



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS



PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PIPGCF

Dissertação de Mestrado

“Avaliação dos efeitos antitumorais do complexo de rutênio
[Ru(GA)(dppe)₂]PF₆ em células não-tumorais e tumorais de
mama cultivadas *in vitro*”

Marina Araújo Naves

Acadêmica

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti

Orientadora

São Carlos, SP

2017

“Avaliação dos efeitos antitumorais do complexo de rutênio
[Ru(GA)(dppe)₂]PF₆ em células não-tumorais e tumorais de
mama cultivadas *in vitro*”

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS

PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PIPGCF

“Avaliação dos efeitos antitumorais do complexo de rutênio
[Ru(GA)(dppe)₂]PF₆ em células não-tumorais e tumorais de
mama cultivadas *in vitro*”

Marina Araújo Naves

Acadêmica

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti

Orientadora

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

São Carlos, SP

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marina Araújo Naves

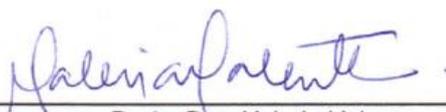
“Avaliação dos efeitos antitumorais do complexo de rutênio
[Ru(GA)(dppe)₂]PF₆ em células não-tumorais e tumorais de
mama cultivadas *in vitro*”

São Carlos, 12 de Maio de 2017

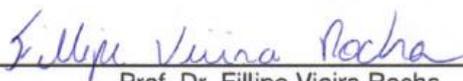
Banca Examinadora



Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti
UFSCar



Profa. Dra. Valeria Valente
UNESP



Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha
UFSCar

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, aos meus pais, Sandra e Romilton, aos meus irmãos, Vinicius e Isadora, e ao meu namorado, Lucas, pelo amor que me motiva todos os dias. Pelo apoio e orientação nas minhas escolhas, o que fez com que eu me tornasse uma pessoa melhor a cada dia, mostrando que com carinho e dedicação podemos ser e realizar tudo que sonhamos.

“Foi o tempo que perdeste com a tua rosa que a fez tão importante...”

- Antoine Saint-Exupéry

Agradecimientos

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, Márcia Regina Cominetti, por acreditar em minha capacidade, pelos ensinamentos que me fizeram crescer durante este trabalho, pela paciência e tempo de dedicação, pela segurança proporcionada, e pela oportunidade de compartilhar conhecimentos que permitiram com que todas as etapas deste trabalho fossem concluídas com êxito e que, com certeza, serão importantes para meu futuro profissional. Agradeço por me aceitar de braços abertos em seu laboratório e grupo de pesquisa, permitindo minha participação nas atividades acadêmicas realizadas e todo meu aprendizado.

Gostaria de agradecer às labenzetes, especialmente a Angélica, Angelina e Liany que contribuíram intensamente com este trabalho e às companheiras de laboratório Carol, Rebeka, Carla, Patrícia, Cecília, Amanda e Izabela, pelo conhecimento compartilhado, calma ao ensinar, pela amizade, conversas, risadas, gordices e comemorações, tornando tudo mais divertido e prazeroso.

Agradeço ao Prof. Alzir Azevedo Batista e sua equipe do Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI), pela síntese e fornecimento do composto de rutênio para a realização deste trabalho. Em especial à Legna e à Kátia, que sempre de prontidão, me ensinaram e me auxiliaram em tudo que precisei no laboratório LERCI para este estudo.

À Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo e sua equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) pela estrutura, ajuda e disposição. Especialmente à Wanessa e Grazielle, sempre muito pacientes e dispostas a ensinar, tiveram uma grande contribuição neste trabalho.

Agradeço imensamente aos meus pais, Romilton e Sandra, pelo esforço e dedicação que me permitiram lidar com o que gosto todos os dias. Pelo suporte emocional, conselhos e apoio em todas as minhas decisões, fazendo com que eu pudesse seguir em frente com sabedoria e paciência, e nunca desistir dos meus sonhos.

Agradeço aos meus irmãos, Vinicius e Isadora, por todas as brincadeiras e companheirismo do dia-a-dia. Por serem meu porto-seguro e os melhores amigos para uma vida inteira. Pela alegria que é minha motivação todos os dias.

Agradeço ao Lucas, pelo amor que me tranquiliza. Por estar ao meu lado nas horas mais difíceis e nas alegrias também. Pela segurança que me proporciona em todos os momentos. Pelo companheirismo em todos estes anos e confiança depositada em mim que me permitem seguir em frente.

Aos meus sogros, minha segunda família, Mário e Cilmara, sempre muito carinhosos e atenciosos comigo.

Agradeço eternamente às minhas amigas, anjos que a vida me presenteou, Thaís, Bárbara, Larissa, Camila, Ana, Erika, Letícia, Monica,

Debora, pelas risadas, pelas fofocas, pelas brincadeiras, por cada saída, pela companhia em todos esses anos, por me animarem e me motivarem nesta jornada. Sem vocês, não seria a mesma coisa, nada teria graça. Sinto falta de ter vocês comigo todos os dias, mas sei que pode passar o tempo que for, estarmos em qualquer distância, eu sei que o amor será sempre o mesmo.

Agradeço também à Shiva, Luna, Toy, Simba e Amora, meus bichinhos e estrelinhas, que com um amor incondicional e inocente, proporcionaram boas risadas e uma companhia fiel ao longo destes anos que nunca vou esquecer.

À FAPESP e à CNPq pelo apoio financeiro para que este trabalho pudesse ser realizado.

Sumário

1. Abstract	15
2. Resumo	17
3. Introdução	19
3.1 Incidência do Câncer	19
3.2 O Câncer.....	20
3.3 O Câncer de Mama.....	23
3.4 Mecanismos de morte celular e Apoptose.....	28
3.5 Uso de compostos inorgânicos à base de metais no tratamento de neoplasias.....	34
3.5. Complexos de rutênio com atividade antitumoral.....	36
3.7. Uso de ensaios <i>in vitro</i> na pesquisa em câncer	41
4. Objetivos	45
4.1 Objetivo Geral.....	45
4.2 Objetivos Específicos.....	45
5. Materiais e Métodos	48
5.1 Síntese e caracterização do Ru(GA).....	48
5.2 Linhagens celulares e padronização do cultivo <i>in vitro</i>	50
5.3 Avaliação da citotoxicidade	50
5.4 Coeficiente de partição.....	51
5.5 Morfologia celular.....	52
5.6 Formação de colônias.....	52
5.7 Interação com o DNA	53
5.8 Interação com albumina humana e transferrina	54
5.9 Transporte do Ru(GA) por albumina e transferrina	56
5.10 Migração celular.....	57
5.11 Invasão celular.....	57
5.12 Marcação com Faloidina	58
5.13 Indução de danos ao DNA	59
5.14 Detecção de apoptose por citometria de fluxo	59
5.15 Detecção de bloqueio no ciclo celular por citometria de fluxo	60
5.16 PCR em tempo real	61
5.17 Western Blotting	62
5.18 Análise estatística.....	63
6. Resultados e Discussão	65

6.1	Citotoxicidade do Ru(GA) e alterações morfológicas observadas.....	65
6.2	Interação com o DNA	69
6.3	Interação com albumina humana e transferrina	70
6.4	Transporte do Ru(GA) pela albumina e transferrina.....	73
6.5	Inibição da migração e invasão celular	76
6.6	Marcação com faloidina	78
6.7	Indução de apoptose	81
7.	Conclusões	87
8.	Referências Bibliográficas	90

Índice de Figuras e Tabelas

Figura 1 – Processo de formação de sítios metastáticos.....	21
Figura 2 – Anatomia normal da mama feminina.....	24
Figura 3 – Vias de ativação de apoptose.....	33
Figura 4 – Estrutura química da cisplatina e seus análogos.....	36
Figura 5 – Mecanismo de ação do rutênio no ambiente da célula tumoral.....	38
Figura 6 – Estrutura química dos compostos NAMI-A e KP1019.....	39
Figura 7 - Síntese do complexo Ru(II)/Ácido gálico/difenilfosfina etano.....	49
Figura 8 – Aspecto das linhagens celulares utilizadas no estudo.....	50
Figura 9 – Efeitos citotóxicos do Ru(GA).....	68
Figura 10 – Interação Ru(GA) com DNA e proteínas plasmáticas.....	73
Figura 11 – Transporte de Ru(GA) por albumina e transferrina.....	75
Figura 12 – Efeitos do Ru(GA) sobre a migração e invasão de células MDA-MB-231.....	77
Figura 13 – Efeitos do Ru(GA) no citoesqueleto das células MDA-MB-231 e MCF-10A.....	80
Figura 14 – Efeitos do Ru(GA) na taxa apoptótica de células MDA-MB-231 e MCF-10A.....	82
Figura 15 – Indução de apoptose pelo Ru(GA).....	85
Tabela 1 – Sequência de <i>primers</i> utilizados no RT-qPCR.....	62
Tabela 2 – Efeitos citotóxicos do Ru(GA) e cisplatina sobre linhagens de células de mama.....	66
Tabela 3 - Constante de decaimento de Stern–Volmer (K_{SV} , M^{-1}), constante de decaimento biomolecular (K_q , $M^{-1} s^{-1}$), constante de ligação (K_b , M^{-1}), número de sítios de ligação (n), valores de ΔG° ($KJ \cdot mol^{-1}$), ΔH° ($KJ \cdot mol^{-1}$) e ΔS° ($J \cdot mol^{-1} K$) para o sistema complexo–HSA/apo-Tf em diferentes temperaturas.....	70

Abstract

1. Abstract

Cancers have become an increasingly relevant problem of public health in the last decades. Within neoplastic diseases, breast cancer is one of the most incidental in female population and related to a high mortality rate. Within types of breast cancer, triple-negative is the most aggressive one and prone to form metastasis to lung and brain. Because they do not express hormone receptors, triple-negative tumors do not have an auxiliary target therapy, thus, treatment is hampered and chemotherapy is the only option of treatment remaining for metastatic cases of this tumor type. However, chemotherapy drugs currently used, in some cases are not selective to tumor cells, acting only on the proportion of cells exposed to treatment or cells that are at certain stages of the cell cycle. Thus, non-tumor cells are affected and some neoplastic cells remain intact, characterizing tumor recurrences and resistance to treatment. Rosenberg and colleagues, in 1964, were responsible for the discovery of cisplatin, a metal and antiproliferative compound still widely used in therapies against various types of tumors, but despite its effectiveness, it has several side effects. Therefore, the search for more selective antitumor drugs for neoplastic cells and with fewer adverse effects is critical to advances in the treatment of cancer. With the limitations of cisplatin, new researches have been developed with ruthenium complexes. Ruthenium has properties that may justify its antitumor potential and selectivity for tumor cells; within them, the ability to imitate iron binding to many biomolecules, including transferrin and albumin. Previous studies have suggested the antitumor effects of ruthenium both *in vitro* and *in vivo*. Therefore, the aim of this study was to evaluate the chemosensitizing ability of the ruthenium complex $[\text{Ru}(\text{GA})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, which we called Ru(GA), as well as its antitumor activity on triple-negative breast cancer cells (TNBC). In addition, differences between the *in vitro* behavior of cells treated with the compound and untreated cells were verified, as well as differences between the activity on tumor and non-tumor cells used in this study. The results demonstrated that the complex Ru(GA) was more efficient in inhibiting the 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 compound was able to reduce the number and size of colonies, to modify the cytoskeleton and act inhibiting the migration ability of tumor cells. The complex also induced apoptosis by increasing the expression of pro-apoptotic genes such as Bax, Caspase-9, Caspase-3 and decreasing anti-apoptotic genes Bcl-2 in TNBC cells. Moreover, Ru(GA) was able to increase the expression of apoptotic proteins and sub-G1 phase distribution on tumor cells. Interaction assays with Ru(GA) and transferrin showed that this protein has a strong participation in the contact between ruthenium complexes and tumor cells, increasing their effectiveness. These results show that the complex Ru(GA) has antitumor potential against breast tumor cells and it might be a good alternative drug for the treatment of cancer.

Keywords: antitumor effects; apoptosis; breast cancer; inorganic compounds; ruthenium; triple-negative.

Resumo

2. Resumo

Os cânceres têm se tornado um problema de saúde pública mundial cada vez mais relevante nas últimas décadas. Dentre os cânceres, o câncer de mama está entre os mais incidentes na população feminina, além de possuir um alto índice de mortalidade. Entre os tipos de câncer de mama, o triplo-negativo é o mais agressivo e propenso à metástases pulmonares e cerebrais. Por não possuir receptores hormonais, tumores triplo-negativos não possuem uma terapia alvo auxiliar e o tratamento é dificultado, sendo a quimioterapia a única opção de tratamento para os casos metastáticos deste tipo tumoral. No entanto, os medicamentos quimioterápicos utilizados atualmente, além de não serem seletivos para as células tumorais, atuam apenas sobre a proporção de células expostas ao tratamento ou que estejam em determinadas fases do ciclo celular. Assim, células não tumorais são atingidas e algumas células neoplásicas ainda permanecem intactas, caracterizando as recorrências tumorais e resistência ao tratamento. Rosenberg e colaboradores em 1964 foram responsáveis pela descoberta da cisplatina, um composto metálico e antiproliferativo ainda muito utilizado em terapias contra vários tipos de tumores, porém, apesar de sua eficácia, apresenta diversos efeitos colaterais. Portanto, a busca por medicamentos antitumorais mais seletivos para as células neoplásicas e com menos efeitos adversos torna-se fundamental para os avanços no tratamento do câncer. Com as limitações da cisplatina, novas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com complexos de rutênio. O rutênio possui propriedades que podem justificar seu potencial antitumoral e seletividade para células tumorais, dentre elas, a capacidade de mimetizar o ferro na ligação a muitas biomoléculas, incluindo a transferrina e albumina. Estudos anteriores sugeriram os efeitos antitumorais do rutênio tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade quimiosensibilizadora do complexo de rutênio $[Ru(GA)(dppe)_2]PF_6$, o qual foi chamado de Ru(GA), bem como sua atividade antitumoral sobre células tumorais de mama do tipo triplo-negativo (TN). Adicionalmente, eventuais diferenças no comportamento *in vitro* de células tratadas com o composto em relação às células não tratadas foram verificadas, bem como diferenças entre a atividade nas células tumorais e não-tumorais utilizadas. Os resultados demonstraram que o complexo Ru(GA) 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 composto foi capaz de diminuir o número e tamanho de colônias, de modificar o citoesqueleto e de atuar inibindo a capacidade migratória das células tumorais. O complexo também foi capaz de induzir apoptose aumentando a expressão de genes pró-apoptóticos como Bax, Caspase-9, e Caspase-3 e diminuindo a expressão genes anti-apoptóticos Bcl-2, nas células tumorais de mama triplo negativas. Além destes efeitos, o Ru(GA) aumentou a expressão de proteínas apoptóticas e a taxa de células em sub-G1 nas células tumorais. Ensaio de interação do Ru(GA) com transferrina mostraram que esta possui forte participação no contato entre complexos de rutênio e células tumorais, aumentando assim sua eficácia. Esses resultados mostram que o complexo Ru(GA) possui potencial antitumoral para células tumorais de mama, podendo ser uma nova alternativa de fármaco para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: apoptose; câncer de mama; compostos inorgânicos; efeitos antitumorais; rutênio; triplo-negativo.

Introdução

3. Introdução

3.1 Incidência do Câncer

A partir dos anos 1960 tem se observado mudanças no perfil das enfermidades que acometem populações humanas. Doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de morte, sendo substituídas pelas doenças do aparelho circulatório e pelas neoplasias. A progressiva ascensão da incidência e da mortalidade por doenças crônico-degenerativas tem como principal causa o envelhecimento da população, resultado do intenso processo de urbanização e das ações de promoção e recuperação da saúde ((INCA). 2016). Nesse cenário, os cânceres têm se tornado um problema de saúde pública cada vez mais relevante, em particular nas últimas décadas.

Atualmente, o câncer é a segunda causa principal de mortes no mundo e, apesar dos muitos avanços terapêuticos na área, a mortalidade é ainda muito elevada. Em 2012, ocorreram 14,1 milhões de novos casos da doença e 8,2 milhões de mortes. Para o ano de 2030, a previsão é o surgimento de 21,4 milhões de novos casos de câncer no mundo, com um total de 13,2 milhões de mortes (FERLAY et al., 2015). No Brasil, a estimativa para o biênio 2016-2017, aponta para a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer. O câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero ((INCA). 2016).

Várias podem ser as causas para o aparecimento da doença. Estima-se que 10% dos casos estão relacionados à hereditariedade, mas alguns fatores sociais aumentam as taxas de incidência do câncer e são responsáveis por 90% dos casos, tais como o uso do tabaco, exposição a agentes tóxicos, uso de drogas, má alimentação, sedentarismo e obesidade, e exposição à radiação, por exemplo. 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 (MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000). Já a falta de informação adequada à população, educação precária e falta de acesso aos serviços de saúde com regularidade, dificultam o diagnóstico precoce do câncer, contribuindo para a alta mortalidade ((INCA). 2016).

3.2 O Câncer

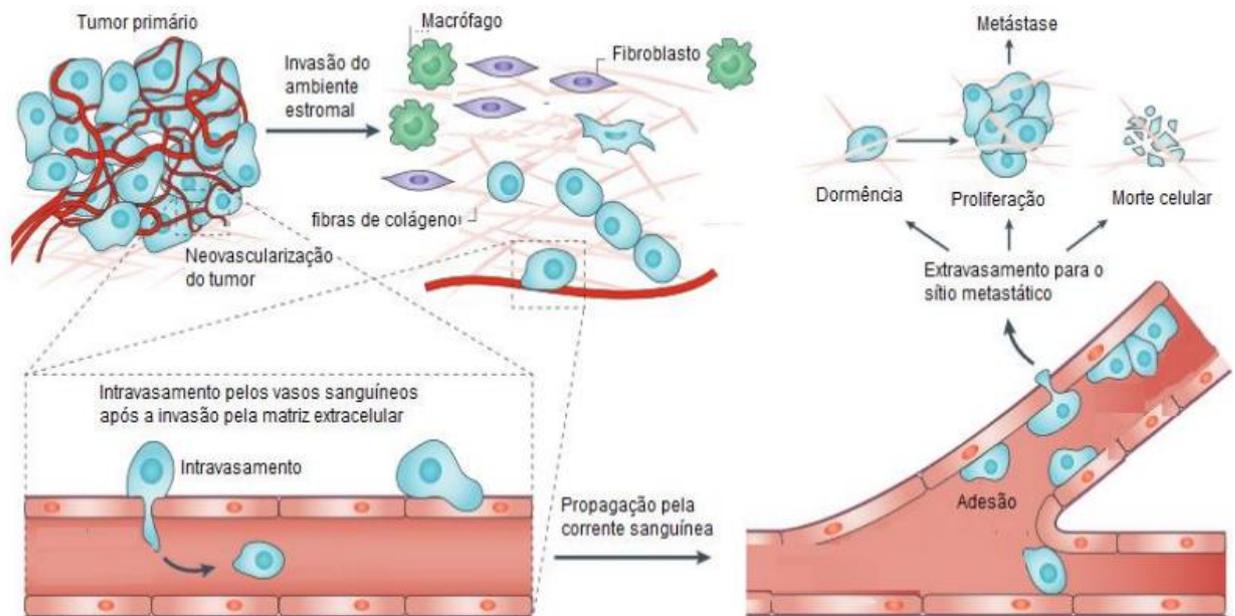
Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças extremamente heterogêneas que ocorrem em diferentes tecidos, mas que possuem em comum o crescimento desordenado de células. A transformação celular, ou seja, o processo no qual uma célula normal é transformada em uma célula maligna, acontece após uma série de mutações acumuladas (EVAN; VOUSDEN, 2001). Os principais grupos de genes envolvidos neste processo são: os proto-oncogenes, que estimulam o crescimento celular, impedem a diferenciação e a morte celular; e os genes supressores de tumor, que limitam a replicação de células, controlando negativamente a proliferação e a sobrevivência celular. O desequilíbrio deste sistema altera a função destes genes, levando a uma perda do controle do ciclo celular, a uma expansão clonal descontrolada das células afetadas e a um acúmulo de erros no DNA destas células em constante divisão (PEDRAZA-FARINA, 2006). Assim, as células que passaram pelo processo de carcinogênese são menos especializadas do que suas correspondentes normais, ocasionando uma perda progressiva da funcionalidade do tecido ((INCA). 2016).

As alterações genéticas conferem novas características fenotípicas às células neoplásicas que garantem a malignidade tumoral, tais como: fornecimento de seus próprios sinais para proliferação, resistência aos sinais inibitórios de crescimento, resistência à morte celular, replicação sem limites, angiogênese sustentada, capacidade de alcançar um alto índice de metabolismo energético, causando um estresse metabólico e oxidativo ao tecido adjacente e, capacidade de invadir tecidos através das membranas

basais, capilares sanguíneos e circulação linfática (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Adicionalmente, o sistema imune não consegue eliminar grande parte das células tumorais devido aos efeitos imunossupressores mediados por estas células (BHUTIA; MAITI, 2008).

As células neoplásicas possuem características de invasão e metástase, fatores que agravam o quadro clínico do paciente. A formação de metástases é um processo complexo e envolve diversas etapas como pode ser visto na Figura 1. Após a célula normal adquirir e acumular características tumorais, há um crescimento celular progressivo que inicialmente é mantido pela difusão simples dos nutrientes necessários, mas, quando o tumor primário atinge um tamanho suficiente, o processo de angiogênese inicia-se com a síntese e secreção de fatores pró-angiogênicos que contribuem para a formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos para continuar suprindo sua nutrição (CAIXEIRO et al., 2014).

Figura 1 – Processo de formação de sítios metastáticos.



*Extraído e modificado de (REYMOND; D'AGUA; RIDLEY, 2013).

O desenvolvimento e a progressão do tumor dependem de uma comunicação contínua entre as células e o microambiente tumoral, já que este proporciona sustentação, invasão, defesa ao sistema imune e também, maior resistência ao tratamento (WHITESIDE, 2008). O microambiente tumoral é constituído principalmente de células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e proteínas de matriz extracelular (MEC), e todos esses fatores contribuem para a formação de novos vasos e nutrição aumentada do tumor (Figura 1). Como por exemplo, os macrófagos recrutados por quimioatraentes derivados do tumor, são capazes de fornecerem fatores pró-migratórios como fator de crescimento epidermal (EGF) e promover remodelação proteolítica da MEC, assim, a migração e invasão das células tumorais pelos tecidos adjacentes, característica adquirida após a transformação celular, é facilitada (QUAIL; JOYCE, 2013).

