

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS – PIPGCF – ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP

Cecília Patrícia Popolin

**Efeitos antitumorais e antimetastáticos de novos complexos de
rutênio em células de câncer de mama**

São Carlos

2016

Efeitos antitumorais e antimetastáticos de novos complexos de rutênio em células de câncer de mama

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS – PIPGCF – ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP

Dissertação de Mestrado

Efeitos antitumorais e antimetastáticos de novos complexos de rutênio em células de câncer de mama

Cecília Patrícia Popolin

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina Cominetti

São Carlos

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P829e Popolin, Cecília Patrícia
Efeitos antitumorais e antimetastáticos de novos complexos de rutênio em células de câncer de mama / Cecília Patrícia Popolin. -- São Carlos : UFSCar, 2016. 64 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Câncer. 2. Complexos de rutênio. 3. Câncer de mama. 4. Metástase. 5. Apoptose. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Cecília Patrícia Popolin, realizada em 29/04/2016:

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti
UFSCar

Prof. Dr. Andrei Leitão
IQSC/USP

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Dedico este trabalho a minha família, a quem devo grande parte de quem sou. Dedico também a você Rodrigo, um anjo que Deus colocou em minha vida, meu companheiro, meu porto seguro, meu grande amor. Muito do que sou e conquistei até hoje, devo a vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meus caminhos e permitir que eu chegasse até aqui. Por me abençoar com pessoas maravilhosas em minha vida e por me dar saúde e força para sempre seguir em frente.

Aos meus pais, Alberto e Laura, pelo amor incondicional, carinho e por sempre apoiar minhas decisões. Obrigada por tudo! Amo vocês!

Ao amor da minha vida, Rodrigo. Agradeço a Deus por cruzar nossos caminhos, não imagino minha vida sem você. Obrigada por acreditar em mim, nos meus sonhos. Obrigada por me acalmar nos meus momentos de medo e fraqueza e me mostrar que sou capaz, que posso sempre mais. Obrigada por sua dedicação, carinho, companheirismo, por tudo. Te amo muito!!!

Ao meu irmão, Rogério, que mesmo distante, sei que estará sempre torcendo por mim.

Aos meus sogros, Quirineu e Vera, pelo carinho e apoio.

Aos meus cunhados, Júnior e Viviane, que mesmo distantes, sempre estiveram torcendo por mim.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Márcia Cominetti, sempre muito paciente e atenciosa. Lembro-me como se fosse hoje nossa primeira conversa, você muito paciente me explicou as linhas de pesquisa do Laben e me ofereceu o estágio. Com o estágio, me encantei pela cultura de células e vi o meu sonho, que era trabalhar com a pesquisa, começar a se tornar realidade. Obrigada Márcia pela oportunidade, disponibilidade em me ajudar e por compreender minhas dificuldades nesta jornada.

À Amanda, por me acolher no Laben, por dividir seu conhecimento seja em cultura de células, power point ou qualquer outro assunto. Muito obrigada pelo apoio, ajuda, pelas nossas conversas e pela grande amizade. Você é um exemplo de dedicação e profissionalismo.

À Angelina, pela acolhida no laboratório, por dividir seus conhecimentos e estar sempre disposta a ajudar, pela amizade e bom humor.

À Angélica, por estar sempre disposta em ajudar, por ser minha professora de química e pela amizade.

À Marcela, por sua disposição em me ajudar sempre que preciso, pelos momentos de descontração e amizade.

À todas as Labenzentes, Patrícia, Liany, Marina, Carol, Carla, pelos momentos de descontração, discussões, pelas gordices e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Alzir Bastista Azevedo e sua equipe do Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI), pela síntese e fornecimento dos compostos de Rutênio para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo e sua equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) pela ajuda e disposição.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas e seus funcionários.

A FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro para que este trabalho pudesse ser realizado.

A todas as pessoas aqui não mencionadas, mas que contribuíram de forma direta ou indiretamente com este trabalho.

RESUMO

As mudanças demográficas que o Brasil e o mundo vêm sofrendo são consequências do processo de urbanização populacional, da industrialização e dos avanços da ciência e da tecnologia. Esse processo, associado à transformação na qualidade de vida da sociedade trouxe uma alteração importante no perfil de morbimortalidade diminuindo a ocorrência das doenças infectocontagiosas e aumentando a incidência das doenças crônico-degenerativas, como o câncer. O câncer é um termo utilizado para doenças em que células anormais se dividem sem controle e são capazes de se espalhar e invadir outros tecidos através dos sistemas sanguíneo e linfático. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo e pode ser considerado um câncer com bom prognóstico se diagnosticado precocemente e tratado oportunamente. O tratamento do câncer de mama tem como objetivos principais aumentar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida da mulher. A cirurgia e a radioterapia respondem pelo controle local do câncer de mama, já o tratamento sistêmico é feito por terapia hormonal ou quimioterapia. Os fármacos utilizados na quimioterapia causam danos ao DNA, tanto das células tumorais, como também das células normais e ainda as células tumorais podem se tornar resistentes a esses fármacos. Rosenberg e colaboradores em 1964 foram responsáveis pela descoberta do fármaco antitumoral a base de metais, a cisplatina, um complexo eficaz e ainda muito utilizada em terapias contra vários tipos de tumores, porém, apesar de sua eficácia, apresenta também diversos efeitos colaterais. Com as limitações da cisplatina, novas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com complexos de rutênio. O rutênio possui algumas propriedades únicas que podem justificar seu potencial antitumoral, dentre elas, a capacidade de imitar o ferro na ligação a muitas biomoléculas, incluindo a transferrina e albumina. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de quatro novos complexos de rutênio com ligantes bipyridina e bifosfina: **(1)** $[\text{Ru}(\text{SO}_4)(\text{dppb})(\text{bipy})]$, **(2)** $[\text{Ru}(\text{CO}_3)(\text{dppb})(\text{bipy})]$, **(3)** $[\text{Ru}(\text{C}_2\text{O}_4)(\text{dppb})(\text{bipy})]$ e **(4)** $[\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CO}_2)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ sobre a proliferação de células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231 e MCF-7, e da linhagem não-tumoral de mama, MCF-10A. Os resultados demonstraram que o complexo **(4)** foi o mais eficaz em inibir a proliferação das células tumorais de mama triplo negativas, da linhagem MDA-MB-231, em comparação com a linhagem não tumoral de mama MCF-10A que se mostrou mais resistente ao complexo. Ainda, o complexo **(4)** foi capaz diminuir o número e tamanho de colônias, de modificar o citoesqueleto e de atuar na cascata metastática inibindo a adesão, migração e invasão, das células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231. O complexo **(4)** inibiu também a secreção de MMP9 e induziu a apoptose aumentando a expressão de genes pró-apoptóticos como Bax e Caspase-3 e diminuindo a expressão genes anti-apoptóticos Bcl-2, nas células tumorais de mama triplo negativas, da linhagem MDA-MB-231. Esses resultados mostram que o complexo **(4)** possui potencial antitumoral e antimetastático para células tumorais de mama, podendo ser uma nova alternativa de fármaco para o tratamento do câncer.

Palavras – chave: câncer, complexos de rutênio, câncer de mama, metástase, apoptose.

ABSTRACT

Brazil and the world are passing through demographic changes as consequences of population urbanization, industrialization and advances in science and technology. This process, associated with the transformation of society's quality of life has brought a significant change in the morbidity and mortality profile reducing the occurrence of infectious diseases and increasing incidence of chronic degenerative diseases, like cancer. Cancer is a term used for diseases in which abnormal cells divide without control, and are able to spread and invade other tissues through blood and lymphatic systems. Breast cancer is the second most common cancer in the world and can be considered a cancer with a good prognosis if diagnosed early and treated timely. Treatment of breast cancer has as main objectives to increase survival and improve the quality of life of women. Surgery and radiotherapy are responsible for local control of breast cancer; on the other hand, systemic treatment is made by hormone therapy and chemotherapy. Drugs used in chemotherapy cause resistance and damage to DNA, not only of tumor cells, but also of normal cells. Rosenberg and colleagues in 1964, were responsible for the discovery of antitumor drug to base metals, cisplatin, an effective complex and remains widely used in therapies against various types of tumors, however, despite its effectiveness, also has several side effects. With the limitations of cisplatin, new research has been developed with ruthenium complexes. Ruthenium has some unique properties that can justify their antitumor potential, among them the ability to mimic the iron in connection to many biomolecules, including transferrin and albumin. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of four new ruthenium complexes with bipyridine and biphosphine ligands: **(1)** $[\text{Ru}(\text{SO}_4)(\text{dppb})(\text{bipy})]$, **(2)** $[\text{Ru}(\text{CO}_3)(\text{dppb})(\text{bipy})]$, **(3)** $[\text{Ru}(\text{C}_2\text{O}_4)(\text{dppb})(\text{bipy})]$ e **(4)** $[\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CO}_2)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ on the proliferation of breast tumor cells, MDA-MB-231 and MCF-7, and a non-tumor cell line MCF-10A. The results demonstrated that the compound **(4)** was more efficient inhibiting proliferation of triple negative breast cancer cells MDA-MB-231, compared with the non-tumor cell line MCF-10A which was more resistant to the complex. Furthermore, the complex **(4)** was able to reduce the number and size of colonies, to act in the metastatic cascade inhibiting the adhesion, migration and invasion. The complex **(4)** also inhibited the secretion of MMP9 and induced apoptosis by increasing the expression of pro-apoptotic genes such as Bax and Caspase-3 and decreasing anti-apoptotic genes Bcl-2 in triple negative breast cancer cells, MDA-MB-231. These results show that the complex **(4)** has potential antitumor and antimetastatic to breast tumor cells; it might be a good alternative drug for the treatment of cancer.

Keywords: cancer, ruthenium complexes, breast cancer, metastasis, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxas de mortalidade dos cinco tipos de cânceres mais frequentes em 2013, ajustadas por idade a cada 100 mil mulheres, entre 1990 e 2013 no Brasil.....	16
Figura 2 - Ranking mundial das taxas de incidência e mortalidade por câncer de mama em mulheres em 2012.	17
Figura 3 - Disseminação da célula tumoral e formação de metástase.	19
Figura 4 - Anatomia da mama feminina.	20
Figura 5 - Principais tipos de carcinoma de mama.	21
Figura 6 - Estruturas dos complexos de rutênio.....	27
Figura 7 - Efeito do complexo (1) na morfologia das células tumorais de mama MDA-MB-231, MCF-7 e não tumorais de mama MCF-10A..	37
Figura 8 - Efeito do complexo (2) na morfologia das células tumorais de mama MDA-MB-231, MCF - 7 e não tumorais de mama MCF-10A..	38
Figura 9 - Efeito do complexo (3) na morfologia das células tumorais de mama MDA-MB-231, MCF - 7 e não tumorais de mama MCF-10A..	39
Figura 10 - Efeito do complexo (4) na morfologia das células tumorais de mama MDA-MB-231, MCF - 7 e não tumorais de mama MCF-10A..	40
Figura 11 - Efeito dos complexos (1-4) na proliferação celular das linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e MCF-10A, após 24 horas de incubação.	41
Figura 12 - Efeito do complexo (4) sobre a formação de colônias em células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231.	43
Figura 13 - Efeito de diferentes concentrações do complexo (4) na migração das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231..	44
Figura 14 - Efeito do complexo (4) sobre a migração das células da linhagem MDA-MB-231 em câmara de Boyden..	45
Figura 15 - Efeito do complexo (4) sobre a expressão da MMP9 em células da linhagem MDA-MB-231. Expressão da MMP9 em gel de zimografia (A). Gráfico da análise da atividade da MMP9 (B).....	46
Figura 16 - Efeito do complexo (4) sobre a invasão de células da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231..	47
Figura 17 - Efeito do complexo (4) sobre a adesão das células da linhagem MDA-MB-231 a proteínas da matriz extracelular: colágeno, fibronectina, laminina e vitronectina..	48
Figura 18 - Efeito de diferentes concentrações do complexo (4) sobre o citoesqueleto das células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231.	50

Figura 19 - Efeito do complexo (4) na indução da apoptose em células tumorais de mama MDA-MB-231 e não tumorais de mama MCF-10A..	51
Figura 20 - Efeito de diferentes concentrações do complexo (4) sobre a fragmentação nuclear das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231.	52
Figura 21 - Efeitos do complexo (4) na expressão gênica de Bax, Caspase-3 e Bcl-2 nas células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR em tempo real.	35
Tabela 2 - Valores de IC ₅₀ dos complexos (1-4) nas linhagens MDA-MB-231, MCF7 e MCF-10A.....	41

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µg - Microgramas

µg/ml – Microgramas por mililitro

µl - Microlitro

µM - Micromolar

7-AAD - 7-Aminoactinomicina D

Bax - Proteína X associada ao Bcl2

Bcl-2 - Linfoma de células B (*B-cell lymphoma 2*)

BSA – Albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin*)

C₂O₄ – Oxalato

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CH₃CO₂ – Acetato

CO₂ – Dióxido de carbono

CO₃ – Carbonato

DAPI – 4,6-diamidino-2-phenylindole

DMEM – Meio Dulbecco's modificado (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EGF – Fator de crescimento epidermal humano (*Epidermal growth factor*)

FBS – Soro fetal bovino

FDA – *Food and Drug Administration*

HELA – Linhagem celular de carcinoma cervical humano

HER – 2 – Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*)

HK2 – Linhagem celular normal de rim humano

IC₅₀ – Concentração capaz de inibir 50% da proliferação celular

KCl – Cloreto de potássio

kDA - Quilodaltons

KP1019 - *Indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)]*

mg/ml – Miligramas por mililitro

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

mM – Milimolar

MMP – Metaloproteinases de matriz

MnCl₂ . Cloreto de manganês

MTT - *3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

mV - Milivolts

NaCl – Cloreto de sódio

NAMI-A - *Imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate*

NaN₃ . Azida de Sódio

ng/ml – Nanogramas por mililitro

NH₄Cl – Cloreto de amônio

nM - Nanomolar

O₂ _ Oxigênio

°C – Grau Celsius

PBS – Tampão fosfato salina

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PE – Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)

pH – Potencial hidrogeniônico

RE – Receptores de estrogênio

RNA – Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RP – Receptores de progesterona

RPM – Rotações por minuto

Ru – Rutênio

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SDS - PAGE – Dodecil-sulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (PAGE) (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SO₄ – Sulfato

SW480 – Linhagem celular de câncer de cólon retal humano

UI/ml – Unidades Internacionais por mililitro

ZnCl₂ – Cloreto de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Incidência do câncer	16
1.1.1 Incidência do Câncer de mama.....	16
1.2 Câncer.....	17
1.3 Câncer de Mama.....	19
1.3.1 Anatomia da Mama	19
1.3.2 Tipos de Câncer de mama	20
1.3.3 Tratamentos para o câncer de mama	22
1.4 Complexos inorgânicos a base de metais com atividade antitumoral	23
1.4.1 Complexos de Rutênio com atividade antitumoral.....	24
2. OBJETIVO	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Material.....	27
3.1.1 Síntese dos complexos.....	27
3.2 Métodos	28
3.2.1 Cultura celular	28
3.2.2 Proliferação celular.....	28
3.2.3 Morfologia Celular	29
3.2.4 Formação de Colônias	29
3.2.5 Migração celular – <i>Wound Healing</i>	30
3.2.6 Migração Celular- Câmara de Boyden	30
3.2.7 Invasão em Matrigel	31
3.2.8 Ensaio de Adesão Celular.....	31
3.2.9 Zimografia	32
3.2.10 Ensaio de Apoptose com Anexina V por Citometria de Fluxo	33
3.2.11 Ensaio de fragmentação Nuclear	33
3.2.12 Marcação do citoesqueleto	34

3.2.13 PCR em tempo real	34
3.3 Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1 Ensaio de Morfologia Celular.....	37
4.2 Ensaio de Proliferação Celular.....	40
4.3 Ensaio de formação de colônias.....	42
4.4 Ensaio de migração celular – método <i>Wound Healing</i>	44
4.5 Ensaio de migração – câmara de Boyden	45
4.6 Ensaio de Zimografia	46
4.7 Ensaio de Invasão.....	47
4.8 Ensaio de Adesão Celular	48
4.9 - Marcação com faloidina	49
4.10 Ensaio de Apoptose com Anexina V por Citometria de Fluxo.....	50
4.11 Ensaio de Fragmentação Nuclear.....	52
4.12 PCR tempo real	52
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Incidência do câncer

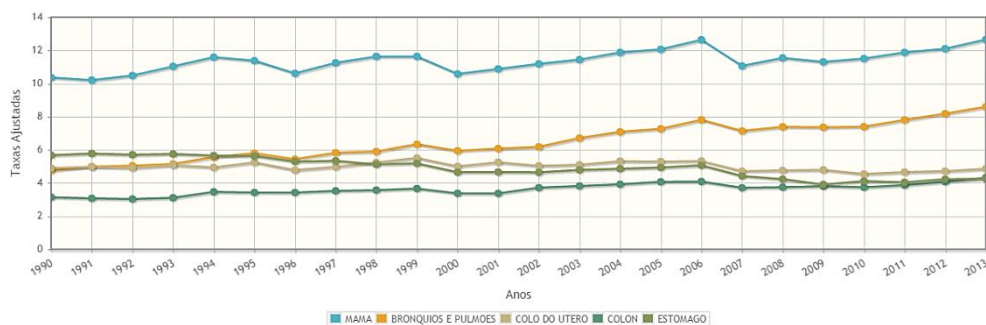
As mudanças demográficas que o Brasil e o mundo vêm sofrendo são consequências do processo de urbanização populacional, da industrialização e dos avanços da ciência e da tecnologia. Esse processo associado à transformação na qualidade de vida da sociedade trouxe uma alteração importante no perfil de morbimortalidade, diminuindo a ocorrência das doenças infectocontagiosas e aumentando a incidência das doenças crônico-degenerativas, como o câncer (BRASIL, 2016b).

Em 2012 cerca de 14 milhões de novos casos e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer ocorreram em todo o mundo. Para as próximas duas décadas é esperado um aumento de 70% no número de novos casos no mundo (TORRE et al., 2015; WORD HEALTH ORGANIZATION, 2016). No Brasil, a estimativa para os anos de 2016/2017, aponta para a ocorrência de aproximadamente 596 mil novos casos de câncer, deste total, 295.200 serão novos casos para homens e 300.870 para mulheres. Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide, quando não considerado os tumores de pele do tipo não melanoma (BRASIL, 2016d).

