

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

Cecília Patrícia Popolin

**Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de novos
complexos de rutênio contendo ácido salicílico e derivados**

São Carlos

2021

Cecília Patrícia Popolin

Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de novos complexos de rutênio contendo ácido salicílico e derivados

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

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti

São Carlos

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Cecília Patrícia Popolin, realizada em 30/04/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti (UFSCar)

Prof. Dr. Filipe Vieira Rocha (UFSCar)

Prof. Dr. Roberto Santana da Silva (USP)

Prof. Dr. Marlus Chorilli (UNESP)

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Dedico este trabalho a você Lorenzo, meu filho, presente valioso que Deus me deu! Eu sempre o protegerei e amarei com todas as minhas forças.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus pela minha vida, saúde e sabedoria para realizar este trabalho.

A você, Rodrigo, meu companheiro nessa jornada, por sempre me apoiar, pelo carinho e todo o cuidado com a nossa família. Que história linda estamos construindo a cada dia. Te amo!

A minha orientadora, Profa. Márcia Regina Cominetti, por quem tenho grande admiração e respeito. Agradeço a oportunidade de realização deste trabalho, por sua disponibilidade, compreensão e orientação.

Aos meus pais Alberto e Laura, pelo apoio e carinho.

Ao meu irmão Rogério pela torcida.

Aos meus sogros, Quirineu e Vera, e a toda sua família, que mesmo distante sempre estiveram torcendo por mim.

A todos os membros do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN), pela colaboração e ajuda nesta jornada. Agradeço também pelos momentos de descontração, almoços de aniversário, idas a congressos, conversas bem-humoradas que tornou a rotina no laboratório mais leve. Meu obrigada especial à Amanda, por me ajudar em todas as etapas dessa jornada, pela amizade e por estar sempre presente! Um agradecimento especial à Angélica, uma pessoa e profissional admirável, por toda ajuda neste trabalho. Não poderia deixar de agradecer também a Angelina, Carol, Patrícia, Luani, Carla, Liany, Izabela e a todos que passaram pelo LABEN durante meu doutorado. Meu muito obrigada a todos!

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

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

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli da UNESP e suas alunas pela síntese e caracterização do complexo nanoestruturado.

À Profa. Dra. Karina Nogueira Z. Pinto Rossi e ao técnico Dr. Paulo Henrique M. de Andrade do Laboratório de Patologia e Biocompatibilidade pela ajuda e disposição.

Aos professores e funcionários do Departamento de Gerontologia - UFSCar.

Ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - PIPGCF e seus funcionários.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento na modalidade doutorado (Processo nº 142335/2016-9).

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

RESUMO

O câncer é um termo utilizado para doenças em que células anormais se dividem sem controle e são capazes de se espalhar e invadir outros órgãos e tecidos através dos sistemas sanguíneo e linfático. O câncer de mama apresenta maior incidência e mortalidade entre as mulheres. Sua heterogeneidade representa um grande desafio na clínica, pois requer planos de tratamentos específicos para cada subtipo da doença. Os fármacos utilizados atualmente para o tratamento do câncer de mama apresentam alta taxa de resistência e baixa seletividade para as células tumorais, causando diversos efeitos colaterais. O desenvolvimento de compostos antitumorais a base de metais iniciou-se com a descoberta da atividade antitumoral da cisplatina, que atualmente está entre os fármacos antitumorais mais utilizados na clínica para o tratamento de diversos tipos de tumores, como de ovário, mama, cabeça e pescoço. Os complexos de rutênio têm atraído grande atenção por apresentarem propriedades únicas que podem justificar seu potencial antitumoral como a capacidade de imitar o ferro na ligação a muitas biomoléculas, incluindo a transferrina e albumina, tornando-o mais específico para as células tumorais. O objetivo deste trabalho foi selecionar dentre diferentes complexos um novo complexo de rutênio contendo ácido salicílico e derivados, o qual pudesse ser candidato a medicamento antitumoral, e avaliar os efeitos do complexo selecionado através de estudos *in vitro* em células de mama e *in vivo* através do modelo de metástase espontâneo singênico ortotópico. Os resultados demonstraram que o complexo Ru(Amsal) foi o mais seletivo para as células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 entre os seis complexos testados. Estudos morfológicos mostraram que o complexo Ru(Amsal) promoveu maiores alterações na morfologia das células MDA-MB-231 quando comparado a outras linhagens testadas e além disso, o complexo foi capaz de atuar no processo de formação de colônias, diminuindo o número e tamanho das mesmas. Nos ensaios relacionados a cascata metastática, o complexo Ru(Amsal) inibiu a migração, invasão, adesão, e alterou a organização do citoesqueleto de células da linhagem MDA-MB-231. O complexo também induziu a morte celular por apoptose, causou danos ao DNA, fragmentação nuclear e despolarização do potencial de membrana da mitocôndria. Ainda, foi capaz de alterar o ciclo celular das células tumorais MDA-MB-231, aumentando a porcentagem dessas células na fase sub-G1. A análise do efeito do complexo Ru(Amsal) incorporado em microemulsão (Ru(Amsal)_{ME}) *in vivo* em modelo de metástase espontâneo singênico ortotópico, demonstrou que este complexo foi capaz de inibir metástases pulmonares e ósseas. Além disso, não houve sinais de toxicidade nos animais tratados com o complexo. Portanto, os resultados indicam que o complexo Ru(Amsal) apresenta propriedades promissoras e que pode ser uma nova alternativa de fármaco para o tratamento do câncer de mama.

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

ABSTRACT

Cancer is a term used for diseases in which abnormal cells divide uncontrolled, spread, and invade other tissues through the blood and lymphatic systems. Breast cancer is one of the most common and with higher mortality among women. Its heterogeneity represents a critical challenge in the clinic, as it requires specific treatment for each subtype of the disease. The treatments used for breast cancer have a high resistance rate and low selectivity for tumor cells, causing several side effects. The development of antitumor metal-based compounds started with the discovery of antitumor activity of cisplatin and is currently among the most widely used antitumor drugs in the clinic to treat various types of tumors, such as ovary, breast, head, and neck. Ruthenium complexes have attracted significant attention because they have unique properties that can justify their antitumor potential, such as mimicking the iron for binding several biomolecules, including transferrin and albumin, making it more specific to tumor cells. This work aimed to select among different complexes a new ruthenium complex, which would be the candidate for antitumor drug, and evaluate the effects of the selected complex through *in vitro* studies on breast cells and *in vivo* through the spontaneous metastases of syngenic and orthotopic model. The results demonstrated that the complex Ru(Amsal) was the most selective against breast tumor cells MDA-MB-231 among the six complexes tested. Morphological studies showed that the Ru(Amsal) complex promoted more significant changes in the morphology of breast cancer cells MDA-MB-231 compared to other cell lines tested and, besides, the complex was able to act in the colony formation process, reducing the number and size of the colonies. In the metastatic cascade assays, the complex Ru(Amsal) inhibited migration, invasion, and uptake and altered the organization of the cytoskeleton of breast cancer cells MDA-MB-231. The complex also induced cell death by apoptosis, DNA damage, nuclear fragmentation, and mitochondrial membrane potential depolarization. Furthermore, it changed the cell cycle of breast tumor cells MDA-MB-231, increasing the percentage of these cells in the sub-G1 phase. An analysis of the effect of the complex Ru(Amsal) synthesized on a microemulsion (Ru(Amsal)_{ME}) *in vivo* in a spontaneous metastases syngenic and orthotopic model demonstrated that this complex was able to inhibit pulmonary and bone metastases. Also, there were no signs of acute toxicity in animals treated with the complex. Therefore, the results indicate that the complex Ru(Amsal) has promising properties and might be a good alternative drug for breast cancer treatment.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxas de mortalidade no Brasil por câncer de mama, específicas por faixas etárias, por 100.000 mulheres no período de 1980 a 2018.	20
Figura 2 – Características fundamentais responsáveis pelo caráter maligno das células tumorais.	22
Figura 3 – O microambiente presente no tumor primário.	23
Figura 4 - Visão geral da cascata metastática: as cinco principais etapas da metástase incluem a invasão, intravasamento, circulação, extravasamento e colonização.	25
Figura 5 - Anatomia da glândula mamária.	26
Figura 6 - Representação da síntese dos complexos $[Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF_6$ e $[Ru(O-O)(dppe)_2]PF_6$	33
Figura 7 - Estrutura molecular do complexo Ru(Amsal)	45
Figura 8 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) na morfologia das células da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 e não tumoral de mama MCF-10A. O experimento foi realizado em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas representativas de cada linhagem celular e as setas representam as alterações morfológicas promovidas pelo complexo Ru(Amsal).	46
Figura 9 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) na morfologia das células das linhagens tumorais de mama MCF-7 e SK-BR-3. O experimento foi realizado em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas representativas de cada linhagem celular e as setas representam as alterações morfológicas. promovidas pelo complexo Ru(Amsal).	47
Figura 10 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) sobre a formação de colônias em células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. O experimento foi realizado em triplicata. (A) Imagem das placas do ensaio de formação de colônias correspondente a uma das triplicatas representativa. (B) Gráfico de porcentagem do número de colônias. (C) Gráfico do tamanho das colônias. Os resultados foram comparados com os controles sem tratamento.	48
Figura 11 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) na apoptose de células MDA-MB-231 e MCF-10A. (A) Ensaio de apoptose com PE-Anexina V (detectada no canal FL2-A) e 7AAD (detectado no canal FL3-A). (B) Porcentagens de apoptose induzida pelo complexo nas células MDA-MB-231. (C) Porcentagem de apoptose induzida pelo complexo nas células MCF-10A. Os ensaios foram realizados em triplicata. Imagens correspondem a uma das triplicatas. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (sem tratamento)..	50