As células metastáticas do tumor primário sofrem alterações morfológicas que as permitem perder o contato célula-célula e adquirirem motilidade. Assim, estas células despreendem-se das células adjacentes, e juntamente com a degradação proteolítica da MEC são capazes de atravessar o tecido circundante e a camada de células endoteliais dos vasos, podendo disseminar-se amplamente através da circulação sanguínea e linfática. Se as células sobreviverem ao sistema imune e ao estresse de cisalhamento da circulação, serão capazes então de extravasar dos vasos, atingindo tecidos distantes de sua origem (Figura 1) (CAIXEIRO et al., 2014).

Uma vez alojadas no sítio metastático, as células tumorais podem ou entrar em um estado de dormência, ou entrar em morte celular e assim, o processo de metástase é interrompido. No entanto, a capacidade destas células em reiniciar uma expansão proliferativa completa o processo metastático, com a formação de um novo tumor,

juntamente com novos vasos e a capacidade destas células de evadir do sistema de defesa do hospedeiro (Figura 1) (VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

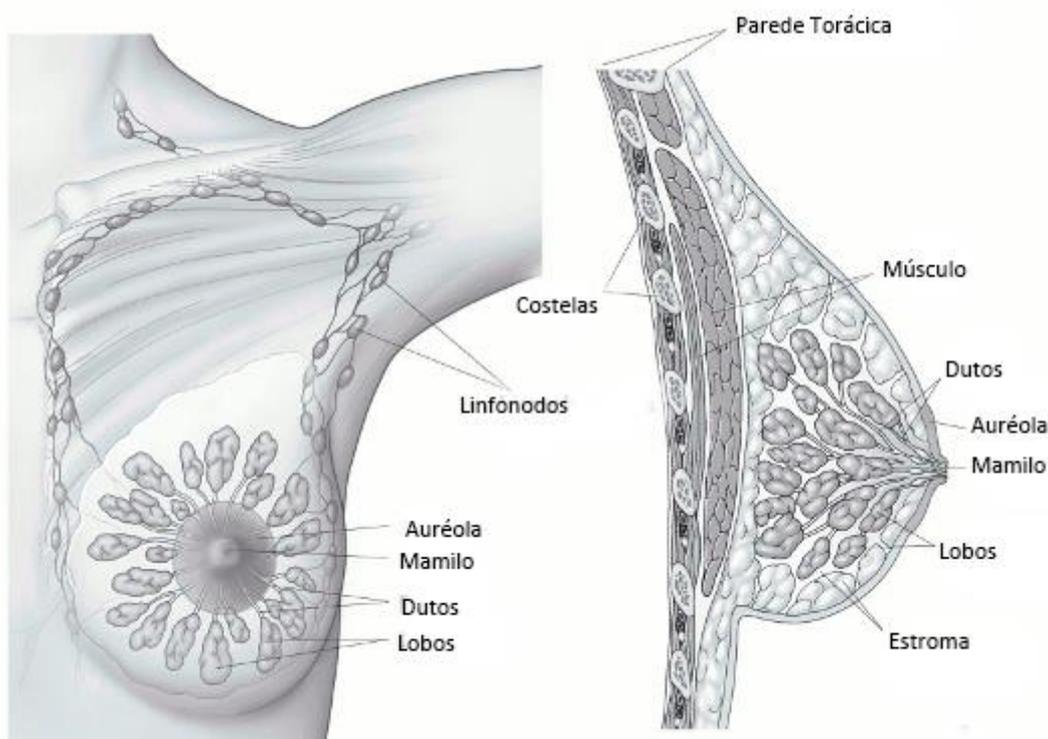
3.3 O Câncer de Mama

O câncer de mama é o segundo tipo mais incidente de câncer na população e o mais comum entre as mulheres globalmente (YOULDEN et al., 2012). Em 2012, ocorreram 1,7 milhão de novos casos da doença e 522.000 mortes por câncer de mama em todo o mundo. Apesar do alto índice de ocorrência, o câncer de mama é o quinto tipo de causa de mortes por câncer devido ao prognóstico altamente favorável atualmente (FERLAY et al., 2015). No Brasil, para o biênio de 2016-2017, a estimativa é do aparecimento de aproximadamente 58.000 novos casos em mulheres, correspondendo à 28,1% dos casos registrados por câncer ((INCA). 2016). Muitos são os fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento da doença, como obesidade, menopausa tardia, consumo de álcool, uso de contraceptivos orais, sedentarismo, não amamentação quando se têm filhos em idades mais avançadas, terapias de reposição hormonal, além do histórico familiar, envelhecimento e predisposição genética, entre outros (MCPHERSON et al., 2000). Estas informações reforçam a necessidade de planejamento de ações e programas de controle, prevenção e tratamento do câncer de mama.

Mundialmente, 89% dos cânceres de mama são diagnosticados a partir dos 40 anos de idade ou mais (ESSERMAN; SHIEH; THOMPSON, 2009). O diagnóstico precoce tem mostrado ser importante devido à forte associação entre o estágio diagnosticado (ou tamanho do tumor) e a taxa de sobrevivência (SOERJOMATARAM et al., 2008). Para muitos tipos de câncer de mama, a propensão à invasão de linfonodos e agravamento do estágio tumoral aumentam conforme aumenta-se o tamanho do tumor, levando à baixa sobrevivência. A mamografia é o método mais eficiente atualmente para a identificação precoce do tumor (SMITH et al., 2006).

A mama feminina é um órgão que situa-se na parede anterior do tórax, na parte superior e está apoiada sobre o músculo peitoral maior. É composta por 15-20 lobos, e cada lobo é formado por partes menores denominadas lóbulos. Nos lóbulos são encontradas as glândulas produtoras de leite. Há a presença de ductos, que são responsáveis pelo transporte do leite das glândulas até o mamilo, e conseqüentemente para o ambiente externo. Os lobos, os ductos, os vasos sanguíneos e linfáticos presentes na mama são envoltos por tecidos adiposo e conjuntivo denominados estroma (Figura) (FOULKES; REIS-FILHO; NAROD, 2010). O tipo mais comum de câncer de mama é o carcinoma ductal, que ocorre nas células epiteliais que formam os ductos e corresponde a 70% dos casos. O Segundo tipo mais comum é o carcinoma lobular, que ocorre nas células epiteliais dos lóbulos. Alguns casos menos comuns ocorrem nas duas regiões (TOSS; CRISTOFANILLI, 2015).

Figura 2 – Anatomia normal da mama feminina.



*Extraído e modificado de (ACS, 2016).

Além da diferenciação anatômica, do ponto de vista clínico e patológico, o câncer de mama pode ser classificado em subtipos moleculares, que diferenciam-se de acordo com a expressão gênica e estão relacionados com a agressividade do tumor, propensão à metástases e resposta aos tratamentos quimioterápicos. São classificados principalmente de acordo com a expressão de alguns receptores que respondem a sinais de crescimento na membrana (NORUM; ANDERSEN; SORLIE, 2014). 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 são caracterizados por células com um baixo índice de proliferação, representado pelo índice Ki-67. 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, ou seja, maior Ki-67 comparado com o luminal A. Estes primeiros subtipos são associados a melhores prognósticos para o paciente (ACS, 2016).

O subtipo HER-2 apresenta uma alta expressão positiva para HER-2, juntamente com amplificação das vias de sinalização relacionadas a estes receptores, e é negativo para receptores hormonais como RE e RP. Os tumores mamários que expressam HER-2 são caracterizados pela alta expressão de genes relacionados à progressão do ciclo celular e proliferação, apresentando assim 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. Finalmente, o subtipo basal, também conhecido por triplo-negativo, não apresenta a expressão RE, RP ou HER-2, mas expressam receptores para fator de crescimento epidérmico (EGFR). Possui células com rearranjos genômicos complexos, sendo considerado tumores de estágio avançado, com alta taxa proliferativa. Este tipo representa de 15-20% dos casos de câncer de mama. Tumores do

tipo HER2 e triplo-negativos são os mais propensos à recorrências e metástases para órgãos como o fígado, pulmões, ossos e cérebro (ACS, 2016).

O tratamento dos tumores luminal A, B e HER-2 pode ser auxiliado com terapias-alvo, que irão antagonizar estes receptores ou diminuir a produção destes hormônios, dificultando o crescimento tumoral (BLOK et al., 2015). Como por exemplo, o tamoxifeno, que antagoniza os receptores de estrogênio e o transtuzumab que antagoniza os receptores para HER-2, aumentam a eficácia dos tratamentos. Nos cânceres do tipo triplo-negativo, o tratamento é dificultado, já que as células tumorais não possuem estes marcadores de superfície e portanto, não há um alvo específico para as terapias atuais (ENGBRAATEN; VOLLAN; BORRESEN-DALE, 2013). Assim, os tumores de mama triplo negativo ainda representam um grande desafio para o desenvolvimento de tratamentos e fármacos específicos para essa linhagem.

As principais alterações genéticas relacionadas ao câncer de mama são mutações no gene supressor tumoral *TP53*, responsável pela codificação da proteína p53, que participa da via de sinalização quando há danos à molécula de DNA. Se o dano puder ser reparado, a proteína sinaliza para ativação de vias de reparo, se não, a proteína sinaliza para impedimento da divisão celular e iniciação de apoptose. Alterações também podem ser encontradas nos genes *PIK3CA* e *MAP3K1*, responsáveis pela codificação da região catalítica da proteína fosfatidilinositol 3-quinase (PIK3) e proteínas da família MAPK respectivamente. Estas proteínas participam de vias de sinalização intracelulares importantes para crescimento, sobrevivência, diferenciação e proliferação das células (TOSS; CRISTOFANILLI, 2015).

O sintoma mais comum do câncer de mama é o aparecimento de uma massa ou nódulo na mama, que pode ser denso, com bordas irregulares e ser dolorido ao toque ou não. Outros possíveis sintomas são um inchaço em toda ou parte da mama, eritemas,

dores na mama ou no mamilo, retração do mamilo, inchaço no braço ou nódulo aumentado na região da axila, espessamento ou retração da pele da mama ou do mamilo, ou detecção de secreção saindo do mamilo (SMITH et al., 2006).

Tumores que são detectados por uma avaliação, como a mamografia, quando são locais, ou seja, não começaram metástase ainda, pode ser curados por remoção cirúrgica, que pode variar de apenas remoção do tecido em que está o tumor a até remoção da mama inteira, incluindo linfonodos adjacentes dependendo da extensão do tumor. Pode ser usada também a radioterapia para auxílio de tratamento após a cirurgia, quando o tumor estiver local. Porém, se o tumor já iniciou seu processo metastático, a quimioterapia é o único tratamento sistêmico para o câncer (SHAPIRO; RECHT, 2001).

A quimioterapia é uma combinação de medicamentos para tratamento sistêmico de metástases. Os agentes quimioterápicos ideais devem agir seletivamente para matar ou inibir o crescimento das células neoplásicas, deixando as células normais intactas. Contudo, a maioria dos medicamentos utilizados em quimioterapia atualmente, devido à alta toxicidade, provocam danos no DNA, tanto das células tumorais, como também das células normais, provocando a morte das células de rápida divisão (como as hematopoiéticas e do bulbo capilar) e caracterizando os indesejáveis efeitos colaterais associados (BOYD; PAULL, 1995). Adicionalmente, o tratamento quimioterápico deixa os pacientes mais sensíveis à infecções, provoca náuseas, vômitos, diarreias e até danos aos ovários.

As técnicas quimioterápicas utilizadas atualmente não são capazes de erradicar todas as células neoplásicas do tumor. Estas, destroem apenas uma proporção das células que foram expostas ao tratamento ou agem somente em estágios específicos do ciclo celular da célula tumoral, podendo levar às recorrências tumorais e resistência à medicação (SCHWARTSMANN et al., 2002). Assim, a busca por medicamentos

antitumorais mais seletivos para as células neoplásicas e com menos efeitos adversos ao paciente torna-se fundamental para os avanços na pesquisa envolvendo compostos quimioterápicos e para melhora da qualidade de vida do paciente com câncer.

Muitas são as opções de quimioterápicos atualmente para o tratamento de casos avançados de câncer de mama. Por exemplo, dentre os utilizados de origem natural está o paclitaxel, da classe dos taxanos, que atua na função normal de polimerização dos microtúbulos, interferindo assim em todo o processo de transporte, sustentação, sinalização e divisão da célula tumoral. A doxorubicina impede a ação da enzima topoisomerase II em abrir a cadeia de DNA, impedindo o processo de replicação. A gencitabina, um antibiótico, atua substituindo as citosinas na molécula de DNA impedindo o processo de replicação. Também inibe a enzima ribonucleotídeo redutase, importante para a síntese de nucleotídeos durante a replicação. Outro quimioterápico amplamente utilizado é a cisplatina, primeiro membro dos agentes tumorais à base de platina, e sua principal ação é fazer ligações intrafita na molécula de DNA, causando quebras na molécula e interferindo também nos processos de replicação. Durante o tratamento do câncer, estes fármacos são utilizados em determinadas combinações, levando em consideração o estágio do tumor (SMITH et al., 2006).

3.4 Mecanismos de morte celular e Apoptose

Uma célula normal é mantida em uma faixa estreita de funções e estrutura por limitações de espaço ocasionadas pelas células vizinhas, pelo seu estado metabólico, disponibilidade de nutrientes, diferenciação e especialização. No entanto, as células atuando em conjunto, são capazes de suprir as demandas fisiológicas, mantendo sempre um estado homeostático por meio de respostas adaptativas. Estas consistem em respostas estruturais e funcionais reversíveis a estresses fisiológicos e alguns estímulos

patológicos permitindo assim que a célula sobreviva e continue a funcionar (HETZ, 2007).

As adaptações podem consistir em mudanças no número, tamanho e atividade funcional da célula. Quando o estresse é eliminado, a célula pode retornar a seu estado original, sem ter sofrido qualquer consequência danosa. Se os limites da resposta adaptativa forem ultrapassados pela exposição das células a agentes lesivos, privadas de nutrientes essenciais, ou ficarem comprometidas por mutações que afetam os constituintes celulares essenciais por exemplo, sobrevém uma sequência de eventos, chamada lesão celular. Esta é caracterizada por tumefação generalizada da célula e suas organelas; formação de bolhas na membrana plasmática; destacamento dos ribossomos do RE e aglomeração da cromatina nuclear. Essas alterações morfológicas estão associadas com o decréscimo de geração de ATP, perda da integridade da membrana celular, defeitos na síntese de proteínas, danos ao citoesqueleto e danos ao DNA. A lesão celular é reversível até um certo ponto, mas se o estímulo persistir ou for intenso o suficiente desde o início, a célula sofre lesão irreversível e, finalmente, entra em processo de morte celular (KUMAR, V. et al., 2014).

A morte celular é um dos eventos mais cruciais na evolução de doenças, em qualquer tecido ou órgão. É resultante de várias causas, incluindo isquemia (redução do fluxo sanguíneo), infecção e toxinas. A morte celular constitui também um processo normal e essencial na embriogênese, no desenvolvimento dos órgãos e na manutenção da homeostasia. Existem duas vias principais de morte celular, a necrose e a apoptose. A privação de nutrientes induz uma resposta celular adaptativa chamada autofagia que pode culminar também em morte celular (HOTCHKISS et al., 2009).

O aspecto morfológico da necrose é caracterizado pelo inchaço da célula e de suas organelas, resultado de uma desnaturação de proteínas intracelulares e da digestão

enzimática das células lesadas. As células necróticas são incapazes de manter a integridade da membrana e seus conteúdos sempre extravasam, um processo que pode iniciar inflamação no tecido circundante (GOLSTEIN; KROEMER, 2007). As enzimas que digerem a célula necrótica são derivadas dos lisossomos das próprias células que estão morrendo ou dos lisossomos dos leucócitos que são recrutados como parte da reação inflamatória. É provocada acidentalmente em resposta à lesões que privam oxigênio à célula (hipóxia), situações de falta de metabólitos necessários, exposição à substâncias tóxicas à célula, ou lesões por estímulos como força mecânica, frio ou calor (KUMAR, V. et al., 2014).

Um segundo tipo de morte celular é por autofagia. Este constitui-se em um mecanismo de sobrevivência em períodos de privação de nutrientes, quando a célula afetada inicia um processo de digestão e reciclagem de seu próprio conteúdo. Assim, as organelas intracelulares e partes do citosol são primeiramente internalizadas em vacúolos autofágicos, que subsequentemente se fundem com lisossomas para formar autofagolisossomas, e os componentes celulares são digeridos por enzimas lisossômicas (MIZUSHIMA et al., 2008). A morte celular por autofagia também pode ser iniciada por exposição da célula a agentes infecciosos ou detecção de um produto de síntese ou metabolismo anormal da célula (HOTCHKISS et al., 2009). A autofagia pode ser reversível se o estímulo de estresse cessar, mas se for superior à capacidade de recuperação da célula, esta entra em processo de vacuolização massiva do conteúdo celular e morte. O processo autofágico tem sido relacionado à perda celular em várias doenças degenerativas dos sistemas nervoso e muscular; em muitos destes distúrbios, as células lesadas contêm vacúolos autofágicos em abundância (KUMAR, V. et al., 2014).

Outro mecanismo de morte celular, a apoptose, é a morte programada da célula, um processo regulado que ocorre normalmente nos organismos para manter a renovação dos tecidos a partir de sinais de morte provenientes de outras células. As células

destinadas a morrer ativam enzimas que degradam seu próprio DNA e as proteínas nucleares e citoplasmáticas. Mas a apoptose também pode ser induzida por estímulos patológicos, quando ocorrem danos à célula, como mutações, e assim, entra em processo de morte por apoptose para evitar a propagação da lesão (ALBERTS; LEWIS; RAFF, 2008). A apoptose é um processo organizado, caracterizado por compartimentalização do conteúdo celular em estruturas vesiculares, chamados de corpos apoptóticos, e com isso a diminuição da célula, também a condensação da cromatina, com consequente fragmentação nuclear. As estruturas fragmentadas formadas são reconhecidas e fagocitadas por células do sistema imune (HOTCHKISS et al., 2009). No caso de tratamento do câncer, a apoptose é o tipo de morte celular de preferência para um agente antitumoral atuar, pois essa morte mais organizada, com fragmentação em vesículas e posterior fagocitose não permite o extravasamento dos conteúdos celulares para o meio, evitando uma resposta inflamatória local, e assim, não provoca danos ao tecido (XU; SHI, 2007).

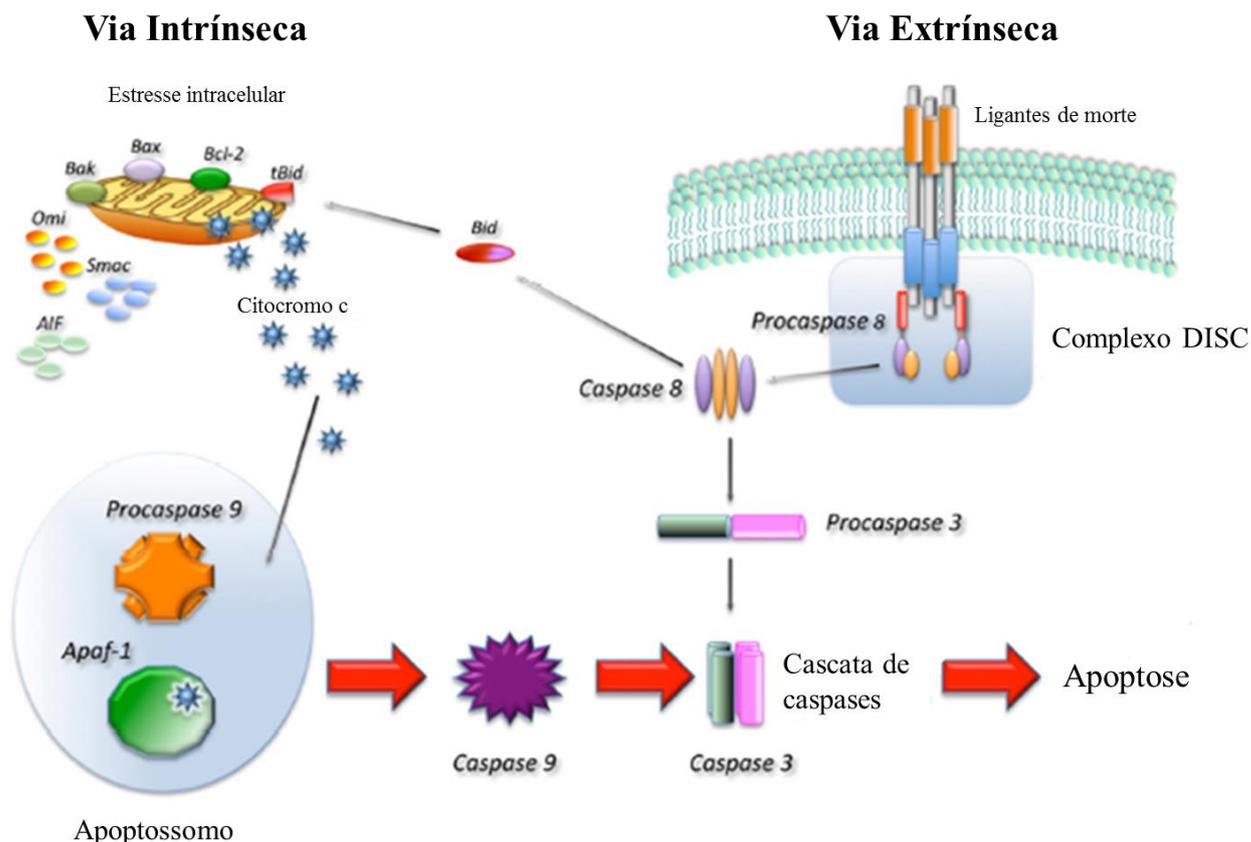
O início da apoptose ocorre principalmente por sinais originados de duas vias distintas: a via intrínseca ou mitocondrial, e a via extrínseca ou morte iniciada por receptor (Figura 3) (FAVALORO et al., 2012). Estas, são iniciadas de maneiras diferentes e convergem para a ativação das caspases, proteases mediadoras reais da morte celular. As caspases são expressas nas células na forma de precursores inativos (pró-caspases) e necessitam de clivagem para sua ativação (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008). Estas proteases clivam diferentes substratos no citoplasma ou no núcleo, levando à muitas das características morfológicas vistas no processo apoptótico (DEGTEREV; BOYCE; YUAN, 2003).

