis". *Cell Dev. Biol.*, 1 (106):106, 2012.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. "Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas". In: *Mutagênese Ambiental*. Org: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. CANOAS: Ulbra, p.247-279, 2003.

GRAF, N.; LIPPARD, S.J. "Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery". *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 64 (11):993, 2012.



GRAMINHA, A.E.; RODRIGUES, C.; BATISTA, A.A.; R. TEIXEIRA, L.R.; FAGUNDES, E.S.; BERALDO, H. "Ruthenium(II) complexes of 2-benzoylpyridine-derived thiosemicarbazones with cytotoxic activity against human tumor cell lines". *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 69 (4):1073, 2008.

GRAY, H.B. "Bioinorganic Electron Transfer Processes". *Inorg. Chim. Acta.* 79:50, 1983.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. "Melanoma biology and new targeted therapy". *Nature*, 445:851, 2007.

GUICHARD, S.M.; ELSE, R.; REID, E.; ZEITLIN, B.; AIRD, R.; MUIR, M.; DODDS, M.; FIEBIG, H.; SADLER, P.J.; JODRELL, D.I. "Anti-tumour activity in non-small cell lung cancer models and toxicity profiles for novel ruthenium(II) based organo-metallic compounds". *Biochem. Pharm.*, 71 (4):408, 2006.

GREAVES, M.; MALEY, C.C. "Clonal evolution in cancer". *Nature*, 481:306, 2012.

GUTIÉRREZ, J.B.; SALSAMENDI, A.L. "Fundamentos de ciência toxicológica". Diaz de Santos, Madrid, p.155–177, 2001.

HABERLAND, M.; HABERLAND, M.; MONTGOMERY, R.L.; OLSON, E. N. "The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy". *Nat. Rev. Genet.*, 10 (1):32, 2009.

HABTEMARIAM, A.; MELCHART, M.; FERNANDEZ, R.; PARSONS, S.; OSWALD, I.D.H.; PARKIN, A.; FABBIANI, F.P.A.; DAVIDSON, J.E.; DAWSON, A.; AIRD, R. E.; JODRELL, D.I.; SADLER, P.J. "Structure–Activity Relationships for Cytotoxic Ruthenium(II) Arene Complexes Containing N,N-, N,O-, and O,O-Chelating Ligands". *J. Med. Chem.*, 49 (23):6858, 2006.

HADJILIADIS, N.; SLETTEN, E. "Metal Complexes-DNA Interactions". John Wiley e Sons, 2009.

HAJDU, S.I. "A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 1". *Cancer.*, 117 (5):1097, 2011.

HAMBLEY T.W. "Developing new metal-based therapeutics: challenges and opportunities". *Dalton Trans.*, (43):4929-37, 2007.

HARRIS, C.C. "Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s". *Cancer Res.*, 51(18 Suppl):5023, 1991.

HARRIS, T.V.; SZILAGYI, R.K.; MCFARLANE HOLMAN, K.L. "Electronic structural investigations of ruthenium compounds and anticancer prodrugs". *J. Biol. Inorg. Chem.*, 14 (6):891, 2009.

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(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A)". *J. Inorg. Biochem.*, 100 (5-6):891, 2006.

HARTINGER, C.G.; JAKUPEC, M.A.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; GROESSL, M.; EGGER, A.; BERGER, W.; ZORBAS, H.; DYSON, P.J.; KEPPLER, B.K. "A new redox-active anticancer agent – Preclinical development and results of clinical phase I study in tumor patients". *Chem. e Biodiversity.*, 5 (10):2140, 2008.

HAWIGHORST, T.; VELASCO, P.; STREIT, M.; HONG, Y.K.; KYRIAKIDES, T.R.; BROWN, L.F.; BORNSTEIN, P.; DETMAR, M. "Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: a novel host anti-tumor defense mechanism". *EMBO J.*, 20 (11):2631, 2001.

HAYASHI, M.; MACGREGOR, J.T.; GATEHOUSE, D.G.; ADLER, I.; BLAKEY, D.H.; DERTINGER, S.D.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; SUTOU, S. "In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. "Some aspects of protocol design including repeated treatments, integrstiom with toxicity, and automated scoring". *Environ. Mol. Mutagen.*, 35 (3):234, 2000.

HAYASHI, M.; YOSHIMURA. I.; SOFUNI. T.; ISHIDATE, M.Jr. "A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control". *Envir. Molec. Mutag.*, 13 (4):347, 1989.

HAYWARD, R.L.; SCHORNAGEL, Q.C.; TENDE, R.; MACPHERSON, J.C.; AIRD, R. E.; GUICHARD, S.; HABTEMARIAM, A.; SADLER, P.; JODRELL, D.I. "Investigation of the role of Bax, p21/Waf1 and p53 as determinants of cellular responses in HCT116 colorectal cancer cells exposed to the novel cytotoxic ruthenium (II) organometallic agent, RM175". *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 55 (6):577, 2005.

HE, W.; LI, Y.; XUE, C.; HU, Z.; CHEN, X.; SHENG, F. "Effect of Chinese medicine alpinetin on the structure of human serum albumin". *Bioorg. Med. Chem.*, 13:1837, 2005.

HEIJINK, A.M.; KRAJEWSKA, M.; VAN VUGT, M.A. "The DNA damage response during mitosis". *Mutat. Res.*, 750 (1-2):45, 2013.

HEINRICH, T.A.; POELHSITZ, G.V., REIS, R.I.; CASTELLANO, E.E.; NEVES, A; LANZNASTER, M.; MACHADO, S. P.; BATISTA, A. A.; COSTA-NETO, C. M. "A new nitrosyl ruthenium complex: Synthesis, chemical characterization, *in vitro* and *in vivo* antitumor activities and probable mechanism of action". *Eur. J. Med. Chem.*, 46(9):3616, 2011.

HEMMINKI, K. "DNA adducts, mutations and cancer". *Carcinogen.*, 14 (10):2007, 1993.

HUSSEINIA, G.A.; VELLUTOB, V.; KHERBECKA, L.; PITT, W.G.; HUBBELL, J.A.; CHRISTENSEN, D.A. "Investigating the acoustic release of doxorubicin from targeted micelles". *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 101:153, 2013.

IGNARRO, L. "Nitric oxide; Biology and Pathology". 1<sup>a</sup> Ed. San Diego, Academic Press, 2000, 1017p.

IKEGUCHI, M.; SUGAI, S.; FUJINO, M.; SUGAWARA, T.; KUWAJIMA, K. "Contribution of the 6–120 disulfide bond of  $\alpha$ -lactalbumin to the stabilities of its native and molten globule states". *Biochemistry*, 31 (50):12695, 1992.

INCA - <http://www.inca.gov.br>, acessado no dia 20 de dezembro de 2013 (INCA).

JAGETIA, G.C.; NAYAK, V. "Treatment of mice with a novel antineoplastic agent taxol before irradiation increases the frequency of micronuclei in the bone marrow". *Mutat. Res.*, 349 (2):219, 1996.

JAKUPEC, M.A.; GALANSKI, M.; ARION, V.B.; HARTINGER, C.G.; KEPPLER, B. K. "Antitumour metal compounds: more than theme and variations". *Dalton Trans.*, 14 (2):183, 2008.

JAKUPEC, M.A.; REISNER, E.; EICHINGER, A.; PONGRATZ, M.; ARION, V. B.; GALANSKI, M.; HARTINGER, C.G.; KEPPLER, B.K. "Redox-active antineoplastic ruthenium complexes with indazole: correlation of *in vitro* potency and reduction potential". *J. Med. Chem.*, 48 (8):2831, 2005.

JAMIESON, E.R.; LIPPARD, S.J. "Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts". *Chem Rev.*, 99 (9):2467, 1999.

JOHNSON, R.K.; MIRABELLI, C.K.; FAUCETTE, L.F.; MCCABE, F.L.; SUTTON, B.M.; BRYAN, D.L.; GIRARD, G.R.; HILL, D.T. "Antitumor-activity of compounds related to bis(diphenylphosphine)ethane and its chlorogold (I) coordination complex". *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 26:254, 1985.

JONES, P.A.; BAYLIN, S.B. "The epigenomics of cancer". *Cell*, 128(4):683, 2007.