1.1.1 Incidência do Câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo. Em 2012 foram 1,7 milhões de novos casos e 521.900 mortes por câncer de mama em todo o mundo (TORRE et al., 2015). No Brasil, a estimativa para o ano de 2016/2017 é de 57.960 novos casos (BRASIL, 2016d). A figura 1 apresenta a taxa de mortalidade de mulheres no Brasil de 1979 a 2013 para os cinco tipos de cânceres mais incidentes nas mulheres.

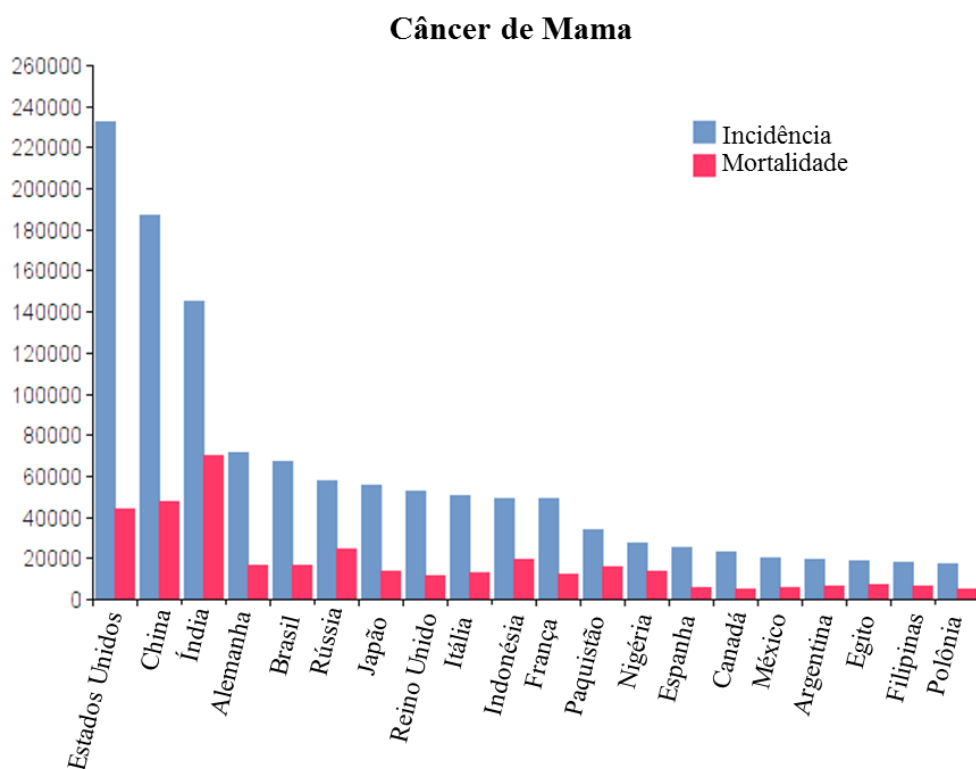
Figura 1 - Taxas de mortalidade dos cinco tipos de cânceres mais frequentes em 2013, ajustadas por idade a cada 100 mil mulheres, entre 1990 e 2013 no Brasil*



*Extraído de (BRASIL, 2016a) <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>

A estabilidade da taxa de mortalidade dos últimos anos deve-se, a detecção precoce do tumor e início rápido do tratamento o que aumenta as chances de cura (FREITAS-JUNIOR et al., 2012). Apesar da tendência de estabilização das taxas nos últimos anos, o câncer de mama é o tipo mais incidente e o que causa maior mortalidade entre as mulheres brasileiras. E de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) e com os dados de incidência e mortalidade do câncer de mama, disponibilizados pelo GLOBOCAN de 2012, o Brasil encontra-se em 5º lugar no ranking mundial (figura 2). Esses dados reforçam a necessidade de planejamento de ações e programas de controle do câncer de mama.

Figura 2 - Ranking mundial das taxas de incidência e mortalidade por câncer de mama em mulheres em 2012.*



*Extraído e Modificado de http://globocan.iarc.fr/Pages/bar_site_sel.aspx

1.2 Câncer

O câncer é um termo utilizado para doenças em que células anormais se dividem sem controle e são capazes de invadir outros tecidos através dos sistemas sanguíneo e linfático (NCI, 2016). As causas do câncer são diversas e estão relacionadas a fatores genéticos, estilo de vida e exposição a diferentes tipos de agentes químicos, físicos e biológicos. O envelhecimento é outro fator fundamental para o desenvolvimento de câncer, pois os mecanismos de reparação celular vão perdendo sua eficácia ao longo do tempo. Esses

fatores podem agir conjuntamente ou em sequência para iniciar ou promover o câncer (BRASIL, 2016c; WORD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

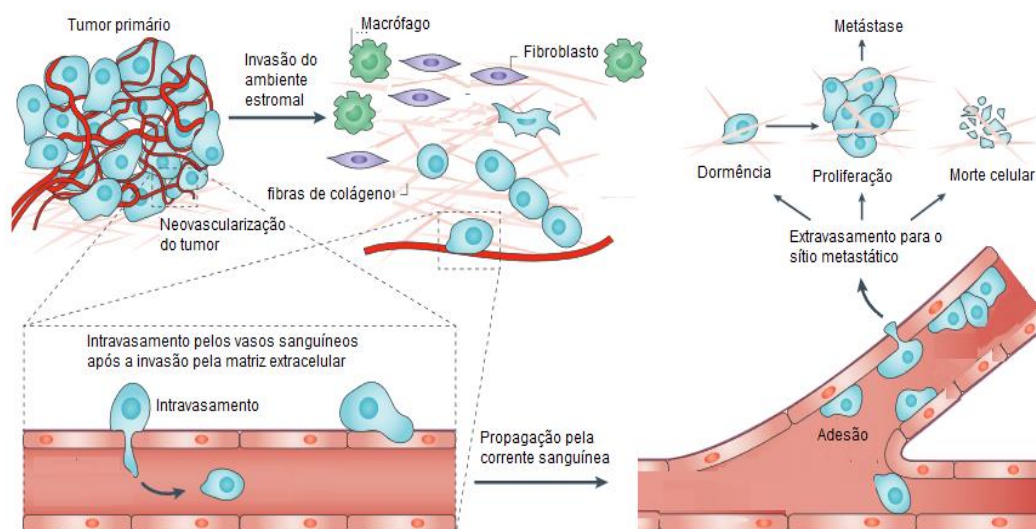
O processo no qual uma célula normal adquire características de uma célula tumoral é consequência de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos, como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes e inativação de genes responsáveis pela apoptose (PEDRAZA-FARINA, 2006). Estes eventos levam a uma perda do controle do ciclo celular e permitem o acúmulo de erros no DNA das células em divisão (STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009). As células tumorais são capazes de fornecer seus próprios sinais de crescimento, ignorar os sinais inibitórios de crescimento, evitar a morte celular, replicar-se sem limites, promover a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e invadir outros tecidos através de membranas basais e capilares. Além disso, o sistema imune não consegue eliminar as células tumorais devido aos efeitos imunossupressores mediados por essas células (BHUTIA; MAITI, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011). As células de todos os tumores malignos possuem potencial de invasão e metástase, porém cada neoplasia apresenta características clínicas e biológicas específicas (CAIXEIRO et al., 2014).

Do ponto de vista clínico, as metástases são consideradas um dos mais importantes estágios do tumor, uma vez que correspondem a mais de 90% das causas de mortes por câncer (MEHLEN; PUISIEUX, 2006). A metástase é o processo pelo qual algumas células tumorais se despreendem do tumor primário, entram na corrente sanguínea ou linfática e são capazes de estabelecer novas colônias de células tumorais em órgãos distantes, dando origem a um tumor secundário (BACAC; STAMENKOVIC, 2008).

As etapas envolvidas na cascata metastática são complexas e estão representadas na figura 3. As interações das células do tumor primário com o microambiente estromal, incluindo células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e proteínas da matriz extracelular, contribuem para a formação de vasos sanguíneos e linfáticos que irão irrigar e suprir as necessidades do tumor, processo denominado angiogênese (REYMOND; D'AGUA; RIDLEY, 2013). As células metastáticas do tumor primário sofrem uma série de alterações morfológicas e moleculares que resultam na perda da polaridade celular, diminuição do contato célula-célula e aquisição de motilidade. Essas alterações favorecem seu despreendimento do tumor primário (GOMES et al., 2011; VERNON; LABONNE, 2004). Para dar continuidade ao processo metastático, as células tumorais precisam se aderir a componentes da matriz extracelular como colágeno, fibronectina, laminina e degradar a matriz extracelular através da ação das metaloproteinases de matriz (MMP). Após este

processo, as células tumorais são capazes de migrar e invadir o estroma circundante e penetram nas vias de circulação mais próximas, pelo processo de intravasamento. Apesar de todas as adversidades encontradas as células metastáticas sobrevivem e se propagam pela corrente sanguínea, onde podem se aderir ao tecido endotelial de vasos sanguíneos de órgãos distantes do tumor primário e extravasar para este novo tecido, e então entrar em um estado de dormência ou se proliferar e formar um novo tumor (BACAC; STAMENKOVIC, 2008; REYMOND et al., 2013; SHIBUE; WEINBERG, 2011).

Figura 3 - Disseminação da célula tumoral e formação de metástase. A metástase é o processo pelo qual algumas células tumorais se desprezem do tumor primário, entram na corrente sanguínea ou linfática e são capazes de estabelecer novas colônias de células tumorais em órgãos distantes, dando origem a um tumor secundário.*



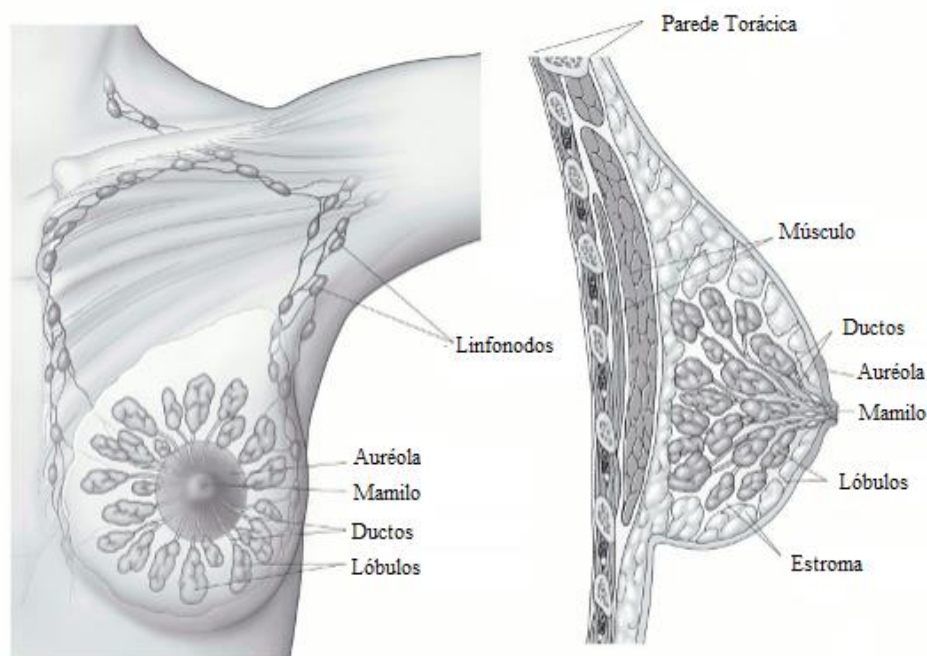
*Extraído e modificado de (REYMOND et al., 2013).

1.3 Câncer de Mama

1.3.1 Anatomia da mama

A mama feminina é composta por lóbulos (glândulas produtoras de leite), por ductos (pequenos tubos que transportam o leite dos lobos ao mamilo) e por estroma (tecido adiposo e conjuntivo que envolve os ductos e lóbulos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos) (figura 4). A pele, a auréola, o tecido subcutâneo e o parênquima mamário são drenados por vasos linfáticos (ACS, 2016).

Figura 4 - Anatomia da mama feminina. A mama feminina é composta lóbulos, ductos e por tecido adiposo e conjuntivo que envolve os ductos e lóbulos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos. A pele, mamilo, auréola, o tecido subcutâneo e o parênquima mamário são drenados por vasos linfáticos.*



*Extraído e modificado de ACS, 2016.

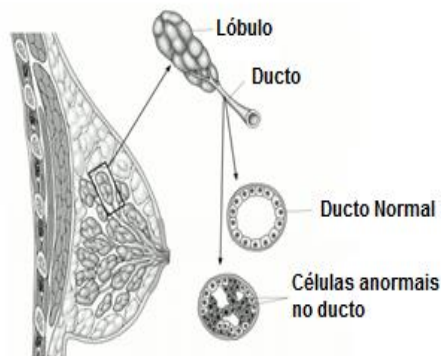
1.3.2 Tipos de Câncer de mama

O câncer de mama é uma doença complexa, de alta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica. Tumores de mama com histologia e clínica semelhantes, podem apresentar diferentes prognósticos e diferentes respostas terapêuticas. É importante ressaltar que até 80% dos tumores mamários são alterações benignas e que não aumentam significativamente o risco para desenvolvimento do câncer de mama. Seu diagnóstico diferencial é amplo, envolvendo os cistos mamários, fibroadenomas, papilomas, lipomas, hamartomas, adenomas, entre outros (GURAY; SAHIN, 2006; HARTMANN; GHOSH, 2007; SANTEN; MANSEL, 2005).

Os carcinomas de mama, na sua maioria, são originados no epitélio dos lóbulos e ductos da glândula mamária (figura 5). Esses subtipos ductal e lobular podem apresentar-se tanto na forma de carcinoma *in situ*, no qual o tumor não possui características invasivas e permanece confinado ao tecido mamário, quanto invasivo, invadindo os tecidos adjacentes e disseminando-se para outros órgãos (YODER; WILKINSON; MASSOLL, 2007).

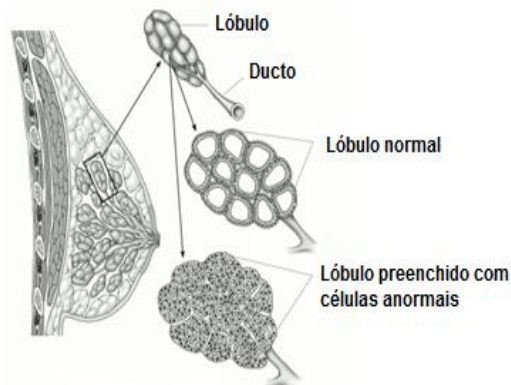
Figura 5 - Principais tipos de carcinoma de mama. A maioria dos carcinomas de mama são originados no epitélio dos ductos (A) e lóbulos (B).*

A



Carcinoma Ductal *in situ*

B



Carcinoma Lobular *in situ*

*Extraído e modificado de ACS, 2016.

Os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama podem estar relacionados com a idade avançada da mulher, menarca precoce, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal, alimentação, histórico familiar, entre muitos outros (CUI et al., 2009; DE WAARD; THIJSEN, 2005; MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000).

Para classificar pacientes com câncer de mama é utilizado no geral, uma variedade de fatores clínicos e patológicos a fim de avaliar o prognóstico e determinar a terapia adequada. Dentre os fatores avaliados incluem a idade do paciente, estado linfonodal regional, tamanho do tumor, tipo e graus histológicos, estadiamento da doença, entre outros. (CIANFROCCA; GRADISHAR, 2009; WEIGEL; DOWSETT, 2010). Nas últimas décadas, várias técnicas moleculares, particularmente a expressão gênica, têm sido cada vez mais utilizadas para ajudar na classificação do câncer de mama. Perou et al. (2000) analisaram amostras de pacientes, utilizando a técnica de expressão gênica, representando 8.102 genes humanos e demonstraram que a diferença fenotípica dos tumores de mama estava associada a uma diversidade na expressão gênica. Em complemento a este trabalho, Sorlie et al. (2001) realizaram experimentos com 78 carcinomas, três fibroadenomas e quatro tecidos mamários normais, com a mesma estratégia para ratificar os achados anteriores. Estes estudos contribuíram para a classificação molecular do carcinoma de mama, dividindo os grupos em luminais A e B, HER-2 e basal (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001).

O subtipo molecular luminal A apresenta receptores de estrogênio (RE), pode ou não apresentar receptores de progesterona (RP) e é negativo para receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2). Tumores com este perfil molecular apresentam baixo grau histológico e bom prognóstico. O subtipo luminal B possui o mesmo padrão de expressão de RE e do RP do subtipo A, porém pode ser positivo para a expressão de HER-2, além disso, possui maior índice de proliferação celular e um pior prognóstico, quando comparado ao luminal A. O subtipo HER-2 apresenta uma expressão positiva para HER-2 e é negativo para receptores hormonais como RE e RP. Os tumores mamários que expressam HER-2 apresentam um comportamento biológico agressivo, o que resulta em altas taxas de recorrência após o tratamento inicial, uma curta sobrevida livre de doença e um pior prognóstico (BRENTON et al., 2005; SCHNITT, 2010).

O subtipo basal representa um grupo diverso e heterogêneo de tumores que, por definição, não expressam RE, RP e HER-2. Essas características fizeram com que estes tumores fossem conhecidos como “triplo-negativos”. A maioria dos tumores classificados como triplo negativo possui um pior prognóstico comparado a outros subtipos de tumores, pois apresentam maior risco de recorrência no período de três anos, maiores taxas de mortalidade e é altamente metastático, com disseminação para órgãos sólidos como fígado, pulmão e cérebro. Portanto, por não possuir receptores específicos para uma terapia-alvo eficaz, os tumores de mama triplo negativo ainda representam um grande desafio para o desenvolvimento de tratamentos e fármacos específicos para essa linhagem (ABRAMSON et al., 2015; MAYER et al., 2014; RAKHA; ELLIS, 2009).

1.3.3 Tratamentos para o câncer de mama

O tratamento varia de acordo com o estágio da doença, suas características biológicas, bem como das condições do paciente. Quando a doença é diagnosticada no início, o tratamento tem maior potencial curativo, porém quando há evidências de metástases, o tratamento tem como objetivo prolongar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida. O tratamento para o câncer de mama, bem como para outros tipos de cânceres, pode ser dividido em local ou sistêmico. O tratamento local é realizado por cirurgia e radioterapia. No câncer de mama a cirurgia é o tratamento mais comum, podendo ser conservadora onde é retirado apenas o tumor ou mastectomia total, que é a retirada de todo o tecido mamário e também dos gânglios linfáticos axilares. A radioterapia é um tratamento que utiliza aparelhos de raios x, raios gama e feixes de elétrons que ao interagirem com os tecidos podem promover a morte celular por diversos mecanismos. A radioterapia geralmente é feita após uma cirurgia

conservadora da mama para eliminar as células tumorais que possam ainda ter ficado depois da cirurgia (BRASIL, 2016e; UK, 2016).