Figura 12 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) no DNA e ciclo celular das células MDA-MB-231. (A) Fragmentação Nuclear após 2 horas de tratamento. As setas brancas mostram os núcleos fragmentados. (B) Efeitos do complexo Ru(Amsal) no ciclo celular de MDA-MB-231 após o tratamento com (0,3 – 2,4µM) do complexo. A camptotecina foi utilizada como controle positivo (C +). Histogramas de DNA do ensaio de ciclo celular. PI corresponde ao iodeto de propídio (detectado no canal FL2-A) (C) . Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado).	52
Figura 13 – Efeitos do complexo de rutênio Ru(Amsal) sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). (A) O potencial de membrana foi avaliado após o tratamento com diferentes concentrações de Ru(Amsal) no período de 4 horas e monitorado por citometria de fluxo com o marcador JC-1. A estaurosporina (0,5µM) foi usada como controle positivo (agente indutor de apoptose). Regiões em vermelho representam células com membranas mitocondriais intactas e os eventos em verde representa células com perda de $\Delta\psi_m$. (B) Gráfico representativo da intensidade de despolarização da membrana após os tratamentos com as concentrações indicadas de Ru(Amsal).....	54
Figura 14 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) nos níveis proteicos de moléculas apoptóticas e anti-apoptóticas de células MDA-MB-231. (A) Efeito do complexo nos níveis proteicos em células MDA-MB-231. (B) Imagem representativa da expressão de proteínas relacionadas à apoptose por análise de Western Blotting O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado).	56
Figura 15 - Transporte de Ru(Amsal) por transferrina. As células MDA-MB-231 foram incubadas com 1,2µM do complexo Ru(Amsal) por 24 horas. Os resultados foram comparados com o grupo de células tratadas com apenas com o complexo, sem a presença da transferrina. O experimento foi realizado em triplicata.	58
Figura 16 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) sobre a migração das células da linhagem MDA-MB-231 em câmara de Boyden. (A) A imagem corresponde a uma das triplicatas. (B) O gráfico apresenta a quantidade de células que conseguiram migrar pelos poros do inserto após o tempo de incubação de 22 horas com o complexo Ru(Amsal). Foram utilizados neste ensaio o controle + (sem tratamento e com quimioatraente) e controle – (sem tratamento e sem quimioatraente). O experimento foi realizado em triplicata.	60
Figura 17 - Efeito de diferentes concentrações do complexo Ru(Amsal) na migração das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 pelo ensaio de wound healing. O ensaio	

foi realizado em triplicata. (A) A imagem corresponde a uma das triplicatas. (B) Gráfico da porcentagem de fechamento.	61
Figura 18 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) sobre a invasão de células da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231. O experimento foi realizado em triplicata. (A) A imagem corresponde a uma das triplicatas. (B) O gráfico apresenta a quantidade de células que conseguiram invadir a matrigel e atravessar os poros do inserto após o tempo de incubação de 22 horas com o complexo Ru(Amsal). Foram utilizados neste ensaio o controle + (sem tratamento e com quimioatraente) e controle - (sem tratamento e sem quimioatraente)..	63
Figura 19 - Efeito do complexo Ru(Amsal) sobre a expressão da MMP9 em células da linhagem MDA-MB-231. (A) Expressão da MMP9 em gel de zimografia. (B) Gráfico da análise da atividade da MMP9.	64
Figura 20 - Efeitos de diferentes concentrações do complexo Ru(Amsal) sobre a adesão celular celular ao colágeno tipo I das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle sem tratamento (somente colágeno tipo I e células). Também foi utilizado um controle negativo de adesão (BSA).	66
Figura 21 - Efeito de diferentes concentrações do complexo Ru(Amsal) no citoesqueleto das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. O ensaio foi realizado em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas.	67
Figura 22 - Efeitos do tratamento do complexo Ru(Amsal) _{ME} no peso (g) dos camundongos pelo período de 27 dias (A) Efeitos do complexo Ru(Amsal) _{ME} na área (mm ³) do tumor primário dos camundongos após 27 dias (B). Tratamento com o Salina refere-se aos camundongos que receberam apenas salina e o Base _{ME} refere-se aos camundongos que receberam apenas o tratamento com a base da microemulsão.	80
Figura 23 - Efeitos dos tratamentos com o complexo Ru(Amsal) _{ME} , Base _{ME} e Salina no peso (g) dos órgãos (pulmão, baço, fígado e tumor primário) dos camundongos, coletados no momento da eutanásia.	81
Figura 24 - Efeito dos tratamentos com o complexo Ru(Amsal) _{ME} , Base _{ME} e Salina na Relative Tumor Burden (RTB) do modelo de formação de metástase espontânea.	82
Figura 25 – Efeito do complexo Ru(Amsal) em metástases e células tumorais circulantes. (A) Imagem representativa das metástases pulmonares dos tratamentos com o complexo Ru(Amsal) _{ME} , Base _{ME} e Salina. (B) Prevalência em % de células tumorais circulantes	83