JUNGWIRTH, U.; KOWOL, C.R.; KEPPLER, B.K.; HARTINGER, C.G.; BERGER, W.; HEFFETER, P. "Anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes". *Antioxid. Redox Signal.*, 15 (4):1085, 2011.

JUNG, Y.; LIPPARD, S.J. "Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage". *Chem. Rev.*, 107 (5):1387, 2007.

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". *Canc. Lett.*, 226 (2):115, 2005a.

KAPITZA, S.; PONGRATZ, M.; JAKUPEC, M.A.; HEFFETER, P.; BERGER, W.; LACKINGER, L.; KEPPLER, B.K.; MARIAN, B.; "Heterocyclic complexes of ruthenium(III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells". *J. Cancer Res. Clinical Oncology.*, 131(2):101, 2005b.

KARIDI, K.; GAROUFIS, A.; TSIPI, A.; HADJILIADS, N.; DEN DULK, H.; REEDIK, J. "Syntheses characterization, *in vitro* antitumor activity, DNA-binding properties and electronic structure and electronic structure (DFT) of the new complex *cis*-(Cl,Cl)[RuII(Cl<sub>2</sub>(NO<sup>+</sup>)(terpy)]Cl". *Dalton Trans.*, 7 (7):1176, 2005.

KARTALOU, M.; ESSIGMANN, J.M. "Mechanisms of resistance to cisplatin". *Mutat. Res.*, 478 (1-2):23, 2001.

KELLAND, L. "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy". *Nat. Rev. Cancer*, 7 (8):573, 2007.

KEPPLER, B.K. editor "Metal complexes in cancer chemotherapy". Weinheim Germany, 1993. 8p.

KEPPLER, B.K.; HENN, M.; JUHL, U.M.; BERGER, M.R.; NIEBL, R.; WAGNER, F.E. "New ruthenium complexes for the treatment of cancer". *Prog. Clin. Biochem. Med.*, 10:41, 1989.

KEPPLER, B.K.; RUPP, W. "Antitumor activity of imidazolium-bisimidazole-tetrachlororuthenate (III). "A representative of a new class of inorganic antitumor agents". *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 111 (2):166, 1986.

KHABELE, D. "The Therapeutic Potential of Class I Selective Histone Deacetylase Inhibitors in Ovarian Cancer". *Front. Oncol.*, 4:111, 2014.

KHATTAK, M.; FISHER, R.; TURAJLIC, S.; LARKIN, J. "Targeted therapy and immunotherapy in advanced melanoma: an evolving paradigm". *Ther. Adv. Med. Oncol.*, 5 (2):105, 2013.

KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, G.; ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ, M.; GONZALEZ, L.; LOOCK, K.V.; DECORDER, I. "The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance". 85 (8):873, 2011.

KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M.; XU, Y. "Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis". *Hum. Exp. Toxicol.*, 19 (10):543, 2000.

KNASMÜLLER, S.; GOTTMANN, E.; STEINKELLNER, H.; FOMIN, A.; PICKL, C.; PASCHKE, A.; GÖD, R.; KUNDI, M. "Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays". *Mutat. Res.*, 420 (1-3):37, 1998a.

KNASMULLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDEMAN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A. T. "Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens". *Mutat. Res.*, 402 (1-2):185, 1998b.

KNASMÜLLER, S.; STIDL, R.; SONTAG, G.; WAGNER, K. "Investigations concerning the long term effects of dietary factors on human health: current topics, methods and new concepts". *Food. Chem. Toxicol.*, 46 (4):1211, 2008.

KRAGH-HANSEN, U. "Structure and ligand properties of human serum albumin". *Dan. Med. Bull.*, 37 (1):57, 1990.

KRATZ, F.; ELSADEK, B. "Clinical impact of serum proteins on drug delivery". *J. Contr. Release.*, 161 (2):429, 2012.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. "In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation". *Mutat. Res.*, 455 (1-2):155, 2000.

KUNG, A.; PIPER, T.; WISSIACK, R.; E. ROSEMBERG, E.; KEPPLER, B. K. "Hydrolysis of the tumorinhibiting ruthenium(III) complexes Hlm *trans*-[RuCl<sub>4</sub>(im)<sub>2</sub>] and HInd *trans*-[RuCl<sub>4</sub>(ind)<sub>2</sub>] investigated by means of HPCE and HPLC-MS". *J. Biol. Inorg. Chem.*, 6 (3):292, 2001.

LACROIX, M.; TOILLON, R.A.; LECLERCQ, G. "P53 and breast cancer, an update". *Endocr.-Relat. Cancer*, 13 (2):293, 2006.

LANGLEY, R.R.; FIDLER, I.J. "The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs". *Int. J. Cancer.*, 128 (11):2527, 2011.

LEE, B.; MUKHI, N.; LIU, D. "Current management and novel agents for malignant melanoma". *J. Hematol. Oncol.*, 5:3, 2012.

LI, J.; QIN, Z.; LIANG, Z. "The prosurvival role of autophagy in Resveratrol-induced cytotoxicity in human U251 glioma cells". *BMC Cancer*, 9:215, 2009.

LIMA, B.A.V. "Avaliação das Atividades Citotóxicas de Alguns Complexos Fósfinicos de Rutênio (Células Tumorais MDA-MB-231)". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2010. Dissertação de mestrado, 207 p.

LIPPARD, S.L.; BERG, J.M. "Bio-inorganic chemistry-Newly charted waters". *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4 (2):137, 2000.

LIPPARD, S.J.; BERG, J.M. "Principles of bioinorganic chemistry". Unniversity Science Books; California, USA, 1994, 411p.

LIPPONER, K.G.; VOGEL, E.; KEPPLER, B.K. "Ruthenate(III), A new anticancer ruthenium complex. ir, uv, nmr, hplc investigations and antitumor activity. Crystal structures of *trans*-1-methyl-Indazoliumtetrachlorobis(1-methylindazole)ruthenate(III) and its hydrolysis product *trans*-monoaquatetrachlorobis(1-methylindazole)ruthenate(III)". *Met. Based Drugs*, 3 (5):243, 1996.

LIU, H.K.; BERNERS-PRICE, S.J.; WANG, F.; PARKINSON, J.A.; XU, J.; BELLA, J.; SADLER, J. P. "Diversity in guanine-selective DNA binding modes for an organometallic ruthenium arene complex", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45 (48):8153, 2006.

LIU, H.K.; BERNERS-PRICE, S.J.; WANG, F.; PARKINSON, J.A.; XU, J.; BELLA, J.; SADLER, J. P. "Diversity in guanine-selective DNA binding modes for an organometallic ruthenium arene complex", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45 (48):8153, 2006.

LOEB, L.A. "Cancer cells exhibit a mutator phenotype". *Adv. Cancer Res.*, 72:25, 1998.

LOEB, L.A. e HARRIS, C.C. "Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective". *Cancer Res.*, 68 (17):6863, 2008.

LORD, C.J.; ASHWORTH, A. "The DNA damage response and cancer therapy". *Nature*, 481:287, 2012.

LYNCH, H.T.; DRESCHER, K.; KNEZETIC, J.; LANSPA, S. "Genetics, Biomarkers, Hereditary Cancer Syndrome Diagnosis, Heterogeneity and Treatment: A Review". *Curr. Treat. Options Oncol.*, Published online, 2014.

MACGREGOR, J.T.; HEDDLE, J.A.; HITE, M.; MARGOLIN, B.H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M.F.; TIA, R.R.; WILD, D. "Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes". *Mutat. Res.*, 189 (2):103, 1987.

MACGREGOR, J.T.; WEHR, C.M.; GOULD, D.H. "Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test". *Environ. Mutagen.*, 2 (4):509, 1980.

MAINES, M.D. "Heme Oxygenase: Function, multiplicity, regulatory mechanism and clinical applications" *J. Faseb*, 2 (10):1557, 1998.

MAJUMDER, K.; BHATTACHARYA, S. "Amino acid complexes of ruthenium: synthesis, characterization and cyclic voltammetric studies". *Polyhedron*. 18:3669, 1999.

MAJER, B.J.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; DARROUDI, F.; LAKY, B.; WIT, K.; KANSMULLER, S. "Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells". *Mutat. Res.*, 51 (1-2):153, 2004.