A via extrínseca é ativada pela ligação de ligantes específicos a receptores de morte celular de superfície, tais como Fas e receptores ligantes de fator de necrose tumoral (TRAIL). Esta ligação permite a agregação de proteínas ao domínio intracelular

do receptor, que juntamente com um pró-domínio de caspases iniciadoras, resultam na formação do complexo DISC (*Death Inducing Signalling Complex*), onde ocorre a ativação da pró-caspase 8, que pode clivar caspases efetoras, como a caspase-3, levando à apoptose (FAVALORO et al., 2012); (PARRISH; FREEL; KORNBLUTH, 2013).

Por outro lado, a via intrínseca pode ser ativada por uma variedade de sinais, incluindo radiação, calor, medicamentos citotóxicos, estresse celular, privação de fatores de crescimento, todos fatores que causam danos à célula e seu DNA. Assim, em resposta a estes fatores, vias de sinalização são convergidas para a mitocôndria, que sofre alterações em seu potencial de membrana e permeabilidade. A permeabilização da membrana é mantida por uma coordenação de membros da família de proteínas Bcl-2. A disfunção da membrana mitocondrial provoca a liberação de proteínas mitocondriais para o citoplasma da célula, dentre elas o citocromo c, que forma um complexo com o fator de ativação associado à apoptose-1 (APAF-1) e com a pró-caspase 9, o que leva à ativação da caspase-9, desencadeando conseqüentemente a ativação das caspases-6/7/3, culminando também no início de um processo apoptótico (XU; SHI, 2007); (FAVALORO et al., 2012); (KANG; REYNOLDS, 2009).

Figura 3 – Vias de ativação de apoptose.



Extraído e modificado de (FAVALORO et al., 2012).

A família das proteínas Bcl-2 regula a permeabilidade da membrana mitocondrial e pode determinar se a célula iniciará ou abortará o processo de apoptose. Esta família é constituída por aproximadamente 25 membros, sendo alguns anti-apoptóticos, como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 e Bfl/A-1 e também, pró-apoptóticos, como Bax, Bak, Bok, Bim, Bad e Bid. As proteínas anti-apoptóticas são responsáveis por manterem a integridade e a funcionalidade dos poros da membrana mitocondrial e um aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas desencadeada por vias sinalizadoras, inibem a ação de Bcl-2, provocando a abertura dos canais voltagem-dependente na mitocôndria, causando perda do seu potencial de membrana (KANG; REYNOLDS, 2009). A compreensão dos mecanismos e alterações intracelulares nos componentes das vias apoptóticas são fundamentais para o desenvolvimento de novas terapias para o câncer.

3.5 Uso de compostos inorgânicos à base de metais no tratamento de neoplasias

O desenvolvimento de antitumorais à 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 (NH₄Cl), sob uma corrente produzida por eletrodos de platina (KELLAND, 2007). 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 possível formação de compostos pela reação entre a platina dos eletrodos e o NH₄Cl da solução, em presença da corrente elétrica aplicada e luz. Dentre os compostos 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 pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1978 com o nome comercial de *Platinol*®. Atualmente, a cisplatina ainda é um dos melhores fármacos antitumorais, sendo responsável pela cura de mais de 90% dos casos de câncer testicular em homens e, ainda, desempenha um papel importante nos tratamentos de alguns tipos de câncer, como de ovário, mama, cabeça, pescoço, câncer de bexiga, entre outros. Além de ser capaz de ligar-se à molécula de DNA, causando sua quebra, acredita-se que a cisplatina também atue em outros alvos intracelulares como por exemplo: nas mitocôndrias, aumentando o nível de estresse intracelular e de espécies reativas de oxigênio; nos lisossomos, causando a liberação de enzimas lisossomais para o citosol; danos ao retículo, interferindo na síntese proteica e também; ser capaz de induzir danos ao

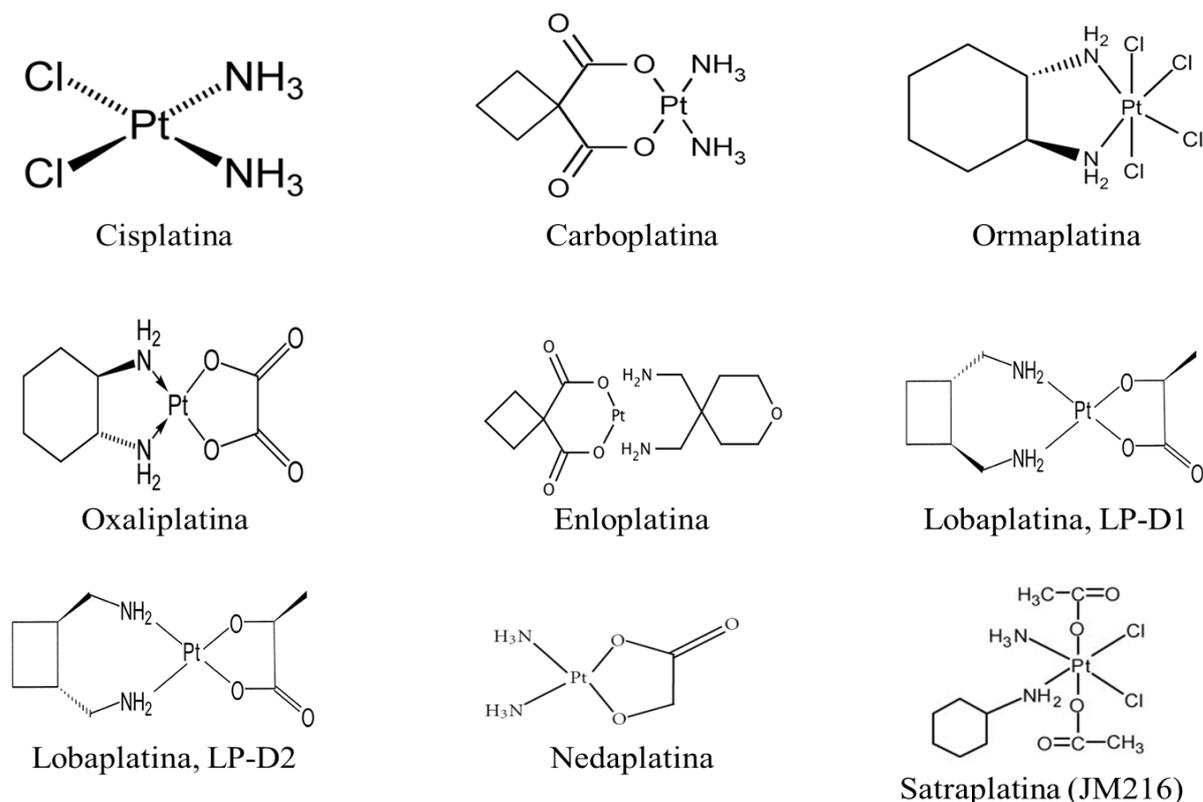
citoesqueleto, interferindo assim em todo o funcionamento da célula tumoral e levando à apoptose. Apesar de sua alta eficácia, os efeitos colaterais como nefrotoxicidade, gastrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade, mielossupressão e a resistência celular, representam uma limitação para seu uso clínico (FLOREA; BUSSELBERG, 2011). As 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.

Vários análogos da cisplatina têm sido sintetizados e testados clinicamente para tentar aumentar a eficácia do tratamento e com menos efeitos adversos, mas apenas a carboplatina e a oxaliplatina sobressaíram-se à cisplatina em relação aos efeitos adversos. A primeira por não apresentar nefrotoxicidade (BARABAS et al., 2008) e a segunda por não apresentar toxicidade hematológica (RAYMOND et al., 1998). Apesar do efeito mais brando destas drogas, são compostos atrativos para serem utilizados em combinação com outros quimioterápicos. A Figura 4 mostra a estrutura química da cisplatina, da carboplatina e outros análogos sintéticos que encontram-se em fase de testes pré-clínicos e clínicos (BARABAS et al., 2008).

O desenvolvimento de medicamentos antitumorais é um campo repleto de desafios. Enquanto alguns compostos citados já são reconhecidos e empregados como medicamentos para tratamento oncológico, outros com propriedades antineoplásicas promissoras encontram-se em fase de estudos. Geralmente são necessários de 20 a 30 anos para um medicamento ser desenvolvido. Durante este período, o mecanismo de ação de cada um deve ser elucidado, de modo a se identificar as atividades que podem ser realmente atribuídas ao composto, sua eficácia e segurança para uso, para então, serem utilizadas clinicamente (MACIEL et al., 2002). Para o desenvolvimento destes

compostos, são necessários uma grande diversidade de ensaios bioquímicos e biológicos para determinação de sua atividade específica em um determinado organismo ou célula alvo.

Figura 4 – Estrutura química da cisplatina e seus análogos.



*Extraído e Modificado de (DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

3.5. Complexos de rutênio com atividade antitumoral

Nas últimas décadas, muitos complexos de rutênio foram sintetizados e testados quanto às propriedades antitumorais como uma alternativa aos efeitos adversos da cisplatina (RADEMAKER-LAKHAI et al., 2004). O rutênio possui algumas propriedades que podem justificar seu potencial antitumoral como: a sua geometria de coordenação octaédrica em contraste com a geometria quadrado planar de complexos de platina, o que o faz formar moléculas mais estáveis, que poderão atingir seu alvo biológico sem sofrer alterações na sua estrutura central; a sua alta acessibilidade aos estados de oxidação (+2, +3, +4) em condições fisiológicas e versatilidade de ligantes

que podem contribuir para sua eficácia e seletividade para células tumorais; e sua capacidade de imitar o ferro na ligação a muitas biomoléculas, incluindo a transferrina e albumina (JAKUPEC et al., 2008).

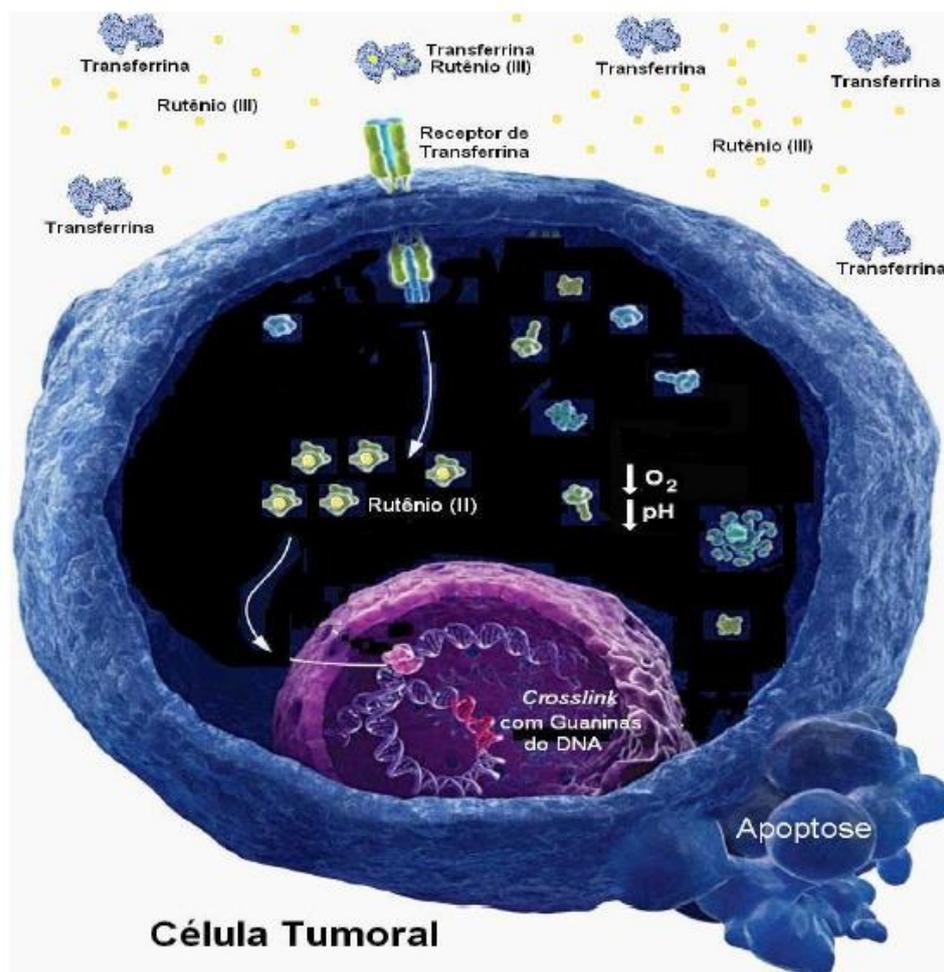
A albumina e transferrina são proteínas utilizadas pelo organismo humano para solubilizar e transportar o ferro, reduzindo assim a sua toxicidade. As células de rápida divisão, como por exemplo, as células tumorais, possuem uma maior necessidade de ferro, com isso, aumentam o número de receptores de transferrina localizados em suas superfícies, sequestrando mais ferro circulante. Adicionalmente, o alto metabolismo das células tumorais provoca um ambiente intracelular com baixos níveis de oxigênio e pH, facilitando assim a reação de redução (de rutênio +4 ou +3 para +2) e consequente ativação do rutênio (Figura 5). Assim, o rutênio pode ser administrado de uma forma que se tornará ativo somente na célula tumoral. Acredita-se que estas propriedades aumentam a especificidade do composto e faz com que o rutênio seja menos tóxico para as células não tumorais (ALLARDYCE; DYSON, 2001; BERGAMO; SAVA, 2011).

Estudos prévios demonstraram os efeitos antitumorais de complexos de rutênio *in vitro*. As ações mais notáveis atribuídas ao rutênio é sua alta citotoxicidade para diferentes linhagens tumorais humanas e indução de apoptose por causar danos ao DNA. De maneira geral, complexos metálicos, incluindo os de rutênio, podem ligar-se ao DNA por meio de interações eletrostáticas, intercalações, ligações covalentes e não-covalentes. Assim, promovem *crosslinks* entre as duas fitas, causando quebras na molécula e impedindo o processo de replicação (BRABEC; NOVAKOVA, 2006). Adicionalmente, os complexos de rutênio são capazes de bloquear o ciclo celular e causar disfunção mitocondrial mediada por ROS (XIE et al., 2013).

Diferentes complexos de rutênio foram citotóxicos e induziram apoptose em células de osteossarcoma MG-63 (LIU et al., 2015), de hepatocarcinoma HepG2 (TAN et al.,

2011), de adenocarcinoma cervical HeLa (PIERROZ et al., 2012), de carcinoma mamário MCF-7 (ZHAO et al., 2014) e MDA-MB-231 (CAO; ZHENG; CHEN, 2015), carcinoma pulmonar A549 e melanoma A375 (CHEN et al., 2010) por exemplo. Em adição, estudos *in vivo* demonstraram que o rutênio é capaz de reduzir o tamanho de diferentes tumores (BENADIBA et al., 2014; CARNIZELLO et al., 2016; CLAVEL et al., 2014). Assim, estudos com complexos de rutênio podem ser promissores e podem levar a descoberta de um novo modelo de fármaco antitumoral, já que esses apresentam características únicas e potencial terapêutico contra diversos tipos de câncer e metástase.

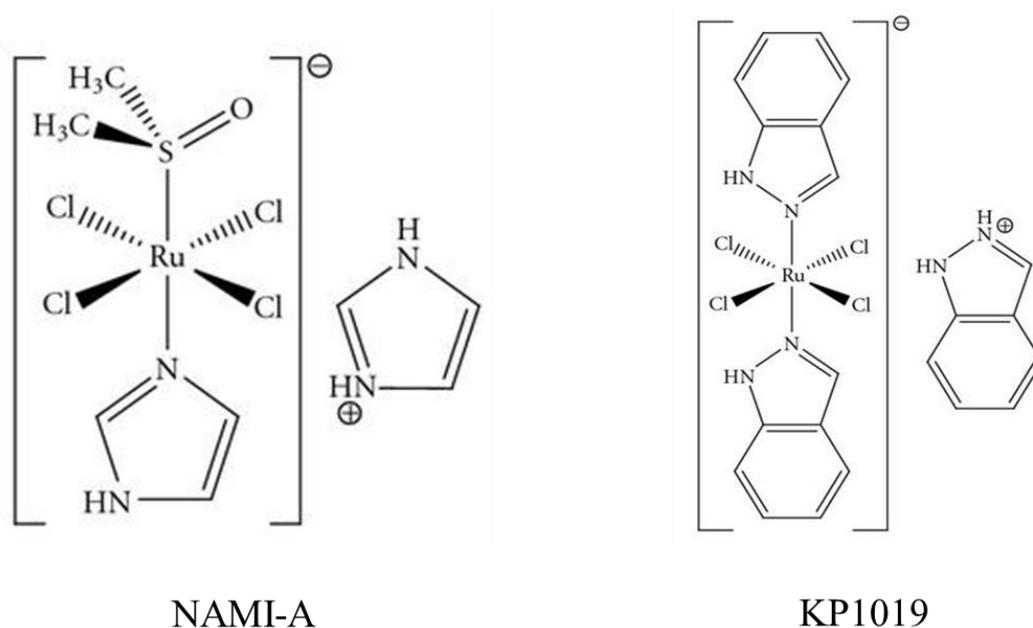
Figura 5 – Mecanismo de ação do rutênio no ambiente da célula tumoral.



*Extraído e modificado de (CLARKE, 2003).

Dois complexos de rutênio com potencial antitumoral entraram em fase de testes clínicos avançados: o Imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate (NAMI-A), entrou em testes clínicos fase 2 e demonstrou ser eficaz contra tumores sólidos de metástase pulmonar, e o fármaco Indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019), entrou em testes clínicos fase 1, demonstrando uma atividade promissora contra células de tumores colorretal (HARTINGER et al., 2006; LEIJEN et al., 2015). Suas estruturas estão representadas na Figura 6.

Figura 6 – Estrutura química dos compostos NAMI-A e KP1019.



*Extraído de (LEIJEN et al., 2015);(HARTINGER et al., 2008).

Tendo em vista o potencial antitumoral do rutênio, neste estudo foi utilizado um complexo de rutênio, composto por rutênio como átomo central e ácido gálico como ligante, denominado como $[Ru(GA)(dppe)_2]PF_6$. Este foi sintetizado e caracterizado sob responsabilidade do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (GRAMINHA, 2015). A adição do trifenol ácido gálico ao complexo deve-se às diversas propriedades biológicas já atribuídas a este composto amplamente encontrado na natureza. Contudo, a mais promissora é sua capacidade antitumoral.

Estudos prévios demonstraram que os efeitos antitumorais do ácido gálico estão relacionados à capacidade de geração de ROS e ao aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular, o que leva à liberação de citocromo c para o citoplasma e à ativação de caspases por meio de disfunção mitocondrial, culminando em apoptose (LOCATELLI; FILIPPIN-MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013). O ácido gálico também parece induzir apoptose por meio da ativação do receptor Fas e pela promoção de uma hiperexpressão de p53 e p21, resultando em alterações do ciclo celular, como bloqueios na fase G1/S e assim, morte celular (LOCATELLI et al., 2013). You e colaboradores demonstraram um aumento dos níveis de ROS e taxa de células apoptóticas com um tratamento de 50 μM de ácido gálico em células da linhagem HeLa. Neste mesmo estudo, o IC_{50} em 24h para estas células foi de 80 μM (YOU et al., 2010). Para células tumorais de mama da linhagem MCF-7, o valor de IC_{50} calculado foi de 80,5 μM em 24h, com um aumento de células apoptóticas em 50 μM de tratamento com ácido gálico (WANG et al., 2014).

Por outro lado, Yen e colaboradores, em um estudo com linfócitos humanos, demonstraram que, dependendo da concentração, o ácido gálico tem a habilidade de provocar uma diminuição dos níveis de desoxirribose, dos níveis do radical DPPH, pelo método do DPPH, e de peróxidos de hidrogênio, indicando uma atividade antioxidante (YEN; DUH; TSAI, 2002). Adicionalmente, o ácido gálico é capaz de inibir a ciclooxigenase-2 (COX-2); que está mais expressa em células tumorais e são enzimas fundamentais para a síntese de prostaglandinas, responsáveis por reações inflamatórias locais, como maior permeabilidade capilar e atração de macrófagos, que irão fornecer fatores de sobrevivência para as células tumorais (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013).

Assim, a hipótese deste trabalho é que a junção de dois quimioterapêuticos em potencial, o ácido gálico e o rutênio, permita uma melhor ação citotóxica do novo complexo formado, além de um potencial efeito quimiopreventivo aos tecidos, por meio

da propriedade anti-inflamatória do ligante e também, pela presença do grupo farmacofórico do complexo livre para atuar - grupos fenólicos do anel do ácido gálico. Estes, podem atuar como possíveis inibidores de estresse oxidativo, já que grupos fenólicos são capazes de neutralizar ânions superóxidos em excesso nas células tumorais. Adicionalmente, espera-se que o $[\text{Ru}(\text{GA})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ altere seletivamente o comportamento *in vitro* das células neoplásicas de mama do tipo triplo-negativo em relação à progressão tumoral, atuando sobre a morfologia normal das células, capacidade de proliferação acentuada, capacidade migratória e invasiva, e seja capaz de provocar apoptose e danos às células.

3.7. Uso de ensaios *in vitro* na pesquisa em câncer

No estudo da atividade biológica de novos compostos é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico. Os sistemas de ensaio devem ser simples, sensíveis e reprodutíveis. Assim, os estudos *in vitro* tornam-se ferramentas fundamentais não apenas para o entendimento da gênese e desenvolvimento de diversas doenças, mas, também, para a observação dos efeitos primários de tratamento utilizando um determinado composto (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

O câncer de mama triplo-negativo mostra-se altamente agressivo, resistente à quimioterapias e em muitos casos, o tratamento apenas aumenta a sobrevida do paciente, que volta a ter a doença. Assim, um aumento no entendimento da biologia molecular desta doença e identificação de novos compostos para tratamento e alvos terapêuticos é essencial (LE DU et al., 2015). Enquanto há vários compostos com uma atividade antitumoral promissora, deve-se tomar cautela em quais modelos escolher para testá-los e garantir que possuem relevância para tratamento da doença em humanos. Assim como em outras doenças, muitos estudos ainda estão em andamento para tentar elucidar as vias moleculares importantes que levam à tumorigênese e

progressão do câncer de mama (MACIEL et al., 2002). No entanto, estudos pré-clínicos completos são necessários para identificar novos alvos terapêuticos e permitir o desenvolvimento de agentes antitumorais adequados.