Já o tratamento sistêmico é feito por terapia hormonal e quimioterapia (BRASIL, 2016e; SHAPIRO; RECHT, 2001). A terapia hormonal atua somente em células que expressam receptores hormonais e tem demonstrado melhorar a sobrevida livre da doença, diminuindo o risco de recorrência e mortalidade. O tamoxifeno é um dos fármacos mais utilizados na prática clínica com ação antagonista aos RE no tecido mamário, podendo ser utilizado em pacientes na pré e pós-menopausa. Os anti-estrogênicos e inibidores de aromatase também são utilizados na terapia hormonal. (CRONIN-FENTON; DAMKIER; LASH, 2014; DROOG et al., 2013). A terapia dirigida também faz parte do tratamento para alguns subtipos de câncer de mama, como HER-2 que não expressa receptores hormonais. Para esse subtipo são utilizados anticorpos monoclonais humanizados específicos, como o trastuzumabe (BRAND et al., 2006; CONSTANTINIDOU; SMITH, 2011)

A quimioterapia consiste na utilização de fármacos com o objetivo de eliminar ou controlar as células tumorais. Para o câncer de mama a quimioterapia é constituída, geralmente, por uma associação de fármacos que podem ser administrados via oral ou intravenosa, podendo ser utilizada em combinação com a cirurgia e a radioterapia. Os quimioterápicos mais utilizados para o tratamento do câncer de mama incluem as antraciclinas e taxanos (MORENO-ASPITIA; PEREZ, 2009). Os agentes de platina, a capecitabina, entre outros quimioterápicos também são utilizados para o tratamento do câncer de mama. Uma característica comum a maioria dos quimioterápicos é resistência celular, ou seja, as células tumorais podem se tornar resistentes a eles. Ainda, os quimioterápicos não atuam somente sobre as células tumorais, as células normais que se renovam constantemente, como células da medula óssea, dos pelos e a mucosa do tubo digestivo, também são afetadas pela ação dos quimioterápicos caracterizando os indesejáveis efeitos colaterais do tratamento, tais como a perda de cabelo, náuseas, vômitos, fadiga, entre outros. Esses efeitos podem ser tratados sintomaticamente, mas em alguns casos, podem ser muito tóxicos para pacientes em estágios avançados do câncer. Além disso, os quimioterápicos não são capazes de erradicar todas as células neoplásicas do tumor e destroem apenas uma proporção das células que foram expostas ao tratamento (CHAKRABORTY, 2007; VIDAL et al., 2014).

1.4 Complexos inorgânicos a base de metais com atividade antitumoral

O desenvolvimento de antitumorais a base de metais iniciou-se com a descoberta da atividade antitumoral da cis-diaminodicloroplatina(II), conhecida como

cisplatina. Suas propriedades citotóxicas foram descobertas por Rosenberg e colaboradores em 1964, enquanto investigavam os efeitos de um campo elétrico na proliferação da bactéria *Escherichia coli* em solução de cloreto de amônio (NH_4Cl), sob uma corrente produzida por eletrodos de platina. Durante o experimento, observou-se que as bactérias apresentavam um crescimento irregular e filamentosos, e que sua divisão celular foi interrompida. Esse efeito foi então atribuído a complexos possivelmente formados pela reação entre a platina dos eletrodos e o NH_4Cl da solução, em presença da corrente elétrica aplicada e luz. Dentre os complexos possivelmente formados na reação, a cisplatina apresentou melhor atividade antitumoral (PIZARRO; SADLER, 2009).

A cisplatina entrou em testes clínicos de fase I em 1971 e foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1978 com o nome comercial de Platinol®. Atualmente a cisplatina ainda é um dos melhores fármacos antitumorais e desempenha um papel importante em alguns tratamentos de câncer, como de mama, ovário, cabeça, pescoço, câncer de bexiga, câncer cervical, melanoma e linfomas. Acredita-se que seu principal mecanismo é ligar-se ao DNA da célula tumoral, interferindo no processo de divisão celular, levando a apoptose. Apesar de sua alta eficácia, os efeitos colaterais como nefrotoxicidade, neurotoxicidade e a resistência celular, representam uma limitação para seu uso clínico (CIARIMBOLI, 2012; FLOREA; BUSSELBERG, 2011). Muitos fatores têm sido atribuídos à resistência celular adquirida à cisplatina, entre eles a ocorrência de reparo no DNA, diminuição do acúmulo e aumento do efluxo na célula e a desativação do fármaco por biomoléculas presentes no plasma, como a cisteína, glutatona e albumina, que possuem a capacidade de se ligar a até 90% da cisplatina (CEPEDA et al., 2007; FUERTES; ALONSO; PEREZ, 2003). Essas limitações da cisplatina vêm motivando pesquisas com novos complexos, para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais que sejam capazes de matar ou inibir seletivamente as células tumorais, deixar as células normais intactas e causar menos efeitos adversos.

1.4.1 Complexos de Rutênio com atividade antitumoral

Nas últimas décadas, muitos agentes de rutênio foram sintetizados e testados quanto às propriedades antitumorais (BERGAMO et al., 2012). O rutênio possui algumas propriedades únicas que podem justificar seu potencial antitumoral como: a sua geometria de coordenação octaédrica em contraste com a geometria quadrado planar de complexos de platina; a acessibilidade aos estados de oxidação em condições fisiológicas e sua capacidade de imitar o ferro na ligação a muitas biomoléculas, incluindo a transferrina e albumina

(JAKUPEC et al., 2008). A albumina e transferrina são proteínas utilizadas pelo organismo humano para solubilizar e transportar o ferro, reduzindo assim a sua toxicidade. As células de rápida divisão, como por exemplo, as células tumorais, possuem uma maior necessidade de ferro, com isso, aumentam o número de receptores de transferrina localizados em suas superfícies, sequestrando mais ferro circulante. Essa propriedade faz com que o rutênio seja menos tóxico para as células não tumorais (ALLARDYCE; DYSON, 2001).

Atualmente, há dois complexos de rutênio em fase de testes clínicos, como potenciais fármacos antitumorais: o *Imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate* (NAMI-A), eficaz contra tumores sólidos de metástase pulmonar, e o fármaco *Indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)]* (KP1019) com atividade promissora contra células de tumores colorretal (HARTINGER et al., 2006; RADEMAKER-LAKHAI et al., 2004).

Portanto, estudos com complexos metálicos que apresentam potencial terapêutico para regressão tumoral e atuam sobre as vias alteradas em células tumorais como a de migração, de invasão, adesão e de proliferação, podem levar a descoberta de um novo modelo de fármaco antitumoral.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste projeto foi avaliar quatro novos complexos de rutênio e selecionar dentre estes o melhor complexo para avaliação dos possíveis mecanismos de ação antitumoral e antimetastático, através de estudos *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Por meio de uma triagem, avaliar o efeito citotóxico dos complexos pelo método do MTT em células tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF-7 e não tumorais de mama MCF-10A.

- Avaliar a capacidade dos complexos em modificar a morfologia das células tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF-7 e não tumorais de mama MCF-10A, através do ensaio de morfologia celular.

- Determinar o complexo mais eficaz em inibir a proliferação e alterar significativamente a morfologia das células destas linhagens definindo as concentrações a serem utilizadas nos próximos experimentos *in vitro*;

- Avaliar, através dos ensaios *in vitro* de formação de colônias, migração celular, invasão celular e adesão celular, o efeito do complexo selecionado em inibir os passos da cascata metastática na linhagem tumoral de mama triplo negativa MDA-MB-231;

- Avaliar a inibição de MMP, envolvidas no processo de migração e invasão celular, através do ensaio de zimografia.

- Avaliar o potencial de indução da apoptose do complexo selecionado na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 e não tumoral de mama MCF-10A, através do ensaio *in vitro* de apoptose com anexinaV e PCR em tempo real. E também avaliar a fragmentação nuclear induzida pelo complexo selecionado na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, através do ensaio de fragmentação nuclear.

- Avaliar a capacidade do complexo selecionado em modificar o citoesqueleto das células tumorais de mama MDA-MB-231, através do ensaio de marcação com faloidina.

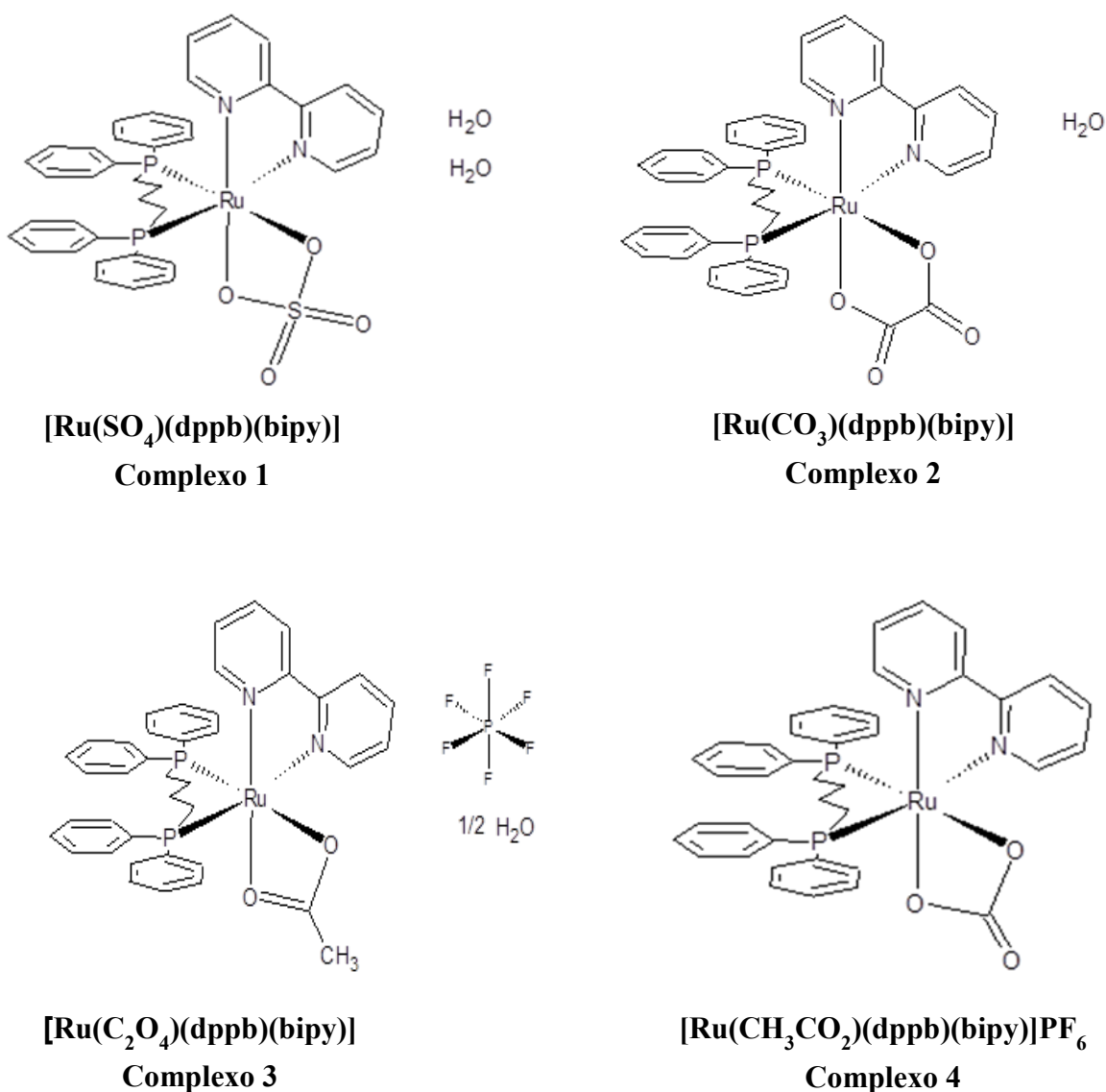
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Síntese dos complexos

As sínteses dos complexos de rutênio utilizados neste projeto foram realizadas e disponibilizadas pelo Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos do Departamento de Química (LERCI-DQ) da UFSCar, sob a supervisão do prof. Dr. Alzir Azevedo Batista. Os complexos de rutênio utilizados neste projeto possuem em suas estruturas ligantes bifosfina, bipyridina e ligante sulfato (**complexo 1**), ligante carbonato (**complexo 2**), ligante oxalato (**complexo 3**) e ligante acetato (**complexo 4**). As estruturas dos complexos estão representadas na figura 6.

Figura 6 - Estruturas dos complexos de rutênio.



3.2 Métodos

3.2.1 Cultura celular

As células foram obtidas do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) sob responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti. As células da linhagem tumoral de mama humano triplo negativa MDA-MB-231, foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contendo penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 mg/ml) e L-glutamina (2 mM) e adicionado 10% de soro fetal bovino (FBS). As células tumorais de mama humano da linhagem MCF-7, foram cultivadas em meio de cultura RPMI adicionado 10% FBS. As células não tumorais de mama humano da linhagem MCF-10A, foram cultivadas em meio DMEM/F12, adicionado de 5% de soro de cavalo, fator de crescimento epidermal humano (EGF) (20ng/ml), hidrocortisona (0.5µg/ml), insulina (10µg/ml) e 1% de penicilina/estreptomicina.

As linhagens celulares foram mantidas em um incubador úmido com 5% de CO₂ 95% de O₂ a 37°C para serem utilizadas nos ensaios ou cultivadas em garrafas de cultura. As passagens celulares foram realizadas por tripsinização das células, que ocorre por incubação com 1ml de solução de tripsina em estufa úmida com 5% de CO₂ e 95% de O₂ a 37°C durante 5 minutos. A reação foi parada com a adição de 1ml de meio de cultura e por centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos. As células foram homogeneizadas em meio de cultura e utilizadas para a finalidade desejada.

3.2.2 Proliferação celular

Para avaliar a citotoxicidade e os efeitos dos complexos estudados sobre a proliferação das células tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF-7 e não tumoral de mama MCF-10A, foi utilizado o reagente *3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT) conforme descrito anteriormente (MOSMANN, 1983). A redução do MTT é um método colorimétrico rápido, frequentemente utilizado para medir proliferação celular e citotoxicidade. Neste ensaio o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de formazan de coloração violeta que se acumula em compartimentos endossomais, sendo transportado para fora das células por exocitose (RISS et al., 2004).

Para o ensaio, as células foram preparadas na concentração de 1×10^4 células/200µl em meio apropriado e plaqueadas em placas de 96 poços estéreis. Estas foram mantidas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas em incubador úmido de cultura de células. No dia seguinte, o meio de cultura foi retirado dos poços e diferentes concentrações dos complexos

(1), (2), (3) e (4) foram adicionadas aos poços. As células foram incubadas por 24 horas nas mesmas condições descritas acima e a medida da proliferação celular foi realizada em comparação aos poços sem tratamento, apenas com meio de cultura. Após o tempo de incubação, o meio de cultura de cada poço foi retirado e uma solução contendo MTT (1mg/ml) foi adicionada (100µl/poço). As placas foram então mantidas durante 4 horas a 37°C e em seguida, os cristais formados foram diluídos em DMSO. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca (Labtech LT4000) em comprimento de onda de 540nm. O controle positivo utilizado nesse experimento foi a cisplatina, uma molécula com atividade antitumoral (MUNCHAUSEN, 1974). A determinação do IC₅₀ (concentração que inibe 50% da proliferação celular) dos complexos foi determinada a partir de uma curva de concentração utilizando o *software* GraphPad Prism®.

3.2.3 Morfologia Celular

Para analisar a capacidade dos complexos em modificar a morfologia das células tumorais de mama das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, e não tumorais de mama MCF-10A, as mesmas foram plaqueadas (1×10^5 células/poço) em placas de 12 poços e mantidas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas em estufa de cultura de células. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado dos poços e diferentes concentrações dos complexos (1), (2), (3) e (4) foram adicionadas. As células foram incubadas por 2 e 24 horas nas mesmas condições descritas acima e imagens foram capturadas com o auxílio de um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS 100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000 – 1.3Megapixels *Live Resolution*) em quatro campos diferentes por poço no aumento de 100X.

3.2.4 Formação de Colônias

Para avaliar a capacidade do complexo (4) em inibir a formação de colônias e/ou diminuir o tamanho das colônias as células tumorais da linhagem MDA-MB-231 foram plaqueadas (3×10^2) em placas de Petri de 6cm e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas em estufa de cultura de células. Após o período, foram adicionadas as concentrações de 2,5, 5, 10 e 20µM do complexo (4) e as células foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente por um período de 2 horas. Após o período, o meio foi removido, as células lavadas delicadamente com tampão fosfato salina (PBS) e posteriormente foi adicionado o meio de cultura com 10% de FBS. As células foram novamente incubadas na mesma condição por 10 dias. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e as células fixadas com uma solução de metanol e ácido acético (3:1) durante cinco minutos e em seguida, coradas com

uma solução de metanol e cristal violeta a 5% por 30 minutos. O número de colônias e seu tamanho foram medidos com auxílio do *software* Image J.