MALINA, J.; NOVAKOVA, O.; KEPPLER, B.K.; ALESSIO, E.; BRABEC, V. "Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by anticancer heterocyclic complexes of ruthenium(III) in cell-free media". *J. Biol. Inorg. Chem.*, 6 (4):434, 2001.

MASSARI, N.A.; MEDINA, V.A.; CRICCO, G.P.; LAMAS, D.J.M.; SAMBUCCO, L.; PAGOTTO, R.; VENTURA, C.; CIRAULO, P.J.; PIGNATARO, O.; BERGOC, R.M.; RIVERA, E.S. "Antitumor activity of histamine and clozapine in a mouse experimental model of human melanoma". *J. Dermatol. Sci.*, 72 (3):252, 2013.

MASSEY, A.J.; SCHOEPFER, J.; BROUGH, P.A.; BRUEGGEN, J.; CHÈNE, P.; DRYSDALE, M.J.; PFAAR, U.; RADIMERSKI, T.; RUETZ, S.; SCHWEITZER, A.; WOOD, M.; GARCIA-ECHEVERRIA, C.; JENSEN, M.R. et al. "Preclinical Antitumor Activity of the Orally Available Heat Shock Protein 90 Inhibitor NVP-BEP800". *Mol. Cancer. Ther.*, 9 (4):906, 2010.

MAVRI, J. "Can the chemical reactivity of an ultimate carcinogen be related to its carcinogenicity? An application to propylene oxide". *Toxicol. in vitro.*, 27 (1):479, 2013.

MCAULIFFE, C.A.; MACKIE, A.G. "P-donor ligands" In: *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. KING, R. B. Ed. New York, Wiley, Interscience, p. 2989, 1994.

MCGARVEY, K.M.; GREENE, E.; FAHRNER, J.A.; JENUWEIN, T.; BAYLIN, S.B. "DNA methylation and complete transcriptional silencing of cancer genes persist after depletion of EZH2". *Cancer Res.*, 67 (11):5097, 2007.

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.*, 232 (1-2):127, 2002.

MCLACHLAN, J.A., BUROW, M., CHIANG, T.C., LI, S.F. "Gene imprinting in developmental toxicology: a possible interface between physiology and pathology". *Toxicol. Lett.*, 120 (1-3):161, 2001.

MENOLI, R.C.; MANTOVANI M.S.; RIBEIRO L.R.; SPEIT, G.; JORDÃO, B.Q. "Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells". *Mutat. Res.*, 496 (1-2):5, 2001.



MERK, O.; SPEIT, G. "Delection of crosslinks with the comet assay in relattonship to genotoxicity and cytotoxicity". *Environm. Mol. Mutag.*, 33 (2):167, 1999.

MERLO, L.M.; PEPPER, J.W.; REID, B.J.; MALEY, C.C. "Cancer as an evolutionary and ecological process". *Nat. Rev. Cancer*, 6 (12):924, 2006.

MERSCH-SUNDERMANN, V., KNASMÜLLER, S., WU, X.J., DARROUDI, F. e KASSIE, F. "Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents". *Toxicol.*, 198 (1-3):329, 2004.

MEYER, T.J.; MCCLEVERTY, J.A. "A comprehensive coordination chemistry, II 2ª Ed. V.1, from biology to nanotechnology", U.S.A., Elsevier, 2003, 819p.

MILANO, V.; PIAO, Y; LAFORTUNE, T.; DE GROOT, J. "Dasatinib-induced autophagy is enhanced in combination with temozolomide in glioma". *Mol. Cancer Ther.*, 8 (2):394, 2009.

MILLER, A.J.; MIHM, M.C. Jr. "Melanoma". *N. Engl. J. Med.*, 355 (1):51, 2006.

MIRABELLI, C.K.; JOHNSON, R.K.; HILL, D.T.; FAUCETTE, L.F.; GIRARD, G.R.; KUO, G.Y.; SUNG, C.M.; CROOKE, S.T. "Correlation of the *in vitro* cytotoxic and *in vivo* antitumor activities of gold(I) coordination complexes". *J. Med. Chem.*, 29 (2):218, 1986.

MIRABELLI, C.K.; JOHNSON, R.K.; SUNG, C.M.; FAUCETTE, L.; MUIRHEAD, K.; CROOKE, S.T. "Evaluation of the *in vivo* antitumor activity and *in vitro* cytotoxic properties of auranofin, a coordinated gold compound, in murine tumor models". *Cancer Res.*, 45 (1):32, 1985.

MONDELLI FLEITAS, M.A. "Complexos de rutênio (II) com ligantes de interesse biológico: síntese, caracterização e citotoxicidade". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar 2011. Dissertação de Mestrado, 128 p.

MONDELLI, M.A.; GRAMINHA, A.E.; CORRÊA, R.S.; SILVA, M.M.; CARNIZELLO, A.P.; POELHSITZ, G.V.; ELLENA, J.; DEFLON, V.M.; CARAMORI, G.F.; TORRE, M.H.; TAVARES, D.C; BATISTA, A.A. "Ruthenium(II)/4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine complexes: Synthesis, characterization, X-ray structures and *in vitro* cytotoxicity activities on cancer cell lines". *Polyhedron*, 68:312, 2014.

MONGE, A.; CHORGHAE, M.; ERHARDT, P.W.; GANELLIN, C.R.; KOGA, N.; LINDBERG, P.; PERUN, T.J.; TOPLISS, J.G.; TRIVEDI, B.K.; WERMUTH, C.G. "Medicinal Chemistry in the development of societies". *Eur. J. Med. Chem.*, 35 (12):1121-1125, 2000.

MONNERET, C. "Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design". *Ann. Pharm. Fr.*, 69 (6):286, 2011.

MORBIDELLI, L.; DONNINI, S.; FILIPPI, S.; MESSORI, L.; PICCIOLI, F.; ORIOLI, P.; SAVA, G.; ZICHE, M. "Antiangiogenic properties of selected ruthenium(III) complexes that are nitric oxide scavengers". *Br. J. Cancer*, 88:1484, 2003.

MORINAGA, Y.; SUGA, Y.; EHARA, S.; HARADA, K.; NIHEI, Y.; SUZUKI, M. "Combination effect of AC-7700, a novel combretastatin A-4 derivative, and cisplatin against murine and human tumors *inv vivo*". *Cancer Scien.*, 94 (2):200, 2002.

MORRIS, R.E.; AIRD, R.E.; MURDOCH, P.D.; CHEN, H.M.; CUMMINGS, J.; HUGHES, N.D.; PARSONS, S.; PARKIN, A.; BOYD, G.; JODRELL, D.I.; SADLER, P. J. "Inhibition of Cancer Cell Growth by Ruthenium(II) Arene Complexes". *J. Med. Chem.*, 44 (22):3616, 2001.

MURA, P.; CAMALLI, M.; MESSORI, L.; PICCIOLI, F.; ZANELLO, P.; CORSINI, M. "Synthesis, Structural Characterization, Solution Chemistry, and Preliminary Biological Studies of the Ruthenium(III) Complexes [TzH][*trans*-RuCl<sub>4</sub>(Tz)<sub>2</sub>] and [TzH][*trans*-RuCl<sub>4</sub>(DMSO)(Tz)].(DMSO), the Thiazole Analogues of Antitumor ICR and NAMI-A". *Inorg. Chem.*, 43 (13):3863, 2004.

NADEAU, J.H. "Modifier genes in mice and humans". *Nature Rev. Genet.*, 2:165, 2001.

NAKABAYASHI, Y.; WATANABE, Y.; NAKAO, T.; YAMAUCHI, O. "Interactions of mixed ligand ruthenium(II) complexes containing an amino acid and 1,10-phenanthroline with DNA", *Inorg. Chim. Acta*, 357 (9):2553, 2004.

NAVARRO, M.; CORONA S., O. A.; COLMENARES, I.; MARCHAN, E.; "Ruthenium Polypyridyl Complexes: Synthesis, Characterization and Biological Activity on *Leishmania (L) Mexicana*", *Letter Drug Desig. Discov.*, 3 (7):454, 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE - NCI.

[training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html](http://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html), acessado em março de 2014.

NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI.

<http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html>, acessado em abril de 2014.