Um grande número de linhagens celulares estão disponíveis com diferentes alterações genéticas e morfológicas. A maioria dos estudos que utilizam linhagens celulares *in vitro* de carcinoma são conduzidos com seu crescimento em monocamadas apoiadas em um plástico para cultura estéril. No entanto, mesmo simples e econômico, esta técnica possui limitações. Por exemplo, as linhagens celulares estabelecidas para uso *in vitro* em alguns casos, podem apresentar comportamentos metabólicos e farmacocinéticos diferentes do tecido cancerígeno. Adicionalmente, mesmo utilizando sistemas tridimensionais que fazem uso de cultura em matrigel, que podem fornecer um modelo *in vitro* fisiologicamente mais relevante para a dinâmica do ambiente tumoral, é preciso reconhecer que os tumores em si são envoltos por suporte mesenquimal, elementos vasculares, matriz extracelular e outros tipos celulares que podem favorecer seu crescimento (KYKER; CULKIN; HURST, 2003).

Nos ensaios podem ser utilizadas as células normais imortalizadas, que representam uma forma de controle importante na pesquisa com novos compostos antitumorais e proporcionam uma oportunidade de se avaliar a resposta celular *in vitro*. Mesmo reconhecendo as limitações do modelo para pesquisa, essas linhagens são úteis como controle normal ou benigno, ou para estudar alterações genéticas e morfológicas, comparando seu comportamento com as linhagens tumorais (TRUSCHEL et al., 1999).

Muitas linhagens celulares originadas de carcinomas de alto grau/estágio avançado também estão disponíveis para estudo. Estas células variam em morfologia, mutações/deleções, características epiteliais e mesenquimais, padrão de crescimento, e outras características como o potencial invasivo e metastático (KILLION; RADINSKY;

FIDLER, 1998). Neste estudo, será utilizada a linhagem MDA-MB-231, correspondente à células tumorais de mama do tipo triplo-negativo. Esta linhagem fornecerá informações importantes em como o composto deste trabalho atua em células que por si só já fornecem desafios aos tratamentos atuais por não possuírem um alvo terapêutico específico. Estes resultados serão de grande utilidade à pesquisa relacionada ao câncer de mama.

A atividade citotóxica das drogas estabelecida em cultura de células tumorais pode ser avaliada através de métodos de observação de variações da morfologia celular, da viabilidade celular, do metabolismo celular normal após tratamento, e no caso, será interessante se for observada uma diminuição das características metastáticas das células (SKEHAN et al., 1990). Reconhecendo as limitações dos ensaios *in vitro*, mesmo assim, ainda são utilizados como ferramentas essenciais de avaliação das alterações moleculares em estudos e dos efeitos pioneiros que as células sofrem quando em contato com o composto estudado.

Objetivos

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo analisar o potencial do complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{GA})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, um complexo inorgânico o qual chamamos de Ru(GA), composto de rutênio como átomo central e ácido gálico como ligante, como agente antitumoral em potencial mais específico para células neoplásicas, avaliando seus efeitos em células epiteliais tumorais triplo-negativas e normais de mama em relação à morfologia normal das células, capacidade de proliferação acentuada, capacidade migratória e invasiva, e de indução de apoptose.

4.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito citotóxico do complexo pelo método do MTT em células tumorais de mama MDA-MB-231 e não tumorais de mama MCF-10A. Assim como determinar a IC_{50} de exposição *in vitro* ao tratamento para as diferentes linhagens;

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

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

4. Avaliar o potencial de indução de apoptose pelo complexo na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, através de ensaios por citometria como PE-Anexina-V e ciclo celular; e outros ensaios *in vitro* como PCR em tempo real e Western Blotting. E também, avaliar o dano nuclear induzido pelo complexo na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, através do ensaio de marcação com DAPI;

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

6. Comparar as eventuais diferenças observadas no comportamento *in vitro* de células tumorais tratadas com o complexo em relação às células não tratadas e, comparar diferenças nas respostas ao tratamento entre as células tumorais e as células não-tumorais, a fim de observar seletividade do complexo para as células tumorais;

7. Avaliar possíveis interações do complexo com as moléculas de DNA, albumina e transferrina e o grau de interação. E também, avaliar se as proteínas de transporte, albumina e transferrina, relacionam-se com a interação entre o complexo e as células tumorais, interferindo assim na eficácia do tratamento.

Materiais e Métodos

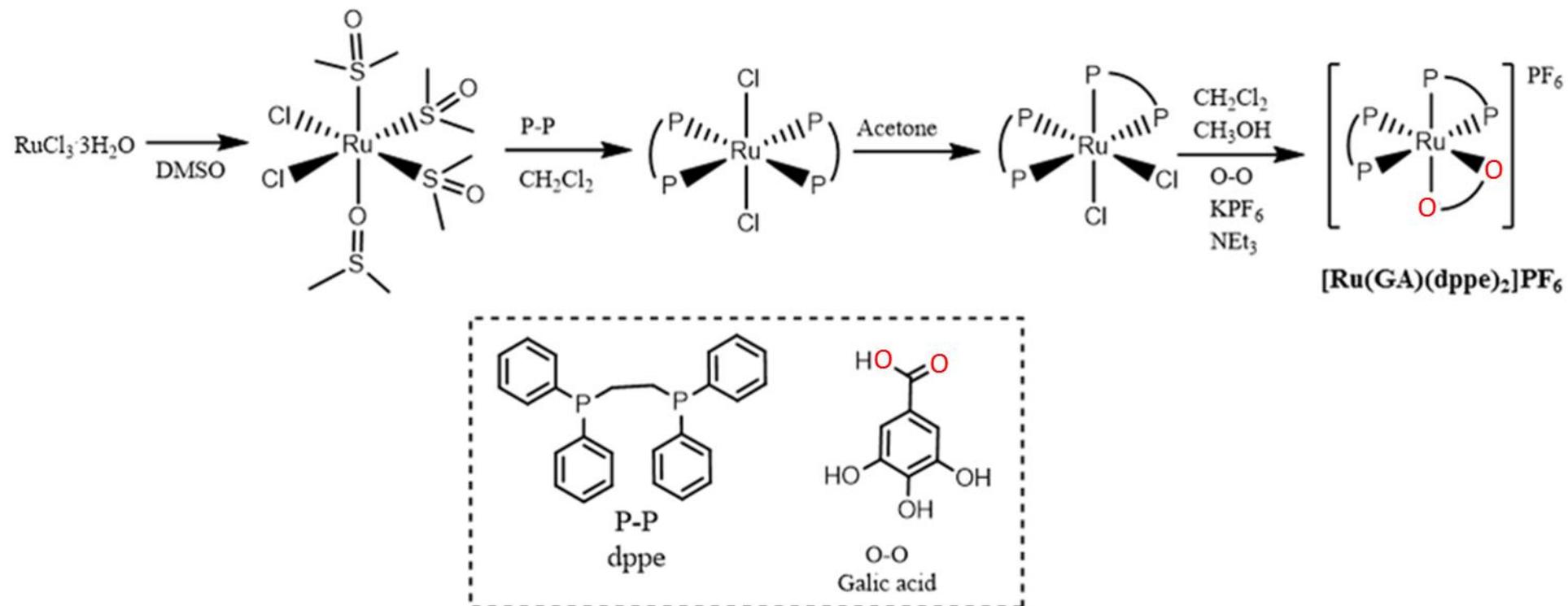
5. Materiais e Métodos

5.1 Síntese e caracterização do Ru(GA)

O complexo foi fornecido após sua síntese pelo Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista do Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI) do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos, SP – Brasil). O processo de síntese e caracterização foi parte do projeto de doutoramento em química da Dra. Angélica Ellen Graminha, do mesmo laboratório (GRAMINHA, 2015). Para síntese, 0,07mmol de ácido gálico (GA) e 0,07mmol de trietilamina (Et₃N) foram dissolvidos em uma solução contendo 5mL de metanol e 25mL de diclorometano (CH₂Cl₂) em uma atmosfera de argônio. Em seguida, 0,05g (0,07mmol) do precursor *cis*-[RuCl₂(dppe)₂] (BAUTISTA et al., 1991) e 0,013g (0,07mmol) de hexafluorofosfato de potássio (KPF₆) foram adicionados à solução. Após 8h de reação o CH₂Cl₂ foi evaporado e 1mL de H₂O foi adicionado. O composto foi filtrado, lavado com água e hexano, e seco a vácuo. O rendimento final de reação foi de: [Ru(GA)(dppe)₂]PF₆ = 0,058g (92%). Este processo está esquematizado na Figura 7. O complexo foi dissolvido em DMSO (Sigma-Aldrich) e aplicado às células em uma concentração final de 1% DMSO.

Análise elementar do [Ru(GA)(dppe)₂]PF₆·½ CH₂Cl₂: encontrada (%): C, 56.61; H, 4.19; teórica (%): C, 56.97; H, 4.34. Espectro de absorção: UV-Vis (λ (nm), ε (M⁻¹ cm⁻¹)): 256 (19585), 346 (1109). Condutividade molar em CH₂Cl₂: 54.9 S cm² mol⁻¹. Espectro de absorção na região do infravermelho (IR) (KBr) cm⁻¹: ν(OH) 3510, ν(CH) 3057, ν_{as}(COO⁻) 1615, ν(C=C) 1587, ν_s(COO⁻) 1499, ν_s(C=C_{arom}) 1485, ν(C=C_{phosp}) 1434, δ(OH_{phenol}) 1311, ν(C-O_{phenol}) 1280, ν(P-CH) 1096, ν(P-F) 844, γ(arom) 697, δ(P-F) 558, ν(Ru-P) 512, ν(Ru-O) 481. Espectro NMR ³¹P (JIANG et al.) (ppm) (CH₂Cl₂): δ 59.9, 58.4 ³J_{p-p} 16.9 (Hz). MALDI-TOF (m/z): 898.093 [M- PF₆-(GA)-H]⁺ e 1067.089 [M- PF₆]⁺. Peso molecular: 1211,97g/mol.

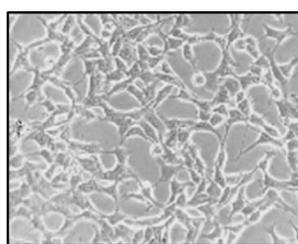
Figura 7 - Esquema resumindo o processo de síntese do complexo Ru(II)/Ácido gálico/difenilfosfina etano.



5.2 Linhagens celulares e padronização do cultivo *in vitro*

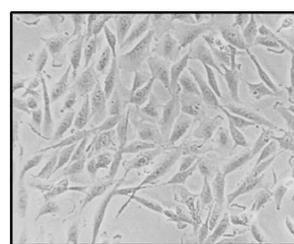
Duas linhagens celulares provenientes de tecido epitelial de mama humana foram utilizadas para os experimentos: uma linhagem não-tumoral, a MCF-10A e uma linhagem tumoral triplo-negativa, a MDA-MB-231. Estas foram obtidas do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) do Departamento de Gerontologia da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos, SP – Brasil), sob responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti. A MCF-10A foi cultivada em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium F12* (DMEM/F12) suplementado com 5% de soro de cavalo, 20ng/mL de Fator de Crescimento Epidermal (EGF), 0,5µg/mL de hidrocortisona, 10µg/ml de insulina e antibióticos apropriados. A MDA-MB-231 foi cultivada em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e antibióticos apropriados. As linhagens foram mantidas a 37°C em incubadora com 95% de umidade relativa e 5% CO₂, a fim de simular as condições fisiológicas e as passagens foram obtidas por tripsinização. Estas linhagens possuem um padrão de crescimento por aderência e suas morfologias estão ilustradas na Figura 8.

Figura 8 – Aspecto das linhagens celulares utilizadas no estudo avaliadas em microscópio óptico invertido, aumento de 100×.



MDA-MB-231

Linhagem humana de carcinoma de mama triplo-negativo



MCF-10A

Linhagem humana epitelial não-tumoral de mama

5.3 Avaliação da citotoxicidade

Para avaliação dos efeitos do Ru(GA) sobre a proliferação e viabilidade das células, foi realizado o ensaio colorimétrico, já padronizado na literatura (MOSMANN, 1983),

metiltiazol tetrazolio (MTT), que consiste na absorção do sal de 1-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan pelas células vivas e sua redução no interior da mitocôndria, originando cristais de formazan. O método consiste basicamente em adicionar às células tratadas, 100µL do MTT diluído a 1mg/mL em cada poço. Após 4 horas de incubação, o meio foi retirado e os precipitados de cristais de formazan diluídos em 100µL de DMSO. A coloração obtida nos poços foi lida em espectrofotômetro em 540nm.

As células foram semeadas em placa de 96 poços em uma quantidade de 1×10^4 células por poço; após 24h foram expostas à concentrações crescentes do composto (0,0122 a 75µM) e monitoradas por até 48h, quando então, foram preparadas para leitura em espectrofotômetro. Cada condição experimental foi avaliada em triplicatas. A referência equivalente a 100% de viabilidade foi dada pela média dos valores obtidos para exposição das células somente ao veículo (meio de cultivo, sem o composto). Para controle positivo de inibição de proliferação foi utilizada a cisplatina. O ácido gálico foi aplicado às células em uma concentração de 3,12 a 200µM.

Ao fim deste experimento, esperou-se observar uma diminuição da proliferação celular das células tumorais tratadas quando comparadas com as que não receberam tratamento. Neste ensaio também foi calculada a IC_{50} do composto (concentração que inibe a viabilidade das células em 50%) sob as linhagens utilizadas por meio da Equação de *Hill* no *software* estatístico GraphPad Prism. O índice de seletividade (IS), que mostra o quanto um composto é seletivo para a linhagem tumoral, foi calculado pela relação $IC_{50} \text{ MCF-10A} / IC_{50} \text{ MDA-MB-231}$ (BADISA et al., 2009).

5.4 Coeficiente de partição

O coeficiente de partição em água-octanol é um parâmetro utilizado para medir a característica hidrofóbica de uma determinada molécula e como esta é distribuída nas estruturas não-polares como as membranas celulares ou em soluções aquosas como o plasma sanguíneo, linfa e fluídos intracelulares (MCKEAGE et al., 2000). Se $\log P < 0$,

o composto é dissolvido preferencialmente em soluções aquosas, tendo um caráter hidrofílico, contudo, se $\log P > 0$, a afinidade do composto é mais por fases orgânicas, apresentando um caráter hidrofóbico. Este parâmetro foi determinado pelo método *shake flash* (BAKA; COMER; TAKACS-NOVAK, 2008). O complexo foi adicionado a uma mistura de igual volume de água (750 μ L) e octanol (750 μ L), que foi mantida sob agitação por 24h a 1000rpm e a 27°C. As amostras foram centrifugadas por 5min a 500rpm e a fase orgânica e aquosa foram separadas. A concentração do composto em cada fase foi determinada por UV-Vis e o valor de P foi calculado por meio da fórmula $\text{Log } P = \log(C_o/C_a)$, onde C_o e C_a correspondem às concentrações do complexo no octanol e na água, respectivamente.

5.5 Morfologia celular

A análise dos efeitos do Ru(GA) sobre a morfologia celular é um passo importante para avaliar visualmente se este composto é capaz de alterar o crescimento das células tumorais, sua estrutura celular e interação com o ambiente de cultivo ao longo do tempo. Para isso, as linhagens foram semeadas em placa de 12 poços em uma concentração de 1×10^5 por poço e, após 24h (tempo suficiente para adquirirem sua morfologia normal), foram expostas às concentrações crescentes do composto (0,049 a 25 μ M) e então, fotografadas em microscópio óptico invertido (Nikon, T5100) com câmera acoplada em aumento de 100 \times em intervalos de 2h, 4h, 8h, 24h e 48h a fim de observação dos efeitos. A eficiência do tratamento nesta análise foi comparada com controle negativo (células sem tratamento).

5.6 Formação de colônias

Este experimento permite a observação de possíveis efeitos citotóxicos ou citostáticos do Ru(GA) sobre a capacidade proliferativa das células tumorais. O ensaio consiste basicamente em semear 300 células em placas de Petri de 6cm e incubá-las em meio apropriado por 24h a 37°C para permitir o crescimento. Então, as células são

expostas à concentrações crescentes do composto (0,0122 a 0,78 μ M) por 48h, em seguida o meio com tratamento é retirado, sendo substituído por meio de cultura apenas. Após 10 dias de incubação, as células foram fixadas em metanol + ácido acético (3:1) por 5min, em seguida, são coradas com cristal violeta 0,5% em metanol por 15min, para então, as placas serem lavadas com água. Ao final do experimento, foi observado e contado o padrão de crescimento em colônias das células, tanto em número quanto em tamanho com auxílio do *software Image J*. Se as colônias foram reduzidas em número nas células tratadas, o composto é considerado citotóxico. Já, se forem reduzidas em tamanho, ou seja, a proliferação foi bloqueada, o composto é considerado citostático (FRANKEN et al., 2006).

5.7 Interação com o DNA

Dois experimentos para avaliar a interação do Ru(GA) com a molécula de DNA foram realizados: por titulação espectroscópica e pela inibição da fluorescência do tiazol laranja (TO). Todas as medidas com DNA (*calif thymus* (ct), Sigma-Aldrich) foram feitas em tampão Tris-HCl (5mM Tris-HCl e 50mM NaCl, pH 7,4). A concentração de DNA foi determinada por análise da absorção espectrofotométrica utilizando o coeficiente molar de absorção de 6.600 mol⁻¹ L cm⁻¹ a 260nm (FREDERICQ; OTH; FONTAINE, 1961). A titulação espectroscópica foi realizada pela adição de quantidades crescentes de DNA a uma solução do complexo, em concentração fixa (20 μ M), em uma cubeta e registrando o espectro UV-vis do complexo após cada adição. A constante de ligação intrínseca K_b foi calculada por meio da equação abaixo, onde [DNA] é a concentração de DNA em determinada medição, e os coeficientes aparentes de absorção (ϵ_a , ϵ_f e ϵ_b) correspondem às medidas de espectro do complexo de rutênio em cada adição de DNA, ao complexo totalmente ligado ao DNA e, ao espectro somente do DNA, respectivamente (VEAL; RILL, 1991).

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

Para a inibição da fluorescência do TO, as medidas foram realizadas utilizando uma solução de *ct*-DNA (100 μ M) e TO (10 μ M). O decaimento da intensidade de emissão do TO entre 540 a 680nm (excitação a 520nm) foi monitorada utilizando o Ru(GA) como supressor em concentrações crescentes (0 a 10 μ M), dissolvido em DMSO. Os experimentos foram realizados em triplicata em uma placa de 96 poços opaca. As medidas de fluorescência foram feitas em um fluorímetro *Sinergy H1 BioTek* a 25°C.

5.8 Interação com albumina humana e transferrina

Os grupamentos de triptofano são a principal fonte de absorção e emissão de UV nas proteínas, e sua emissão é sensível a mudanças no microambiente local, podendo ser utilizada para monitorar interações entre proteína e ligante (SCHREURS et al., 2012). Os resíduos de triptofano fazem com que a albumina humana (HSA) e a apo-transferrina humana (apo-Tf) sejam altamente fluorescentes com um pico de emissão entre 300 a 340nm, quando excitadas a aproximadamente 280nm (KANDAGAL et al., 2006). A análise da interação Ru(GA) – HSA/apo-Tf foi realizada por meio da medição do decaimento de fluorescência do triptofano. Assim, as proteínas foram aplicadas em uma solução de 2,0 μ M de HSA/apo-Tf em tampão Tris-HCL pH 7,4, separadamente. A concentração da solução de HSA (Sigma-Aldrich) foi determinada por análise de absorção espectrofotométrica utilizando o coeficiente molar de absorção de 36,500 mol⁻¹ L cm⁻¹ em 280nm (NAIK; NANDIBEWOR, 2016). Já para a apo-Tf (Sigma-Aldrich), a concentração foi determinada em 84,000 mol⁻¹ L cm⁻¹ em 270nm (SPIEWAK; BRINDELL, 2015). O decaimento da intensidade de emissão do triptofano entre 300 e 500nm (excitação em 280nm para a HSA e 270nm para a apo-Tf) foi monitorado utilizando o Ru(GA) como supressor em concentrações crescentes (5 a

50 μ M), dissolvido em DMSO, enquanto que a concentração da proteína foi mantida constante em todas as amostras. Os experimentos foram feitos em triplicata em uma placa de 96 poços opaca. As medidas de fluorescência foram feitas em um fluorímetro *Sinergy HI BioTek* a 25°C e 37°C. A constante de ligação (K_b), a qual indica uma interação de moderada a forte entre proteína e complexo, e o número de sítios de ligação por molécula da proteína (n) podem ser determinados pela equação:

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

onde F_0 e F representam a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do complexo respectivamente, K_b é obtida por meio do coeficiente linear da equação de reta do gráfico $\log(F_0 - F)/F \times \log[Q]$, n também pode ser calculado por meio do coeficiente angular da mesma equação de reta, e $[Q]$ é a concentração do complexo em determinado ponto. Os resultados também podem ser analisados pela equação clássica de *Stern-Volmer* a fim de calcular a constante de decaimento:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$$

onde K_q corresponde à constante da taxa de decaimento biomolecular, τ_0 corresponde ao tempo de vida médio do fluoróforo na ausência do supressor ($\sim 10^{-9}$ s), e K_{sv} é a constante de decaimento de *Stern-Volmer*, a qual indica interações estáticas ou dinâmicas entre o complexo e a proteína (LAKOWICZ; WEBER, 1973).

Para avaliar o tipo de interação (hidrofóbica, eletrostática, van der Waals, pontes de hidrogênio, etc) que está agindo entre a proteína e o complexo, alguns parâmetros termodinâmicos, como energia livre de Gibbs (ΔG°), variação de entalpia (ΔH°), e variação de entropia (ΔS°) foram determinados. Estes parâmetros foram calculados com valores das duas temperaturas utilizadas por meio das seguintes equações:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b$$

onde R é a constante dos gases, T é a temperatura em Kelvin (K), K_b é a constante de interação com a proteína calculada para cada temperatura.

$$\Delta H^\circ = \left[\ln \left(\frac{K_{b1}}{K_{b2}} \right) \times R \right] / a$$

onde K_{b1} é constante calculada para a primeira temperatura, K_{b2} é a constante para a segunda temperatura, R é a constante dos gases e $a = (1/T1 - 1/T2)$, sendo T em Kelvin.

$$\Delta S^\circ = -(\Delta G - \Delta H)/T$$

O sinal e a magnitude dos parâmetros termodinâmicos podem indicar alguns tipos de interações operando entre o complexo e proteínas: ΔH° e ΔS° positivos sugerem interações hidrofóbicas; ΔH° e ΔS° negativos sugerem ligações por pontes de hidrogênio ou van der Waals; e ΔH° negativo mas ΔS° positivo sugerem interações eletrostáticas (GANESHPIANDIAN et al., 2014).