3.2.5 Migração celular – *Wound Healing*

O ensaio de *wound healing* é muito utilizado para o estudo das características da migração celular, assim como para a validação de moléculas que podem interferir no processo migratório (YARROW et al., 2004). Células da linhagem MDA-MB-231 (1×10^5) foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C até a cultura atingir 100% de confluência. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira de 100µl e de uma régua, foi feita uma risca no centro de cada poço. Cuidadosamente, cada poço foi lavado com PBS para remover fragmentos celulares e células desaderidas da área riscada. Então, as células foram tratadas com as concentrações de 5, 10 e 20µM do complexo (4), exceto os controles que receberam meio fresco somente. Imagens foram capturadas nos tempos de 24 e 48 horas com o auxílio de um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS 100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000 – 1.3Megapixels Live Resolution) em dois campos diferentes por poço. A área de fechamento da risca pela migração celular foi medida através do *software* ImageJ e a porcentagem de fechamento foi calculada utilizando a seguinte equação descrita por (YUE et al., 2010). Onde, $A_{t=0h}$ é a medida da área da risca imediatamente após sua realização e $A_{t=\Delta h}$ é a medida da área da risca após 24 ou 48 horas de incubação com o complexo (4).

$$\% \text{ de fechamento} = \frac{(A_{t=0h} - A_{t=\Delta h})}{(A_{t=0h})} \times (100)$$

3.2.6 Migração Celular- Câmara de Boyden

O efeito do complexo (4) sobre a migração das células também foi avaliado pelo ensaio de câmara de Boyden. Neste ensaio foram utilizados insertos com membranas de polietileno tereftalato microporosas de 8µm (BD Biosciences), em placas de 24 poços. As células da linhagem tumoral de MDA-MB-231 foram então semeadas dentro dos insertos $0,5 \times 10^5$ em 350µl de meio sem adição de FBS e adicionado as concentrações de 5, 10 e 20µM do complexo (4). Nos poços da placa onde foram mergulhados os insertos, foi adicionado 750µl de meio de cultura com de 10% de FBS, o qual agirá como quimioatratante indutor da migração. O controle positivo foi feito sem adição do complexo e com FBS como

quimioatraente e controle negativo não foi adicionado o complexo e o FBS. As placas com os insertos foram incubadas por 22 horas a 37°C, 5% CO₂ e em seguida, as células que não migraram foram removidas do interior do inserto com auxílio de hastes flexíveis de algodão. As células que penetraram pelos poros e migraram foram fixadas em metanol (100%) e em seguida coradas com uma solução de azul de toluidina (1%) diluído em borato de sódio (1%). A membrana do inserto foi recortada e montada em uma lâmina histológica com auxílio de óleo de imersão. Com auxílio de um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) foi realizado a contagem manual das células que migraram pelos microporos da membrana.

3.2.7 Invasão em Matrigel

Para avaliar a capacidade do complexo (4) em inibir a invasão das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231, foram utilizados insertos com membranas microporosas de 8µm pré-tratados com matrigel (material que simula a matriz extracelular) do kit *BioCoat Matrigel Invasion Chambers* (BD Biosciences), em placas de 24 poços. Os insertos foram previamente hidratados com meio DMEM sem adição de FBS por 2 horas em ambiente úmido a 37°C. Posteriormente células da linhagem MDA-MB-231 ($0,5 \times 10^5$) foram plaqueadas dentro dos insertos em meio livre de FBS e adicionado concentrações de 5, 10 e 20µM do complexo (4). O meio DMEM 10% de FBS foi adicionado aos poços da placa onde foram mergulhados os insertos. O FBS irá atuar como quimioatraente para invasão das células tumorais. O controle positivo foi feito sem adição do complexo e com adição do FBS (quimioatraente) o negativo sem adição do complexo e sem adição de FBS. As placas foram mantidas em incubadora úmida com 5% de CO₂ a 37°C por 22 horas. Em seguida, as células que não invadiram pela matrigel no interior do inserto foram removidas com o auxílio de hastes flexíveis de algodão. As células que foram capazes de invadir através da camada de matrigel atingindo o outro lado da membrana do inserto foram fixadas com metanol por 5 minutos e coradas com solução de 1% de azul de toluidina. A membrana do inserto foi recortada e montada em uma lâmina histológica com auxílio de óleo de imersão. Com o auxílio de um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) foi realizado a contagem manual das células que invadiram a matrigel e atravessaram os poros da membrana.

3.2.8 Ensaio de Adesão Celular

Para analisar a capacidade do complexo (4) em inibir a adesão das células da linhagem MDA-MB-231 a quatro proteínas de adesão presentes na matriz extracelular (colágeno tipo I, fibronectina, laminina e vitronectina), foram utilizadas placas de 96 poços, preparadas com solução de 1µg/poço de vitronectina, 0,3 µg/poço de laminina ou

fibronectina, imobilizadas em tampão de adesão (20mM HEPES, 1mM de $MgSO_4$, 5mM de KCl e 150nM de NaCl em pH 7,35 e então adicionado 1mM de $MnCl_2$) *overnight* a 4°C. A solução de 10µg de colágeno tipo I foi imobilizada em uma solução de ácido acético (0,1%) *overnight* a 4°C. O bloqueio dos poços foi realizado com o tampão de adesão contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA) por 1 hora e em seguida, os poços foram lavados com 100µl de tampão de adesão. Após a preparação das placas com as soluções contendo as proteínas de adesão, as células da linhagem MDA-MB-231 (5×10^4) foram incubadas em microtubos com o complexo (4) nas concentrações de 5, 10, 20 e 40µM, por 30 minutos em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37°C e então semeadas nas placas previamente tratadas e incubadas nas mesmas condições por mais 1 hora. Em seguida as células não aderidas foram removidas cuidadosamente através de lavagem com 100µl de meio de cultura sem soro e as células aderidas fixadas com 100µl de etanol 70% por 10 minutos. Após a fixação as células foram coradas com cristal violeta 0,5% por 20 minutos e o excesso de corante foi removido por lavagem com PBS. As células coradas foram diluídas em 100µl de solução de 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) por 30 minutos e a leitura das placas foi realizada em leitora de microplacas (Labtech LT4000) a 595nm de comprimento de onda.

3.2.9 Zimografia

A técnica de zimografia é utilizada para verificar a presença de metaloproteínases de matriz (MMPs) em gel de poliacrilamida a 10% com adição de gelatina. Células da linhagem MDA-MB-231 (1×10^5) foram plaqueadas em placas de 12 poços e incubadas em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37°C até a cultura atingir 100% de confluência. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta e ponteira de 200µl, além de uma régua esterilizada, foi feita uma risca vertical no centro de cada poço. Imediatamente as células foram tratadas com as concentrações de 2,5, 5, 10 e 20 µM do complexo (4) em meio sem soro. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO_2 por 24 horas. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi removido e centrifugado a 1000rpm para a remoção de possíveis células ou restos celulares. Com auxílio do kit BCA® (Thermo) foi realizada a quantificação proteica para que a mesma quantidade de proteína pudesse ser aplicada em gel de SDS-PAGE 10%. Em cada poço foi adicionado 30µg de proteína. A corrida de eletroforese foi realizada a 70mV em cuba de eletroforese (BioRad) na geladeira. Ao fim da corrida o gel foi lavado duas vezes por 20 minutos em solução de lavagem contendo 2,5% triton-x e em seguida incubado por 22 horas em tampão de incubação (50mM tris, 5mM $CaCl_2$, 0,02% NaN_3 e 10mM $ZnCl_2$) a 37°C. Após a incubação o gel foi corado com corante *comassie blue* e em seguida utilizou-se

solução descorante (10% ácido acético, 40% metanol e 80% água) para visualização das bandas. Uma imagem do gel foi registrada com o auxílio do aparelho ChemiDoc (BioRad) e a quantificação das bandas foi realizada com o *software* Image Lab.

3.2.10 Ensaio de Apoptose com Anexina V por Citometria de Fluxo

A apoptose possui papel importante e crítico no desenvolvimento e homeostase em tecidos normais. É também um mecanismo de defesa, ativado sempre que ocorre uma invasão por agentes patogênicos, ou quando há uma lesão ao DNA da célula. A atividade apoptótica do complexo (4) sobre a linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 e não tumoral de mama MCF-10A foi analisada por citometria de fluxo utilizando o kit *PE - Annexin V Apoptosis Detection Kit* (BD Biosciences). As células foram plaqueadas (1×10^5) em placas de 12 poços e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. Em seguida foram tratadas com as concentrações de 5, 10, 20, 40 e 80µM do complexo (4), exceto os controles, por 3 horas. Logo em seguida a placa foi centrifugada a 2000rpm por 5 minutos a 4°C, os poços lavados com PBS e adicionado 400µl de tampão de ligação, proveniente do kit e diluído 1X. As células foram incubadas com 10µl de 7AAD e 10µl PE Anexina V por 15 minutos ao abrigo da luz e após o tempo de incubação foi removido o sobrenadante e adicionado aos poços 400µl tampão de ligação. As células foram então removidas dos poços com auxílio de um *cell scraper* e transferidas para tubos de citometria. As amostras foram analisadas no citômetro BD Accuri C6 e a fluorescência quantificada através do *software* CSampler.

3.2.11 Ensaio de fragmentação Nuclear

Para verificar se o complexo (4) induz a fragmentação nuclear, processo que ocorre durante a apoptose celular, as células tumorais de mama MDA-MB-231 foram plaqueadas (1×10^5 células/poço) em placas de 12 poços e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas em estufa de cultura de células. Após a incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações 20, 40, 60 e 70µM do complexo (4), durante 2 horas. Então, as células foram lavadas com PBS e, em seguida, fixadas com metanol durante 10 minutos. Depois de fixadas, as células foram coradas com 1µg/ml de 4',6- diamidino-2-phenylindole Dihydrochloride (DAPI) (Life Technologies), diluído em meio de cultura sem soro por 10 minutos e lavadas 3 vezes com PBS. As imagens foram capturadas com auxílio do microscópio automatizado ImageXpress® Micro XLS System (Molecular Devices). A estaurosporina (0,5µM) foi utilizada como controle positivo de condensação nuclear (GODARD et al., 1999) por 5 horas. Núcleos normais foram identificados como não

condensados, núcleos com cromatina dispersa e núcleos apoptóticos foram identificados como possuindo a cromatina condensada ou núcleos fragmentados (ZOU et al., 2012).

3.2.12 Marcação do citoesqueleto

Para examinar os efeitos do complexo (4) sobre a organização do citoesqueleto em células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231, foi utilizado o marcador Alexa 488 Fluor® *Phalloidin* específico para fibras F-actina. As células MDA-MB-231 foram plaqueadas (5×10^4 células/100 μ L) em placas de 96 poços e mantidas a 37°C, 5% de CO₂ durante 24 horas. No dia seguinte, as células foram tratadas com 10, 20 e 40 μ M do complexo (4) e incubadas por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, fixadas com 3,7% de paraformaldeído em PBS durante 30 minutos e permeabilizadas com 0,1% de TritonX-100 em PBS durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após esta etapa, foi feita a lavagem dos poços com PBS e adicionou-se 2% de BSA durante 30 minutos. Após a lavagem com PBS, foi adicionado o marcador Alexa 488 Fluor® *Phalloidin* durante 20 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e coradas com DAPI para marcação nuclear durante 10 minutos. As células foram lavadas novamente com PBS e imagens foram capturadas em microscópio automatizado ImageXpress® Micro System XLS (Molecular Devices).

3.2.13 PCR em tempo real

A regulação da apoptose é mediada pela atividade integrada de várias vias de sinalização, algumas atuam para induzir a morte e outras para promover a sobrevivência celular (DANIAL; KORSMEYER, 2004). A expressão de genes relacionados a apoptose foi verificada por PCR em tempo real. Para extração do RNA, as células (1×10^6 células/placa) foram semeadas em placas de Petri de 6cm e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. Após a incubação, as células foram tratadas com as concentrações de 20 e 40 μ M do complexo (4) durante 3 horas e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após este período, as células foram lisadas com 1ml de Trizol® (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante e transferidas para microtubos. Em seguida foram adicionados 200 μ l de clorofórmio e os microtubos foram homogeneizados por inversão e deixados no gelo por 2 minutos seguindo-se de centrifugação durante 15 minutos a 12.000rpm a 4°C. Este procedimento resultou em três fases: a fase aquosa onde está o RNA, a interface que contém as proteínas e por fim a fase com fenol/clorofórmio. Após a transferência da fase aquosa para um novo microtubo, foram adicionados 500 μ l de álcool isopropílico para precipitação do

RNA. Em seguida os microtubos foram incubados por 10 minutos no gelo e após a incubação foram centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C. O RNA foi então lavado com 1ml de etanol 75% e em seguida centrifugado por 10 minutos a 12.000rpm a 4°C. Após a centrifugação foi descartado o álcool e os tubos foram colocados em capela para evaporação do álcool. Após a evaporação completa do álcool o RNA foi dissolvido em 20µl de água ultrapura. Em seguida, as amostras de RNA foram então tratadas com DNase (Promega) para eliminar qualquer DNA contaminante e após o tratamento o material foi estocado em -80°C. A concentração e o grau de pureza do material foram estimados em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific) e o grau de pureza foi avaliado de acordo com a relação 260/280. O RNA total (1,5µg) foi reversamente transcrito em cDNA pelo uso do *kit Enhanced Avian First Strand Synthesis* (Sigma Aldrich). O cDNA foi estocado a -20°C até o momento do uso. Para reação de PCR em tempo real foram utilizados 12,5µl de SYBR® Green (Sigma Aldrich), 1µl de cada *primer* (500nM), 10µl de água e 0,5µl de cDNA. Os *primers* utilizados para amplificação dos genes relacionados a apoptose estão descritos na tabela 1. As condições da PCR foram ajustadas para cada par de *primer*, dependendo de sua temperatura de *melting* usando o equipamento CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Após a amplificação, análises da curva de *melting* foram realizadas entre 72- 95°C por monitoramento da fluorescência associada ao aumento da temperatura. Produtos específicos foram determinados como picos únicos em suas curvas de *melting*. O nível comparativo de expressão de cada condição foi calculado como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (método do $\Delta\Delta Ct$ 1), aonde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ amostra - ΔCt controle. Os valores de *Ct* das amostras e dos controles foram normalizados pela quantidade de β -actina (ΔCt do controle ou amostra = *Ct* do controle ou amostra - *Ct* β -actina do controle ou amostra). Os *primers Bax* (NM_001291428.1) e *Bcl-2* (NM_000633.2) foram desenhados e testados com auxílio do programa Genrunner (versão 5.0.63 Beta), com exceção do *primer da Caspase-3* (NM_004346.3) (TSUBOY et al., 2014).

Tabela 1 - *Primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real.

	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>
<i>Casp3*</i>	5'GTG CTA CAA TGC CCC TGG AT3'	5'GCC CAT TCA TTT ATT GCT TTC C3'
<i>Bax</i>	5'CAT CCA GGA TCG AGC AGG3'	5'CGA TGC GCT TGA GAC ACT C3
<i>Bcl-2</i>	5'GGT GGG AGG GAG GAA GAA T3'	5'GCA GAG GCA TCA CAT CGA C3'
<i>β-actina</i>	5'GAC GGC CAG GTC ATC ACC ATT G3'	5'AGC ACT GTG TTG GCG TAC AGG 3'

*CASP3 = Caspase-3;

3.3 Análise estatística

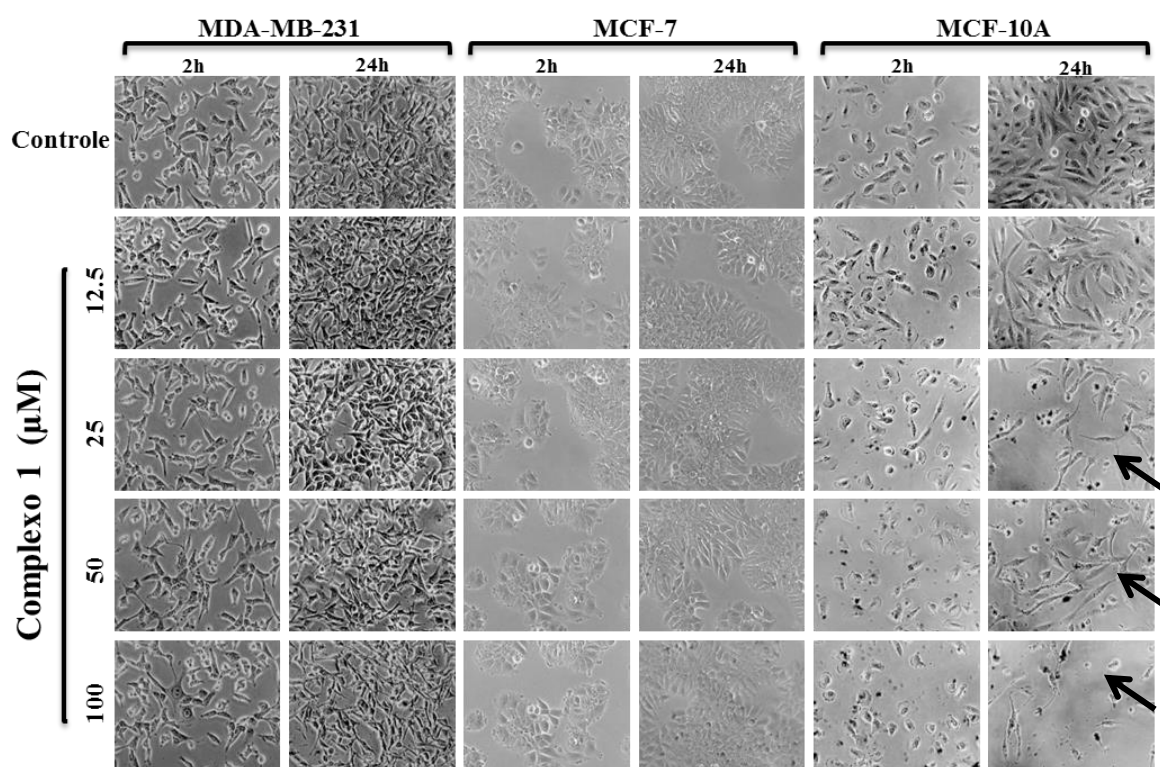
Cada experimento foi realizado em triplicata, independentemente, e repetido três vezes para garantir a confiabilidade dos dados. Os dados foram calculados com auxílio do programa Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp., Estados Unidos) e então comparados por de análise de variância One-way (ANOVA), seguida pelo pós teste de Tukey, com o auxílio do *software* de estatística GraphPad Prism® (versão 6.0).