Figura 26 - Efeito dos tratamentos com o complexo Ru(Amsal) _{ME} , Base _{ME} e salina nos parâmetros bioquímicos. (A) Toxicidade renal / ureia, (B) Toxicidade renal / creatinina e (C) hepatotoxicidade de GOT (AST).....	85
Figura 27 - Análise histológica dos órgãos dos animais corados com HE. Imagens representativas do coração, rim e baço com os diferentes tratamentos (Base _{ME} , Ru(Amsal) _{ME} e Salina). As setas indicam as alterações morfológicas ou patológicas promovidas pelos tratamentos.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.	19
Tabela 2 - Atividade citotóxica dos complexos de rutênio em células tumorais de mama MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR-3 e de mama não tumoral MCF-10A após 24 horas de incubação. O experimento foi realizado em triplicata. DP = desvio padrão. *IS =Índice de seletividade dos complexos.	44
Tabela 3 - Atividade citotóxica dos complexos de rutênio em células tumorais de mama MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR-3 e de mama não tumoral MCF-10A após 48 horas de incubação. O experimento foi realizado em triplicata. DP = desvio padrão. *IS =Índice de seletividade dos complexos.	44
Tabela 4 - Primers e probes utilizados no experimento de PCR em tempo real para determinação da Relative Tumor Burden (RTB).	74
Tabela 5 - Componentes da PCR em tempo real Taqman para os ensaios <i>in vivo</i>	75
Tabela 6 - Dados da caracterização físico-química das microemulsões incorporadas ou não com o complexo de rutênio Ru(Amsal).	78
Tabela 7 - Atividade citotóxica dos complexo Ru(Amsal), Ru(Amsal)ME e BaseME em células tumorais de mama humano MDA-MB-231, células tumorais de mama de camundongo 4T1.13ch5T1 e não tumoral de camundongo L929, após 24 e 48 horas de incubação. O experimento foi realizado em triplicata. DP = desvio padrão.	79

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$ – potencial de membrana mitocondrial
ASal - Ácido Salicílico
AmSal - Ácido Aminosalicílico
AdiSal - 2,4 – dihidroxibenzóico
7AAD – 7-amino-actinomicina D
Base_{ME} - base do sistema lipídico nanoestruturado do tipo microemulsão
BCA – Ácido bicinchrônico (*BiCinchoninic Acid*)
bipy – 2,2' -bipiridina
BSA – Albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*)
BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro
CO₂ – Gás carbônico
Ct – Ciclo Limiar (*Cycle Threshold*)
CTCs – Células tumorais circulantes
DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride*)
DISC – Complexo de sinalização induzido por morte (*Death-Inducing Signaling Complex*)
DMEM – Meio Dulbecco's modificado (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
DMSO – Dimetilsulfóxido (*Dimethyl Sulfoxide*)
DNA – Ácido desoxirribonucleico (*DeoxyriboNucleic Acid*)
DNAg – DNA genômico
DP – Desvio padrão
dppe – 1,2'-bis(difenilfosfina)etano
dppb – 1,4'-bis(difenilfosfina)butano
EGF – Fator de crescimento epidermal (*Epidermal Growth Factor*)
FBS – Soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)
FITC – Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein IsoThiocyanate*)
HE – Hematoxilina e eosina
HER2 – Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor - 2*)
IC₅₀ – Concentração capaz de induzir 50% de morte celular
IS – Índice de Seletividade
KCl – Cloreto de potássio
kDa - Quilodaltons
KP1019 - *Indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)]*
KP1339 - *Sodium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)]*
ME - microemulsão
MEC – Matriz Extracelular
MMPs – Metaloproteinases de Matriz (*Matrix Metalloproteinases*)
MMP9 – Metaloproteinases de Matriz 9 (*Matrix Metalloproteinase 9*)
MMP2 - Metaloproteinases de Matriz 2 (*Matrix Metalloproteinase 2*)
MTT – Brometo de dimetiazol-difeniltetrazólio (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*)

mg/mL – Miligramas por mililitro
MgSO₄ – Sulfato de magnésio
mM – Milimolar
MnCl₂ - Cloreto de manganês
mV - Milivolts
NaCl – Cloreto de sódio
NAMI-A - *Imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate*
ng/mL – Nanogramas por mililitro
nM - Nanomolar
O₂ - Oxigênio
°C – Grau Celsius
PBS – Tampão Salina Fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)
PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
PE – Ficoeritrina (*PhycoErythrin*)
PI – Iodeto de propídio (*Propidium Iodide*)
RE – Receptores de estrogênio
RP – Receptores de progesterona
rpm – Rotações por minuto
RTB – Carga tumoral relativa (*Relative Tumor Burden*)
Ru – Rutênio
RNA – Ácido ribonucleico (*RiboNucleic Acid*)
RTB – Carga tumoral Relativa (*Relative Tumor Burden*)
Ru(Amsal) – [Ru(AmSal)(dppe)₂]PF₆
Ru(Amsal)_{ME} – Sistema lipídico nanoestruturado do tipo microemulsão do complexo Ru(Amsal)
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulphate*)
SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
µg - Microgramas
µg/mL – Microgramas por mililitro
µl - Microlitro
µM - Micromolar
UI/mL – Unidades Internacionais por mililitro
VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*)
ZnCl₂ – Cloreto de zinco

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução	19
1.1 Câncer: incidência e causas	19
1.2 Patologia do câncer.....	21
1.3 Câncer de mama	25
1.3.1 Diagnóstico e tratamento do câncer de mama	27
1.4 Complexos inorgânicos a base de metais no tratamento do câncer.....	29
1.4.1 Complexos de Rutênio como potenciais quimioterápicos.....	30
1.5 Produtos naturais como ligantes	31
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Complexos de rutênio	33
3.1.1 Diluição dos complexos de rutênio	34
3.2 Linhagens celulares e padronização do cultivo <i>in vitro</i>	34
3.3 Ensaio de citotoxicidade	35
3.3.1 Ensaio de viabilidade celular – Método do MTT	35
3.3.2 Ensaio de morfologia celular	35
3.3.3 Ensaio de formação de colônias	36
3.4 Ensaio relacionados a apoptose.....	36
3.4.1 Ensaio de apoptose com anexina V por citometria de fluxo	36
3.4.2 Ensaio de fragmentação nuclear – marcação com DAPI	37
3.4.3 Ensaio de ciclo celular.....	37
3.4.4 Ensaio de <i>Western Blotting</i>	38
3.4.5 Ensaio de potencial de membrana mitocondrial.....	38
3.5 Ensaio relacionado ao transporte de rutênio e sua interação celular.	39
3.5.1 Ensaio de Transporte do Ru(Amsal) por transferrina.....	39
3.6 Ensaio relacionados à cascata metastática	39
3.6.1 Ensaio de migração celular – Câmara de Boyden	39
3.6.2 Ensaio de migração - <i>Wound Healing</i>	40
3.6.3 Ensaio de invasão celular	40
3.6.4 Zimografia	41

3.6.5 Ensaio de adesão celular.....	41
3.6.6 Ensaio de marcação do citoesqueleto com a faloidina	42
3.7 Análise estatística	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Efeito dos complexos de rutênio sobre a citotoxicidade e alterações na morfologia celular....	43
4.2 Efeitos sobre a apoptose	48
4.3 Efeitos sobre o transporte e interação celular	57
4.4 Efeitos sobre a cascata metastática.....	58
 Capítulo 2 – Nanotecnologia e Ensaios <i>in vivo</i>	69
5 Nanotecnologia.....	69
5.1 Modelos de metástase <i>in vivo</i>	70
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	70
6.1 Síntese do sistema lipídico nanoestruturado do tipo microemulsão (ME) do complexo Ru(Amsal)	70
6.1.2 Dispersão de luz dinâmica.....	71
6.1.3 Potencial zeta.....	71
6.2 Linhagens celulares	71
6.3 Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade	72
6.4 Modelo <i>in vivo</i> de metástase.....	72
6.4.1 Procedimentos éticos	72
6.4.2 Animais.....	72
6.4.3 Formação de metástase espontânea do tumor primário.....	72
6.4.4 Extração do DNAg	73
6.4.5 Carga tumoral relativa ou <i>Relative Tumor Burden</i> (RTB).....	74
6.4.6 Análise de peso corporal e dos órgãos.....	75
6.4.7 Análise histológica do coração, rim e baço	75
6.4.8 Análise Bioquímica	76
6.4.9 Células tumorais circulantes (CTCs).....	76
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
7.1 Caracterização físico-química do complexo Ru(Amsal) incorporado em microemulsão	77
7.2 Ensaios <i>in vitro</i> de citotoxicidade.....	78

7.3 Ensaio <i>in vivo</i> de metástase.....	79
7.3.1 Modelo de formação de metástase espontânea singênico ortotópico sem cirurgia	79
Capítulo 3 – Considerações finais	88
8 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS	100

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Câncer: incidência e causas

A incidência e a mortalidade por câncer vêm crescendo em todo o mundo. O envelhecimento e o crescimento populacional são em parte responsáveis por este aumento, bem como as mudanças na distribuição e prevalência dos fatores de risco, no qual observa-se um declínio dos tipos de câncer associados à infecções e o aumento daqueles associados à urbanização (sedentarismo, alimentação inadequada, entre outros) (BRASIL, 2020c).