5.9 Transporte do Ru(GA) por albumina e transferrina

Este ensaio foi realizado com a finalidade de avaliar a interferência da albumina e da transferrina no transporte do Ru(GA) e sua interação com as células. Assim, as linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A foram semeadas em placas de 96 poços em uma concentração de 1×10^4 células/poço e após 24h, foram expostas por 48h a uma concentração próxima do IC_{50} encontrada no ensaio de MTT para cada linhagem ($0,5 \mu M$ para a MDA-MB-231 e $3,12 \mu M$ para a MCF-10A). Adicionalmente, um tratamento com concentrações crescentes – recomendadas pelo fabricante - de albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich), (20 a $300 \mu g/mL$), e transferrina humana (apo-Tf, Sigma-Aldrich), (0 a $100 \mu g/mL$) foi adicionado separadamente. A porcentagem de células viáveis em cada tratamento foi analisada por um ensaio de MTT. A referência de 100% de viabilidade foi determinada pelas células controle (sem tratamento). Neste experimento, foi esperado observar uma diminuição na viabilidade das células proporcionalmente ao aumento da concentração das proteínas, quando comparadas com as células que receberam somente o composto, indicando assim que a determinada proteína pode aumentar a interação entre a célula e o complexo. Um controle de células

recebendo tratamento somente com a proteína foi utilizado a fim de afirmar a citotoxicidade do composto.

5.10 Migração celular

Os efeitos do Ru(GA) sobre a migração das células tumorais foram avaliados pelo método de *Wound Healing*. Para este ensaio, as células MDA-MB-231 a uma concentração de 2×10^5 por poço foram semeadas em placa de 12 poços e após 24h, um risco foi feito na porção central de cada poço, removendo as células desta região com o auxílio de uma micropipeta. Os poços foram lavados com PBS para remover as células desaderidas. Em seguida, as células foram expostas a concentrações crescentes do complexo (0,195 a $3,12 \mu\text{M}$) e incubadas por 24h. Durante o período de incubação, a área da risca foi analisada com auxílio de microscópio óptico invertido (Nikon, T5100) em aumento de $40\times$ a fim de observar o fechamento da risca. Fotos foram tiradas em 0, 6, 12 e 24h de tratamento. A área de fechamento foi medida com auxílio do *software Image J*, e a porcentagem de fechamento foi calculada, comparando os tempos com o tempo zero, utilizando a fórmula previamente descrita (YARROW et al., 2004).

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

5.11 Invasão celular

Um ensaio de invasão celular permite avaliar os efeitos do Ru(GA) sobre este importante passo da metástase. Assim, foi realizado um ensaio de invasão analisando a capacidade das células tumorais em atravessar uma camada de matrigel como previamente descrito (FUZER et al., 2013). Brevemente, as células MDA-MB-231 a uma concentração de $0,5 \times 10^5$ células por inserto foram semeadas em insetos contendo matrigel em uma placa de 24 poços (*BioCoat Matrigel Invasion Chambers Kit*, BD Biosciences). Os insertos foram previamente hidratados com meio de cultura sem FBS por 30min em incubadora a 37°C . As células foram semeadas na parte superior do

inserto juntamente com concentrações crescentes do composto (0,195 a 3,12 μ M) completando um volume final de 350 μ L de meio de cultura sem FBS. Na parte inferior, 750 μ L de meio com 10% FBS foi adicionado para atuar como um quimioatraente indutor de migração celular. As células foram permitidas migrar por 22h a 37°C e após o tratamento, as células que remaneceram na parte superior foram removidas com auxílio de um *swab* de algodão. As células que migraram pela matrigel foram fixadas com metanol por 5min, e coradas com azul de toluidina (1%) e borato de sódio (1%) diluídos em água por 5min. As membranas de cada inserto foram cortadas e fixadas em lâminas histológicas. Os insertos então foram fotografados em microscópio em 5-10 áreas aleatórias e as células que migraram foram contados no *software Image J*. Os tratamentos foram comparados com o controle positivo para migração (células sem composto, e meio com 10% FBS na parte inferior do inserto) e com o controle negativo (células sem composto, e meio sem FBS na parte inferior do inserto).

5.12 Marcação com Faloidina

Alterações nas proteínas do citoesqueleto podem interferir nos mecanismos de migração e invasão das células tumorais e ativarem sinais para apoptose. Assim, se o complexo Ru(GA) for capaz de alterar o citoesqueleto, pode inibir passos do processo de metástase e levar à morte celular. Para avaliar danos à organização do citoesqueleto causados pelo complexo, as células foram coradas com faloidina *Alexa Fluor 488*® (ThermoFisher Scientific). As células MDA-MB-231 e MCF-10A foram plaqueadas a uma concentração de 1×10^4 células por poço em uma placa escura de 96 poços com fundo transparente (Corning Incorporated®) e após 24h de incubação a 37°C, foram expostas a concentrações crescentes do composto (12,5 a 50 μ M) por 6h. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido, as células foram fixadas com paraformaldeído (3,7%) em PBS por 30 min e permeabilizadas com Triton X-100 (0,1%) em PBS por 5min em temperatura ambiente. Esta reação foi bloqueada pela

adição de BSA a 2% em PBS por 30min. Assim, as células foram marcadas com faloidina *Alexa Fluor 488*® por 20min e coradas com DAPI a 1µg/mL (Life Technologies, Carlsbad, CA) para marcação nuclear por 10min. As imagens foram obtidas em microscópio automático *ImageXpress*® *Micro XLS System* (Molecular Devices) com amplificação de 400× e ajuste confocal.

5.13 Indução de danos ao DNA

Uma das características mais importantes da apoptose é a indução de danos ao DNA. Para avaliar se o Ru(GA) é capaz de causar estes danos nas células tumorais, a linhagem MDA-MB-231 foi plaqueada a uma concentração de 1×10^4 células por poço em uma placa escura de 96 poços com fundo transparente (Corning Incorporated®). Após 24h de incubação a 37°C, as células foram expostas a concentrações crescentes do composto (12,5 a 100µM) por 8h e então, fixadas com metanol por 10min e coradas com DAPI a 1µg/mL (Life Technologies, Carlsbad, CA) para marcação nuclear por 10min. As imagens foram obtidas em microscópio automático *ImageXpress*® *Micro XLS System* (Molecular Devices) com amplificação de 400× e ajuste confocal. Juntamente às imagens, foi realizada uma quantificação dos núcleos com cromatina condensada e dos corpos apoptóticos formados após o tratamento.

5.14 Detecção de apoptose por citometria de fluxo

Durante a progressão tumoral, as células malignas são capazes de desenvolver mecanismos de escape aos sinais inibitórios de crescimento e à apoptose, levando à resistência aos tratamentos quimioterápicos. Assim, uma substância capaz de desencadear um processo apoptótico mais específico para células tumorais seria de grande interesse na pesquisa envolvendo compostos antitumorais. A taxa apoptótica foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando o *PE Annexin V Apoptosis Detection kit* (BD Biosciences). O processo inicial de apoptose é caracterizado pela exposição de um fosfolípido de membrana ao ambiente extracelular, a fosfatidilserina (FAS). A

Anexina- V é uma proteína com alta afinidade para a FAS e é capaz de se conjugar com o fluorocromo PE. Adicionalmente, o fluorocromo 7AAD pode ser apenas internalizado por células com suas membranas já danificadas. Assim, neste ensaio, é possível distinguir a porcentagem de células viáveis (Anexina V e 7AAD negativos), células na fase inicial de apoptose (Anexina V positivo e 7AAD negativo) e, células na fase tardia de apoptose ou já mortas (Anexina V e 7AAD positivos). As células MDA-MB-231 e MCF-10A foram plaqueadas a uma concentração de $0,7 \times 10^5$ células por poço em uma placa de 24 poços. Após 24h de incubação a 37°C , foram expostas a concentrações crescentes do Ru(GA) (3,12 a $50\mu\text{M}$) por 24h e, após seguir algumas recomendações do *kit*, as células foram incubadas no escuro com $2,5\mu\text{L}$ de PE Anexina V e $2,5\mu\text{L}$ de 7AAD por 15min. A análise foi feita em citômetro de fluxo *Accuri C6* (BD Biosciences) gravando 15.000 eventos para cada tratamento. A fluorescência emitida por cada corante foi quantificada no *software CellQuest* (BD Biosciences), e esta é proporcional à porcentagem de células em cada estágio de morte celular. A taxa apoptótica dos tratamentos foi comparada com o controle (células sem composto). A camptotecina a $32\mu\text{M}$ foi utilizada como controle positivo de indução de apoptose.

5.15 Detecção de bloqueio no ciclo celular por citometria de fluxo

A capacidade do Ru(GA) em induzir bloqueio no ciclo das células tumorais também foi avaliado. As células MDA-MB-231 foram semeadas a uma concentração de 1×10^6 células por poço em uma placa de 6 poços e após 24h de incubação a 37°C , foram tratadas com concentrações crescentes do composto (0,195 a $3,12\mu\text{M}$) por 24h. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e fixadas com etanol (70%) por 24h a -20°C . Após a fixação, as células foram novamente lavadas com PBS, incubadas com RNase ($0,2\text{mg/mL}$) por 30min a 37°C e depois com iodeto de propídeo – PI ($20\mu\text{g/mL}$) por 1h no gelo e no escuro. O DNA marcado foi analisado em citômetro de fluxo *Accuri C6* (BD Biosciences) gravando 20.000 eventos por tratamento e as células em cada fase

do ciclo celular foram quantificadas no *software CellQuest* (BD Biosciences). Camptotecina a 32 μ M foi utilizada como controle positivo de indutor de bloqueio de ciclo celular.

5.16 PCR em tempo real

Uma reação de PCR em tempo real foi realizada para avaliar os efeitos do Ru(GA) sobre a expressão de genes relacionados à apoptose. Foi esperado que o tratamento com o composto aumentasse a expressão de genes pró-apoptóticos como Bax e Caspase 3 e inibisse a expressão de anti-apoptóticos como BcL-2, além de ser mais seletivo para as células tumorais. Adicionalmente, a expressão de Caspase 8 e 9 foram também avaliadas, a fim de determinar a via de indução de apoptose. Neste ensaio, as células MDA-MB-231 e MCF-10A foram plaqueadas a uma concentração de 1×10^6 células por placa de Petri de 6cm e após 24h de incubação, foram expostas a concentrações crescentes do complexo (6,25 a 25 μ M) por 20h. O RNA total foi extraído pelo método de Trizol (Invitrogen), seguindo recomendações do fabricante. Em seguida, o RNA foi quantificado em Nanodrop (Thermo Scientific) e 1,5 μ g foi reversamente transcrito em cDNA utilizando o *Enhanced Avian RT First Strand Synthesis kit* (Sigma-Aldrich). As reações foram ajustadas para cada *primer*, dependendo de sua temperatura de *melting* específica utilizando o *software Rotor Gene 6* em um equipamento *Rotor-Gene RG 3000* (Corbett Life Science). Para a reação, 12,5 μ L de *SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix* (Sigma-Aldrich), 10 μ L de água ultrapura, 2 μ L do par de *primers* e 0,5 μ L de cDNA em uma concentração final de 500nmol L⁻¹, fazem um sistema de reação final de 25 μ L. Após a amplificação, as curvas de *melting* foram analisadas pelo monitoramento da fluorescência associada com o aumento da temperatura. As amostras foram amplificadas em triplicata. Os valores utilizados como base para padronizar os resultados de expressão foi a média dos valores de Δ Cts do grupo controle (sem composto). A calibração foi calculada como $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct (gene de interesse) – Δ Ct

(controle endógeno). O nível de expressão gênica foi determinado por quantificação relativa, utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), e a média da expressão de GAPDH foi usada como controle endógeno. A expressão dos genes relacionados à apoptose nas células tratadas foi comparado com o controle, além de eventuais diferenças de expressão nas células tumorais e nas não tumorais. A tabela 1 traz as sequências dos *primers* utilizados.

Tabela 1 – Sequência de *primers* utilizados no RT-qPCR.

Primer	Acesso no NCBI	Forward	Reverse
Bax	NM_001291428.1	5'CATCCAGGATCGAGCAGG3'	5'GCATGCGCTTGAGACACTC3'
Bcl-2	NM_000633.2	5'GGTGGGAGGGAGGAAGAAT3'	5'GCAGAGGCATCACATCGAC3'
Caspase-3	NM_004346.3	5'GTGCTACAATGCCCTGGAT3'	5'GCCCATTCATTTATTGCTTTCC3'
Caspase-9	NM_001229.3	5'GGAAGAGCTGCAGGTGGAC3'	5'CCTGCCCGCTGGATGTC3'
Caspase-8	NM_001080125	5'GGATGAGGCTGACTTTCTG3'	5'CTGGCAAAGTGACTGGATG3'
GAPDH	NM_001256799.1	5'GACTTCAACAGCGACCCAC3'	5'CACCACCCTGTTGCTGTAG3'

5.17 Western Blotting

Um ensaio de *western blotting* foi realizado para analisar a expressão de proteínas relacionadas à apoptose nas células tumorais. Assim, as células MDA-MB-231 foram plaqueadas a uma concentração de 1×10^6 células em placas de Petri de 6cm e após 24h de incubação, foram expostas a concentrações crescentes do complexo (6,25 a 25 μ M) por 24h. Após a incubação, as células foram lisadas com o reagente *CellLytic™ M* (Sigma-Aldrich), seguindo recomendações do fabricante. A concentração de proteínas nas amostras foram determinadas utilizando o *Pierce® BCA Protein Assay kit* (Thermo-Scientific). As amostras de proteínas (15 μ g) foram colocadas para correr em gel *Tris-glycine 4-20%* por 1h a 100V e transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad) seguindo recomendações do fabricante. Após o processo de transferência, as membranas foram bloqueadas com uma solução de Caseína 1% (BioRad) por 1h e incubadas

overnight com anticorpos primários anti-Caspase-3, anti-Caspase-9, anti-Bax e anti-Bcl-2 (1:1000) (abcam), seguido por uma incubação por 2h com anticorpo secundário *HRP-conjugated goat antimouse* (1:5000) (Thermo Scientific). β -actina foi utilizada como controle endógeno (Anticorpo anti- β -actina já conjugado – Abcam – 1:2000). As proteínas foram analisadas por quimioluminescência utilizando o *Clarity™ Western ECL Substrate* (BioRad), seguindo recomendações do fabricante. As bandas específicas foram visualizadas em fotodocumentador *ChemiDoc MP* (BioRad).

5.18 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e independentemente para garantir a confiabilidade dos resultados. Os dados foram expressos em média \pm D.P. A determinação da IC_{50} , as medidas estatísticas e os gráficos foram feitos no *software GraphPad Prism* (Inuitive Software for Science, San Diego, CA). Os resultados foram comparados por *one-way ANOVA* (significativo com $p < 0.05$), seguido pelo teste de *Dunnett*, o qual comparou os tratamentos com o controle.

Resultados e Discussão

6. Resultados e Discussão

6.1 Citotoxicidade do Ru(GA) e alterações morfológicas observadas

As técnicas quimioterápicas atualmente utilizadas não são capazes de erradicar todas as células tumorais, destruindo apenas uma proporção de células que foram expostas ao tratamento ou atuam em estágios específicos do ciclo celular das células tumorais, o que pode ocasionar recorrências tumorais e resistência aos tratamentos (SCHWARTSMANN et al., 2002). Assim, a pesquisa por compostos mais seletivos para células neoplásicas é fundamental. Este estudo apresenta a síntese e atividades biológicas de um novo complexo de rutênio Ru(GA) *in vitro*. A citotoxicidade sobre as células das linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A foi avaliada e os resultados expressos como valores de IC₅₀ estão descritos na Tabela 2. Como mostrado, o Ru(GA) exibiu maior citotoxicidade (IC₅₀ 4,5±0,29µM) contra a MDA-MB-231 e foi menos citotóxico para a MCF-10A (IC₅₀ 12,04±2,33µM) em 24h de tratamento, com um índice de seletividade de ~2,68 para as células tumorais. No entanto, a cisplatina mostrou ser mais citotóxica para a MCF-10A. Em 48h de tratamento, a maior seletividade do Ru(GA) (IC₅₀ 0,81±0,08µM) para as células MDA-MB-231 se manteve, apresentando menor citotoxicidade (IC₅₀ 5,82±0,33µM) para as células MCF-10A com um índice de seletividade de ~7,19 para as células tumorais. Resultados anteriores mostraram que o complexo rutênio(II)-areno inibiu de forma mais eficiente a proliferação de células MDA-MB-231 (IC₅₀ 20,8±0,40µM) quando comparado com a MCF-10A (IC₅₀ >300µM) e com células humanas normais de rim HK 2 (IC₅₀ 110,3±0,61µM). Estes resultados podem indicar uma seletividade dos complexos de rutênio pelas células tumorais quando comparado com células normais (WU et al., 2014). A lipofilicidade ou coeficiente de partição é um parâmetro utilizado para mensurar a característica hidrofóbica de uma molécula (MCKEAGE et al., 2000). A citotoxicidade do Ru(GA)

pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo seu valor de Log *P* (Tabela 2), o que indica um comportamento hidrofóbico e facilidade de atravessar membranas biológicas.

Tabela 2 – Efeitos citotóxicos do Ru(GA) e cisplatina sobre linhagens de células de mama. Os valores de IC₅₀ estão expressos como média ± DP de três ensaios independentes e em triplicata. O índice de seletividade (IS) e o Log *P* foram calculados como descrito na seção de Materiais e Métodos. *Log *P* da cisplatina foi extraído de Buss et al, 2011(BUSS et al., 2011). (A) 24h de tratamento. (B) 48h de tratamento.

	Composto	IC ₅₀ ± DP (μM)		IS	Log <i>P</i>
		MDA-MB-231	MCF-10A		
(A)	Ácido Gálico	>200	>200		
	Ru(GA)	4,52±0,29	12,04±2,33	2,68	0,277±0,004
	Cisplatina	12,42±1,1	2,86±0,29	0,23	-2,53*
(B)	Ru(GA)	0,81±0,08	5,82±0,33	7,19	

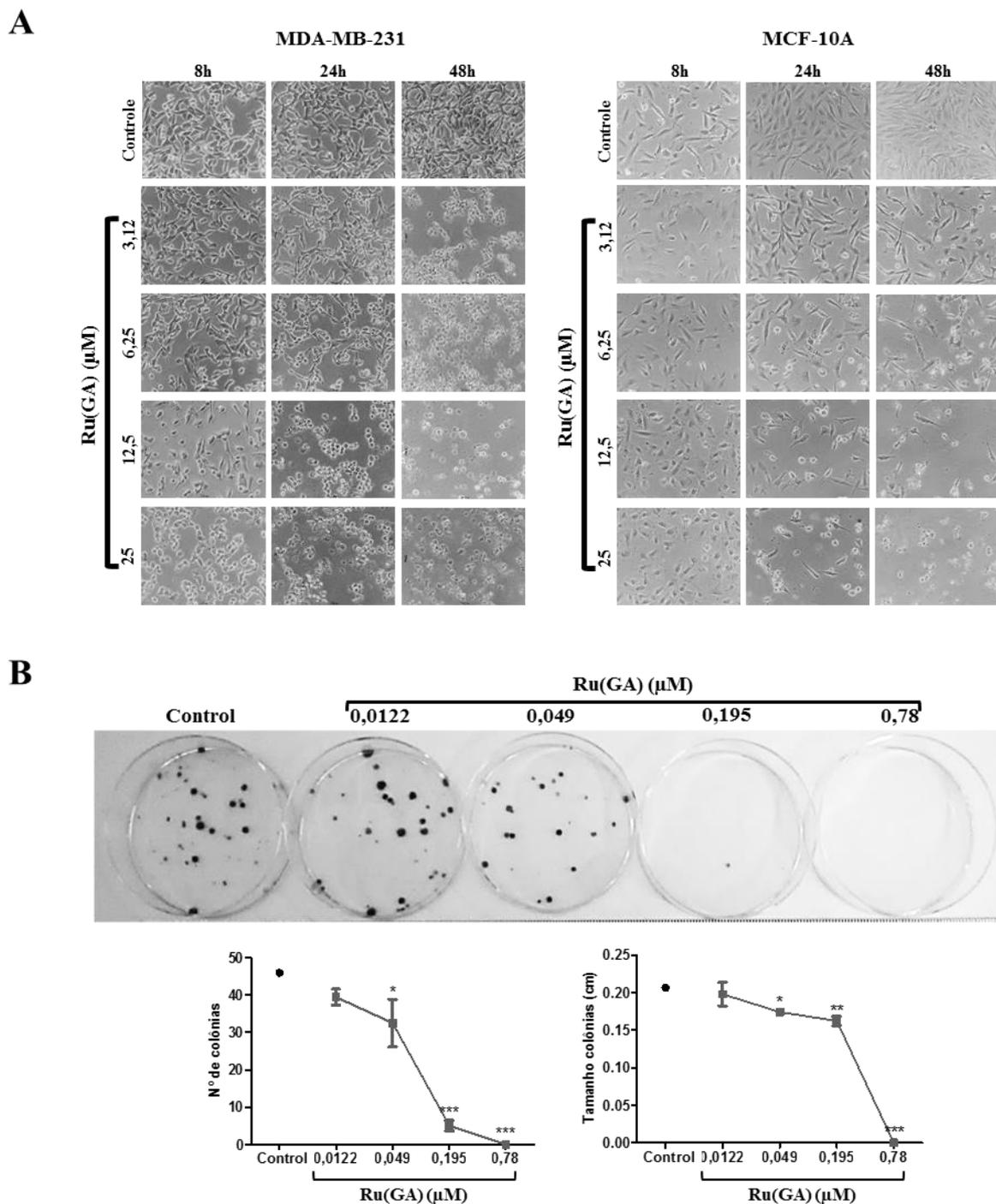
Apesar de alguns estudos demonstrarem um potencial citotóxico para o ácido gálico em algumas linhagens tumorais, para a linhagem MDA-MB-231 não apresentou citotoxicidade até 200μM em 24h de tratamento. Gomes e colaboradores demonstraram que um tratamento com 100μM de ácido gálico por 72h diminuiu a viabilidade da MDA-MB-231 para 65%, este resultado evidencia a baixa atividade citotóxica do composto para estas células (GOMES et al., 2003). Um ensaio de viabilidade com o precursor *cis*-[RuCl₂(dppe)₂] não foi possível de ser realizado já que este composto não é solúvel em meio aquoso assim como, em solventes orgânicos permitidos para uso em cultura celular, como por exemplo o DMSO. Uma vantagem da coordenação do rutênio com o ácido gálico foi a melhora na solubilidade deste novo complexo, permitindo a realização dos ensaios biológicos e a atividade citotóxica do complexo.