4. RESULTADOS

4.1 Ensaio de Morfologia Celular.

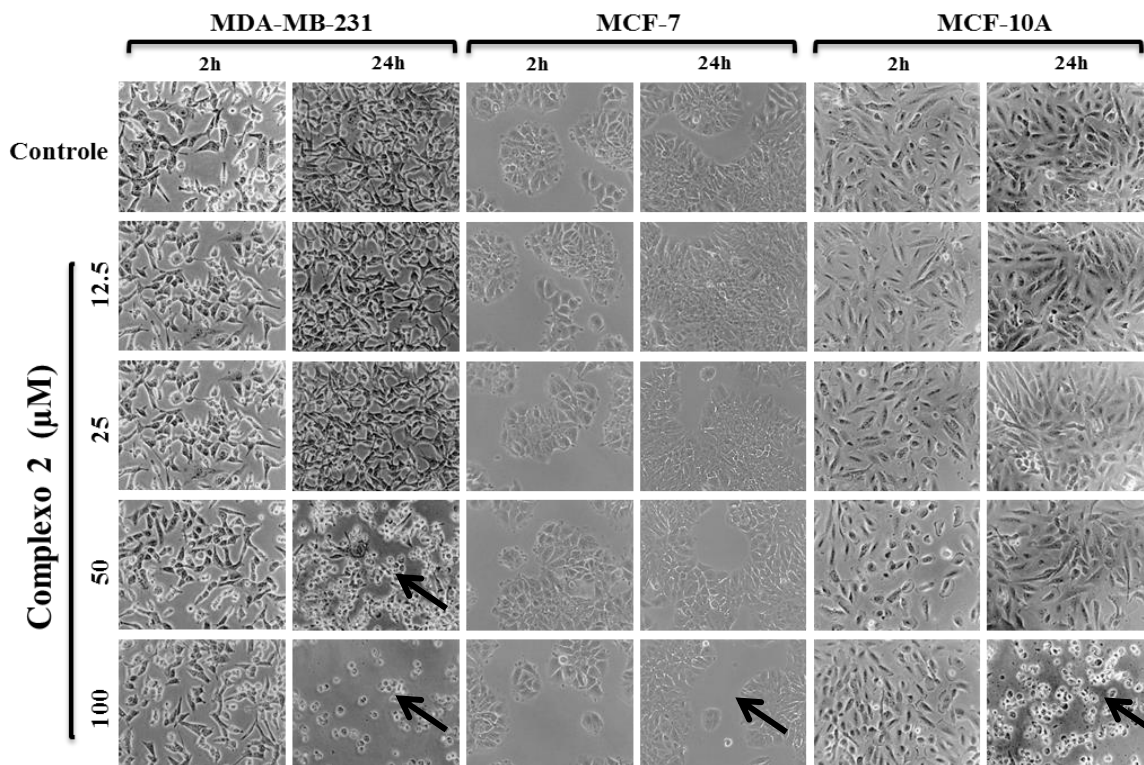
Para investigar as mudanças morfológicas que os complexos (1-4) podem promover nas células, as linhagens tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF-7 e a linhagem não tumoral de mama MCF-10A, foram tratadas com as concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 μ M e capturadas imagens através de uma câmera acoplada ao microscópio de luz para análise das imagens nos tempos de 2 e 24 horas.

Figura 7 - Efeito do complexo (1) na morfologia das células tumorais de mama MDA-MB-231, MCF-7 e não tumorais de mama MCF-10A. O experimento foi realizado em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas representativas (100X) de cada linhagem celular e as setas representam as alterações morfológicas promovidas pelo complexo (1).



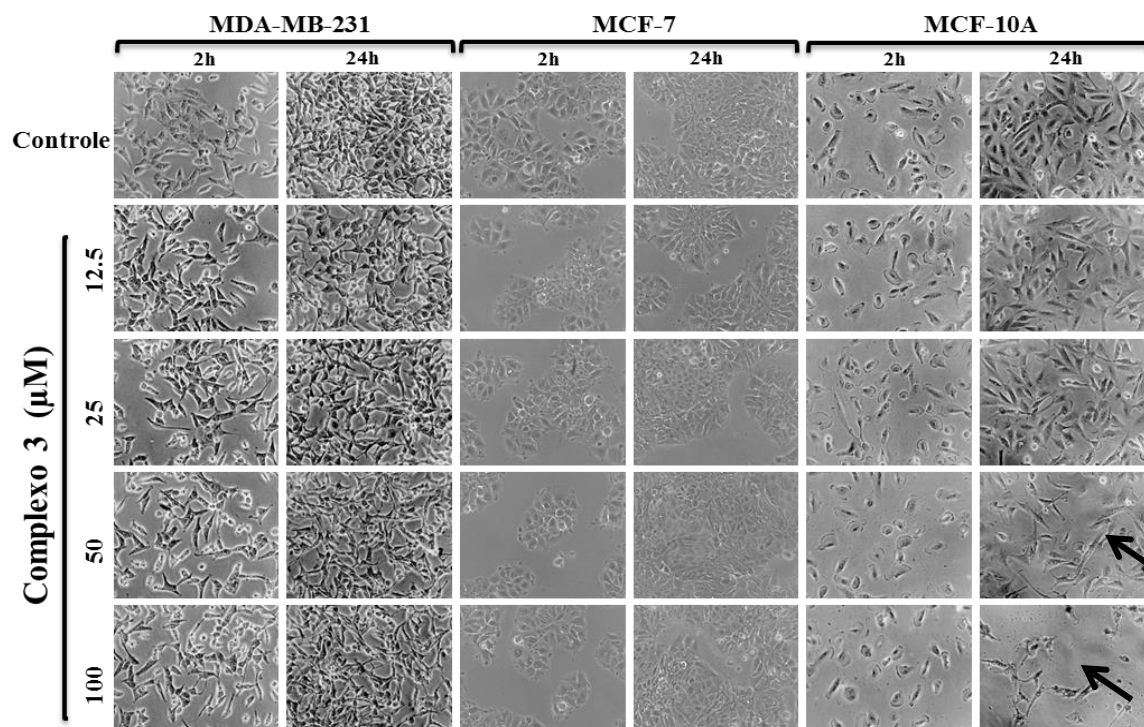
De acordo com os resultados o complexo (1) não alterou a morfologia das células das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 em nenhuma das concentrações e tempos de incubação testados. Já na linhagem MCF-10A, nas concentrações de 25, 50 e 100 μ M no tempo de 24 horas, podemos observar uma diminuição da densidade celular comparado aos controles sem tratamento (Figura 7).

Figura 8 - Efeito do complexo (2) na morfologia das células tumorais de mama MDA-MB-231, MCF - 7 e não tumorais de mama MCF-10A. O experimento foi realizado em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas representativas (100X) de cada linhagem celular e as setas representam as alterações morfológicas promovidas pelo complexo (2).



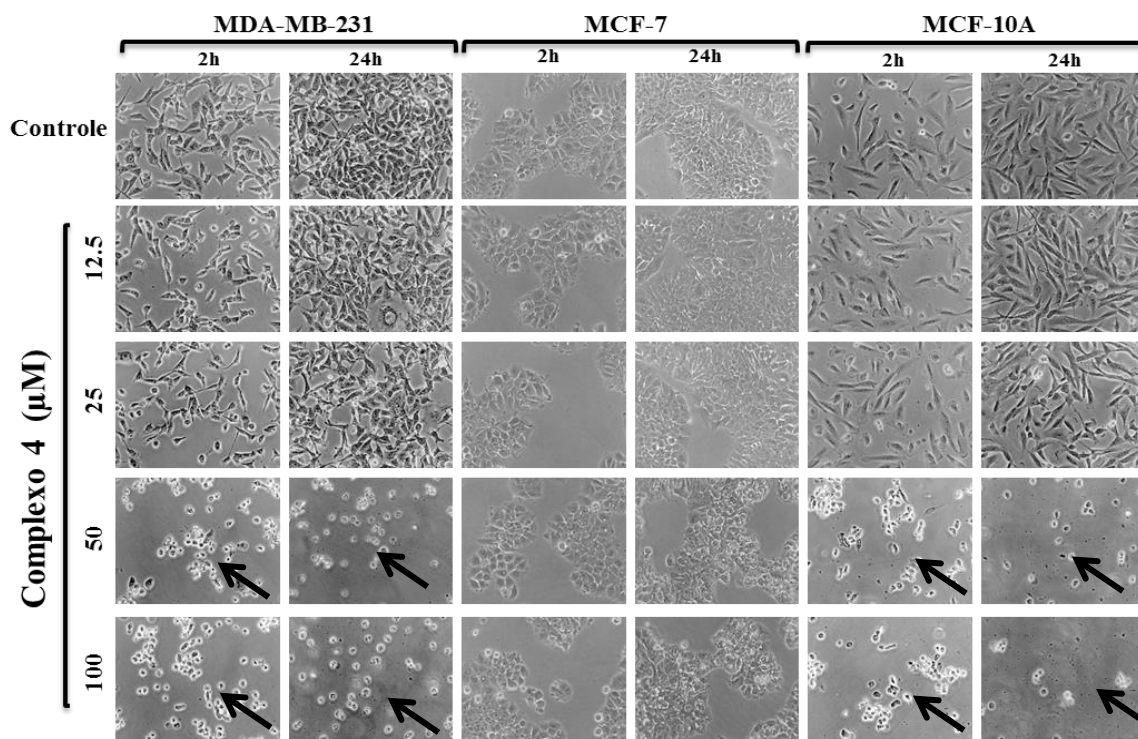
As células da linhagem MDA-MB-231 quando tratadas com o complexo (2) nas concentrações de 50 e 100μM no tempo de incubação de 24 horas, tiveram sua morfologia alterada, onde podemos observar as células em formato circular e parcialmente desaderidas. Na linhagem MCF-7, podemos observar no tempo de 24 horas na concentração de 100μM uma diminuição da densidade celular. Já na linhagem MCF-10A, podemos notar na concentração de 100μM no tempo de incubação de 24 horas as células em formato circular, quase que totalmente desaderidas e restos celulares (Figura 8).

Figura 9 - Efeito do complexo (3) na morfologia das células tumorais de mama MDA-MB-231, MCF - 7 e não tumorais de mama MCF-10A. O experimento foi realizado em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas representativas (100X) de cada linhagem celular e as setas indicam as alterações morfológicas promovidas pelo complexo (3).



O tratamento das células das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 com o complexo (3) não alterou a morfologia das células em nenhuma das concentrações e tempos de incubação testados. Já na linhagem MCF-10A, podemos observar nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M no tempo de incubação de 24 horas uma diminuição da densidade celular (Figura 9).

Figura 10 - Efeito do complexo (4) na morfologia das células tumorais de mama MDA-MB-231, MCF - 7 e não tumorais de mama MCF-10A. O experimento foi realizado em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas representativas (100X) de cada linhagem celular e as setas representam as alterações morfológicas promovidas pelo complexo (4).



O complexo (4) promoveu grandes alterações morfológicas nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A nas concentrações de 50 e 100 μ M em todos os tempos de incubação testados, onde podemos observar uma diminuição da densidade celular, células desaderidas e em formato circular. Já na linhagem MCF-7 o complexo (4) não alterou a morfologia das células em nenhuma das concentrações e tempos de incubação testados (Figura 10).

4.2 Ensaio de Proliferação Celular.

No presente trabalho, os efeitos citotóxicos e antiproliferativos dos complexos de rutênio em três linhagens de mama humano, MDA-MB-231 e MCF-7 linhagens tumorais de mama e MCF-10A não tumoral de mama, foram analisados pelo ensaio de MTT. Para investigar os efeitos citotóxicos e antiproliferativos dos complexos de rutênio, células tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF-7 e não tumoral mama de MCF-10A, foram tratadas com diferentes concentrações dos complexos (1-4), incubadas por 24 horas e a análise foi realizada pelo método de MTT.

Figura 11 - Efeito dos complexos (1-4) na proliferação celular das linhagens MDA-MB-231, MCF-10A e MCF-7, após 24 horas de incubação. O experimento foi realizado em triplicata. Gráfico do IC₅₀ complexo (1) (A). Gráfico do IC₅₀ complexo (2) (B). Gráfico do IC₅₀ complexo (3) (C). Gráfico do IC₅₀ complexo (4) (D).

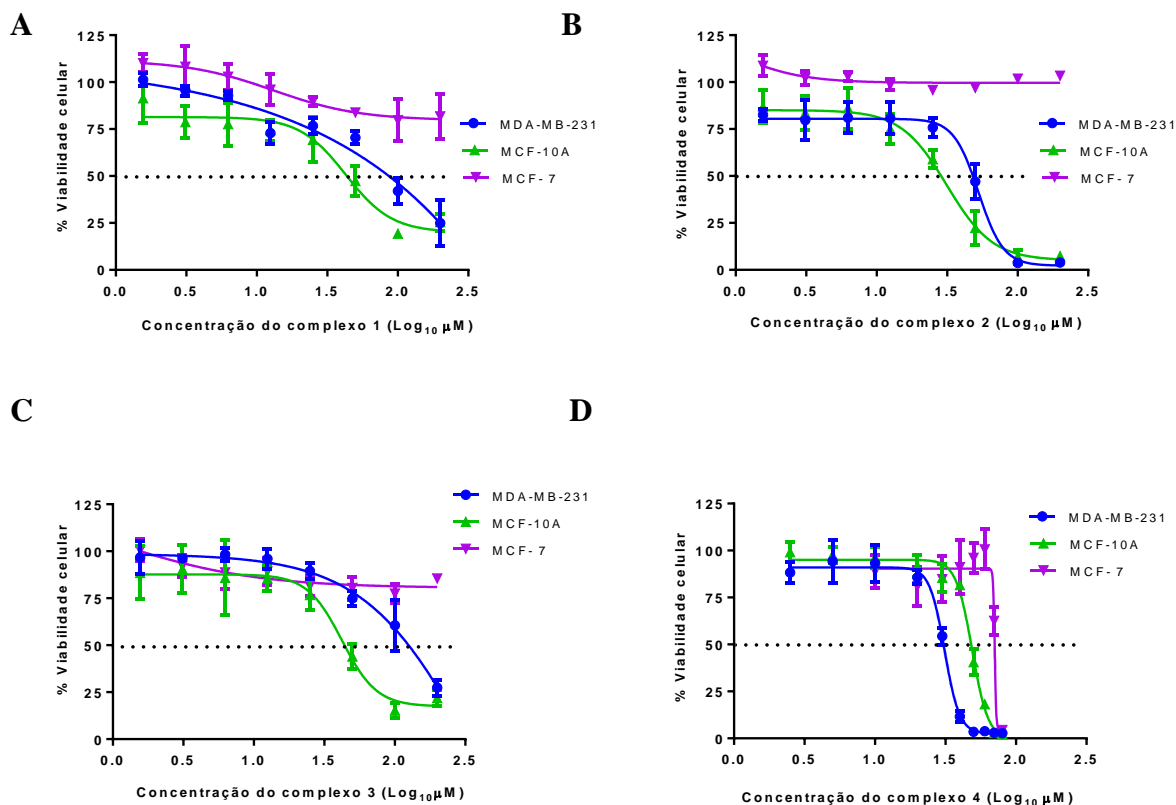


Tabela 2 - Valores de IC₅₀ dos complexos (1-4) nas linhagens MDA-MB-231, MCF7 e MCF-10A.

Tabela IC ₅₀ (μM) 24 horas			
Complexos	MDA-MB-231	MCF-10A	MCF-7
[Ru(SO ₄) (dppb)(bipy)] (1)	>200	42.75 ± 5.02	>200
[Ru(CO ₃) (dppb)(bipy)] (2)	52.74 ± 0.62	31.46 ± 1.06	>200
[Ru(C ₂ O ₄)(dppb)(bipy)] (3)	>200	42.18 ± 2.37	>200
[Ru(CH ₃ CO ₂)(dppb)(bipy)]PF ₆ (4)	31.16 ± 0.04	48.89 ± 0.09	>200

Como podemos observar na tabela 1, a inibição da proliferação dos complexos foi diversificada sobre as linhagens testadas. Os complexos (1) e (3) não inibiram a proliferação das células tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF-7, apresentando IC₅₀ > 200μM. Já para a linhagem não tumoral de mama MCF-10A, os complexos (1) e (3) foram capazes de inibir a proliferação dessas células com IC₅₀ de 42,75 e 42,18μM, respectivamente (Figura 11 A, C). Os complexos (2) e (4) também não inibiram a proliferação das células da linhagem tumoral de mama MCF-7, apresentando IC₅₀ > 200μM. Na linhagem tumoral de

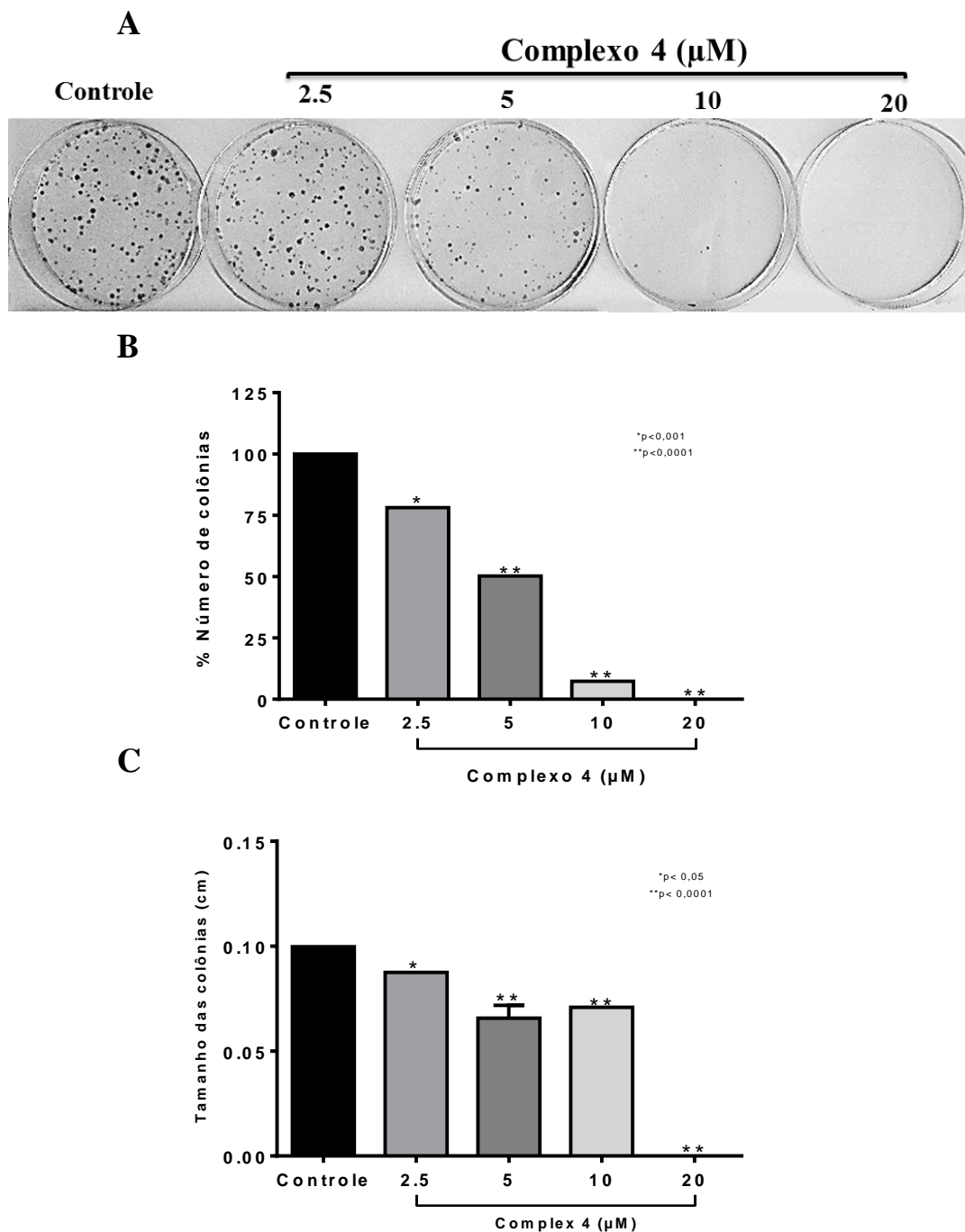
mama triplo negativa MDA-MB-231 o complexo (4) inibiu de forma mais eficaz a proliferação dessas células com IC_{50} de $31,16\mu M$ quando comparado com o complexo (2) que apresentou um IC_{50} de $52,74\mu M$. Já na linhagem não tumoral de mama MCF-10A, ao contrário do observado na linhagem MDA-MD-231, o complexo (4) apresentou um valor de IC_{50} maior $48,89\mu M$ em comparação com o complexo (3) com IC_{50} $31,46\mu M$ (Figura 11 B, D).