A estimativa mundial mais recente aponta que em 2020 ocorreram 19,3 milhões de novos casos de câncer e um total de 10 milhões de mortes. O câncer de mama é o mais incidente no mundo, seguido pelo câncer de pulmão, colorretal, próstata e estômago (SUNG; FERLAY; SIEGEL; LAVERSANNE *et al.*, 2021). No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional de Câncer José Gomes Alencar da Silva (INCA) para cada ano do triênio 2020-2022 apontam para ocorrência de 625 mil novos casos de câncer. O câncer de pele não melanoma será o mais incidente, seguido pelos cânceres de mama, próstata, cólon, reto, pulmão e estômago (BRASIL, 2020c). A Tabela 1 apresenta a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020, exceto pele não melanoma.

Tabela 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. *

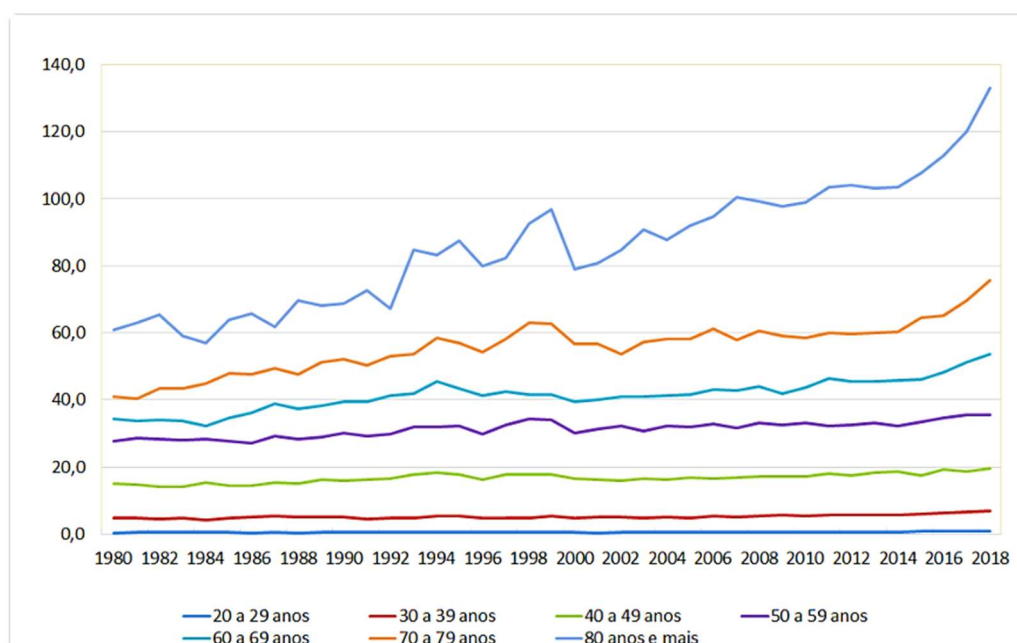
Localização primária	Casos	%		Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%		Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%		Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%		Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	5,0%		Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%		Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%		Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%		Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%		Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%		Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%

*Extraído de (BRASIL, 2020b)

O câncer de mama apresenta a maior incidência e mortalidade na população feminina em todo o mundo. Em 2020, foram 2,3 milhões de novos casos no mundo, representando 24,5% de todos os tipos de cânceres que acometeram as mulheres (IARC, 2021). Ainda, para o ano de 2020, no Brasil, foram estimados 66.280 novos casos, o que representa uma taxa de incidência de 43,74 casos de câncer de mama por 100 mil mulheres. A incidência e mortalidade do câncer

de mama apresentam um crescimento progressivo em mulheres a partir dos 40 anos. Na população feminina abaixo de 40 anos, ocorrem menos de 10 mortes a cada 100 mil mulheres, enquanto na faixa etária a partir de 60 anos o risco é 10 vezes maior, como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 - Taxas de mortalidade no Brasil por câncer de mama, específicas por faixas etárias, por 100.000 mulheres no período de 1980 a 2018. *



*Extraído de (BRASIL, 2020c)

O câncer é um dos problemas de saúde pública mais complexos que o sistema brasileiro e mundial enfrenta, dada a sua magnitude epidemiológica, social e econômica. A hereditariedade ou predisposição genética constitui fator importante para a evolução do câncer, no entanto, a maioria dos casos está diretamente relacionada com exposição a fatores ambientais acumulados. Estes fatores ambientais são externos ao organismo, como por exemplo, compostos químicos presentes em alimentos e agrotóxicos, tabagismo, exposição à radiação, e contato com organismos infecciosos. Associados aos fatores ambientais e genéticos, a atuação de hormônios e a condição do sistema imune também podem contribuir para a progressão da doença (CAO; GIOVANNUCCI, 2016; NCI, 2020a).

O diagnóstico do câncer pode ocorrer em qualquer faixa etária; no entanto, em indivíduos idosos a incidência é maior. Nesta etapa da vida, as alterações do sistema imune associadas ao envelhecimento, o acúmulo de mutações genéticas, uma maior exposição

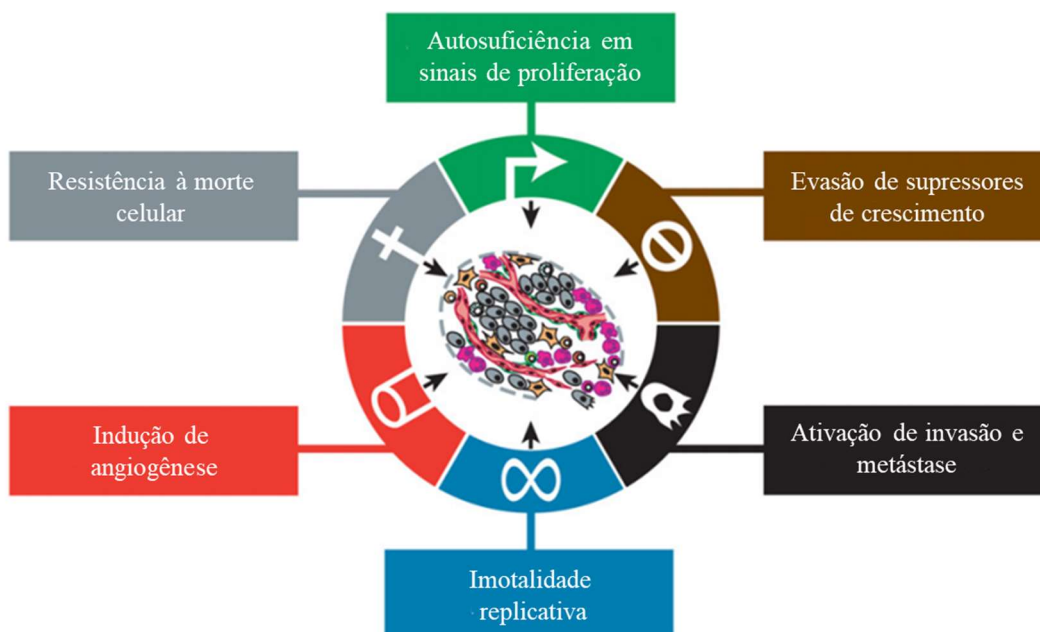
ambiental a agentes carcinogênicos e alterações hormonais podem ser fatores contribuintes, justificando a maior incidência de câncer nestes indivíduos (FALANDRY; BONNEFOY; FREYER; GILSON, 2014; PAWELEC, 2017). É importante ressaltar que pelo menos um terço dos casos novos e entre 30% a 50% das mortes por câncer que ocorrem anualmente no mundo poderiam ser evitadas modificando ou evitando os principais fatores de risco e implementando medidas de prevenção. A prevenção geralmente atua sobre os fatores de risco modificáveis, e inclui mudanças de hábito que envolvem evitar o consumo de bebidas alcoólicas, não fumar, praticar atividade física, adotar uma alimentação saudável e evitar exposição aos riscos ambientais (IARC, 2021).