A fim de investigar os efeitos do Ru(GA) sobre a morfologia das células, a MDA-MB-231 e a MCF-10A foram incubadas com o complexo em diferentes concentrações por 48h. Os resultados representativos estão descritos na Figura 9. As células MDA-MB-231 tratadas com Ru(GA) em 12,5μM por 8h, apresentaram uma diminuição da densidade celular quando comparada com as células sem tratamento (Figura 9A). Em

24h de tratamento a $12,5\mu\text{M}$ de Ru(GA), a morfologia foi profundamente alterada, com o aparecimento de células circulares, o que é um indicativo de desaderência celular e provável morte celular. Em 48h, estas alterações podem ser vistas em todas as concentrações apresentadas. Por outro lado, a alteração mais evidente promovida pelo Ru(GA) nas células MFC-10A é uma diminuição da densidade celular em $6,25\mu\text{M}$ em 24h, com o aparecimento de algumas células circulares em $3,12\mu\text{M}$ em 48h. Uma desaderência aumentada destas células pode ser vista em $25\mu\text{M}$ em 24h e em $6,25\mu\text{M}$ em 48h (Figura 9A).

O ensaio de formação de colônias é um experimento de sobrevivência celular *in vitro* baseado na habilidade de uma única célula se proliferar e formar colônias. É um método muito utilizado para avaliar a resistência de células tumorais após tratamento com radiação ionizante, mas também, para determinar a eficácia de agentes citotóxicos ou que bloqueiam a proliferação celular. Os resultados mostram que o Ru(GA) nas concentrações testadas foi capaz de inibir significativamente as colônias de células MDA-MB-231 em número e em tamanho após 48h de tratamento, indicando um comportamento citotóxico e citostático, respectivamente (Figura 9B). A maior concentração ($0,78\mu\text{M}$) foi suficiente para inibir completamente a capacidade de formação de colônias.

Figura 9 – Efeitos citotóxicos do Ru(GA). **(A)** Morfologia celular das células MDA-MB-231 e MCF-10A em 8, 24 e 48h de tratamento com as concentrações indicadas de Ru(GA) em aumento de 400×. **(B)** Ensaio clonogênico das células MDA-MB-231 tratadas com as concentrações indicadas de Ru(GA) por 48h. Uma imagem representativa das placas de Petri são mostradas juntamente com a quantificação do número e tamanho das colônias. Os resultados representam média \pm DP de três ensaios independentes em triplicata. Dados significativos em * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ utilizando ANOVA e teste de Dunnet.



6.2 Interação com o DNA

Os complexos de rutênio podem ligar-se ao DNA por meio de interações covalentes ou não-covalentes, eletrostáticas e intercalativas (BRABEC; NOVAKOVA, 2006). Para avaliar a possibilidade do Ru(GA) em interagir com a molécula de DNA, foram realizados estudos de titulações espectroscópicas e de supressão da fluorescência do TO. A espectroscopia de absorção do UV-visível é um método versátil para determinar a ligação de complexos metálicos ao DNA (BARTON, 1989). O espectro de absorção em 260 nm, observado para o complexo, foi utilizado para analisar a possível interação com o *ct*-DNA. Os experimentos foram realizados mantendo a concentração de Ru(GA) constante, e variando a concentração de *ct*-DNA. Ao adicionar *ct*-DNA à solução do complexo, um forte decaimento na intensidade de absorção foi observado, indicando mudanças na estrutura do complexo (Figura 10A). A constante de ligação intrínseca K_b encontrada foi de $9,13 \pm 1,10 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, o que indica uma ordem de interação moderada quando comparada com a K_b do brometo de etídeo (ordem de 10^6 a 10^7 M^{-1}), conhecido por ser um intercalante de DNA (HENG et al., 2015). O valor de K_b encontrado neste trabalho é comparável com os encontrados para os complexos $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{PHBI})]^{2+}$ e $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{PHNI})]^{2+}$ (PHBI = 2-(2-benzimidazol)-1,10-fenantrolina; PHNI = 2-(2-naftoimidazol)-1,10-fenantrolina; tpy = 2,2':6',2''-terpiridil)(JIANG et al., 2003) e outros complexos de rutênio Ru(II) catiônicos que ligam-se ao DNA por meio de interações eletrostáticas. Como as interações eletrostáticas são consideradas mais fracas, como quando comparadas com as intercalativas (AMBROISE; MAIYA, 2000; KUMAR, C. V.; BARTON; TURRO, 1985), é sugerido então que o complexo Ru(GA) possa induzir morte celular atuando em outros alvos intracelulares, já que interações eletrostáticas não são capazes de induzir danos à molécula de DNA e assim, provocar apoptose. O DNA não seria o alvo principal.

O TO é um corante que possui fluorescência praticamente nula em solução, mas é capaz de intercalar com ácidos nucleicos e assim, emitir intensa fluorescência quando excitado em 520 nm. Para tanto, a análise de supressão da fluorescência do TO é um método validado para determinar a capacidade de compostos em interagir com o DNA (NYGREN; SVANVIK; KUBISTA, 1998). O experimento consiste em adicionar concentrações crescentes do complexo a uma solução contendo uma concentração fixa de DNA ligado a TO. Uma diminuição da fluorescência do TO foi observada, indicando que o Ru(GA) é capaz de interagir com o DNA. Este efeito observado é causado provavelmente por meio de uma mudança na conformação do Ru(GA), liberando alguns sítios de ligação, ou até mesmo o ligante pode ser o responsável pela interação, causando um deslocamento do TO (Figura 10B).

6.3 Interação com albumina humana e transferrina

Estudos prévios descreveram que complexos de rutênio são capazes de ligar-se com biomoléculas de transporte como a albumina e transferrina humanas. Para entender o mecanismo de interação entre o Ru(GA) e estas proteínas, foram realizados experimentos de supressão de fluorescência. O decaimento da fluorescência dos resíduos intrínsecos de triptofano das proteínas é um método relativamente rápido e fácil para analisar interações entre proteínas e ligantes (KANDAGAL et al., 2006; SCHREURS et al., 2012; XUE et al., 2012). Os dados de decaimento foram medidos em diferentes temperaturas (25 e 37°C) e os resultados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Constante de decaimento de Stern–Volmer (K_{SV} , M^{-1}), constante de decaimento biomolecular (K_q , $M^{-1} s^{-1}$), constante de ligação (K_b , M^{-1}), número de sítios de ligação (n), valores de ΔG° ($KJ \cdot mol^{-1}$), ΔH° ($KJ \cdot mol^{-1}$) e ΔS° ($J \cdot mol^{-1} K$) para o sistema complexo–HSA/apo-Tf em diferentes temperaturas.

Protein	T (°C)	K_{sv} ($\times 10^4$)	K_q ($\times 10^{13}$)	K_b ($\times 10^7$)	n	ΔG°	ΔH°	ΔS°
HAS	25	7,65	6,33	0,043	1,18	-3,21	25,1	192
	37	7,62	6,24	0,064	1,22	-3,44		
apo-Tf	25	7,25	4,83	1,05	1,65	-4,00	36,4	257
	37	7,21	4,60	1,85	1,57	-4,31		

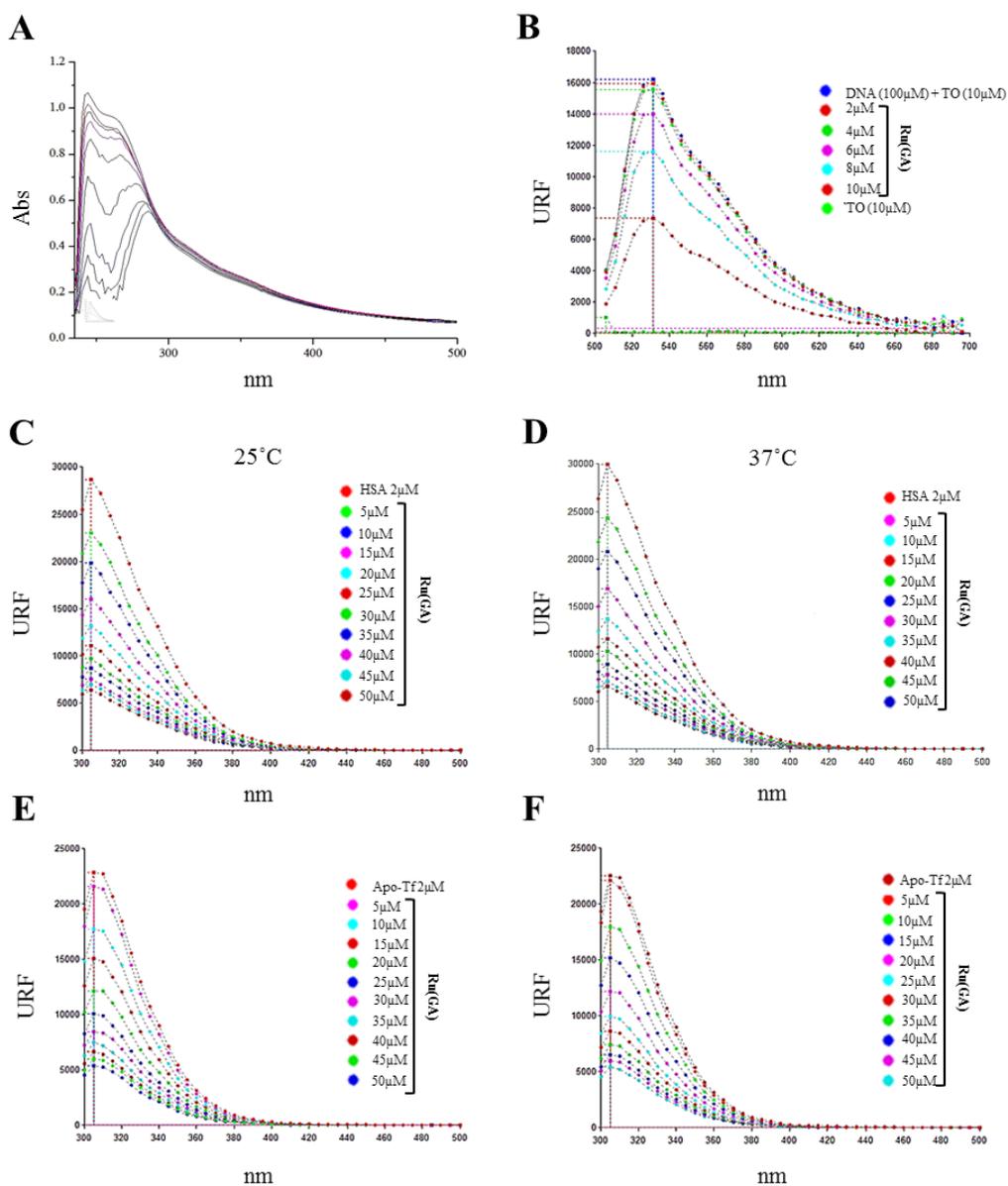
Em relação à HSA, os resultados mostram uma diminuição da fluorescência do triptofano na presença do Ru(GA) (Figura 10C e 10D) sem ter influência da temperatura. A constante de decaimento K_{sv} não alterou com o aumento da temperatura, indicando que a interação ocorre por meio da formação de um complexo composto-proteína e interação estática, ao invés de interação por colisão dinâmica. Adicionalmente, os valores de K_q foram de 6,33 e $6,24 \times 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para 25 e 37°C respectivamente, bem maior que $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o valor máximo possível para interações dinâmicas, evidenciando a presença de interações estáticas entre complexo-proteína (GANESHPANDIAN et al., 2014). O número de sítios de ligação foi de aproximadamente igual a 1, indicando que há somente um local de ligação para o complexo na molécula de HSA.

Os parâmetros termodinâmicos, como a variação de entalpia (ΔH°), variação de entropia (ΔS°) e energia livre de Gibbs (ΔG°) são os principais valores utilizados para indicar os tipos de interação entre complexos e proteínas. Como observado na Tabela 3, os valores positivos para ΔH° e ΔS° revelam a predominância de interações hidrofóbicas do Ru(GA) com a HSA, indicando que a variação de energia durante a reação foi capaz de alterar a posição das moléculas de água no sistema. As moléculas de água que estavam ordenadas ao redor da proteína, agora adquiriram uma distribuição aleatória após a interação com o composto, levando a uma diminuição da solubilidade. Adicionalmente, os valores negativos de ΔG° mostram que a interação ocorre de forma espontânea, ou seja, ocorre naturalmente sem intervenção externa, nenhuma energia precisa ser fornecida para que a reação ocorra (GANESHPANDIAN et al., 2014; ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). A magnitude da constante de ligação para o sistema Ru(GA)-HSA (K_b), quando comparada com outros complexos de rutênio previamente

descritos, sugere uma interação forte com a molécula de HSA (ALAGESAN et al., 2014).

Os resultados encontrados para a transferrina (apo-Tf) também mostram um decaimento na fluorescência do triptofano na presença do complexo (Figura 10E e 10F). O aumento da temperatura também não alterou a intensidade de decaimento; a K_{sv} manteve-se inalterada com a temperatura e, juntamente com o valor de K_q , indica uma interação estática, assim como para a HSA. O n evidencia que há apenas um sítio de ligação para o complexo na molécula de apo-Tf. O valor de K_b encontrado sugere uma forte interação entre a apo-Tf e o Ru(GA). Os parâmetros ΔH° e ΔS° apontam para uma interação hidrofóbica entre as moléculas, e os valores negativos para ΔG° indicam um processo espontâneo. Em um estudo anterior, o complexo NAMI-A exibiu uma constante de decaimento biomolecular (k_q) equivalente a $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a apo-Tf (SPIEWAK; BRINDELL, 2015), corroborando com uma interação estática encontrada para o Ru(GA).

Figura 10 – Interação Ru(GA) com DNA e proteínas plasmáticas. **(A)** Espectro de absorção do complexo na presença de concentrações crescentes de *ct*-DNA em 25°C. Resultados são mostrados como decaimento do espectro UV-vis do complexo. **(B)** Espectro de emissão de fluorescência de TO na presença de concentrações crescentes do Ru(GA) em 25°C. **(C)** e **(D)** Espectro de emissão de fluorescência da HSA em 25 e 37°C, respectivamente, na presença de concentrações crescentes do complexo. **(E)** e **(F)** Espectro de emissão de fluorescência de apo-Tf em 25 e 37°C, respectivamente, na presença de concentrações crescentes do complexo. Medidas foram realizadas em fluorímetro *Sinergy H1 BioTek*.



6.4 Transporte do Ru(GA) pela albumina e transferrina

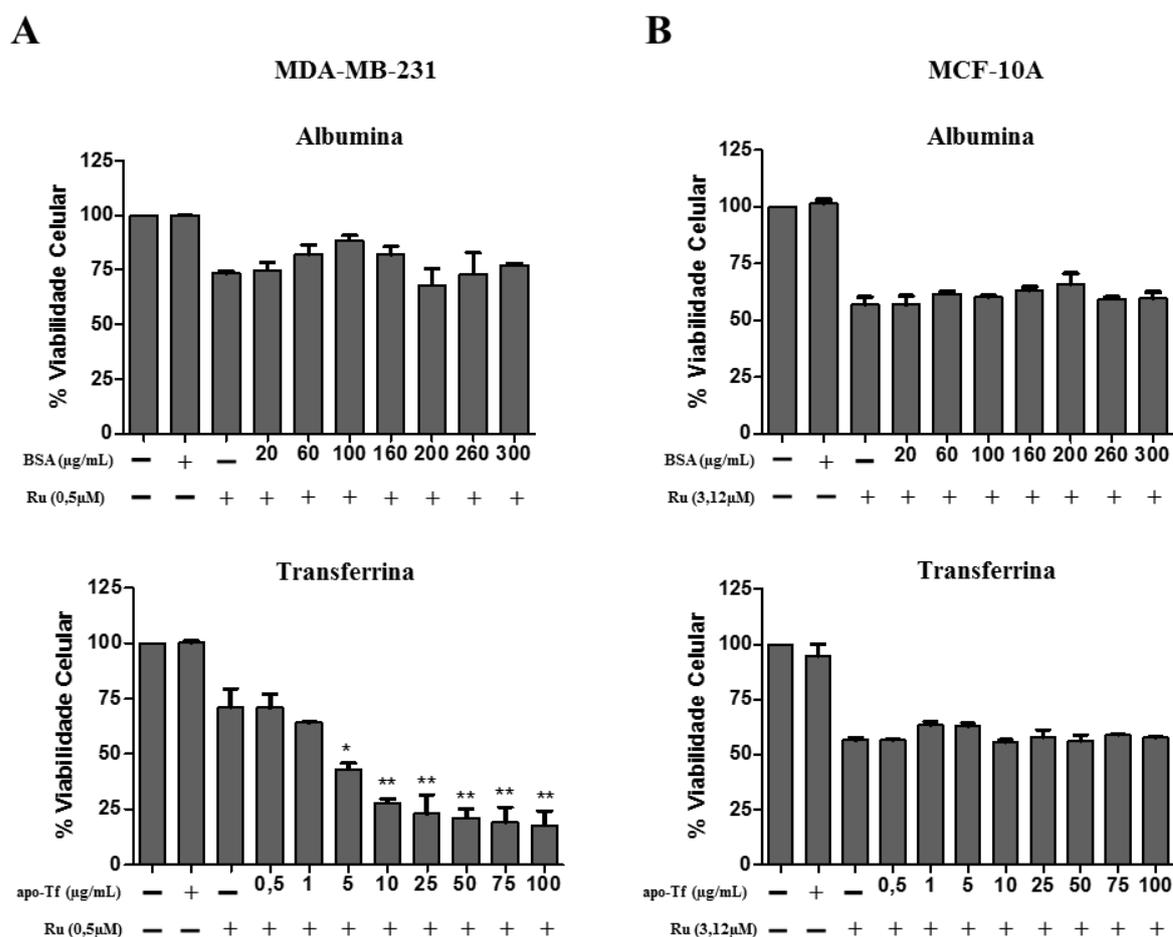
Para avaliar a interferência da albumina e transferrina no transporte e interação do Ru(GA) com as células, as linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A foram expostas ao

tratamento com o complexo em uma concentração constante próxima do IC_{50} ($0,5\mu M$ para a MDA-MB-231 e $3,12\mu M$ para a MCF-10A), juntamente com concentrações crescentes de BSA e apo-transferrina humana, em ensaios independentes, por 48h. A porcentagem de células viáveis em cada tratamento foi analisada por um ensaio de MTT. A referência de 100% de viabilidade utilizado foram as células controle negativo (sem tratamento). Neste experimento, foi esperado observar uma diminuição na viabilidade das células proporcionalmente ao aumento da concentração de proteína, comparando todos os grupos de tratamento com o controle positivo (células que receberam somente o complexo e não a proteína). Este resultado indica que a proteína pode aumentar a interação entre as células e o complexo.

Os resultados mostram que apesar do complexo exibir forte interação com a albumina, como demonstrado no experimento anterior, esta proteína pode estar relacionada ao transporte do Ru(GA), no entanto, não interfere na internalização do Ru(GA) pelas células MDA-MB-231, já que concentrações crescentes de BSA juntamente com uma concentração constante de Ru(GA) não exerceram efeitos significativos na viabilidade de células MDA-MB-231 neste experimento, quando comparado com as células que receberam somente o complexo (Figura 11A). Mesmo aumentando para $300\mu g/mL$ (3-vezes a concentração de transferrina), o resultado não alterou. Os mesmos efeitos foram encontrados para as células não-tumorais (Figura 11B). Por outro lado, quando a concentração de transferrina aumentou, mantendo a concentração do complexo constante, a viabilidade das células MDA-MB-231 diminuiu significativamente quando comparado com as células que receberam somente o Ru(GA), indicando que, possivelmente, a transferrina pode ser responsável por, além do transporte do complexo, mas também aumentar a interação entre o complexo e as células tumorais. Já para a MCF-10A, a viabilidade das células não se alterou

significativamente. Este resultado corrobora com a informação de que a seletividade do rutênio pode ser maior para as células neoplásicas por meio de uma maior expressão de receptores de transferrina por estas células, recrutando maior quantidade de transferrina e consequentemente, maior contato com o complexo de rutênio (ALLARDYCE; DYSON, 2001; BERGAMO; SAVA, 2011; HUANG et al., 2013).

Figura 11 – Transporte de Ru(GA) por albumina e transferrina. As células MDA-MB-231 e MCF-10A foram incubadas com 0,5 e 3,12 μ M do composto respectivamente, e com as concentrações indicadas de BSA e apo-Tf por 48h. **(A)** Resultados para MDA-MB-231. **(B)** Resultados para MCF-10A. A viabilidade celular foi estimada por ensaio de MTT e os resultados foram comparados com o grupo de células tratadas com composto mas sem a proteínas. Dados representam média \pm DP de três ensaios independentes em triplicata. Resultados significativos em * p <0.001, ** p <0.0001 utilizando ANOVA e teste de Dunnet.