NELSON, D.R.; KAMATAKI, T.; WAXMAN, D.J.; GUENGERICH, F.P.; ESTABROCK, R. W.; FEYEREISEN, R.; GONZALEZ, F. J.; COON, M. J.; GUNSALUS, I. C.; GOTOH, O. “The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial name of enzymes, and nomenclature”. *DNA Cell Biol.*, 12 (1):1, 1993.

NEVES, A.P.; VARGAS, M.D. “Complexos de Platina(II) na Terapia do Câncer”. *Rev. Virtual Quim.*, 3 (3):196, 2011.

NG, L.T.; CHIANG, L-C.; LIN, Y-T.; LIN, C-C. “Antiproliferative and Apoptotic Effects of Tetrandrine on Different Human Hepatoma Cell Lines”. *Am. J. Chin. Med.*, 34 (1):125, 2006.

NOVAKOVA, O.; KASPARKOVA, J.; VRANA, O.; VANVLIET, P.M.; REEDIJK, J.; V. BRABEC, V. “Correlation between cytotoxicity and dna-binding of polypyridyl ruthenium complexes”. *Biochemistry*, 34 (38):12369, 1995.

NOWELL, P.C. “The clonal evolution of tumour cell populations”. *Science*, 194:23, 1974.

NUCLEUS MEDICAL ILLUSTRATION. <http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma>, acessado em 27 de dezembro de 2013.

NUSSBAUMER, S.; BONNABRY, P.; VEUTHEY, J.L.; FLEURY-SOUVERAIN, S. “Analysis of anticancer drugs: a review”. *Talanta*, 85 (5):2265, 2011.

OGATA, S.; INOUE, K.; IWATA, K.; OKUMURA, K.; TAGUCHI, H. “Apoptosis induced by picolinic acid-related compounds in HL-60 cells”. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(10): 2337, 2001.

OLIVEIRA DE, J.C. “Epigenetics and human diseases”. *Semina: Cienc. Biol. Saúde*, 33 (1):21, 2012.

OLIVEIRA, A.M.; BORGES P.; PONS, A.H.; BABINSKI, M.A.; BRASIL, F.B. “Análise histopatológica e estereológica do coração de camundongos na fase aguda da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*”. *Acta Scient. Med.*, 1 (1):10, 2007.

OLIVEIRA, N.F.P.; PLANELLO, A.C.; ANDIA, D.C.; PARDO, A.P.S. “Metilação de DNA e câncer”. *Rev. Bras. Cancerol.*, 56(4):493, 2010.

OLIVEIRA, P.A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ, L.F.; LOPES, C. “Chemical carcinogenesis”. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 79(4):593, 2007.

OTIKO, G.; RAZI, M.; SADLER, P.J.; ISAB, A.A.; RABENSTEIN, D.L. “A <sup>1</sup>H nmr study of the interaction of aurothiomalate ("Myocrisin") with human red blood cells *in vitro*”. *J. Inorg. Biochem.*, 19 (3):227, 1983.

OTROCK, Z.K.; MAHFOUZ, R.A.; MAKAREM, J.A.; SHAMSEDDINE, A.L. “Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms”. *Blood Cells Mol. Dis.*, 39 (2):212, 2007.

PARVEN, H.; HAYAT, F.; SALAHUDDIN, A.; AZAM, A. “Syntheses characterization and biological evaluation of novel 6-ferrocenyl-4-aryl-2substituted pyrimidine derivates”. *Eur. J. Med. Chem.*, 45(8):3497, 2010.

PAULA, A.S.A.; BARBOSA, P.S.; TORRES, M.R.; MATINS, A.M.; MARTINS, R.D.; DE SOUSA, A.R.; DE SOUSA, D.F.; ALVES, C.D.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTEIRO, H.S. “The renal effects of alginates isolated from brown seaweed *Sargassum vulgare*”. *J. Applied Toxicol.*, 28 (3):364, 2008.

PAVAN, F.R.; POELHSITZ, G.V.; BARBOSA, M.I.F.; LEITE, S.R.A.; BATISTA, A.A.; ELLENA, J.; SATO, L. S.; FRANZBLAU, S.G.; MORENO, V.; GAMBINO, D.; LEITE, C.Q.F. “Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis”. *Eur. J. Med. Chem.*, 46 (10):5099, 2011.

PEREIRA, F.C.; VILANOVA-COSTA, C.A. S.T.; LIMA, A.P.; RIBEIRO, A.S.B.B.; SILVA, H.D.; PAVANIN, L.A.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. “Cytotoxic and Genotoxic Effects of *cis*-Tetraammine (oxalato) Ruthenium(III) Dithionate on the Root Meristem Cells of *Allium cepa*”. *Biol. Trace Elem. Res.*, 128 (3):258, 2009.

PETRELLA, T.; VERMA, S.; SPITHOFF, K.; QUIRT, I.; MCCREADY, D.; MELANOMA DISEASE SITE GROUP. “Adjuvant Interferon Therapy for Patients at High Risk for Recurrent Melanoma: An Updated Systematic Review and Practice Guideline”. *Clin. Oncol.*, 24 (6):413, 2012.

PFEIFER, G.P. “Environmental exposures and mutational patterns of cancer genomes”. *Genome Med.*, 2 (8):54, 2010.

PIERCE, B.A. *Genética Essencial: Conceitos e conexões*. 1ª Edição. Ed. Guanabara Koogan S. A., 2012, 532p.

PITOT, H.C.; DRAGAN, Y.P. “Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis”. *FASEB J.*, 5 (6):2280, 1991.

PIZARRO, A.M.; SADLER, P.J. “Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes”. *Biochim.*, 91 (10):1198, 2009.

PLUIM, D.; VAN WAARDENBURG, R.C.A.M.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLENS, J.H.M. “Cytotoxicity of the organic ruthenium anticancer drug NAMI-A is correlated with DNA binding in four different human tumor cell lines”, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 54 (1):71, 2004.

PODLAHA, O.; RIESTER, M.; DE, S.; MICHOR, F. “Evolution of the cancer genome”. *Trends Genet.*, 28 (4):155, 2012.

POIRIER, M.C.; BELAND, F.A. “DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment”. *Chem. Res. Toxicol.*, 5 (6):749, 1992.

POIRIER, M.C.; SANTELLA, R.M.; WESTON, A. “Carcinogen macromolecular adducts and their measurement”. *Carcinogen*, 21 (3):353, 2000.

PONDER, B.A.J. “Câncer genetics”. *Nature.*, 411 (6835):336, 2001.

PSAILA, B.; LYDEN, D. “The metastatic niche: adapting the foreign soil”. *Nat. Rev. Cancer*, 9 (4):285, 2009.

QI, L.; XU, Z. “In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles”. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 16 (16):4243, 2006.

QUE, J.R., L.; BANCI, L. “Bioinorganic Chemistry”. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6 (2):169, 2002.

QUEIROZ, S.L.; BATISTA A.A. “Complexos fosfínicos e suas aplicações na medicina”. *Quim. Nova*, 19 (6):651, 1996.

RABIK, C.A.; DOLAN, M.E. “Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents”. *Cancer Treat. Rev.*, 33 (1):9, 2007.

RADEMAKER-LAKHAI, J.M.; VAN DER BONGARD, D.; PLUIM D.; BENIJNEN J. H.; SCHELLENS, L. H. “A phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSOimidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent”. *Clinic. Cancer Res.*, 10 (11):3717, 2004.

RAJA, G.; BUTCHER, R.J.; JAYABALAKRISHNANA, C. “Studies on synthesis, characterization, DNA interaction and cytotoxicity of ruthenium(II) Schiff base complexes”. *Spectrochim. Acta Part A*, 94:210, 2012.

RAJENDIRAN, V.; MURALI, M.; SURESH, E.; SINHA, S.; SOMASUNDARAM, K.; PALANIANDAVAR, M. “Mixed ligand ruthenium(II) complexes of bis(pyrid-2-yl)-bis(benzimidazol-2-yl)-dithioether and diimines: study of non-covalent DNA binding and cytotoxicity”. *Dalton Trans.*, (1):148, 2008a.

RAJENDIRAN, V.; MURALI, M.; SURESH, E.; PALANIANDAVAR, M.; PERIASAMY, V.S.; AKBARSHA, M.A. “Non-covalent DNA binding and cytotoxicity of certain mixed-ligand ruthenium(II) complexes of 2,2'-dipyridylamine and diimines”. *Dalton Trans.*, (16):2157, 2008b.