1.2 Patologia do câncer

O câncer é um conjunto de doenças extremamente heterogêneas que ocorrem em diferentes tecidos, mas que possuem em comum o crescimento desordenado de células. Essa perda de controle é resultante de alterações em genes relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular. Os genes envolvidos na perda do controle da proliferação celular são divididos em duas grandes classes: os proto-oncogenes, que estimulam o crescimento celular, impedem a diferenciação e a morte celular, e os genes supressores de tumor, que limitam o crescimento das células, controlando negativamente a proliferação e sobrevivência celular. O desequilíbrio na regulação desse sistema, por meio da ativação de proto-oncogenes ou da perda da função de genes supressores de tumor, pode levar à proliferação descontrolada de células e ao acúmulo de sucessivas anormalidades genéticas, características do câncer (PEDRAZA-FARINA, 2006).

As células potencialmente malignas apresentam um conjunto de características fundamentais, tais como: autossuficiência em sinais de crescimento (não dependem de fatores de crescimento), resistência aos sinais antiproliferativos (são insensíveis aos inibidores de crescimento), resistência à morte celular, potencial replicativo ilimitado (imortalidade), angiogênese sustentada (crescimento sustentado em células do estroma para atrair novos vasos), evasão do sistema imunológico, invasão, metástase, além de estresse metabólico, oxidativo e de dano ao DNA (Figura 2) (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000; 2011).

Figura 2 – Características fundamentais responsáveis pelo caráter maligno das células tumorais. *

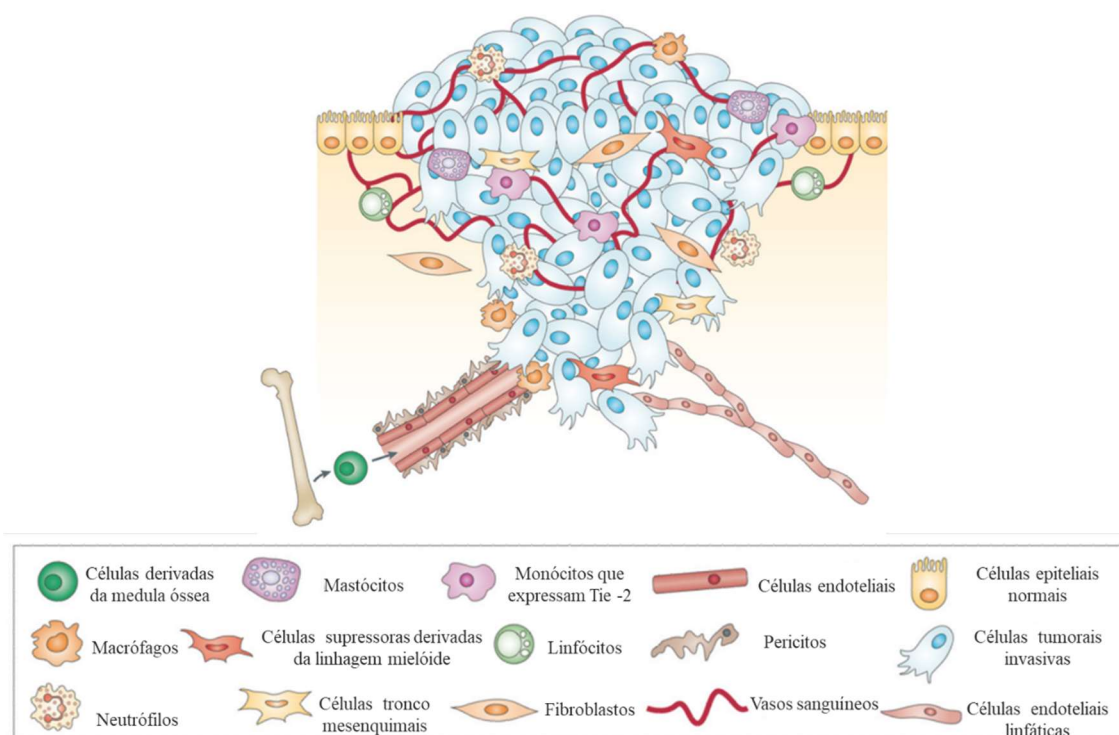


*Extraído e modificado (HANAHAAN; WEINBERG, 2011).

O entendimento do câncer como um microambiente tumoral no qual ocorre a interação de células geneticamente alteradas, células normais (como fibroblastos, células imunes, células endoteliais), vasos, e substâncias produzidas localmente ou originárias da irrigação sanguínea, tem se mostrado muito mais satisfatória na compreensão do desenvolvimento tumoral. Simultaneamente às mudanças genéticas e epigenéticas, as células tumorais são influenciadas pelo microambiente que as cercam, podendo adaptar seu fenótipo à medida que o meio se modifica (MAO; KELLER; GARFIELD; SHEN *et al.*, 2013). O microambiente tumoral diz respeito ao sítio de desenvolvimento do tumor, que envolve não só as células tumorais, mas também células estromais, sendo considerado um ambiente extremamente complexo (JOYCE; POLLARD, 2009). Estão presentes no microambiente tumoral células vasculares endoteliais que são capazes de formar vasos sanguíneos para suprir o crescimento do tumor; os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) responsáveis por produzir diferentes fatores de crescimento, dentre eles o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) que favorece a angiogênese, e componentes da matriz extracelular (MEC). Os linfócitos, macrófagos e neutrófilos também estão presentes e produzem citocinas que beneficiam a imunossupressão. Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) apresentam função muito importante na imunossupressão e no remodelamento tumoral através da secreção de diferentes metaloproteinases de matriz (MMPs). A MEC também possui relevância no desenvolvimento do tumor devido a constantes interações

com as células tumorais (Figura 3) (ADJEI; BLANKA, 2015; PICKUP; MOUW; WEAVER, 2014; QUAIL; JOYCE, 2013). Sendo assim, essas interações contínuas no microambiente tumoral podem contribuir para promover o aparecimento do câncer, sustentar o desenvolvimento do tumor, defender o tumor do sistema imune do hospedeiro, resistir a terapias e levar à metástase.