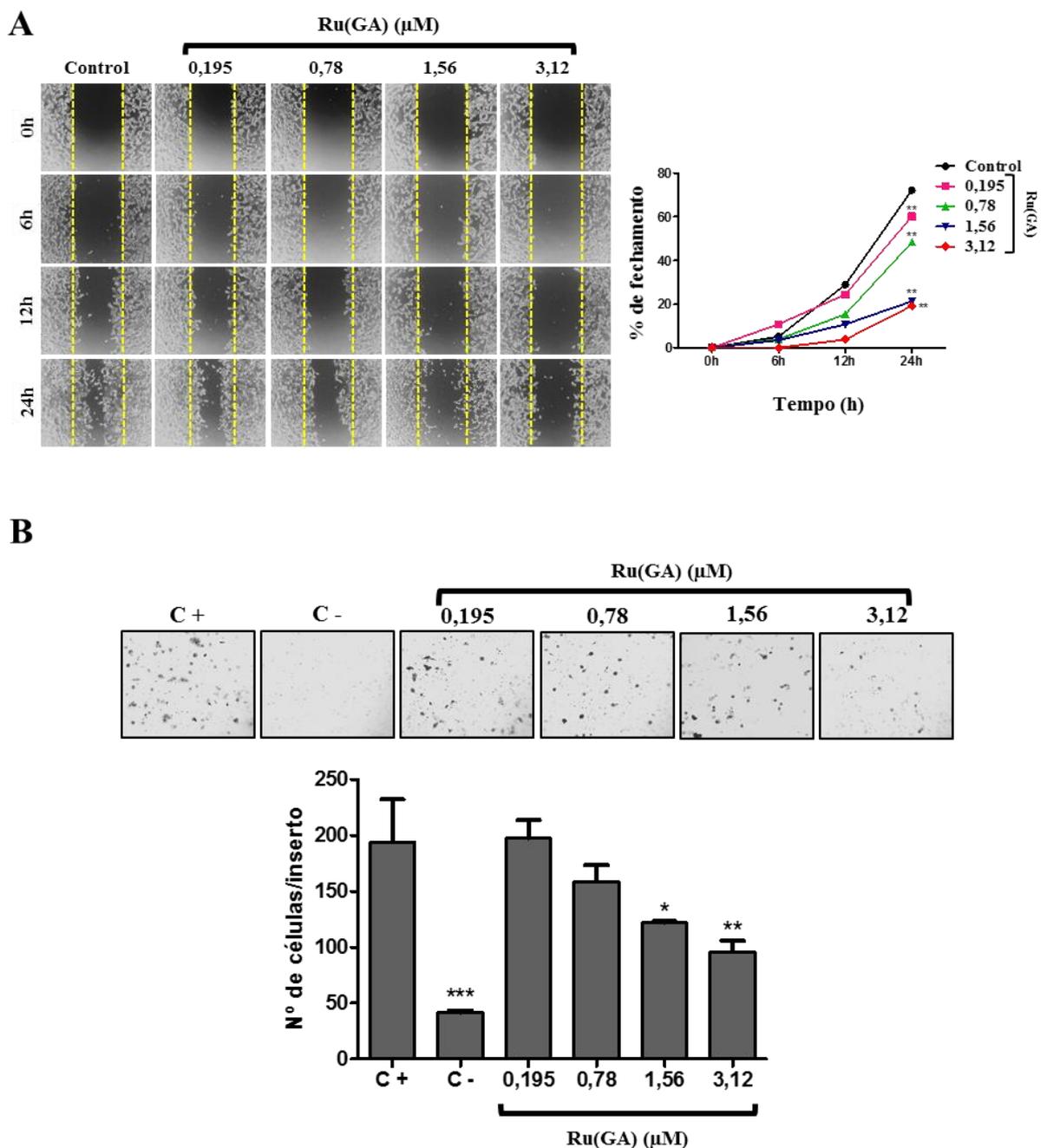
Os resultados encontrados estão em acordo com Zhao e colaboradores, os quais demonstraram que quando receptores de transferrina são bloqueados por anticorpos específicos em células humanas de carcinoma mamário da linhagem MCF-7, a internalização de complexos de rutênio Ru(II) polipiridil foi inibida em 53.6%. Assim, é

sugerido que os receptores de transferrina são responsáveis pela maior parte do transporte de complexos de rutênio para células tumorais (ZHAO et al., 2014).

6.5 Inibição da migração e invasão celular

A capacidade migratória das células tumorais e de invasão a tecidos adjacentes são processos que levam ao extravasamento de células neoplásicas para órgãos distantes e a consequente formação de tumores secundários (QUAIL; JOYCE, 2013). Se um composto é capaz de inibir a migração e a invasão celular, pode então interromper processos fundamentais para a metástase. Para avaliar os efeitos do Ru(GA) sobre a migração, foi realizado um ensaio de *Wound Healing*. Os resultados mostram que em 24h de tratamento, o complexo inibiu significativamente o fechamento da risca e consequente migração celular em aproximadamente 10% em 0,195 μ M, 20% em 0,78 μ M, e 50% em 1,56 e 3,12 μ M quando comparado com as células MDA-MB-231 sem tratamento (Figura 12A). Estes efeitos estão relacionados à migração celular ao invés de morte celular, já que todas as concentrações do Ru(GA) testadas não são citotóxicas neste período de incubação. O ensaio de invasão permite avaliar se o complexo é capaz de reduzir a habilidade das células tumorais em degradar proteínas da matriz extracelular e invadir tecidos. Os resultados estão exibidos na Figura 12B e evidenciam que o tratamento com o complexo inibiu significativamente a invasão das células MDA-MB-231 em 1,56 e 3,12 μ M. Estudos prévios demonstraram que o complexo de rutênio Picolinato areno Ru(II) inibiu a migração e invasão de células humanas da linhagem de carcinoma cervical HeLa (GLIGORIJEVIC et al., 2012) e um complexo Ru polipiridil inibiu efetivamente a migração e invasão de células MDA-MB-231 de forma não citotóxica por meio de ensaios de *Wound Healing* e transmigração por camada de matrigel (CAO et al., 2015).

Figura 12 – Efeitos do Ru(GA) sobre a migração e invasão de células MDA-MB-231. **(A)** Ensaio de *Wound Healing* em 6, 12 e 24h de tratamento com as concentrações indicadas de Ru(GA) em aumento de 40×. O gráfico representa a porcentagem de fechamento da risca, comparando as células tratadas com o grupo controle. Dados representam média \pm DP de três ensaios independentes em triplicata. Resultados significativos em 24h em $**p < 0.0001$ utilizando ANOVA e teste de *Dunnet*. **(B)** Efeitos do Ru(GA) na invasão das células pela matrigel. As células foram semeadas em insertos contendo matrigel juntamente com concentrações crescentes do complexo por 22h, utilizando FBS como quimioatratante. As células invasivas foram fixadas e contadas manualmente. Os insertos foram fotografados em aumento de 40×. O gráfico representa a inibição de células invasivas. O controle positivo (C+) representa as células invasivas sem tratamento, com FBS na parte inferior do inserto e o controle negativo (C-) representa as células invasivas sem tratamento e sem FBS na parte inferior do inserto. Imagens representativas dos insertos são apresentadas. Dados estão expressos em média \pm DP de três ensaios independentes em triplicata. Resultados significativos em $*p < 0.05$, $**p < 0.001$, $***p < 0.0001$ utilizando ANOVA e teste de *Dunnet*.



6.6 Marcação com faloidina

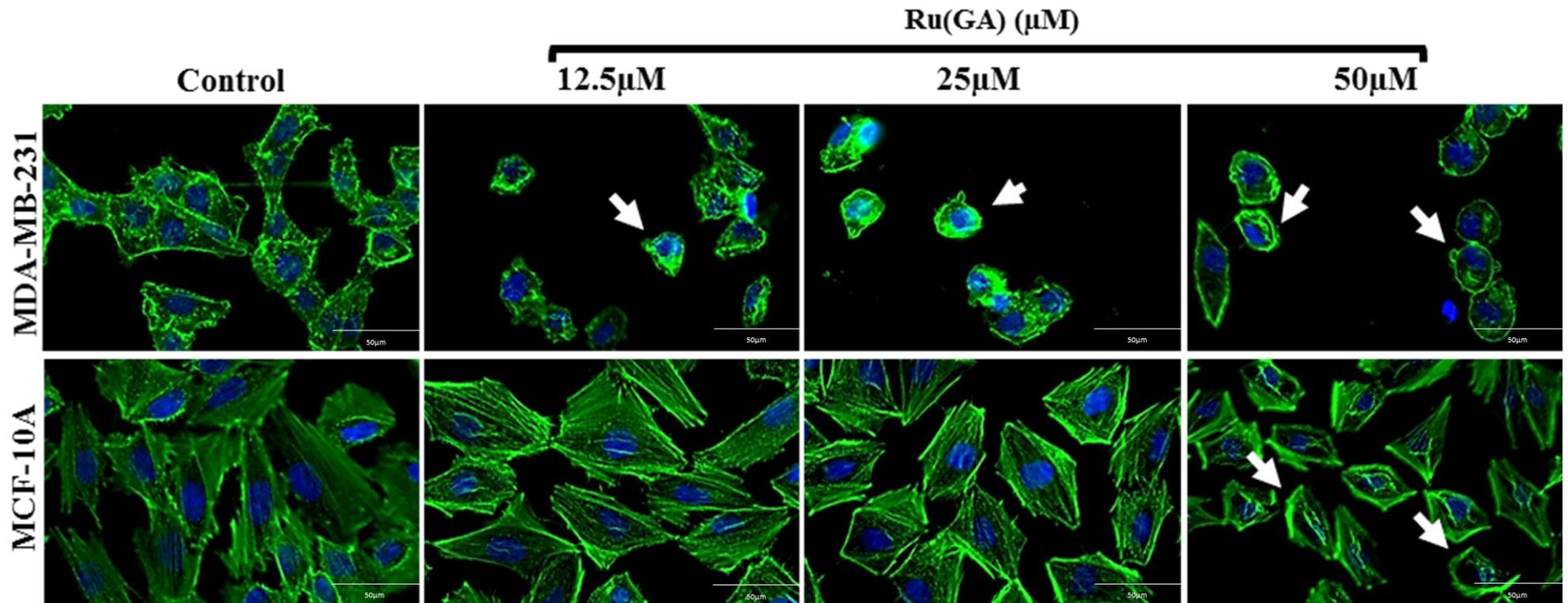
O citoesqueleto é uma estrutura celular com uma variedade de funções. Essencialmente, fornece forma, resistência mecânica às deformações e, por meio de associações com proteínas extracelulares e outras células, é responsável por fornecer estabilidade aos tecidos. O citoesqueleto possui habilidade de contração, causando assim uma deformidade na célula, permitindo sua migração. Adicionalmente, é envolvido em diversas vias de sinalização celular; na internalização de componentes extracelulares (endocitose); na segregação cromossômica durante a mitose; na citocinese; organização das organelas citoplasmáticas e compartimentos intracelulares e; no transporte intracelular, como por exemplo o transporte de vesículas (FLETCHER; MULLINS, 2010). Alterações nas proteínas do citoesqueleto podem interferir nos mecanismos de migração e invasão das células tumorais.

Para avaliar se o Ru(GA) é capaz de alterar o citoesqueleto das células tumorais, e assim, provocar uma inibição da capacidade migratória e invasiva destas células, a linhagem MDA-MB-231 foi marcada com faloidina após 6h de tratamento com o complexo. Os resultados mostram que o composto altera fortemente a actina do citoesqueleto das células MDA-MB-231 a partir de 12,5 μ M, reduzindo a densidade da estrutura celular e promovendo condensação dos filamentos de actina. Nas células MCF-10A, estas alterações aparecem mais evidentemente apenas na concentração de 50 μ M (Figura 13). Este resultado é consistente com um estudo prévio, que demonstra a capacidade do complexo de rutênio NAMI-A em alterar a estrutura do citoesqueleto de células humanas da linhagem de carcinoma cervical HeLa (SAVA et al., 2004).

Alterações citoplasmáticas, como danos ao citoesqueleto, são também uma fonte de sinais para a apoptose (SANCHO-MARTÍNEZ et al., 2012). Estudos prévios descrevem que a cisplatina pode interagir diretamente com a F-actina do citoesqueleto evitando

assim os processos de polimerização e despolimerização, alterando as funções desta estrutura. Membros da família de proteínas Bcl-2 contribuem para ambos os processos de organização e disfunção do citoesqueleto. Ao sinal de danos e desorganização, estas são responsáveis por iniciar uma sinalização pró-apoptótica, como a ativação de caspases, culminando em morte celular. O citoesqueleto é alvo de caspases ativas, tendo assim sua estrutura desorganizada, proteínas clivadas, o que facilita a formação dos corpos apoptóticos (SANCHO-MARTÍNEZ et al., 2012). Assim como a cisplatina, o Ru(GA), como mostrado neste estudo, foi capaz de causar danos ao citoesqueleto de forma seletiva nas células tumorais, o que pode ser um fator iniciador de sinalização para apoptose provocada pelo complexo, com consequente alteração da expressão de genes e proteínas relacionados ao processo, como demonstrado a seguir.

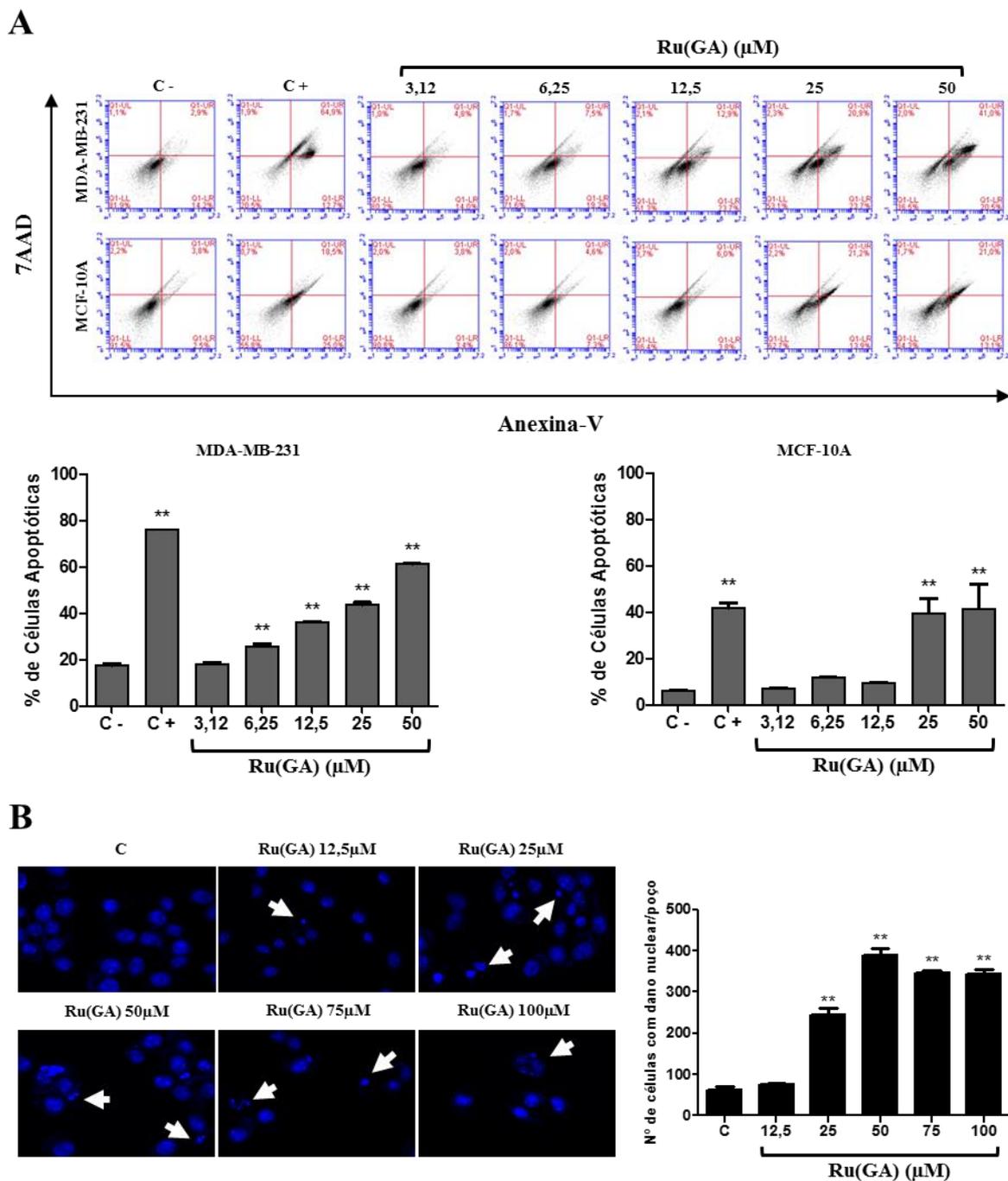
Figura 13 – Efeitos do Ru(GA) no citoesqueleto das células MDA-MB-231 e MCF-10A. As células foram tratadas com concentrações crescentes do complexo por 6h. As células foram fixadas, marcadas com faloidina *Alexa Fluor 488*® e DAPI. As imagens foram obtidas em aumento de 400×. As setas brancas mostram a perda de prolongações celulares, condensação dos filamentos de actina e redução da densidade do citoesqueleto quando comparado com células sem tratamento.



6.7 Indução de apoptose

Complexos de rutênio que causam bloqueio do ciclo celular e induzem apoptose em células tumorais podem ser uma estratégia promissora para o tratamento do câncer. A capacidade do Ru(GA) em induzir apoptose nas células MDA-MB-231 foi avaliado pelos ensaios de marcação com PE-Anexina V e DAPI. Os resultados mostram que a apoptose nas células tumorais foi induzida de forma concentração dependente (Figura 14A), com um aumento significativo começando em 6,25 μ M, alcançando aproximadamente 60% de células apoptóticas na concentração mais alta utilizada. Contudo, foram necessárias concentrações de 25 e 50 μ M para induzir apoptose significativa na linhagem MCF-10A, com uma taxa de aproximadamente 40 e 50% de células apoptóticas, respectivamente (Figura 14A). A marcação com DAPI mostrou que 8h de tratamento com o complexo resultou em um aumento de células com cromatina condensada, dano nuclear, e presença de corpos apoptóticos quando comparadas com células MDA-MB-231 sem tratamento (Figura 14B).

Figura 14 – Efeitos do Ru(GA) na taxa apoptótica de células MDA-MB-231 e MCF-10A. As células foram expostas às concentrações indicadas do composto por 24h. A camptotecina foi usada como controle positivo de indução de apoptose. Após o tratamento, as células foram incubadas com PE-Anexina-V e 7AAD por 15 min no escuro em temperatura ambiente, raspadas do poço e analisadas em citometria de fluxo. **(A)** Análise por citometria das células MDA-MB-231 e MCF-10A. A porcentagem de células apoptóticas para cada linhagem celular está representada nos gráficos. Os dados representam média \pm DP de três ensaios independentes em triplicata. Resultados significativos em $**p < 0.0001$ utilizando ANOVA e teste de Dunnet. **(B)** Danos nucleares causados pelo Ru(GA) em células MDA-MB-231. As células foram tratadas com concentrações crescentes do complexo por 8h. As células foram fixadas e marcadas com DAPI. As imagens foram obtidas em aumento de 400 \times . As setas brancas mostram o aumento da ocorrência de cromatina condensada, dano nuclear e aparecimento de corpos apoptóticos quando comparado com células sem tratamento.



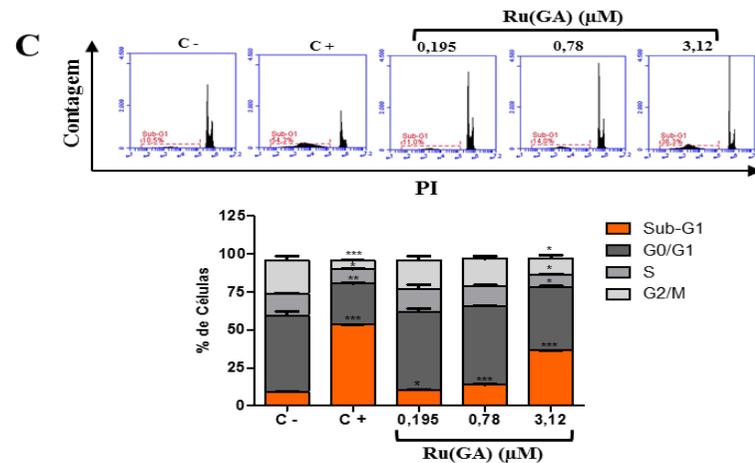
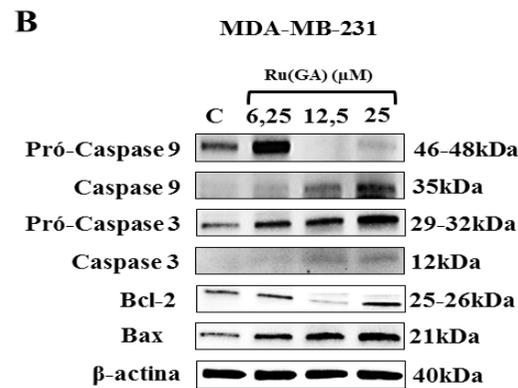
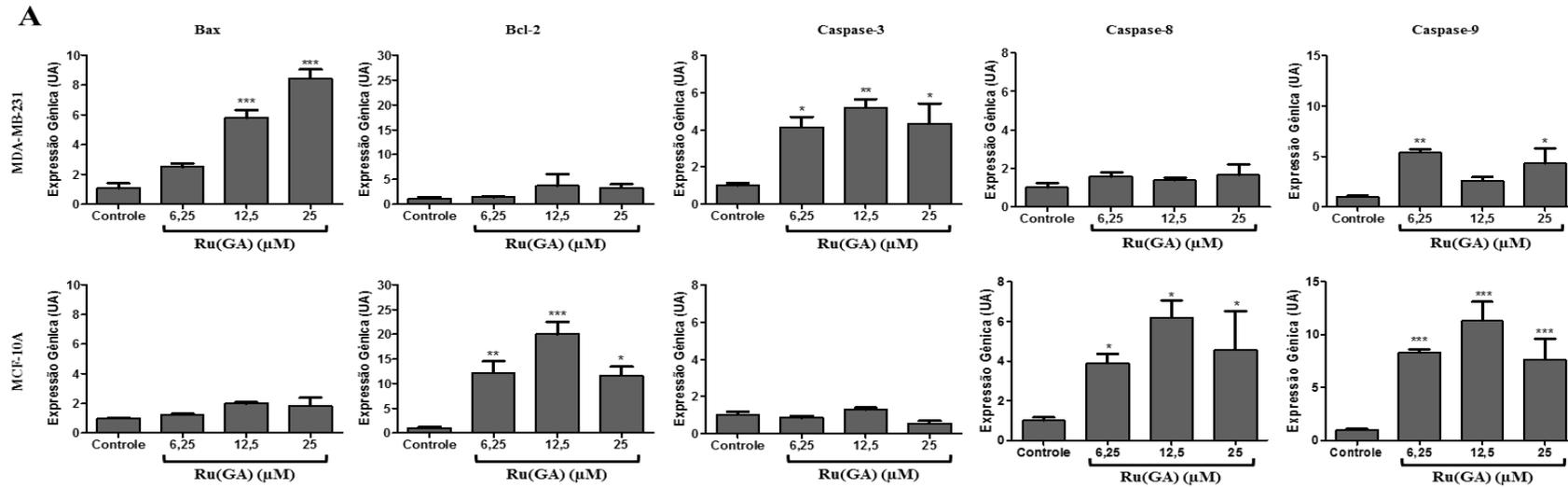
A análise da expressão de genes relacionados à apoptose foi feita por meio de uma reação de RT-qPCR. Quatro genes pró-apoptóticos (Bax, Caspase-8, Caspase-9 e Caspase-3) e um gene anti-apoptótico (Bcl-2) foram analisados. Os resultados, representados na figura 15A, mostram que o tratamento com o Ru(GA) aumentou de forma significativa a expressão de Bax em 12,5 e 25 μ M e Caspase-3, efetora final da via de sinalização para apoptose, em 6,25, 12,5 e 25 μ M, quando comparado com as células MDA-MB-231 sem tratamento. No entanto, não houve alteração na expressão de Bcl-2. Ainda analisando a expressão gênica nas células tumorais, é possível observar que os níveis de expressão de caspase-8, relacionada à via de sinalização extrínseca, não se altera com o tratamento. Já os níveis de caspase-9 foram significativamente alterados, sugerindo que, juntamente com a alteração de Bax, a sinalização precursora à ativação da caspase-3 ocorreu via disfunção mitocondrial. Por outro lado, os níveis de expressão na MCF-10A ao mesmo tempo de tratamento não apresentaram alteração significativa para Bax e Caspase-3, mas a expressão de Bcl-2 aumentou em 6,25, 12,5 e 25 μ M quando comparado com células MCF-10A sem tratamento. Ao analisar a expressão de caspase-8 e 9 nas células MCF-10A, sugere-se que ambas as vias de sinalização foram ativadas nestas células, já que houve aumento significativo da expressão gênica de ambas, embora um nível maior para a caspase-9. Outra característica possível de ser observada é a confirmação da sensibilidade maior das células tumorais ao tratamento como mostrado no ensaio de PE-Anexina-V, já que em um mesmo tempo de tratamento, as células não tumorais ainda não iniciaram a expressão de caspase-3 e a relação entre Bax/Bcl-2, ainda é favorável à manutenção da integridade mitocondrial.