RAMAN, N.; SELVAN, A.; MANISANKAR, P. “Spectral, magnetic, biocidal screening, DNA binding and photocleavage studies of mononuclear Cu(II) and Zn(II) metal complexes of tricoordinate heterocyclic Schiff base ligands of pyrazolone and semicarbazide/thiosemicarbazide based derivatives”. *Spectrochim. Acta Part A*, 76 (2):161, 2010.

REISNER, E.; ARION, V.B.; KEPPLER, B.K.; POMBEIRO, A.J.L. “Electron-transfer activated metal-based anticancer drugs”, *Inorg. Chim. Acta*, 361(6):1569, 2008.

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F. “Dietary components may prevent mutation-related diseases in humans”. *Mutat. Res.*, 544 (2-3):195-201, 2003.

RIVOIRE, W.A.; CAPP, E.; CORLETA, H.E.; SILVA, I.S.B. “Bases biomoleculares da oncogênese cervical”. *Rev. Bras. Cancerol.*, 47(2):179, 2001.

ROCHA-FILHO, R.C. “Monóxido de carbono: Mais do que Somente um Gás Letal”. *Quím. Nova Esc.*, 9:3, 1999.

ROCHE, MANUAL. “Cell proliferation kit II (XTT). Colorimetric assay (XTT based) for the non-radioactive quantification of cell proliferation and viability”. *Cat.No. 11 465 015 001*, versão 2011.

ROMÃO, C.C.; BLÄTTLER, W.A.; SEIXAS, J.D. ; BERNARDES, G.L. “Developing drug molecules for therapy with carbon monoxide” *Chem. Soc. Rev.*, 41 (9):3571, 2012.

RONCONI, L.; SADLER, P.J. “Using coordination chemistry to design new medicines”. *Coord. Chem. Rev.*, 251 (13-14):1633, 2007.

ROSENBERG, B; VANCAMP, L. “The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds”. *Cancer Res.*, 30 (6):1799, 1970.

ROTHFUSS, A.; MASAMITU, H.; CZICH, A.; AARDEMA, M.J.; BURLISON, B.; GALLOWAY, S.; HAMADA, S. KIRKLAND, D.; HEFLICH, R.H.; HOWE, J.; NAKAJIMA, M.; DONOVAN, M.; PLAPPERT-HELBIG, U.; PRIESTLEY, C.; RECIO, L.; SCHULER, M.; UNO, Y.; MARTUS, H. “Improvement of in vivo genotoxicity assessment: Combination of acute tests and integration into standard toxicity testing”. *Mutat. Res.*, 723 (2): 108, 2010.

RUFFMAN, R.; SCHLICK, R.; CHIRIGOS, M.A.; BUDZYNSKY, W.; VARELIO, L. “Antiproliferative activity of picolinic acid due to macrophage activation”. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 13 (10):604, 1987.

SADLER, P.J. “Metals in Medicine: Design and mechanism of action”. *Adv. Inorg. Chem.*, 36:1, 1991.

SALVADORI, D.M.; RIBEIRO, L.R.; NATARAJAN, A.T. “The anticlastogenicity of beta-carotene evaluated on human hepatoma cells”. *Mutag. Res.*, 303 (4):151, 1993.

SANTIAGO, O.M. “Síntese, caracterização e estudos cinéticos da isomerização de compostos de Ru(II) contendo ligantes (X-bipy)”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2004. Tese de Doutorado, 125p.

SANTOS, E.R. "Síntese e caracterização dos complexos de fórmula geral [Ru(AA)(P-P)(N-N)]PF<sub>6</sub>, (AA=aminoácidos; P-P=bifosfinas; N-N=2-2'-bipiridina e derivados e 1,10 fenantrolina): avaliação das suas potencialidades citotóxicas. Tese (Doutorado em Química Inorgânica) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

SANTOS, E.R.; MONDELLI, M.A.; POZZI, L.V.; CORRÊA, R.S; SALISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; PAVAN, F.R.; LEITE, C.Q.F; ELLENA, J.; MALTA, V.R.S.; MACHADO, S.P.; BATISTA, A.A. "New ruthenium(II) / phosphines/diimines complexes: Promising antitumor (human breast cancer) and Mycobacterium tuberculosis fighting agents". *Polyhedron.*, 51:292, 2013.

SARASIN, A. "An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis". *Mutat. Res.*, 544 (2-3):19, 2003.

SATHYADEVI, P.; KRISHNAMOORTHY, P.; BHUVANESH, N.S.P.; KALAISELVI, P.; PADMA, V.V.; DHARMARAJ, N. "Organometallic ruthenium(II) complexes: Synthesis, structure and influence of substitution at azomethine carbon towards DNA/BSA binding, radical scavenging and cytotoxicity". *Eur. J. Med. Chem.*, 55:420, 2012.

SATHYARAJ, G.; WEYHERMÜLLER, T.; NAIR, B.U. "Synthesis, characterization and DNA binding studies of new ruthenium(II) bisterpyridine complexes". *Eur. J. Med. Chem.*, 45 (1):284, 2010.

SAVA, G.; ALESSIO, E.; BERGAMO, A.; MESTRONI, G. "Sulfoxide ruthenium complexes: non toxic tools for the selective treatment of solid tumour metastases". *Topics in Biological Inorganic Chemistry, Volume 1 "Metallo-pharmaceuticals"*, M. J. Clarke and P. J. Sadler eds., Springer, Berlin, 143, 1999.

SAVA, G.; BERGAMO, A. "Ruthenium-based compounds and tumour growth control (Review)". *Int. J. Oncol.*, 17 (2):353, 2000.

SAVA, G.; BERGAMO, A.; ZORZET, S.; GAVA, B.; CASARSA, C.; COCCHIETTO, M.; FURLANI, A.; SCARCIA, V.; SERLI, B.; IENGO, E.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G. "Influence of chemical stability on the activity of the antimetastasis ruthenium compound NAMI-A", *Eur. J. Cancer*, 38 (3):427, 2002.



SCHLUGA, P.; HARTINGER, C.G.; EGGER, A.; REISNER, E.; GALANSKI, M.; JAKUPEC, M.A.; KEPPLER, B.K. "Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP", *Dalton Trans.*, (14):1796–1802, 2006.

SCHROTEROVÁ, L.; KRÁLOVÁ, V.; VORÁCOVÁ, A.; HASKOVÁ, P.; RUDOLF, E.; ERVINKA, M.C. "Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays". *Toxicol. In Vitro.*, 23 (7):1406, 2009.

SCOLARO, C.; BERGAMO, A.; BRESCACIN, L.; DELFINO, R.; COCCHIETTO, M.; LAURENCZY, G.; GELDBACH, T.J.; SAVA, G.; DYSON, P.J. "In Vitro and in Vivo Evaluation of Ruthenium(II)-Arene PTA Complexes". *J. Med. Chem.*, 48 (12):4161, 2005.

SCUDIERO, D.A.; SHOEMAKER, R.H.; PAULL, K.D.; MONKS, A.; TIERNEY, S.; NOFZIGER, T.H.; CURRENS, M.J.; SENIFF, D.; BOYD, M.R. "Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines". *Cancer Res.*, 48 (17):4827, 1988.

SEELIG, M. H.; BERGER, M.R.; KEPPLER, B.K. "Antineoplastic activity of three ruthenium derivatives against chemically induced colorectal carcinoma in rats". *J. Cancer Res. Clinical. Oncology.*, 118 (3):195, 1992.

SHACTER, E.; WEITZMAN, S.A. "Chronic inflammation and cancer". *Oncol.*, 6 (1):217, 2002.

SHARMA, S.; KELLY, T.K.; JONES, P.A. "Epigenetics in Cancer". *Carcinogen.*, Oxford, 31(1):27, 2010.

SHI, Y. "Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease". *Nat. Rev. Genet.*, 8 (11):829, 2007.

SIJA, E.; HARTINGER, C.G.; KEPPLER, B.K.; KISS, T.; ENYEDY, E.A. "Solution equilibrium studies of anticancer ruthenium(II)- $\eta^6$ -p-cymene complexes of pyridinecarboxylic acids". *Polyhedron*, 67:51, 2014.