Figura 3 – O microambiente presente no tumor primário. *



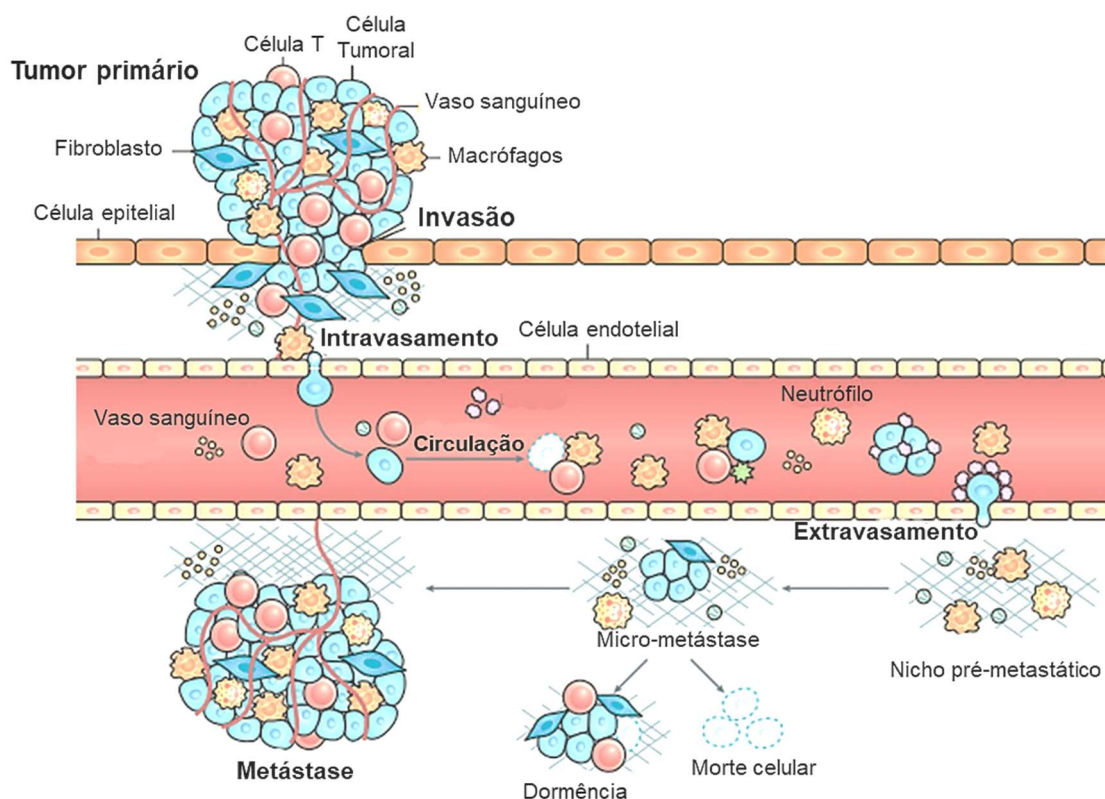
*Extraído e modificado de (JOYCE; POLLARD, 2009)

O processo metastático é descrito como um conjunto de eventos sequenciais e interligados de modo complexo e dinâmico. As cinco principais etapas da cascata metastática incluem: a invasão, intravasamento, circulação, extravasamento e colonização (Figura 4) (ANDERSON; BALASAS; CALLAGHAN; COOMBES *et al.*, 2019). Para invadir, as células tumorais utilizam uma variedade de proteases extracelulares, incluindo MMPs, que auxiliam na degradação da matriz extracelular, além de células mieloides que por sua vez, são responsáveis por gerar um ambiente imunossupressor. Já os fibroblastos e TAMs interagem com as células tumorais por meio da produção e secreção de componentes como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas e uma vez ativados, produzem ainda VEGF, que induz a permeabilidade vascular e angiogênese (OBENAUF; MASSAGUE, 2015). A saída do tumor

primário também é favorecida pela transição epitélio-mesenquimal (EMT) das células tumorais no qual, a célula epitelial modifica sua polaridade e propriedade adesiva para um fenótipo de célula mesenquimal, com alterações no citoesqueleto, resistência à apoptose e ganho na capacidade de migração e invasão. As células tumorais, através de movimentos ameboides, atravessam a parede endotelial por meio de poros entre os endoteliócitos e alcançam a circulação sanguínea (REYMOND; D'AGUA; RIDLEY, 2013). Uma vez no interior dos vasos, as células tumorais estão expostas a uma intensa força mecânica proveniente da corrente circulatória, e muitas não resistem a esses estímulos. Estudos mostram que menos de 0,01% de células que deixam um tumor primário terão potencial para colonizar outros locais. Na circulação sanguínea, as plaquetas parecem estar envolvidas como facilitadoras no processo de extravasamento, no qual elas se ligam as células tumorais circulantes e as protegem de fatores de necrose tumoral circulantes, ocasionam a embolia tumoral em capilares favorecendo a adesão ao endotélio e podem induzir a neoangiogênese, possibilitando o crescimento em órgãos secundários (FARES; FARES; KHACHFE; SALHAB *et al.*, 2020). O extravasamento depende das interações entre células neoplásicas e endoteliais e da permeabilidade vascular, eventos que são dependentes de moléculas de adesão. As células tumorais estendem seus pseudópodos e penetram nas junções entre as células endoteliais. Uma vez as células neoplásicas extravasadas, elas podem sofrer apoptose ou entrar em um período de dormência por meses ou décadas. As células tumorais podem também formar micrometástases no órgão-alvo, porém sua sobrevivência depende de diversos fatores e condições do microambiente (NEOPHYTOU; KYRIAKOU; PAPAGEORGIS, 2019). Ainda, para a adaptação no novo local, as células tumorais induzem modificações que suportam suas necessidades metabólicas incluindo a síntese de fatores pró-angiogênicos para a formação de uma nova rede vascular para estabelecimento do tumor no novo local (SCENEAY; SMYTH; MOLLER, 2013).

A metástase constitui a principal causa de morte para 90% dos pacientes com câncer, portanto, compreender a dinâmica de todo o processo ajudará a identificar possíveis alvos para terapias moleculares com o objetivo de interromper ou reverter o crescimento do tumor e metástases (FARES; FARES; KHACHFE; SALHAB *et al.*, 2020).

Figura 4 - Visão geral da cascata metastática: as cinco principais etapas da metástase incluem a invasão, intravasamento, circulação, extravasamento e colonização. *



*Extraído e modificado (ANDERSON; BALASAS; CALLAGHAN; COOMBES *et al.*, 2019)

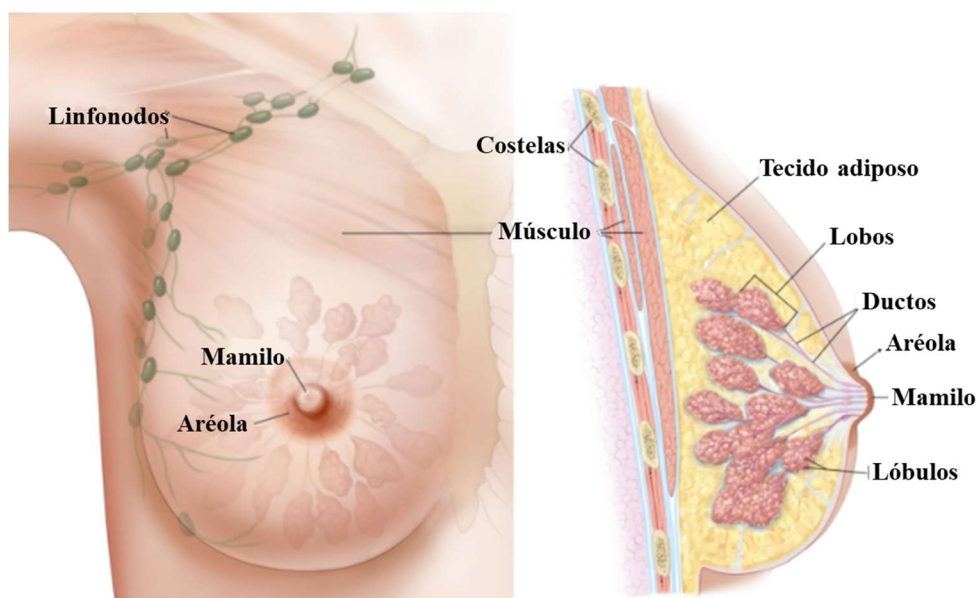
1.3 Câncer de mama

O câncer de mama caracteriza-se pela diversidade e heterogeneidade clínica, biológica e molecular. É uma das doenças que mais acomete as mulheres e apesar dos avanços nas pesquisas, ainda é um grande desafio seu diagnóstico e tratamento (POURTEIMOOR; MOHAMMADI-YEGANEH; PARYAN, 2016). Dentre os principais fatores de risco associados ao surgimento e à progressão do câncer de mama estão os hábitos de vida, como a falta de exercício físico, obesidade, consumo de álcool e exposição a radiações. Outro conjunto de elementos associados a esta doença são os fatores hormonais e reprodutivos relacionados, principalmente, à menarca precoce e à menopausa tardia, à nuliparidade e às terapias de reposição hormonal (BRASIL, 2020a; FENG; SPEZIA; HUANG; YUAN *et al.*, 2018). Acredita-se que cerca de 5 a 10% dos casos de câncer de mama são hereditários, mulheres com história familiar de carcinoma ductal ou lobular de mama *in situ* ou invasor têm um risco aumentado de câncer de mama, e apenas uma pequena fração desses casos (4% a 5%) é