Levando em consideração a iniciação de apoptose pela via intrínseca nas células MDA-MB-231, a expressão de proteínas relacionadas à esta sinalização nas células tumorais foi avaliada por *Western Blotting*. Os resultados mostrados na figura 15B

corroboram os resultados encontrados no RT-qPCR, sugerindo uma sinalização para apoptose por disfunção mitocondrial, já que houve um aumento da relação Bax/Bcl-2 e aumento dos níveis de caspase-9 e 3 ativas. Um ensaio para analisar a distribuição do ciclo celular mostrou um aumento da porcentagem de células MDA-MB-231 na fase sub-G1 em 0,78 μ M e 3,12 μ M com tratamento de 24h (Figura 15C). Neste ensaio, o iodeto de propídeo (PI) liga-se ao DNA fragmentado das células com dano, sendo detectado em citometria como picos de células em sub-G1. Este resultado também é um indicativo de apoptose (KAJSTURA et al., 2007).

Estudos prévios demonstraram a habilidade de complexos de rutênio em induzir apoptose. Complexos de Rutênio(II) polipiridil aumentaram as características apoptóticas como a diminuição nuclear, condensação da cromatina e formação de vesículas com conteúdo citoplasmático em células humanas de hepatocarcinoma da linhagem BEL-7402. Adicionalmente, o complexo induziu bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 e aumentou a taxa de células apoptóticas de forma concentração-dependente (HAN et al., 2015; XIE et al., 2013). O complexo Rutênio metilimidazol $[\text{Ru}(\text{MeIm})^4(\text{p-cpip})]^{2+}$ provocou os mesmos efeitos em células humanas de carcinoma pulmonar da linhagem A549 (CHEN et al., 2010). Liu e colaboradores demonstraram os efeitos apoptóticos de complexos de rutênio em células humanas de osteossarcoma da linhagem MG-63, nas quais aumentaram o número de células com danos no DNA, taxa de células apoptóticas e induziram bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 (LIU et al., 2015). Os mesmos efeitos foram descritos na linhagem HeLa de adenocarcinoma humano (TAN et al., 2011) e células MDA-MB-231 (CAO et al., 2015).

Figura 15 – Indução de apoptose pelo Ru(GA). **(A)** Efeitos do Ru(GA) na expressão de genes relacionados à apoptose. As células MDA-MB-231 e MCF-10A foram incubadas com as concentrações indicadas do complexo por 20h. Após o tratamento, o RNA foi extraído com reagente Trizol. Os cDNAs foram sintetizados e a amplificação do controle endógeno e genes de interesse foram analisados pelo método previamente descrito. **(B)** Imagem representativa da expressão de proteínas relacionadas à apoptose por análise de *Western Blotting*. **(C)** Distribuição de células MDA-MB-231 em cada fase do ciclo celular após tratamento com o Ru(GA). Método foi realizado como descrito na seção de Materiais e Métodos. A camptotecina foi utilizada como controle positivo de apoptose. A análise por citometria de células em sub-G1 é mostrada. Gráfico representa a porcentagem de células em cada fase. Análise da fase sub-G1 é destacada em laranja. Os dados representam média \pm DP de três ensaios independentes em triplicata. Resultados significativos em $*p<0.05$, $**p<0.001$, $***p<0.0001$ utilizando ANOVA e teste de *Dunnet*.



Conclusões

7. Conclusões

Os complexos de rutênio com diferentes ligantes vieram à tona em estudos recentes como candidatos promissores para o tratamento do câncer, já que a cisplatina apresenta diversos efeitos adversos. No entanto, muito sobre seus mecanismos de ação precisam ser elucidados. Assim, neste estudo é apresentado a síntese e a caracterização de um complexo de rutênio sendo o ácido gálico um dos ligantes do Ru(GA). O ácido gálico é uma molécula trifenólica conhecida por suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais. A hipótese deste trabalho foi que a junção de dois quimioterapêuticos em potencial, o ácido gálico e o rutênio, permitiria uma melhor ação citotóxica do complexo, além de um potencial efeito quimiopreventivo, evitando danos aos tecidos adjacentes, por meio da seletividade do rutênio pelas células tumorais e pelas propriedades já conhecidas do ácido gálico. O complexo foi testado em relação à sua ação antitumoral contra células de tumor de mama triplo-negativo e em relação à possível interação com biomoléculas de transporte, como a albumina e a transferrina, e se estas proteínas poderiam aumentar a interação entre complexo e célula.

Os resultados deste trabalho mostram que o complexo foi mais citotóxico para as células tumorais do que para as não-tumorais, inibindo a viabilidade, capacidade de formação de colônias e alterando a morfologia e o citoesqueleto. Adicionalmente, o complexo mostrou ser mais eficiente na linhagem MDA-MB-231 do que a cisplatina. Outros passos importantes do processo metastático, como a migração e a invasão celular foram inibidos também nesta linhagem. O tratamento com diferentes concentrações mostrou um aumento concentração-dependente da taxa de células apoptóticas quando analisadas por citometria de fluxo, além disso, as células tumorais foram mais sensíveis, o que foi confirmado pela análise da expressão

gênica, proteica e do ciclo celular. O Ru(GA) demonstrou ser capaz de interagir moderadamente com a molécula de DNA, mostrando que esta não é seu alvo principal na célula. Embora o composto tenha mostrado forte interação com a albumina e transferrina, esta demonstrou ser a responsável por aumentar o contato entre as células tumorais e o complexo, com consequente inibição da viabilidade celular. Os resultados deste trabalho sugerem que o complexo Ru(GA) é capaz de interagir com receptores de transferrina e assim, atuar em alvos intracelulares, como citoesqueleto e mitocôndrias, iniciando uma sinalização intrínseca para apoptose, com a consequente compartimentalização das células em corpos apoptóticos. A seletividade do complexo pelas células neoplásicas pode ser devido à maior expressão de receptores de transferrina pelas células tumorais.

Em geral, este trabalho fornece estratégias para testar a atividade biológica de compostos *in vitro*, para o estudo de novos indutores de apoptose, como os complexos metálicos de rutênio, e apoia que o Ru(GA) deve ser estudado em outros aspectos a fim de elucidar quais os mecanismos de ação em células de câncer de mama triplo-negativo podem ser atribuídos ao complexo, sua ação em outras linhagens neoplásicas e sobre a inibição de metástases *in vivo*. Estes estudos podem contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais para quimioterapia.

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

- (INCA), B. I. N. D. C. J. A. G. D. S. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. 2016. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf> >. Acesso em: Março em: Março
- EUA. American Cancer Society (ACS). Breast Cancer: About Breast Cancer. 2017. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about.html>>. Acesso em: Março/2016.
- ALAGESAN, M. et al. DMSO containing ruthenium(ii) hydrazone complexes: in vitro evaluation of biomolecular interaction and anticancer activity. **Dalton Trans**, v. 43, n. 42, p. 15829-40, Nov 14 2014.
- ALBERTS, B. J.; LEWIS, A.; RAFF, J. **Molecular biology of the cell**. 2008. ISBN 0815341059.
- ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Review**, v. 45, n. 2, p. 62-69, 2001.
- AMBROISE, A.; MAIYA, B. G. Ruthenium(II) complexes of redox-related, modified dipyrrophenazine ligands: synthesis, characterization, and DNA interaction. **Inorg Chem**, v. 39, n. 19, p. 4256-63, Sep 18 2000.
- BADISA, R. B. et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Res**, v. 29, n. 8, p. 2993-6, Aug 2009.
- BAKA, E.; COMER, J. E.; TAKACS-NOVAK, K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. **J Pharm Biomed Anal**, v. 46, n. 2, p. 335-41, Jan 22 2008.
- BARABAS, K. et al. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. **Vet Comp Oncol**, v. 6, n. 1, p. 1-18, Mar 2008.
- BARTON, J. Mixed-ligand complexes of ruthenium (II): factors governing binding to DNA. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 111, p. 3051-3058, 1989.
- BAUTISTA, M. T. et al. PREPARATION AND SPECTROSCOPIC PROPERTIES OF THE ETA-2-DIHYDROGEN COMPLEXES [MH (ETA-2-H₂)(PR₂CH₂CH₂PR₂)₂]+(M= FE, RU, R= PH, ET) AND TRENDS IN PROPERTIES DOWN THE IRON GROUP TRIAD. **J Am Chem Soc**, v. 113, n. 13, p. 4876-4887, 1991.
- BENADIBA, M. et al. Growth inhibitory effects of the Diruthenium-Ibuprofen compound, [Ru₂Cl (Ibp)₄], in human glioma cells in vitro and in the rat C6 orthotopic glioma in vivo. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 1025-1035, 2014.
- BERGAMO, A.; SAVA, G. Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. **Dalton Trans**, v. 40, n. 31, p. 7817-23, Aug 21 2011.
- BHUTIA, S. K.; MAITI, T. K. Targeting tumors with peptides from natural sources. **Trends Biotechnol**, v. 26, n. 4, p. 210-7, Apr 2008.
- BLOK, E. J. et al. Extended adjuvant endocrine therapy in hormone-receptor positive early

breast cancer: current and future evidence. **Cancer Treat Rev**, v. 41, n. 3, p. 271-6, Mar 2015.

BOYD, M. R.; PAULL, K. D. Some practical considerations and applications of the national cancer institute in vitro anticancer drug discovery screen. **Drug Development Research**, v. 34, n. 2, p. 91-109, 1995.

BRABEC, V.; NOVAKOVA, O. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. **Drug Resist Updat**, v. 9, n. 3, p. 111-22, Jun 2006.

BUSS, I. et al. Enhancing lipophilicity as a strategy to overcome resistance against platinum complexes? **J Inorg Biochem**, v. 105, n. 5, p. 709-17, May 2011.

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, Mar 17 2015.

CARNIZELLO, A. P. et al. In vitro and in vivo antitumor activity of a novel carbonyl ruthenium compound, the ct-[RuCl (CO)(dppb)(bipy)] PF₆ [dppb= 1, 4-bis (diphenylphosphine) butane and bipy= 2, 2'-bipyridine]. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 164, p. 42-48, 2016.

CHEN, T. et al. Ruthenium polypyridyl complexes that induce mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells. **Inorg Chem**, v. 49, n. 14, p. 6366-8, Jul 19 2010.

CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 236, n. 1, p. 209-233, 2003.

CLAVEL, C. M. et al. Discovery of a highly tumor-selective organometallic ruthenium(II)-arene complex. **J Med Chem**, v. 57, n. 8, p. 3546-58, Apr 24 2014.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol**, v. 740, p. 364-78, Oct 05 2014.

DEGTEREV, A.; BOYCE, M.; YUAN, J. A decade of caspases. **Oncogene**, v. 22, n. 53, p. 8543-67, Nov 24 2003.

ENGBRAATEN, O.; VOLLAN, H. K.; BORRESEN-DALE, A. L. Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets. **Am J Pathol**, v. 183, n. 4, p. 1064-74, Oct 2013.

ESSERMAN, L.; SHIEH, Y.; THOMPSON, I. Rethinking screening for breast cancer and prostate cancer. **Jama**, v. 302, n. 15, p. 1685-92, Oct 21 2009.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 342-8, May 17 2001.

FAVALORO, B. et al. Role of apoptosis in disease. **Aging (Albany NY)**, v. 4, n. 5, p. 330-49, May 2012.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 01 2015.

FLETCHER, D. A.; MULLINS, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 485-492, 2010.

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, Mar 15 2011.

FOULKES, W. D.; REIS-FILHO, J. S.; NAROD, S. A. Tumor size and survival in breast cancer--a reappraisal. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 7, n. 6, p. 348-53, Jun 2010.

FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006.

FREDERICQ, E.; OTH, A.; FONTAINE, F. The ultraviolet spectrum of deoxyribonucleic acids and their constituents. **J Mol Biol**, v. 3, p. 11-7, Feb 1961.

FUZER, A. M. et al. Effects of limonoid cedrelone on MDA-MB-231 breast tumor cells in vitro. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 13, n. 10, p. 1645-53, Dec 2013.

GANESHPANDIAN, M. et al. New ruthenium(II) arene complexes of anthracenyl-appended diazacycloalkanes: effect of ligand intercalation and hydrophobicity on DNA and protein binding and cleavage and cytotoxicity. **Dalton Trans**, v. 43, n. 3, p. 1203-19, Jan 21 2014.

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.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends Biochem Sci**, v. 32, n. 1, p. 37-43, Jan 2007.

GOMES, C. A. et al. Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure-activity study. **J Med Chem**, v. 46, n. 25, p. 5395-401, Dec 04 2003.

GRAMINHA, A. E. Produtos naturais e derivados, complexação com o rutênio visando aumento da atividade citotóxica. 2015.

HAN, B. J. et al. DNA interaction, antioxidant activity, and bioactivity studies of two ruthenium(II) complexes. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 135, p. 840-9, Jan 25 2015.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 04 2011.

HARTINGER, C. G. et al. KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. **Chem Biodivers**, v. 5, n. 10, p. 2140-55, Oct 2008.

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.

HENG, M. P. et al. Synthesis of a DNA-targeting nickel (II) complex with testosterone

thiosemicarbazone which exhibits selective cytotoxicity towards human prostate cancer cells (LNCaP). **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 150, p. 360-72, 2015.

HETZ, C. A. ER stress signaling and the BCL-2 family of proteins: from adaptation to irreversible cellular damage. **Antioxidants & redox signaling**, v. 9, n. 12, p. 2345-2356, 2007.

HOTCHKISS, R. S. et al. Cell death. **N Engl J Med**, v. 361, n. 16, p. 1570-83, Oct 15 2009.

HUANG, Y. et al. Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer-targeted selenium nanoparticles. **Biomaterials**, v. 34, n. 29, p. 7106-7116, 2013.

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

JIANG, C. W. et al. Syntheses, characterization and DNA-binding studies of ruthenium(II) terpyridine complexes: [Ru(tpy)(PHBI)]²⁺ and [Ru(tpy)(PHNI)]²⁺. **J Inorg Biochem**, v. 93, n. 3-4, p. 247-55, Jan 15 2003.

KAJSTURA, M. et al. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. **Cytometry Part A**, v. 71, n. 3, p. 125-131, 2007.

KANDAGAL, P. B. et al. Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. **J Pharm Biomed Anal**, v. 41, n. 2, p. 393-9, May 03 2006.

KANG, M. H.; REYNOLDS, C. P. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 4, p. 1126-32, Feb 15 2009.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 8, p. 573-84, Aug 2007.

KILLION, J. J.; RADINSKY, R.; FIDLER, I. J. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. **Cancer Metastasis Rev**, v. 17, n. 3, p. 279-84, 1998.

KUMAR, C. V.; BARTON, J. K.; TURRO, N. J. Photophysics of ruthenium complexes bound to double helical DNA. **J. Am. Chem. Soc**, v. 107, n. 19, p. 5518-5523, 1985.

KUMAR, V. et al. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. Elsevier Health Sciences, 2014. ISBN 0323296394.

KYKER, K. D.; CULKIN, D. J.; HURST, R. E. A model for 3-dimensional growth of bladder cancers to investigate cell-matrix interactions. **Urol Oncol**, v. 21, n. 4, p. 255-61, Jul-Aug 2003.

LAKOWICZ, J. R.; WEBER, G. Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules. **Biochemistry**, v. 12, n. 21, p. 4161-70, Oct 09 1973.

LE DU, F. et al. Is the future of personalized therapy in triple-negative breast cancer based on molecular subtype? **Oncotarget**, v. 6, n. 15, p. 12890-908, May 30 2015.

LEIJEN, S. et al. Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. **Invest New Drugs**, v. 33, n. 1, p.

201-14, Feb 2015.

LIU, S. H. et al. Effect of radiation on cytotoxicity, apoptosis and cell cycle arrest of human osteosarcoma MG-63 induced by a ruthenium(II) complex. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 140, p. 202-9, Apr 05 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: a review. **Eur J Med Chem**, v. 60, p. 233-9, Feb 2013.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330-8, May 2003.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MCKEAGE, M. J. et al. Role of lipophilicity in determining cellular uptake and antitumour activity of gold phosphine complexes. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 46, n. 5, p. 343-50, 2000.

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 09 2000.

MIZUSHIMA, N. et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, v. 451, n. 7182, p. 1069-75, Feb 28 2008.

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.

NAIK, K. M.; NANDIBEWOOR, S. T. Investigation into the interaction of methylparaben and erythromycin with human serum albumin using multispectroscopic methods. **Luminescence**, v. 31, n. 2, p. 433-41, Mar 2016.

NORUM, J. H.; ANDERSEN, K.; SORLIE, T. Lessons learned from the intrinsic subtypes of breast cancer in the quest for precision therapy. **Br J Surg**, v. 101, n. 8, p. 925-38, Jul 2014.

NYGREN, J.; SVANVIK, N.; KUBISTA, M. The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. **Biopolymers**, v. 46, n. 1, p. 39-51, 1998.

PARRISH, A. B.; FREEL, C. D.; KORNBLUTH, S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 6, Jun 01 2013.

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.

PIERROZ, V. et al. Molecular and cellular characterization of the biological effects of ruthenium(II) complexes incorporating 2-pyridyl-2-pyrimidine-4-carboxylic acid. **J Am Chem Soc**, v. 134, n. 50, p. 20376-87, Dec 19 2012.

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 01 2004.

RAYMOND, E. et al. Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. **Ann Oncol**, v. 9, n. 10, p. 1053-71, Oct 1998.

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.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3096-102, May 26 1981.

SANCHO-MARTÍNEZ, S. M. et al. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. **Pharmacology & therapeutics**, v. 136, n. 1, p. 35-55, 2012.

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.

SCHREURS, S. et al. Fluorescence lifetime measurements of intrinsically unstructured proteins: application to alpha-synuclein. **Methods Mol Biol**, v. 895, p. 461-6, 2012.

SCHWARTSMANN, G. et al. Anticancer drug discovery and development throughout the world. **J Clin Oncol**, v. 20, n. 18 Suppl, p. 47s-59s, Sep 15 2002.

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.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J Natl Cancer Inst**, v. 82, n. 13, p. 1107-12, Jul 4 1990.

SMITH, R. A. et al. Breast cancer in limited-resource countries: early detection and access to care. **Breast J**, v. 12 Suppl 1, p. S16-26, Jan-Feb 2006.

SOERJOMATARAM, I. et al. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 107, n. 3, p. 309-30, Feb 2008.

SPIEWAK, K.; BRINDELL, M. Impact of low- and high-molecular-mass components of human serum on NAMI-A binding to transferrin. **J Biol Inorg Chem**, v. 20, n. 4, p. 695-703, Jun 2015.

TAN, C. et al. Synthesis, structures, cellular uptake and apoptosis-inducing properties of highly cytotoxic ruthenium-Norharman complexes. **Dalton Trans**, v. 40, n. 34, p. 8611-21, Sep 14 2011.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 3, p. 231-41, Mar 2008.

TOSS, A.; CRISTOFANILLI, M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 17, p. 60, Apr 23 2015.

TRUSCHEL, S. T. et al. Primary uroepithelial cultures. A model system to analyze umbrella cell barrier function. **J Biol Chem**, v. 274, n. 21, p. 15020-9, May 21 1999.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275-92, Oct 14 2011.

VEAL, J. M.; RILL, R. L. Noncovalent DNA binding of bis(1,10-phenanthroline)copper(I) and related compounds. **Biochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1132-40, Jan 29 1991.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: molecular rival of cancer. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 35, n. 3, p. 473-85, May 2013.

WANG, K. et al. Investigation of gallic acid induced anticancer effect in human breast carcinoma MCF-7 cells. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 28, n. 9, p. 387-93, Sep 2014.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5904-12, Oct 06 2008.

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.

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

XU, G.; SHI, Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. **Cell Res**, v. 17, n. 9, p. 759-71, Sep 2007.

XUE, F. et al. Two new dicopper(II) complexes with oxamido-bridged ligand: synthesis, crystal structures, DNA binding/cleavage and BSA binding activity. **J Inorg Biochem**, v. 115, p. 78-86, Oct 2012.

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 09 2004.

YEN, G.-C.; DUH, P.-D.; TSAI, H.-L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 307-313, 2002.

YOU, B. R. et al. Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. **Food Chem Toxicol**, v. 48, n. 5, p. 1334-40, May 2010.

YOULDEN, D. R. et al. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. **Cancer Epidemiol**, v. 36, n. 3, p. 237-48, Jun 2012.

ZHAO, Z. et al. Mixed-ligand ruthenium polypyridyl complexes as apoptosis inducers in cancer cells, the cellular translocation and the important role of ROS-mediated signaling. **Dalton Trans**, v. 43, n. 45, p. 17017-28, Dec 07 2014.