SIMON, T.M.; KUNISHIMA, D.H.; VIBERT, G. J.; LORBER, A. "Inhibitory effects of a new oral gold compound on HeLa-cells". *Cancer*, 44 (6):1965, 1979.

SIMON, T.M., KUNISHIMA, D.H., VIBERT, G.J.; LORBER, A. "Screening trial with the coordinated gold compound aurano<sup>®</sup>n using mouse lymphocyte leukemia p388". *Cancer Res.*, 41 (1):94, 1981.

SINGH, N. P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. "A simple technique for quantitation of lows levels of DNA damage in individual cells". *Exp. Cell Res.*, 175 (1):184, 1988.

SINGH, S.; LI, S.S. "Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol a and phthalates". *Int. J. Mol. Sci.*, 13 (8):10143, 2012.

SINGH, R.; FARMER, P.B. "Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection". *Carcinogen.*, 27 (2):178, 2006.

SINGH, R; KAUR, B; KALINA, I.; POPOV, T.A.; GEORGIEVA, T.; GARTE, S.; BINKOVA, B; SRAM, R.J.; TAIOLI, E.; FARMER, P.B. "Effects of environmental air pollution on endogenous oxidative DNA damage in humans". *Mutat. Res.*, 620 (1-2):71, 2007.

SKINCANCER -<http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma>, acessado em 27 de dezembro de 2013.

SOM, P.; OSTER, Z.H.; MATSUI GUGLIELMI, G.; PERSSON, B.R.; PELLETTIERI, M.L.; SRIVASTAVA, S.C.; RICHARDS, P.; ATKINS, H.L.; BRILL, A.B. "97Ru-transferrin uptake in tumor and abscess". *Eur. J. Nuclear Med.*, 8(11):491, 1983.

SOUZA, G.; VON POELHISTZ, G; BATISTA, A.A; ARAÚJO, H. "Complexos de Ru(II) como potenciais agentes citotóxicos na linhagem celular tumoral MDA-MB231". In: *30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Águas de Lindóia-SP. Livro de resumos, QI-168, 2007.

SPINK, B.C.; BENNETT, J.A.; PENTECOST, B.T.; LOSTRITTO, N.; ENGLERT, N.A., BENN, G.K.; GOODENOUGH., A.K.; TURESKY, R.J.; SPINK, D.C. "Long-term estrogen exposure promotes carcinogen bioactivation, induces persistent changes in gene expression, and enhances the tumorigenicity of MCF-7 human breast cancer cells". *Toxicol. Appl. Pharm.*, 240 (3):355, 2009.

SRIVASTAVA, S. C.; MAUSNER, L. F.; CLARKE, M. J. "Radioruthenium-labeled compounds for diagnostic tumor imaging". *Prog. Clin. Biochem. Med.*, 10:111, 1989.

STEINKELLNER, H.; MUN-SIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T.H.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. "Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays". *Environ. Mol. Mutagen.* 31 (2):183–191, 1998.

STENBÄCK, F.; PETO, R.; SHUBIK, P. "Initiation and promotion at different ages and doses in 2200 mice. I.Methods, and the apparent persistence of initiated cells". *Br. J. Cancer*, 44 (1):1, 1981.

STRATTON, M.R.; CAMPBELL, P.J.; FUTREAL, P.A. "The cancer genome". *Nature*, 458 (7239):719, 2009.

STORR, T.; THOMPSON, K.H.; ORVIG, C. "Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry". *Chem. Soc. Rev.*, 35 (6):534, 2006.

SUN, Y. "Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis". *Free Radical Biol. Med.*, 8 (6):583, 1990.

SZYF, M. "The dynamic epigenome and its implications in toxicology". *Toxicol. Sci.*, 100 (1):7, 2007.

TABASSUM, S.; AL-ASBAHY, W.M.; AFZAL, M.; ARJMAND, F. "Synthesis, characterization and interaction studies of copper based drug with Human Serum Albumin (HSA): Spectroscopic and molecular docking investigations". *J Photochem Photobiol B*, 114:132, 2012.

TAM, W.L.; WEINBERG, R.A. "The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer". *Nat. Med.*, 19(11):1438, 2013.

TENHUNEM, R.; MARVER, H.S.; SCHMID, R. "The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase". *Proc.Nat. Acad. Scien. USA*, 61 (2):748, 1968.

THAYER, A.M. "Platinum drugs take their toll - Small firms struggle to make their compounds the new standard in cancer therapy". *Chem. Eng. News*, 88 (26):24, 2010.

THOMPSON, K.H.; ORVIG, C. "Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design". *Dalton Trans.*, 14 (6):761, 2006.

THORP, H.H.; PECORARO, V.L. "Mechanistic Bioinorganic Chemistry". *American Chem. Society*, Washington, DC, 1995.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y. F. "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing". *Environ. Mol. Mutag.*, 35 (3):206, 2000.

TIEDEMAN, P.W. "Energia de Gibbs". *Quim. Nov. Int.* <http://qnint.s bq.org.br/qni/visualizarConceito.php?idConceito=4>, acessado em março de 2014.

TOLOSA, L.; DONATO, M.T.; PÉREZ-CATALDO, G.; CASTELL, J.V.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. "Upgrading cytochrome P450 activity in HepG2 cells co-transfected with adenoviral vector for during hepatotoxicity assessment". *Toxicol. in Vitro*, 26 (8):1272, 2011.

TROSKO, J.E. "Commentary: is the concept of "tumor promotion" a useful paradigm?" *Mol. Carcinog.*, 30 (3):131, 2001.

TROSKO, J.E. "The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis". *J. Biochem Mol. Biol.*, 36 (1):43, 2003.

TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F.; MANTOVANI, M.S.; KNASMULLER, S.; UMBUZEIRO, G.A., RIBEIRO, L.R. "Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI disperse blue 291 in the human hepatic cell line HepG2". *Toxicol. In Vitro*, 21 (8):1650, 2007.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMULLER, S. "Single cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (HepG2) cells". *Mutat. Res.*, 441 (2):215, 1999.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMULLER, S. "Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells". *Mutat. Res.*, 468 (2):213, 2000.

UNOKI, M.; BRUNET, J.; MOUSLI, M. "Drug discovery targeting epigenetic codes: The great potential of UHRF1, which links DNA methylation and histone modifications, as a drug target in cancers and toxoplasmosis". *Biochem. Pharmacol.*, 78 (10):1279, 2009.

VACCA, A.; BRUNO, M; BOCCARELLI, A.; COLUCCIA, M.; RIBATTI, D.; BERGAMO, A.; GARBISA, S.; SARTOR, L.; SAVA, G. "Inhibition of endothelial cell functions and of angiogenesis by the metastasis inhibitor NAMI-A". *Br. J. Cancer*, 86 (6):993, 2002.

VACCARO, M.; DEL LITTO, R.; MANGIAPIA, G.; CARNERUP, A. M.; D'ERRICO, G.; RUFFO, F.; PADUANO, L. "Lipid based nanovectors containing ruthenium complexes: a potential route in cancer therapy". *Chem. Commun.*, 21 (11):1404, 2009.

VALENTIN-SEVERIN, I.; HEGARAT, L.L.; LHUGUENOT, J.C.; BONA, A. M.L.; CHAGNONA, M.C. "Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays". *Mutat. Res.*, 536 (1-2):79, 2003.

VAN RIJT, S.H.; SADLER, P.J. "Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs". *Drug Discov. Today*, 14 (23-24):1089, 2009.

VALLE, E.M.A.; NASCIMENTO, F.B.; FERREIRA, A.G.; BATISTA, A.A.; MONTEIRO, M.C.R.; MACHADO, S.P.; ELLENA, J.; CASTELLANO, E.E.; AZEVEDO, E.R. "Sobre uma degenerescência acidental nos deslocamentos químicos de rnm de  $31p\{1h\}$  em complexos difosfínicos de rutênio". *Quim. Nova*, 31 (4): 807, 2008.

VASQUEZ, M.Z. "Recommendations for safety testing with the in vivo comet assay". *Mutat Res.*, 747 (1):142, 2012.

VELHO, T.R. "Metastatic melanoma - a review of current and future drugs". *Drugs Context.*, 2012:212242, 2012.

VERNA, L.; WHYSNER, J.; WILLIAMS, G.M. "2-Acetylaminofluorene mechanistic data and risk assessment: DNA reactivity, enhanced cell proliferation and tumor initiation". *Pharmacol. Ther.*, 71 (1-2):83, 1996.