explicada por mutações patogênicas nos genes BRCA1 (*Breast Cancer Gene 1*) ou BRCA2 (*Breast Cancer Gene 2*) (ANTONIOU; PHAROAH; NAROD; RISCH *et al.*, 2003).

A glândula mamária feminina é composta por lóbulos (glândulas produtoras de leite), por ductos (pequenos tubos que transportam o leite dos lobos ao mamilo) e por estroma (tecido adiposo e conjuntivo que envolve os ductos e lóbulos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos) (ACS, 2020a). O câncer de mama pode ser classificado de acordo com a sua origem, no qual, os tipos mais comuns são aqueles que começam nos lóbulos ou nos ductos mamários denominados respectivamente de carcinoma lobular e ductal *in situ*. Estes carcinomas correspondem a 40 a 75% dos casos e podem adquirir características invasivas e invadir outros tecidos, podendo gerar metástases (CHATTERJEE; MCCAFFREY, 2014).

Figura 5 - Anatomia da glândula mamária. *



*Extraído e modificado (NCI, 2020b).

De acordo com as características moleculares, o câncer de mama foi dividido em quatro principais grupos, sendo eles: Luminal A, Luminal B, receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER2) e triplo negativo (PEROU; SORLIE; EISEN; VAN DE RIJN *et al.*, 2000; SORLIE; PEROU; TIBSHIRANI; AAS *et al.*, 2001). Os subtipos luminais correspondem a aproximadamente 70% dos tumores de mama e são caracterizados, principalmente, pela expressão dos receptores hormonais de estrogênio (RE) e/ou progesterona (RP) (RE+/RP+). O subtipo Luminal B se difere por apresentar amplificação do receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER2), conferindo a este um maior grau histológico, maior agressividade e, portanto, pior prognóstico em relação ao subtipo A. Outro

subtipo corresponde aos casos que apresentam HER2 amplificado com baixa expressão dos receptores hormonais (RE-/RP-/HER2+), representando aproximadamente 20% dos tumores invasivos de mama e caracterizados por apresentar baixa sobrevida e pior prognóstico em relação ao subtipo luminal (BRENTON; CAREY; AHMED; CALDAS, 2005; RUSSNES; LINGJAERDE; BORRESEN-DALE; CALDAS, 2017; SCHNITT, 2010). O subtipo triplo-negativo corresponde a cerca de 15% dos casos diagnosticados de câncer de mama e apresentam como característica um pior prognóstico em relação aos subtipos luminais e HER2, um aumento no tamanho do tumor, elevada agressividade e maiores taxas de recorrência. A ausência de receptores hormonais e de amplificação de HER2 impede que os tratamentos convencionais para o câncer de mama sejam eficientes para este subtipo do tumor e, por isso, as principais estratégias terapêuticas para estes tumores são o uso de quimioterapia, radioterapia e cirurgia (ABRAMSON; LEHMANN; BALLINGER; PIETENPOL, 2015; LEHMANN; JOVANOVIC; CHEN; ESTRADA *et al.*, 2016).

1.3.1 Diagnóstico e tratamento do câncer de mama

A detecção do câncer de mama envolve o diagnóstico precoce que utiliza a abordagem de pessoas com sinais ou sintomas iniciais da doença e o rastreamento, que consiste na aplicação de teste ou exame numa população sem sinais e sintomas de câncer de mama (BRASIL, 2020d). Segundo a Sociedade Brasileira de Mastologia a recomendação é de que se inicie o rastreamento através da realização de mamografia a partir dos 40 anos de idade e com frequência anual na tentativa de se fazer o diagnóstico precoce da doença. Já o Ministério da Saúde recomenda a mamografia de rotina para as mulheres de 50 a 69 anos uma vez a cada 2 anos, com potenciais benefícios de melhor prognóstico da doença, tratamento mais efetivo e menor morbidade associada. A ultrassonografia e ressonância magnética também são utilizados no rastreamento, porém não são indicados para a população em geral. Após a observação do tumor, deve ser realizada a biopsia para o diagnóstico final, que pode ser realizada através de punção aspirativa por agulha fina, biopsia de agulha grossa ou biopsia cirúrgica. Além dos métodos de imagem também é recomendado o exame clínico das mamas, que deve ser efetuado por profissional qualificado e com frequência anual a partir dos 35 anos de idade (ACS, 2020b; BRASIL, 2020d; URBAN; CHALA; BAUAB; SCHAEFER *et al.*, 2017). Os pacientes devem realizar também com frequência a palpação das mamas para familiarização dos aspectos normais e identificação precoce de eventuais alterações (BRASIL, 2020d).

O tratamento do câncer de mama é multidisciplinar e depende da fase em que a doença se encontra e do tipo do tumor. O tratamento local envolve cirurgia e radioterapia, já o tratamento sistêmico é feito por hormonioterapia, terapia biológica e quimioterapia. A cirurgia pode ser conservadora, quando é retirado apenas o tumor, ou pode haver a mastectomia total/parcial que envolve a retirada do tecido mamário, muscular e gânglios linfáticos axilares. Já a radioterapia utiliza doses controladas de radiação e geralmente é administrada após a cirurgia a fim de eliminar as células tumorais remanescentes. As principais modalidades de tratamento sistêmico são a paliativa, em caso de metástases; adjuvante, quando a terapia ocorre após a cirurgia e a neoadjuvante, quando a terapia é utilizada antes da cirurgia com objetivo de reduzir o volume tumoral (BRASIL, 2020a; NHS, 2019).

A quimioterapia pode ser uma terapia única ou uma combinação de fármacos que atuam inibindo o crescimento e a proliferação das células tumorais. Os agentes quimioterápicos amplamente utilizados no tratamento do câncer de mama em estágio inicial e avançado incluem as antraciclinas (doxorrubicina e epirrubicina) e os taxanos (paclitaxel e docetaxel) (BRAUNSTEIN; LIAO; LYTTLE; LOBO *et al.*, 2016). O mecanismo de ação das antraciclinas está relacionado à inibição da topoisomerase II, devido à intercalação da droga entre os pares de bases adjacentes do DNA, e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) resultando em apoptose. Os taxanos têm como principal mecanismo de ação a inibição da mitose, pois se ligam aos microtúbulos estabilizando-os, promovendo a parada do ciclo celular e apoptose (MORENO-ASPITIA; PEREZ, 2009).

O esquema quimioterápico padrão para o câncer de mama é baseado na combinação de antraciclina e ciclofosfamida seguida de taxanos. Para o subtipo HER2 é aplicado ainda a terapia alvo com trastuzumabe, pertuzumabe, entre outros. Já para os tumores triplo negativos, a adição de compostos de platina (por exemplo, a carboplatina) ao regime padrão tem aumentado a eficácia do tratamento (BARTSCH; BERGEN; GALID, 2018).