De acordo com os resultados, ao analisar a atividade dos quatros complexos testados, o composto (4) foi o complexo que apresentou maior citotoxicidade para a linhagem de mama triplo negativa MDA-MB-231. E para a linhagem não tumoral de mama MCF-10A em comparação com os outros complexos, o complexo (4) apresentou uma menor citotoxicidade, o que indica uma possível seletividade para células tumorais.

4.3 Ensaio de formação de colônias

O ensaio de formação de colônias é um ensaio *in vitro* de sobrevivência de células com base na capacidade das células individuais crescerem em colônias. É um ensaio padrão para determinar a morte celular reprodutiva após tratamento com radiação ionizante ou agentes quimioterápicos (BRASELMANN et al., 2015).

Figura 12 - Efeito do complexo (4) sobre a formação de colônias em células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231. O experimento foi realizado em triplicata. A imagem corresponde a uma das triplicatas representativa (A); Gráfico de porcentagem do número de colônias (B); Gráfico do tamanho das colônias (C). Os resultados foram comparados com os controles sem tratamento.



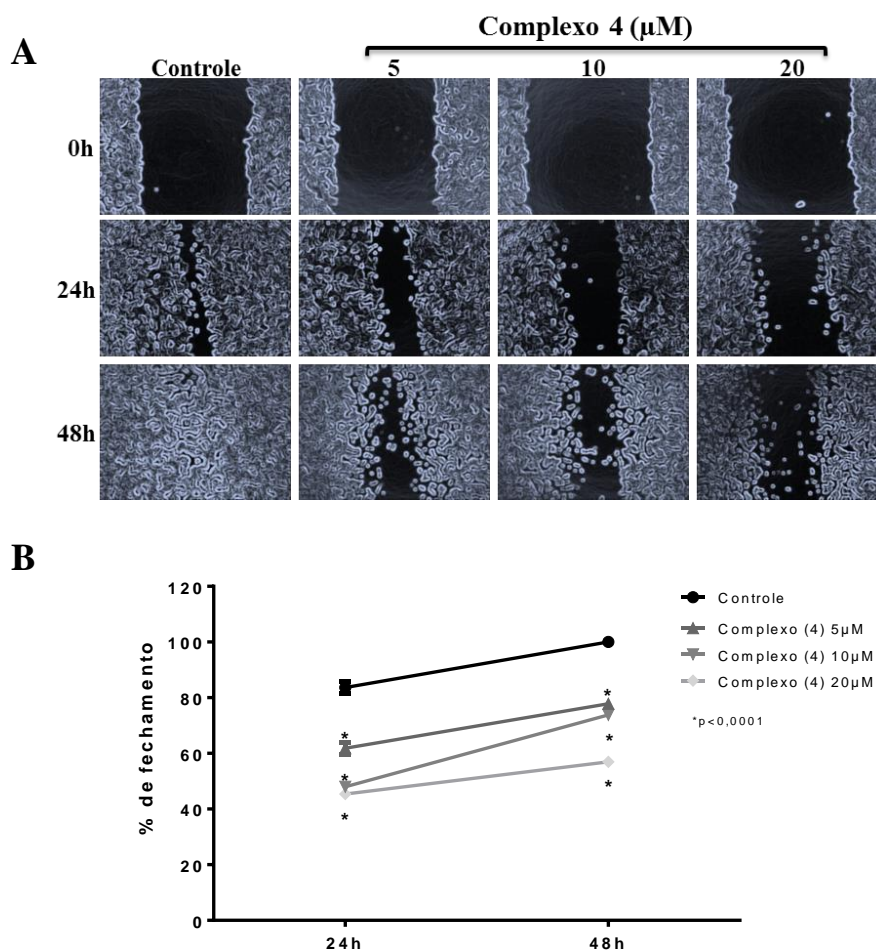
Os resultados mostram que todas as concentrações testadas 2,5, 5, 10 e 20 μM do complexo (4) inibiram significativamente o número de colônias das células MDA-MB-231 quando comparado com o controle sem tratamento (figura 11B). Também podemos observar que o mesmo acontece com o tamanho das colônias das células MDA-MB-231 (figura 12C).

Na concentração de 20 μ M é possível observar que houve a inibição total das colônias (figura 11A). Podemos concluir que o complexo é capaz de inibir a formação de colônias de células tumorais da linhagem MDA-MB-231 e de diminuir também o tamanho dessas, agindo de forma citotóxica e citostática.

4.4 Ensaio de migração celular – método *Wound Healing*

As células utilizam o processo de migração no organismo tanto em condições fisiológicas, bem como em situações patológicas. No processo metastático as células tumorais migram do tumor primário para o sistema circulatório e se estabelecem em um novo local (YAMAGUCHI; CONDEELIS, 2007). Para analisar o efeito do complexo (4) na migração das células MDA-MB-231 foi realizado o ensaio de *wound healing*.

Figura 13 - Efeito de diferentes concentrações do complexo (4) na migração das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. O ensaio foi realizado em triplicata. A imagem corresponde a uma das triplicatas (A). Gráfico da porcentagem de fechamento (B).

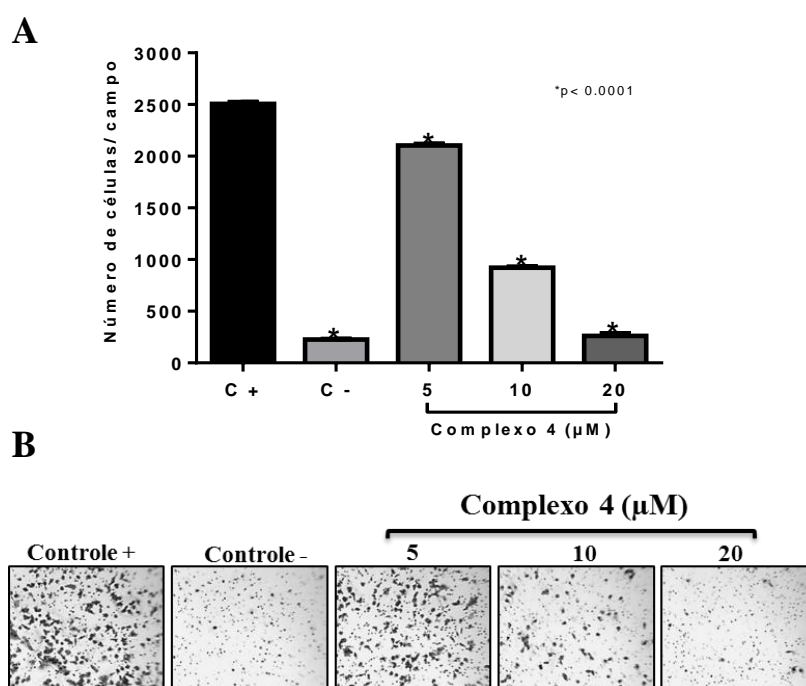


Os resultados obtidos permitem observar que após o tempo de incubação de 24 horas a concentração de 5 μ M já é capaz de inibir em aproximadamente 20% o fechamento da risca em comparação com o controle de células sem tratamento, o mesmo é observado no tempo de 48 horas. Nas concentrações de 10 e 20 μ M no tempo de incubação de 24 horas podemos observar que houve uma maior inibição do fechamento da risca, em aproximadamente 30% em relação ao controle. No tempo de incubação de 48 horas a concentração de 20 μ M foi capaz de inibir o fechamento em aproximadamente 60% quando comparado com o controle (Figura 13B). É importante ressaltar que as concentrações utilizadas neste ensaio, não foram capazes de alterar a morfologia e também não promoveram nenhum efeito citotóxico para as células.

4.5 Ensaio de migração – câmara de Boyden

A capacidade do complexo (4) de interferir na migração celular das células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231, também foi avaliada pelo ensaio de migração por câmara de Boyden.

Figura 14 - Efeito do complexo (4) sobre a migração das células da linhagem MDA-MB-231 em câmara de Boyden. O experimento foi realizado em triplicata. O gráfico apresenta a quantidade de células que conseguiram migrar pelos poros do inserto após o tempo de incubação de 22 horas com o complexo (4) (A). A imagem corresponde a uma das triplicatas (B). Foram utilizados neste ensaio o controle + (sem tratamento e com quimioatraente) e controle - (sem tratamento e sem quimioatraente).

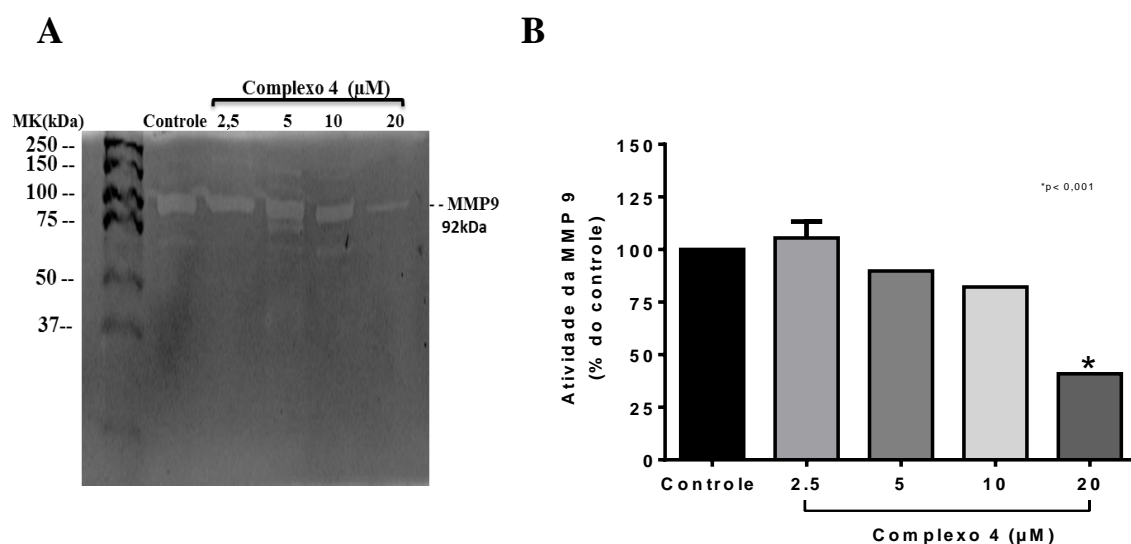


Podemos observar pelos resultados que todas as concentrações inibiram a migração das células da linhagem MDA-MB-231 (figura 14A). Esses resultados vão de acordo com os resultados obtidos no ensaio de migração – *wound healing*, onde todas as concentrações também foram capazes de inibir o fechamento da risca.

4.6 Ensaio de Zimografia

Nos processos de migração e invasão celular é necessária a degradação da matriz extracelular. Essa degradação é mediada por metaloproteinases de matriz (MMP), enzimas zinco-dependentes que possuem a capacidade de degradar componentes da matriz extracelular como colágeno, fibronectina, laminina, entre outros. As MMP apresentam diversas classes, dentre elas as gelatinases (MMP2 e MMP9) conhecidas na literatura por atuar na progressão tumoral (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). Os efeitos causados pela incubação das células MDA-MB-231 com complexo (4) sobre a atividade da MMP9 foram investigados através do ensaio de zimografia em gel de poliacrilamida 10% contendo gelatina.

Figura 15 - Efeito do complexo (4) sobre a expressão da MMP9 em células da linhagem MDA-MB-231. Expressão da MMP9 em gel de zimografia (A). Gráfico da análise da atividade da MMP9 (B).



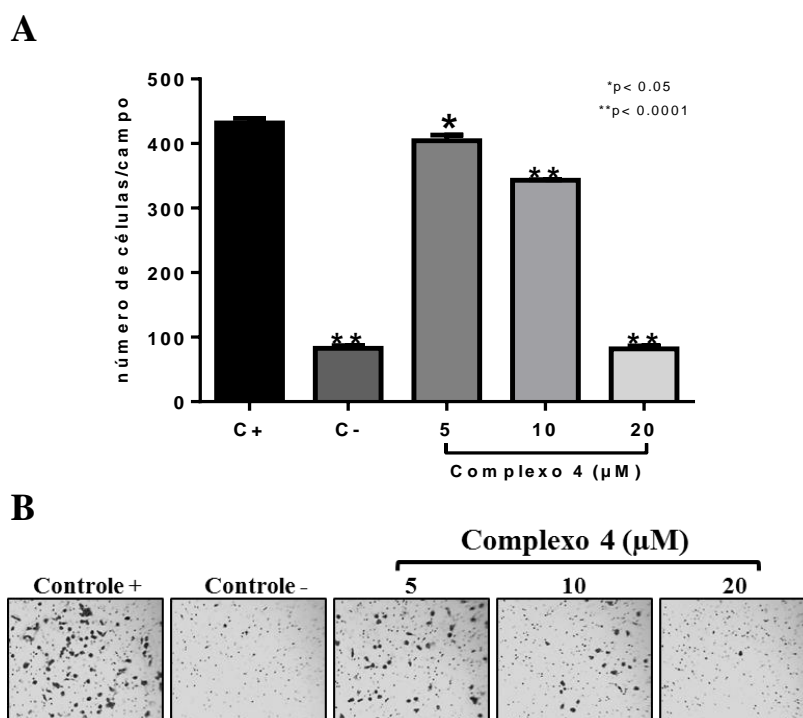
Os resultados mostram que o complexo (4) nas concentrações de 2,5, 5 e 10 μM não alterou a atividade da MMP9 na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231. Já a

concentração de 20 μM foi capaz de inibir em 60% a atividade da MMP9 quando comparada ao controle sem tratamento (figura 15B).

4.7 Ensaio de Invasão

Uma importante característica do tumor metastático é o poder de invasão de suas células em tecidos adjacentes. Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito do complexo (4) na invasão das células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231.

Figura 16 - Efeito do complexo (4) sobre a invasão de células da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231. O experimento foi realizado em triplicata. O gráfico apresenta a quantidade de células que conseguiram invadir a matrigel e atravessar os poros do inserto após o tempo de incubação de 22 horas com o complexo (4) (A). A imagem corresponde a uma das triplicatas (B). Foram utilizados neste ensaio o controle + (sem tratamento e com quimioatraente) e controle - (sem tratamento e sem quimioatraente).



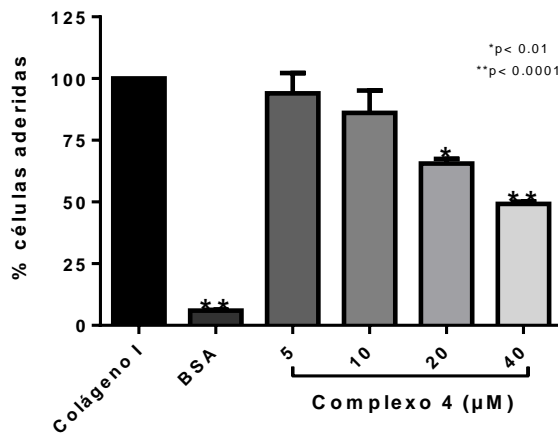
De acordo com os resultados o complexo (4) foi capaz de inibir a invasão das células MDA-MB-231 em todas as concentrações testadas. Na concentração de 20 μM a inibição foi de aproximadamente 80% em comparação com o controle positivo, lembrando que o controle positivo é constituído de células sem tratamento e também foi utilizado no inferior do inserto meio de cultura com 10% FBS, como quimioatraente (figura 16A). É importante ressaltar também que as concentrações utilizadas neste ensaio, não alteraram a morfologia e não foram citotóxicas para as células.

4.8 Ensaio de Adesão Celular

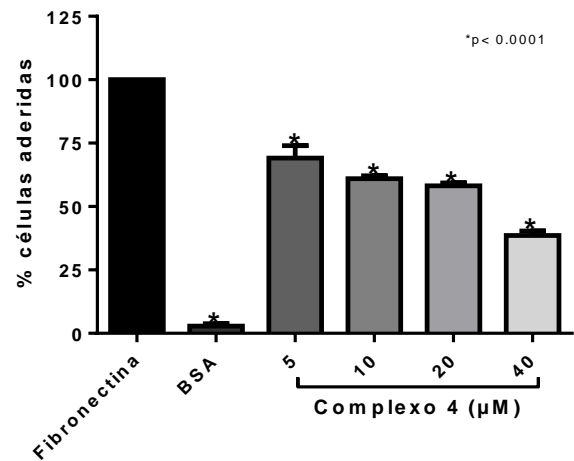
As células interagem com a matriz extracelular em diversas etapas do processo metastático. Para penetrar na matriz extracelular as células tumorais devem se aderir a componentes da matriz como colágeno, fibronectina, laminina e vitronectina. Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar o efeito do complexo (4) na adesão das células MDA-MB-231 a essas proteínas de adesão.