VILLALOBOS LEON, M.L.; MOLINA VILLAVERDE, R.M.; LOPES GONZALEZ, J.L.; ÁLVAREZ-MON SOTO, M. "Melanoma". *Medicine*, 11 (26):1597, 2013.

VON POELHSITZ, G. "Nitrosilo complexos de rutênio com ligantes bifosfínicos: espectroscopia, eletroquímica, estudo de reatividade e liberação de NO". São Carlos, Programa de Pós graduação em Química – UFSCar, 2005 – Tese de Doutorado, 251p.

VON POELHSITZ, G.; BATISTA, A. A.; DE ARAUJO, M. P.; DEFLON, V.; COSTA-NETO, C.; HEINRICH, T.; LEITE, C.; PAVAN, F.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. ‘Estudo das atividades antitumoral e antimicobacteriana de novos complexos de Ru(II)’. In: *30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Águas de Lindóia, SP, 2007.

YAW, K.Y.; MELCHART, M.; HABTEMARIAM, A.; SADLER, P.J. “Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes”. *Chem. Commun.*, 38 (14):4764, 2005.

YOO, S.Y.; KWON, S.M. “Angiogenesis and Its Therapeutic Opportunities”. *Mediators Inflamm.*, 2013:127170, 2013.

WAINSTEIN, A.J.A.; BELFORT, F.A. “Management of cutaneous melanoma”. *Rev. Col. Bras. Cir.*, 31 (3):204, 2004.

WANG, F.; BELLA, J.; PARKINSON, J.A.; SADLER, P.J. “Competitive reactions of a ruthenium arene anticancer complex with histidine, cytochrome c and an oligonucleotide”. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 10 (2):147, 2005

WANG, R. “Resurgence of carbon monoxide: an endogenous gaseous vasorelaxing factor”. *J. Physiol. Pharmacol.*, 76(1):1, 1998.

WANING, D.L.; GUISE, T.A. “Molecular Mechanisms of Bone Metastasis and Associated Muscle Weakness”. *Clin. Cancer Res.*, 20 (12):3071, 2014.

WEINBERG, R.A. “How cancer arises”. *Sci Am.* 9:9, 1996.

WELTI, J.; LOGES, S.; DIMMELER, S.; CARMELIET, P. “Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer”. *J. Clin. Invest.*, 123 (8):3190, 2013.

WEXSELBLATT, E.; YAVIN, E.; GIBSON, D. “Cellular interactions of platinum drugs”. *Inorg. Chem. Acta*, 393 (1):75, 2012.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION, “Genes and human disease”. <http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index3.html>, acessado em maio de 2014.

WILKINSON, W. J.; KEMP, P.J. “Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels”. *J Physiol.*, 589(Pt 13):3055, 2011.

WITTE, I.; PLAPPERT, U.; WALL, H.; HARTMANN, A. "Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part III: the comet assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection". *Toxicol. Scienc.*, 97 (1):21, 2007.

WOLFFE, A. P.; GUSCHIN, D. "Chromatin structural features and targets that regulate transcription". *J. Struct. Biol*, 129 (2-3):102, 2000.

WONG, E.; GIANDOMENICO, C.M. "Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs" *Chem. Rev.*, 99 (9): 2451, 1999.

WORKMAN, P.; ABOAGYE, E.O.; BALKWILL, F.; BALMAIN, A.; BRUDER, G.; CHAPLIN, D.J.; DOUBLE, J.A.; EVERITT, J., FARNINGHAM, D.A.H., GLENNIE, M.J.; KELLAND, L.R.; ROBINSON, V.; STRATFORD, I.J.; TOZER, G.M.; WATSON, S.; WEDGE, S.R.; ECCLES, S.A. "Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research". *Br. J. Cancer.*, 102 (11):1555, 2010.

WU, L.; WANG, R. "Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions and pharmacological applications". *Pharm. Rev*, 57 (4):585, 2005.

WU, Y.; ZHOU, Z. "Binding to DNA purine bases and amino acid residues of a ruthenium(II) antitumor complex: A density functional study". *Inorg. Chem. Acta*, 363 (13): 3274, 2010.

YAMAMOTO, K.; KIKUCHI, Y. "A comparison of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons". *Mutat. Res.*, 71 (1):127, 1980.

YAN, Y.K.; MELCHART, M.; HABTEMARIAM, A.; SADLER, P.J. "Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes". *Chem. Comm.*, 14 (38):4764, 2005.

YI, H.; WU, L.; JIANG, L. "Genotoxicity of arsenic evaluated by Allium-root micronucleus assay". *Sci. Total Environ.*, 383 (1-3):232, 2007.

ZHANG, C.X.; LIPPARD, S.J. "New metal complexes as potential therapeutics", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7 (4):481, 2003.

ZHAO, Q.; RANK, G.; TAN, Y.T.; LI, H.; MORITZ, R. L.; SIMPSON, R. J.; CERRUTI, L.; CURTIS, D.J.; PATEL, D.J.; ALLIS, C.D.; CUNNINGHAM, J. M.; JANE, S.M. "PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing". *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16 (3):304, 2009.

ZHAO, X.L.; HAN, M.J.; ZHANG, A.G.; WANG, K.Z. "DNA- and RNA-binding and enhanced DNA-photocleavage properties of a ferrocenyl-containing ruthenium(II) complex". *J. Inorg. Biochem.*, 107 (1):104, 2012.

ZISOWSKY, J.; KOEGEL, S.; LEYERS, S.; DEVARAKONDA, K.; KASSACK, M.U.; OSMAK, M.; JAEHDE, U. "Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells". *Biochem. Pharmacol.* 73(2):298, 2007.





# *Apêndices*

## APÊNDICES

### APÊNDICE I

TABELA 1 - Frequências de células binucleadas micronucleadas (CBNMNs) e valores de índices de divisão nuclear (IDN) obtidos nas culturas de células V79 tratadas com as diferentes concentrações do composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> e seus respectivos controles

Tratamentos ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	CBNMNs				Total de Micronúcleos	IDN
	1MN	2MN	3MN	4MN		
<b>Controle</b>	5	0	0	0	5	1,65
	6	0	0	0	6	1,73
	3	0	0	0	3	1,87
<b>Controle solvente (DMSO)</b>	2	0	0	0	2	1,67
	2	0	0	0	2	1,68
	1	0	0	0	1	1,93
<b>0,321</b>	3	0	0	0	3	1,68
	3	0	0	0	3	1,59
	4	0	0	0	4	1,87
<b>0,625</b>	7	0	0	0	7	1,68
	7	0	0	0	7	1,61
	9	0	0	0	9	1,74
<b>1,25</b>	4	0	0	0	4	1,61
	8	1	0	0	10	1,68
	9	1	0	0	11	1,71
<b>Cisplatina</b>	9	1	1	0	15	1,60
	17	1	0	0	19	1,85
	24	1	0	0	26	1,85
<b>MMS</b>	42	1	0	0	44	1,75
	27	2	4	0	43	1,69
	37	0	0	0	37	1,80

CBNMNs: Células Binucleadas cotendo Micronucleadas; MN: Micronúcleos; IDN: Índice de Divisão Nuclear;  $\text{IDN} = [\text{M1} + 2(\text{M2}) + 3(\text{M3}) + 4(\text{M4})]/\text{N}$ , onde N = nº de células contabilizadas; DMSO: dimetilsulfóxido (0,1%); Cisplatina: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (3,33  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); MMS: metilmetanosulfonato (400,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); Foram analisadas 1000 células binucleadas/cultura para a obtenção das frequências de CBNMNs e 1.500 células/cultura para obtenção dos valores de IDN

## APÊNDICE II

TABELA 2 - Frequências de células binucleadas micronucleadas (CBNMNs) e valores de índices de divisão nuclear (IDN) obtidos nas culturas de células HepG2 tratadas com as diferentes concentrações do complexo (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> e seus respectivos controles