Figura 17 - Efeito do complexo (4) sobre a adesão das células da linhagem MDA-MB-231 a proteínas da matriz extracelular: colágeno, fibronectina, laminina e vitronectina. O experimento foi realizado em triplicata. Gráfico da % de adesão ao colágeno (A); Gráfico % de adesão a fibrinectina (B); Gráfico% de adesão a laminina (C). Gráfico % de adesão a vitronectina (D). Os resultados foram comparados com os controles sem tratamento (somente proteína de adesão e células). Também foi utilizado um controle negativo de adesão BSA.

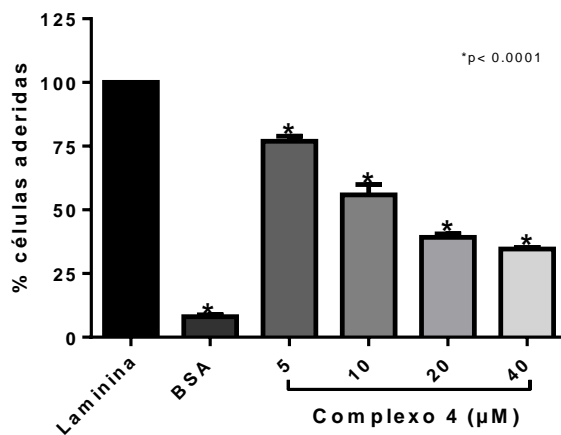
A



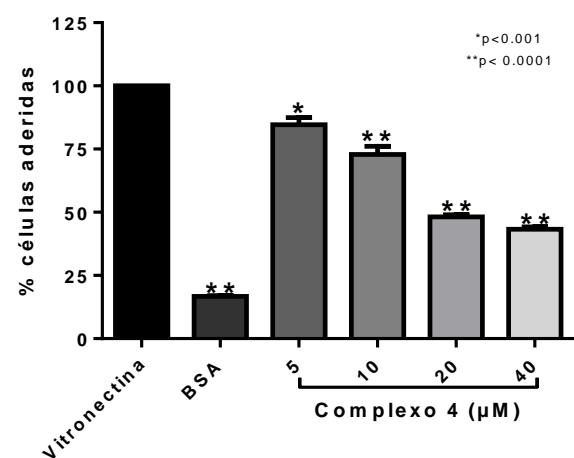
B



C



D

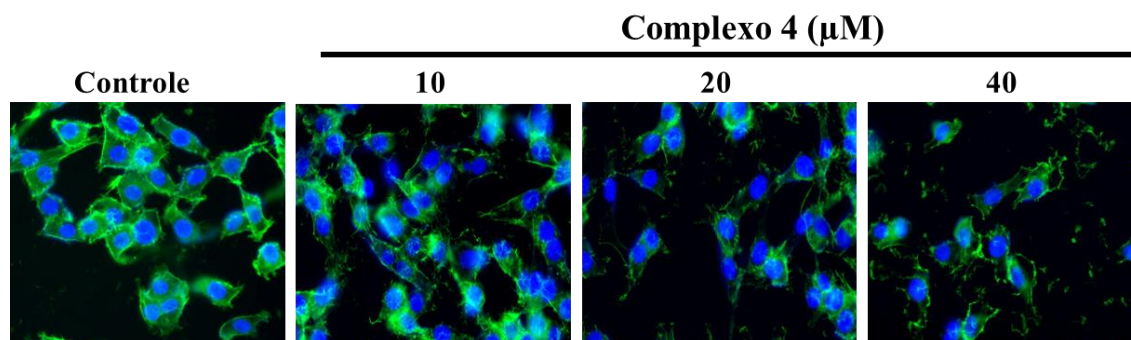


É possível observar, a partir dos resultados, que o complexo (4) nas concentrações de 20 e 40 μ M inibiu aproximadamente 35% e 51% a adesão das células da linhagem MDA-MB-231 ao colágeno tipo I, respectivamente (figura 17A). O complexo (4) também inibiu a adesão celular a fibronectina e laminina em todas as concentrações testadas. A concentração de 40 μ M inibiu em aproximadamente 65% a adesão das células MDA-MB-231 a fibronectina e laminina, comparado com o controle de células sem tratamento (Figura 17 B,C). O complexo (4) também foi capaz de inibir da adesão celular a vitronectina em todas as concentrações testadas, onde na concentração de 40 μ M do complexo (4) inibiu cerca de 70% a adesão a essa proteína da matriz, quando comparado com o controle sem tratamento (figura 17D). Neste ensaio foram utilizados dois controles, um sem tratamento (apenas a proteína de adesão e células) e um controle de BSA (proteína sem função adesiva, aonde as células plaqueadas nesse substrato não vão se aderir a ele). Também é importante ressaltar que as células ficaram incubadas por 30 minutos com os complexos, e neste tempo as concentrações utilizadas não foram capazes de alterar a morfologia e também não foram citotóxicas para as células.

4.9 - Marcação com faloidina

O citoesqueleto fornece a infraestrutura básica para a manutenção da motilidade celular. Existem três tipos de proteínas do citoesqueleto: microtúbulos, filamentos intermediários e os filamentos de actina (também chamados de microfilamentos). Os filamentos de actina do citoesqueleto são responsáveis por regular a dinâmica da motilidade celular em células tumorais de mama (JIANG; ENOMOTO; TAKAHASHI, 2009). Este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar os efeitos do complexo (4) sobre a organização do citoesqueleto de células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231, utilizando o marcador Alexa 488 Fluor® Phalloidin específico para fibras F-actina.

Figura 18 - Efeito de diferentes concentrações do complexo (4) sobre o citoesqueleto das células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231.

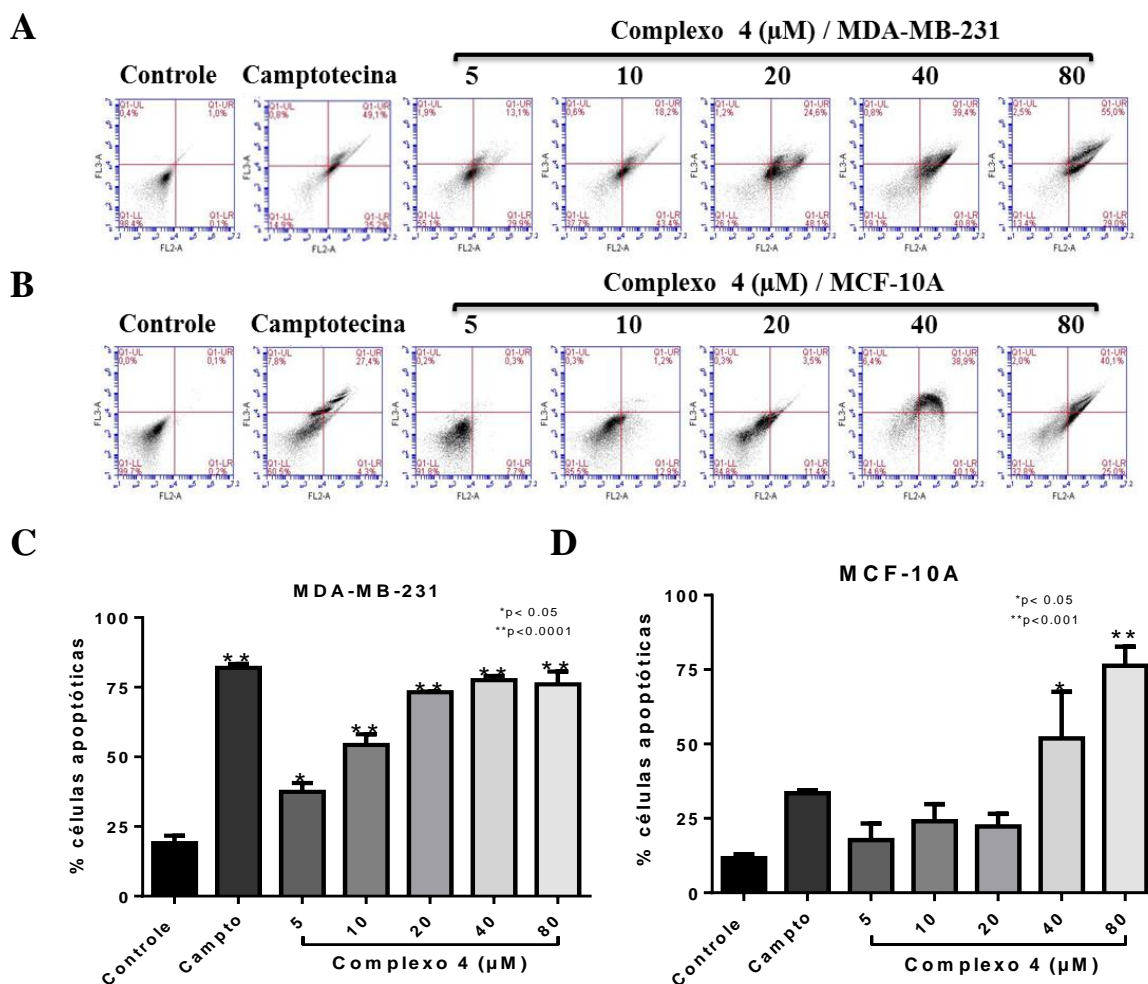


Os resultados indicam que complexo (4) em todas as concentrações testadas foi capaz de alterar a estrutura do citoesqueleto das células tumorais de mama, MDA-MB-231, em comparação com o controle sem tratamento. Na concentração de 40 μ M podemos observar uma diminuição marcante da densidade das fibras de actina do citoesqueleto, quando comparado ao controle (figura 18). É possível concluir, que a alteração marcante na organização no citoesqueleto das células tumorais de mama MDA-MB-231, promovida pelo complexo (4), pode estar relacionada com a inibição da adesão dessas células a proteínas da matriz extracelular, já que o citoesqueleto possui diversas funções celulares e dentre elas a promoção da adesão célula-célula ou célula matriz.

4.10 Ensaio de Apoptose com Anexina V por Citometria de Fluxo

Apoptose possui papel importante e crítico no desenvolvimento e homeostase em tecidos normais. É também um mecanismo de defesa, ativado sempre que ocorre uma invasão por agentes patogênicos, ou quando há uma lesão ao DNA da célula (DANIAL; KORSMEYER, 2004). A atividade apoptótica do complexo (4) sobre as células das linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A foi analisada por citometria de fluxo utilizando o kit PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences).

Figura 19 - Efeito do complexo (4) na indução da apoptose em células tumorais de mama MDA-MB-231 e não tumorais de mama MCF-10A. Gráfico da análise por citometria (a fluorescência de 7AAD é detectada no canal FL3-A e a fluorescência de PE-Anexina é detectada no canal FL2-A) (A). Gráfico da porcentagem de células tumorais de mama MDA-MB-231 em apoptose. Gráfico da porcentagem de células não tumorais de mama MCF-10A em apoptose.

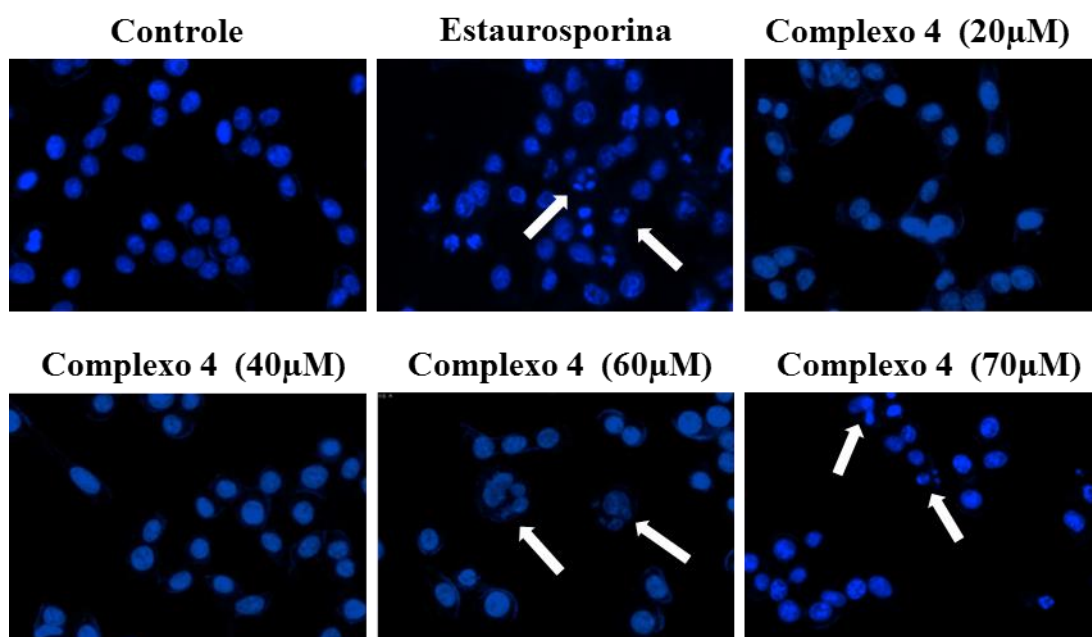


Os resultados mostram que na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 a porcentagem de células mortas por apoptose aumenta significativamente conforme aumentamos a concentração do complexo (4). O aumento nas concentrações de 40 e 80 μM o aumento é de aproximadamente 75% em relação ao controle sem tratamento (figura 19C). Já na linhagem não tumoral de mama MCF-10A podemos observar que apenas nas concentrações de 40 e 80 μM do complexo (4) houve um aumento significativo da porcentagem de células em apoptose, cerca de 50% em 40 μM e 75% em 80 μM quando comparado com o controle sem tratamento (figura 19D). Neste ensaio foram utilizados dois controles, um apenas de células sem tratamento e outro de camptotecina, um fármaco antitumoral conhecido na literatura como indutor de apoptose (ZUNINO; PRATESI, 2004).

4.11 Ensaio de Fragmentação Nuclear

A fragmentação nuclear é um marcador de apoptose. A coloração com o corante fluorescente DAPI, marcador de DNA, foi utilizada para verificar a capacidade do complexo (4) em promover alterações indicativas de apoptose nas células, como a fragmentação dos núcleos.

Figura 20 - Efeito de diferentes concentrações do complexo (4) sobre a fragmentação nuclear das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. A imagem corresponde a uma das triplicatas. As setas brancas nas imagens indicam as alterações no núcleo promovidas pelo complexo (4). Foi utilizado um controle sem tratamento e um controle positivo com tratamento com estaurosporina

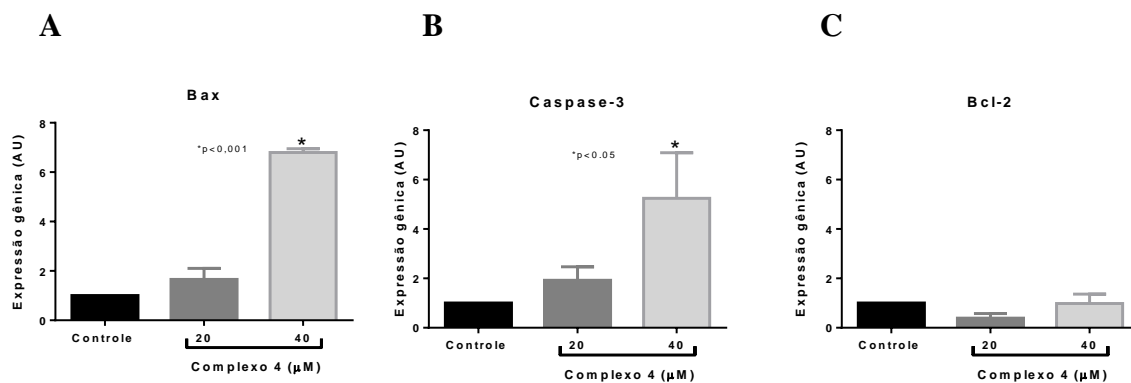


É possível observar, a partir dos resultados, que a incubação das células com o complexo (4) nas concentrações de 60 e 70µM por 2 horas, promoveu a formação de corpos apoptóticos, em comparação com o controle sem tratamento (figura 20). Neste experimento também foi utilizado como controle positivo de fragmentação nuclear a estaurosporina.

4.12 PCR tempo real

A expressão de três genes relacionados à apoptose foi analisada após a incubação com o complexo (4) por 3 horas com células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 por PCR em tempo real. Dois genes codificam para proteínas pró-apoptóticas (Bax e Caspase-3) e um gene codifica para a proteína anti-apoptótica (Bcl-2).

Figura 21 - Efeitos do complexo (4) na expressão gênica de Bax, Caspase-3 e Bcl-2 nas células tumorais de mama, da linhagem MDA-MB-231. Efeitos do complexo (4) na expressão gênica da Bax (A); Efeitos do complexo (4) na expressão gênica da Caspase-3(B); Efeitos do complexo (4) na expressão gênica da Bcl-2 (C).



Os resultados indicam que o complexo (4) na concentração de 40μM aumentou a expressão dos genes pró-apoptóticos Bax (figura 21A) e Caspase-3 (figura 21B). Já a expressão de genes anti-apoptóticos Bcl-2 não foi alterada em nenhuma das concentrações testadas, em comparação com o controle sem tratamento (figura 21C). Nesse ensaio também foi utilizado como controle a β-actina.

5. DISCUSSÃO

Medicamentos à base de platina são amplamente utilizados como fármacos antitumorais apesar da sua aplicabilidade limitada, resistência adquirida e os efeitos colaterais graves (DASARI; TCHOUNWOU, 2014). Nos últimos anos, pesquisas com novos complexos metálicos com atividade antitumoral têm sido uma alternativa cada vez mais atraente para a substituição da platina no tratamento do câncer. Os complexos de rutênio são promissores candidatos para substituir a platina na quimioterapia. NAMI-A e KP-1019 são os únicos dois complexos rutênio que estão em fase de testes clínicos e novos candidatos devem surgir para que seus mecanismos de ação sejam completamente compreendidos.

Neste estudo, foram descritos os efeitos de uma série de complexos de rutênio com ligantes difosfina e bipyridina. O complexo (4) apresentou o menor IC_{50} sobre a proliferação de células tumorais de mama triplo negativa MDA-MB-231 e foi selecionado para ser investigado seu potencial antitumoral e antimetastático nesta mesma linhagem de células. Wu e colaboradores descreveram que o complexo de rutênio(II) com ligante areno, inibe mais eficazmente a proliferação de células MDA-MB-231 (IC_{50} de 20,8 μ M) em comparação com células não tumorais de mama MCF-10A ($IC_{50} > 300\mu$ M) e células normais de rim humano HK2 (IC_{50} 110,3 μ M). Esses resultados indicam especificidade dos complexos para as células tumorais, em comparação com células normais (WU et al., 2014). Em outro estudo, também foi avaliado o potencial antitumoral de complexos de rutênio(II) polipiridil combinados com derivados de antraceno em linhagens de células de hepatoma humano (Bel-7402), adenocarcinoma de pulmão (A549), osteossarcoma (MG-63) e na linhagem tumoral de mama (SKBR-3). De acordo com os resultados os complexos mostraram-se eficazes em inibir a proliferação de células de todas as linhagens testadas, porém foram mais ativos na linhagem tumoral de mama SKBR-3 em comparação com as outras linhagens (XU et al., 2014).