Tratamento ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	CBNMNs				Total de Micronúcleos	IDN
	1MN	2MN	3MN	4MN		
<b>Controle</b>	2	0	0	0	2	1,78
	5	0	0	0	5	1,71
	5	0	0	0	5	1,81
<b>Controle solvente (DMSO)</b>	3	0	0	0	3	1,90
	2	0	0	0	2	1,36
	3	0	0	0	3	1,43
<b>0,321</b>	7	1	0	0	9	1,44
	6	1	0	0	8	1,35
	4	0	0	0	4	1,94
<b>0,625</b>	1	0	0	0	1	1,91
	4	0	0	0	4	1,53
	2	0	0	0	2	1,50
<b>1,25</b>	7	1	1	0	12	1,69
	7	2	0	0	11	1,61
	7	1	0	0	9	1,56
<b>Cisplatina</b>	24	2	0	0	28	1,43
	20	3	0	0	26	1,44
	12	5	1	0	25	1,37
<b>MMS</b>	17	3	0	0	23	1,61
	15	1	1	0	20	1,73
	23	1	0	0	25	1,73

CBNMNs: Células Binucleadas cotendo Micronucleadas; MN: Micronúcleos; IDN: Índice de Divisão Nuclear; DP: Desvio Padrão; DMSO: dimetilsulfóxido; Cisplatina: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (3,33  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); MMS: metil metanosulfonato (400,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); <sup>a</sup>1000 células binucleadas analisadas por cultura a um total de 3000 células por tratamento; <sup>b</sup>500 células analisadas por cultura a um total de 1500 células por tratamento. <sup>c</sup>Significativamente diferente do grupo controle negativo ( $P < 0,05$ ).

## APÊNDICE III

TABELA 3- Frequências de PCEMNs e valores de PCE / ( PCE + NCE) obtidos em medula óssea de camundongos Swiss tratados com diferente doses do complexo (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub> e seus respectivos controles

Tratamentos mg kg <sup>-1</sup>	PCEMNs	PCE / ( PCE + NCE)
<b>Controle</b>	3	0,690
	3	0,737
	2	0,583
	3	0,730
	3	0,750
	2	0,590
<b>0,625</b>	2	0,610
	5	0,477
	4	0,595
	4	0,652
	7	0,366
	6	0,527
<b>1,25</b>	2	0,467
	4	0,632
	3	0,680
	1	0,670
	4	0,500
	4	0,620
<b>2,5</b>	6	0,552
	3	0,595
	4	0,462
	2	0,505
	3	0,647
	5	0,660
<b>5,0</b>	3	0,602
	3	0,482
	6	0,512
	2	0,750
	7	0,587
	6	0,705
<b>Cisplatina</b>	72	0,477
	57	0,567
	44	0,525
	59	0,650
	62	0,422
	63	0,510
<b>MMS</b>	25	0,610
	25	0,621
	29	0,567
	33	0,571
	30	0,572
	34	0,483

Cisplatina: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (1,5 mg kg<sup>-1</sup> p.c.) ; MMS: metilmetanosulfonato (40,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c.); Foram analisados 400 eritrócitos/animal para a obtenção da Citotoxicidade e 2000 eritrócitos/animal para a obtenção da frequência de micronúcleos (PCEMNs).

## APÊNDICE IV

TABELA 4 - Frequências de danos no DNA obtidos em hepatócitos de camundongos Swiss após os tratamentos com as diferentes doses do composto (9) *cis*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>

Tratamentos (mg kg <sup>-1</sup> p.c.)	% DNA	Tail Moment	Tail Length
<b>Controle Negativo</b>	18,73	2,11	8,37
	17,88	2,80	10,25
	15,88	2,01	10,10
	19,29	1,65	5,67
	25,52	3,56	11,00
	20,85	2,16	7,50
<b>0,625</b>	13,18	1,17	6,22
	19,85	1,88	7,66
	20,25	3,69	13,15
	17,18	3,00	10,40
	23,84	3,24	10,04
	24,89	3,58	10,32
<b>1,25</b>	21,7	2,79	8,97
	27,28	4,43	12,73
	20,21	2,10	6,11
	18,60	3,29	8,65
	24,84	3,25	10,05
	18,29	3,52	12,84
<b>2,50</b>	21,65	3,24	10,22
	22,67	3,86	11,82
	19,02	2,60	10,58
	19,03	2,30	9,98
	24,57	5,93	13,26
	16,25	1,83	7,95
<b>5,00</b>	27,50	8,93	16,95
	33,73	10,32	22,25
	20,47	2,35	7,46
	24,79	6,81	17,04
	33,49	9,39	19,87
	29,26	4,25	11,21
<b>Cisplatina</b>	32,82	10,25	21,96
	40,79	16,98	30,55
	37,54	10,04	20,6
	46,46	13,25	24,34
	37,70	9,89	19,84
	40,37	12,14	23,55
<b>MMS</b>	37,35	9,59	21,54
	46,81	21,20	35,08
	44,44	16,90	31,64
	39,30	13,23	24,52
	42,01	9,90	20,01
	41,20	14,98	29,80

% DNA: porcentagem de DNA na cauda do cometa; Tail Moment: momento de cauda; Tail Length: comprimento da cauda; Cisplatina: *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (1,5 mg kg<sup>-1</sup> p.c.); MMS: metilmetanosulfonato (40,0 mg kg<sup>-1</sup> p.c.).Foram analisados 300 cometas por tratamento.

## APÊNDICE V

TABELA 5 – Volumes tumorais apresentados no ensaio antitumoral *in vivo* para os dois grupos de tratamentos controle solvente e para o Composto (9) *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF<sub>6</sub>

TRATAMNENTOS	ANIMAIS	Volume tumoral (mm <sup>3</sup> )				
		1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia
Controle (DMSO 1,0 %)	1	171,5	196,0	288,0	550,0	864,0
	2	126,0	171,5	196,0	256,0	288,0
	3	108,0	126,0	171,5	288,0	320,34
	4	75,0	126,0	171,5	256,0	500,0
	5	62,5	75,0	171,5	288,0	405,0
	6	105,875	126,0	196,0	364,5	550,0
Composto 9 (5,0 mg kg <sup>-1</sup> )	1	90	147,0	171,5	196,	148,1
	2	62,5	108,0	171,5	196,0	196,0
	3	108	108,0	117,0	178,9	196,0
	4	50	62,5	108,0	256,0	196,0
	5	126	126,0	196,0	196,0	162,0
	6	126	126,0	171,5	171,5	147,9

## APÊNDICE VI

TABELA 6 – Peso dos órgãos e tumor dos animais no dia do sacrifício para os diferentes tratamentos, 24 horas após o último tratamento com o composto (9)  $ct\text{-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$

Tratamentos	Animais	Órgãos (g)						Tumor (g)
		Cérebro	Coração	Pulmão	Fígado	Baço	Rim	
Controle Negativo	1	0,4861	0,2638	0,1634	1,3750	0,0710	0,3624	-
	2	0,4725	0,2224	0,1547	1,3650	0,0780	0,3643	-
	3	0,4838	0,1530	0,2058	1,4861	0,0655	0,4098	-
	4	0,4920	0,1135	0,2090	1,2400	0,1040	0,3940	-
	5	0,4780	0,1354	0,1882	1,2240	0,0140	0,3090	-
	6	0,5375	0,0476	0,1349	1,6834	0,0422	0,3732	-
Controle (DMSO 1,0%)	1	0,4880	0,0960	0,1320	1,2150	0,1290	0,3560	0,9520
	2	0,4920	0,2700	0,1720	1,080	0,2600	0,3360	0,7380
	3	0,4700	0,1320	0,1970	1,532	0,0970	0,3810	0,4860
	4	0,4480	0,1730	0,1710	1,608	0,1450	0,4080	1,1560
	5	0,4510	0,2050	0,157	1,436	0,0450	0,3120	0,7500
	6	0,3853	0,2448	0,1280	1,7283	0,4609	0,3310	1,1859
Composto 9 (5,0 mg kg <sup>-1</sup> )	1	0,4980	0,1680	0,2420	1,4830	0,1340	0,3770	0,9320
	2	0,3830	0,1740	0,1970	1,2210	0,0042	0,2985	0,2169
	3	0,4570	0,031	0,2250	1,633	0,133	0,356	0,5440
	4	0,4200	0,150	0,0810	1,421	0,064	0,388	0,4480
	5	0,4647	0,1168	0,1516	1,4379	0,1237	0,2812	0,7653
	6	0,2331	0,0749	0,1183	1,1069	0,0384	0,3136	1,3128