O processo metastático é descrito como uma cascata de eventos em que as células normais são transformadas em células tumorais devido a mutações nos genes que regulam vias importantes, produzindo um desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular. Interações das células tumorais com o microambiente estromal e proteínas da matriz extracelular contribuem para a formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos. Essas interações facilitam a migração e invasão das células tumorais para os tecidos circundantes, intravasamento através dos vasos recém-formados e disseminação para outros tecidos, para formar os tumores secundários (QUAIL; JOYCE, 2013). O complexo (4) foi capaz de inibir a migração e invasão das células tumorais de mama MDA-MB-231 de um modo dependente da

concentração. Os sobrenadantes do ensaio de *wound healing* foram testados por zimografia para a secreção de MMP. As MMP têm potencial na degradação da matriz extracelular e estão correlacionadas com os estágios finais da invasão tumoral e metástase (KESSENBROCK et al., 2010). Estes resultados sugerem que a inibição da invasão celular e migração é devido, pelo menos em parte, à inibição da secreção de MMP-9 pelo complexo (4). Complexos de rutênio polipiridil também inibiram a migração celular e invasão, através da regulação negativa da expressão de MMP-9 e a regulação positiva de TIMP-1 (inibidor de metaloproteinases) em células MDA-MB-231 (CAO; ZHENG; CHEN, 2015). Em outro estudo, os autores demonstraram que o complexo de rutênio (II) - picolinato de areno inibiram a migração e invasão em células de carcinoma cervical humano HeLa (GLIGORIJEVIC et al., 2012). Bergamo et al., (2008) também demonstraram que o complexo organometálico de rutênio(Rapta-t) promoveu uma redução na produção e atividade de MMP9 pelo ensaio de zimografia em células MDA-MB-231 (BERGAMO et al., 2008). Todos estes resultados estão de acordo com o nosso estudo, mostrando o potencial dos complexos de rutênio para atuar nas diferentes etapas do processo metastático.

Neste estudo foi demonstrado que o complexo (4) inibe a adesão de células MDA-MB-231 a proteínas da matriz extracelular como colagénio do tipo I, fibronectina, laminina e vitronectina. Os mecanismos envolvidos na presente inibição permanecem por ser elucidados, no entanto, uma das hipóteses é que o complexo (4) pode atuar através da inibição da expressão de moléculas de adesão que medeiam à ligação de células MDA-MB-231 a proteínas da matriz, tais como integrinas ou ainda ligar-se a estas integrinas, impedindo a adesão das células aos componentes da matriz testados (TAKADA; YE; SIMON, 2007).

O citoesqueleto é uma estrutura celular, com várias funções, como organização de organelas citoplasmáticas e compartimentos intracelulares, segregação dos cromossomos nos eventos de mitose e também é responsável pela determinação da forma da célula e promoção da adesão célula-célula ou célula-matriz, através de suas interações com caderina e integrinas, respectivamente (HALL, 2009; OLSON; SAHAI, 2009). Este estudo analisou a ação do complexo (4) sobre a estrutura do citoesqueleto das células MDA-MB-231 através de um marcador específico para F-actina e observamos que todas as concentrações testadas foram capazes de modificar a estrutura das fibras de F-actina do citoesqueleto. Esse resultado sugere, portanto, que a inibição da migração, invasão e adesão, podem estar relacionadas também com a capacidade do complexo (4) em modificar a estrutura do citoesqueleto. Sava e colaboradores demonstraram que o complexo de rutênio NAMI-A modificou a estrutura da

actina do citoesqueleto e ainda afetou a função de integrinas e a adesão de células HELA (SAVA et al., 2004).

Finalmente, foi demonstrado neste trabalho que o complexo (4) induziu a apoptose em células MDA-MB-231 de uma forma dependente da concentração. No entanto, em células não tumorais de mama MCF-10A, este efeito foi atingido apenas em concentrações mais elevadas. Ao analisar a expressão dos genes da Caspase-3, Bax e Bcl-2, através de PCR em tempo real, observamos que o complexo (4) aumentou a expressão dos genes da Caspase-3 e Bax, que são genes pró-apoptóticos, porém não promoveu alterações na expressão do Bcl-2, um gene anti-apoptótico. Também foi demonstrado que o complexo (4) nas maiores concentrações testadas, induziu a fragmentação nuclear das células MDA-MB-231, uma modificação característica de células em apoptose. Nhukeyaw e colaboradores realizaram um estudo com complexos de rutênio (II) – cloro e avaliaram a indução de apoptose em três linhagens de células tumorais de mama (MDA-MB-231, MCF-7 e HCC1932). De acordo com os resultados os complexos de rutênio (II)- cloro induziram de forma mais significativa a apoptose de células da linhagem MDA-MB-231 em comparação com as outras linhagens celulares testadas HCC1937 e MCF-7 (NHUKEYAW et al., 2014). Outro estudo com complexos de rutênio (II) / ósmio-areno demonstrou que esses complexos foram capazes de induzir a morte celular por apoptose em aproximadamente 72% em células de carcinoma do cólon da linhagem SW480 (MUHLGASSNER et al., 2012).

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho identificou a atividade antitumoral e antimetastática de novos complexos de rutênio, em células tumorais de mama.

O complexo (4) foi mais seletivo e eficaz para as células tumorais de mama triplo negativas MDA-MB-231 e mostrou-se capaz de inibir a proliferação e modificar a morfologia dessas células. Além disso, inibiu a formação de colônias e o tamanho das colônias em todas as concentrações testadas, a migração, invasão e adesão dessas células. O complexo (4) também diminuiu a secreção de MMP9 nas maiores concentrações testadas. A indução da apoptose pelo complexo (4) foi confirmada pelo ensaio de apoptose e fragmentação nuclear. Essa indução é decorrente do aumento da expressão dos genes pró-apoptóticos Bax e Caspase-3 e diminuição da expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2. O complexo (4) também foi capaz de modificar profundamente o citoesqueleto das células MDA-MB-231.

Tomados em conjunto, os resultados mostram que o complexo de (4) possui potencial antitumoral e antimetastático para células tumorais de mama, podendo ser uma nova alternativa de fármaco para o tratamento do câncer. Entretanto, mais estudos devem ser realizados a fim de verificar seus efeitos na toxicidade e sua capacidade de inibir metástases, em modelos animais *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS

ABRAMSON, V. G. et al. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. **Cancer**, v. 121, n. 1, p. 8-16, Jan 1 2015.

ACS, A. C. A.-. **Breast Cancer - What is breast cancer?** 2016.

BACAC, M.; STAMENKOVIC, I. Metastatic cancer cell. **Annu Rev Pathol**, v. 3, p. 221-47, 2008.

BERGAMO, A. et al. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **J Inorg Biochem**, v. 106, n. 1, p. 90-9, Jan 2012.

BERGAMO, A. et al. Modulation of the metastatic progression of breast cancer with an organometallic ruthenium compound. **Int J Oncol**, v. 33, n. 6, p. 1281-9, Dec 2008.

BHUTIA, S. K.; MAITI, T. K. Targeting tumors with peptides from natural sources. **Trends Biotechnol**, v. 26, n. 4, p. 210-7, Apr 2008.

BRAND, F. X. et al. Prospect for anti-HER2 receptor therapy in breast cancer. **Anticancer Res**, v. 26, n. 1B, p. 463-70, Jan-Feb 2006.

BRASELMANN, H. et al. CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. **Radiat Oncol**, v. 10, p. 223, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Atlas de Mortalidade por Câncer**, 2016a. Disponível em: < <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/> >. Acesso em: 24 de janeiro de 2016.

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa, 2014**, 2016b. Disponível em: < http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-destaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa_cancer_24042014.pdf >. Acesso em: 25 de fevereiro de 2016.

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). 2016c. Disponível em: < http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322 >. Acesso em: 01 de março de 2016.

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2016**, 2016d. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf> >. Acesso em: 12 de fevereiro de 2016.

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Controle do Câncer de Mama**, 2016e. Disponível em: < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controlado_cancer_mama/tratamento >. Acesso em: 5 de fevereiro de 2016.

BRENTON, J. D. et al. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? **J Clin Oncol**, v. 23, n. 29, p. 7350-60, Oct 10 2005.

CAIXEIRO, N. J. et al. Circulating tumour cells--a bona fide cause of metastatic cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 33, n. 2-3, p. 747-56, Sep 2014.

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

CEPEDA, V. et al. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 7, n. 1, p. 3-18, Jan 2007.

CHAKRABORTY, B. S. Cancer Drug Development - Key Regulatory Considerations. **Health Administrator**, v. 20, p. 29-36, 2007.

CIANFROCCA, M.; GRADISHAR, W. New molecular classifications of breast cancer. **CA Cancer J Clin**, v. 59, n. 5, p. 303-13, Sep-Oct 2009.

CIARIMBOLI, G. Membrane transporters as mediators of Cisplatin effects and side effects. **Scientifica (Cairo)**, v. 2012, p. 473829, 2012.

CONSTANTINIDOU, A.; SMITH, I. Is there a case for anti-HER2 therapy without chemotherapy in early breast cancer? **Breast**, v. 20 Suppl 3, p. S158-61, Oct 2011.

CRONIN-FENTON, D. P.; DAMKIER, P.; LASH, T. L. Metabolism and transport of tamoxifen in relation to its effectiveness: new perspectives on an ongoing controversy. **Future Oncol**, v. 10, n. 1, p. 107-22, Jan 2014.

CUI, Y. et al. Menstrual and reproductive history, postmenopausal hormone use, and risk of benign proliferative epithelial disorders of the breast: a cohort study. **Breast Cancer Res Treat**, v. 114, n. 1, p. 113-20, Mar 2009.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-19, Jan 23 2004.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol**, v. 740, p. 364-78, Oct 5 2014.

DE WAARD, F.; THIJSEN, J. H. Hormonal aspects in the causation of human breast cancer: epidemiological hypotheses reviewed, with special reference to nutritional status and first pregnancy. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 97, n. 5, p. 451-8, Dec 2005.

DROOG, M. et al. Tamoxifen resistance: from bench to bedside. **Eur J Pharmacol**, v. 717, n. 1-3, p. 47-57, Oct 5 2013.

FLOREA, A. M.; BUSSELBERG, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. **Cancers (Basel)**, v. 3, n. 1, p. 1351-71, 2011.

FREITAS-JUNIOR, R. et al. Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 67, n. 7, p. 731-7, Jul 2012.

FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; PEREZ, J. M. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. **Chem Rev**, v. 103, n. 3, p. 645-62, Mar 2003.

GLIGORIJEVIC, N. et al. Picolinate ruthenium(II)-arene complex with in vitro antiproliferative and antimetastatic properties: comparison to a series of ruthenium(II)-arene complexes with similar structure. **J Inorg Biochem**, v. 108, p. 53-61, Mar 2012.

GODARD, T. et al. Comet assay and DNA flow cytometry analysis of staurosporine-induced apoptosis. **Cytometry**, v. 36, n. 2, p. 117-22, Jun 1 1999.

GOMES, L. R. et al. Epithelial-mesenchymal transition: implications in cancer progression and metastasis. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 12, n. 11, p. 1881-90, Nov 2011.

GURAY, M.; SAHIN, A. A. Benign breast diseases: classification, diagnosis, and management. **Oncologist**, v. 11, n. 5, p. 435-49, May 2006.

HALL, A. The cytoskeleton and cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 28, n. 1-2, p. 5-14, Jun 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011.

HARTINGER, C. G. et al. 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**, v. 100, n. 5-6, p. 891-904, May 2006.

HARTMANN, L. C.; GHOSH, K. Benign breast disease: emerging findings in a diverse population. **Breast J**, v. 13, n. 2, p. 113-4, Mar-Apr 2007.

JAKUPEC, M. A. et al. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. **Dalton Trans**, n. 2, p. 183-94, Jan 14 2008.

JIANG, P.; ENOMOTO, A.; TAKAHASHI, M. Cell biology of the movement of breast cancer cells: intracellular signalling and the actin cytoskeleton. **Cancer Lett**, v. 284, n. 2, p. 122-30, Nov 1 2009.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52-67, Apr 2 2010.

MAYER, I. A. et al. New strategies for triple-negative breast cancer--deciphering the heterogeneity. **Clin Cancer Res**, v. 20, n. 4, p. 782-90, Feb 15 2014.

MCPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ**, v. 321, n. 7261, p. 624-8, Sep 9 2000.

MEHLEN, P.; PUISIEUX, A. Metastasis: a question of life or death. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 6, p. 449-58, Jun 2006.

MORENO-ASPITIA, A.; PEREZ, E. A. Treatment options for breast cancer resistant to anthracycline and taxane. **Mayo Clin Proc**, v. 84, n. 6, p. 533-45, Jun 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MUHLGASSNER, G. et al. Biological activity of ruthenium and osmium arene complexes with modified paullones in human cancer cells. **J Inorg Biochem**, v. 116, p. 180-7, Nov 2012.

MUNCHAUSEN, L. L. The chemical and biological effects of cis-dichlorodiammineplatinum (II), an antitumor agent, on DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 71, n. 11, p. 4519-22, Nov 1974.

NCI, N. C. I. **What Is Cancer?**, 2016. Disponível em: < <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer> >. Acesso em: 16 de fevereiro de 2016.

NHUKEAW, T. et al. Cellular responses of BRCA1-defective and triple-negative breast cancer cells and in vitro BRCA1 interactions induced by metallo-intercalator ruthenium(II) complexes containing chloro-substituted phenylazopyridine. **BMC Cancer**, v. 14, p. 73, 2014.

OLSON, M. F.; SAHAI, E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. **Clin Exp Metastasis**, v. 26, n. 4, p. 273-87, 2009.

PEDRAZA-FARINA, L. G. Mechanisms of oncogenic cooperation in cancer initiation and metastasis. **Yale J Biol Med**, v. 79, n. 3-4, p. 95-103, Dec 2006.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-52, Aug 17 2000.

PIZARRO, A. M.; SADLER, P. J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1198-211, Oct 2009.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med**, v. 19, n. 11, p. 1423-37, Nov 2013.

RADEMAKER-LAKHAI, J. M. et al. A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 11, p. 3717-27, Jun 1 2004.

RAKHA, E. A.; ELLIS, I. O. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. **Pathology**, v. 41, n. 1, p. 40-7, Jan 2009.

REYMOND, N.; D'AGUA, B. B.; RIDLEY, A. J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 12, p. 858-70, Dec 2013.

RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G. S.; COUSSENS, N. P., *et al* (Ed.). **Assay Guidance Manual**. Bethesda (MD), 2004.

SANTEN, R. J.; MANSEL, R. Benign breast disorders. **N Engl J Med**, v. 353, n. 3, p. 275-85, Jul 21 2005.

SAVA, G. et al. Actin-dependent tumour cell adhesion after short-term exposure to the antimetastasis ruthenium complex NAMI-A. **Eur J Cancer**, v. 40, n. 9, p. 1383-96, Jun 2004.

SCHNITT, S. J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Mod Pathol**, v. 23 Suppl 2, p. S60-4, May 2010.

SHAPIRO, C. L.; RECHT, A. Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. **N Engl J Med**, v. 344, n. 26, p. 1997-2008, Jun 28 2001.

SHIBUE, T.; WEINBERG, R. A. Metastatic colonization: settlement, adaptation and propagation of tumor cells in a foreign tissue environment. **Semin Cancer Biol**, v. 21, n. 2, p. 99-106, Apr 2011.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p. 10869-74, Sep 11 2001.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 719-24, Apr 9 2009.

TAKADA, Y.; YE, X.; SIMON, S. The integrins. **Genome Biol**, v. 8, n. 5, p. 215, 2007.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 2, p. 87-108, Mar 2015.

TSUBOY, M. S. et al. Genistein at maximal physiologic serum levels induces G0/G1 arrest in MCF-7 and HB4a cells, but not apoptosis. **J Med Food**, v. 17, n. 2, p. 218-25, Feb 2014.

UK, C. R. **Types of treatment for breast cancer**, 2016. Disponível em: <
<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/breast-cancer/treatment/which-treatment-for-breast-cancer#surgery> >.

VERNON, A. E.; LABONNE, C. Tumor metastasis: a new twist on epithelial-mesenchymal transitions. **Curr Biol**, v. 14, n. 17, p. R719-21, Sep 7 2004.

VIDAL, S. J. et al. Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. **Oncogene**, v. 33, n. 36, p. 4451-63, Sep 4 2014.

WEIGEL, M. T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocr Relat Cancer**, v. 17, n. 4, p. R245-62, Dec 2010.

WORD HEALTH ORGANIZATION, W. **Cancer: fact Sheet n° 297**, 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> >. Acesso em: 24 de janeiro de 2016.

WU, Q. et al. Arene ruthenium(ii) complex, a potent inhibitor against proliferation, migration and invasion of breast cancer cells, reduces stress fibers, focal adhesions and invadopodia. **Metallomics**, v. 6, n. 12, p. 2204-12, Dec 2014.

XU, L. et al. Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity, and apoptosis-inducing properties of ruthenium(II) complexes. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96082, 2014.

YAMAGUCHI, H.; CONDEELIS, J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. **Biochim Biophys Acta**, v. 1773, n. 5, p. 642-52, May 2007.

YARROW, J. C. et al. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. **BMC Biotechnol**, v. 4, p. 21, Sep 9 2004.

YODER, B. J.; WILKINSON, E. J.; MASSOLL, N. A. Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. **Breast J**, v. 13, n. 2, p. 172-9, Mar-Apr 2007.

YUE, P. Y. et al. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **J Biomol Screen**, v. 15, n. 4, p. 427-33, Apr 2010.

ZOU, X. et al. Beta-asarone induces LoVo colon cancer cell apoptosis by up-regulation of caspases through a mitochondrial pathway in vitro and in vivo. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 10, p. 5291-8, 2012.

ZUNINO, F.; PRATESI, G. Camptothecins in clinical development. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 13, n. 3, p. 269-84, Mar 2004.