Uma característica comum da maioria dos quimioterápicos é a resistência celular, ou seja, as células tumorais podem se tornar resistentes ao tratamento. Os pacientes podem desenvolver resistência à quimioterapia ou hormonioterapia, sendo que mais de 30% das mulheres com doença metastática não respondem à primeira linha de quimioterapia baseada em antraciclinas e taxanos, apresentando progressão da doença em intervalo inferior a um ano (MASOOD, 2016). Além disso, os quimioterápicos atuam sobre todas as células em rápida divisão, tanto tumorais quanto normais, o que leva aos efeitos adversos do tratamento, tais como a perda de cabelo, náuseas, vômitos, fadiga, perda de apetite, infecções, entre outros. Esses efeitos podem ser tratados sintomaticamente, mas em alguns casos, podem ser tóxicos para

pacientes em estágios avançados da doença (VIDAL; RODRIGUEZ-BRAVO; GALSKEY; CORDON-CARDO *et al.*, 2014).

1.4 Complexos inorgânicos a base de metais no tratamento do câncer

O potencial de agentes antitumorais a base de metais passou a ser explorado após a descoberta da atividade biológica da cis-diaminodicloroplatina (II), conhecida como cisplatina. A introdução da cisplatina para o tratamento clínico do câncer resultou em melhorias significativas nas repostas de diferentes tumores, tais como de ovário e testículo. A cisplatina é um dos agentes mais eficazes no tratamento de câncer testicular, no qual a taxa de cura total é de 90% (MONNERET, 2011). O mecanismo de ação da cisplatina é baseado na sua ligação covalente com o DNA, através da formação de adutos, originando ligações intra e intercadeias, que levam a alterações estruturais no DNA. Essas alterações inibem a transcrição e a replicação do DNA, levando a morte celular (DASARI; TCHOUNWOU, 2014; PIZARRO; SADLER, 2009). Apesar da eficiência da cisplatina no tratamento de diversos tumores, seus efeitos colaterais como ototoxicidade, neurotoxicidade e nefrotoxicidade representam uma grande limitação para sua utilização. Outro grande problema enfrentado é a resistência adquirida, observada depois de 4 a 6 ciclos de tratamento (CHEN; CHANG, 2019; FLOREA; BUSSELBERG, 2011; MILLER; TADAGAVADI; RAMESH; REEVES, 2010).

Nas últimas décadas, a cisplatina passou por diversas modificações em sua estrutura com a finalidade de se obter compostos que pudessem diminuir seus efeitos adversos. Muitos análogos à cisplatina foram sintetizados e avaliados, no entanto apenas a carboplatina e oxaliplatina foram aprovados, juntamente com a cisplatina, para o uso mundial no tratamento do câncer (HARTINGER; ZORBAS-SEIFRIED; JAKUPEC; KYNAST *et al.*, 2006). Estima-se que 50% dos pacientes com câncer serão tratados com a cisplatina, confirmando sua importância e de seus análogos. Tamanha utilização e efetividade encorajaram a busca por novos compostos para o tratamento de diferentes tipos de câncer, empregando também outros tipos de metais (CHEN; CHANG, 2019). Neste sentido, vários pesquisadores têm direcionado suas pesquisas para complexos contendo outros metais de transição (paládio, cobre, ouro, gálio, rutênio, entre outros), com o objetivo de encontrar novos fármacos antitumorais mais seletivos e com menos efeitos adversos.

1.4.1 Complexos de Rutênio como potenciais quimioterápicos

O interesse em avaliar o potencial antitumoral de complexos de rutênio surgiu na década de 80 e desde então esses complexos metálicos vêm sendo sintetizados e testados em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (LI; IP; MAN; SONG *et al.*, 2017; PIZARRO; SADLER, 2009; POPOLIN; COMINETTI, 2017). Os complexos de rutênio apresentam baixa toxicidade sistêmica quando comparado aos compostos de platina, e isso pode estar relacionado à habilidade desses complexos de se acumular especificamente em tecidos tumorais. Complexos de rutênio (III) podem atuar como pró-fármacos, ou seja, podem ser facilmente reduzidos e assim ativados seletivamente em ambientes de hipóxia e pH levemente ácido encontrados nos tecidos tumorais, o que favorece a redução do estado de oxidação do rutênio (III) para rutênio (II) nessas células (BERGAMO; GAIDDON; SCHELLENS; BEIJNEN *et al.*, 2012). Além da ativação por redução, os complexos de rutênio apresentam algumas propriedades químicas que contribuem para seu potencial antitumoral como a geometria octaédrica, que oferece possibilidades ao ligar-se a ácidos nucleicos, a cinética de substituição de ligantes e a habilidade de mimetizar o ferro na ligação com biomoléculas. A albumina e transferrina são proteínas utilizadas pelo organismo humano para solubilizar e transportar o ferro, reduzindo assim a sua toxicidade. 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 (ALLARDYCE, 2001; FISCHER; HEFFETER; KRYEZIU; GILLE *et al.*, 2014; NAVES; GRAMINHA; VEGAS; LUNA-DULCEY *et al.*, 2019).

O primeiro complexo de rutênio com potencial antitumoral a entrar em fase de testes clínicos foi o fármaco *Imidazolium-trans-dimethylsulfoxide-imidazoletetrachlororuthenate* (NAMI-A). Os estudos mostraram que o NAMI-A é capaz de inibir o crescimento de tumores metastáticos em vários tipos de cânceres de pulmão. O mecanismo de ação do NAMI-A envolve a parada do ciclo celular na fase G2M, inibição de MMPs, além de se ligar a ácidos nucleicos, inibindo a replicação do DNA. Nos estudos clínicos de fase II, o NAMI-A foi associado a um quimioterápico utilizado na clínica, a gencitabina, para o tratamento de pacientes com câncer de pulmão, contudo a combinação foi menos eficaz que o uso isolado da gentabicina e os estudos foram interrompidos (ALESSIO; MESSORI, 2019).

O fármaco *Indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)]* (KP1019) com potencial citotóxico para o tratamento de cânceres colorretais resistentes à platina entrou em estudos de fase I, porém devido a sua baixa solubilidade, os ensaios clínicos continuaram com o complexo KP1339 (análogo ao KP1019), diferenciado apenas pela presença do contra

ion de sódio que aumentou consideravelmente a solubilidade do complexo. O mecanismo de ação proposto para o complexo KP1019/KP1339 envolve seu transporte pela transferrina, indução de apoptose via processos mitocondriais e ligação direta com o DNA. Nos ensaios clínicos com o complexo KP1339 foram obtidos resultados satisfatórios como baixa toxicidade hematológica e ausência de neurotoxicidade em diferentes tipos de tumores (ALESSIO; MESSORI, 2018; THOTA *et al.*, 2018).

Portanto, acredita-se que os complexos de rutênio apresentam boas perspectivas para obtenção de potenciais fármacos com atividades antitumorais e a facilidade de modificações estruturais através de reações planejadas pode favorecer o desenvolvimento de complexos estáveis e mais ativos.

1.5 Produtos naturais como ligantes

Os compostos de fontes naturais há muito tempo são utilizados no tratamento de várias doenças. A maioria dos medicamentos encontrados no mercado deriva direta ou indiretamente de vegetais, microrganismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres. Cerca de 60% dos fármacos antitumorais introduzidos na terapêutica nas últimas décadas são de origem natural (CRAGG; NEWMAN, 2013).

O ácido salicílico é um derivado da salicina, substância originalmente isolada da casca do salgueiro branco (*Salix alba*). O ácido salicílico teve suas atividades comprovadas como um excelente anti-inflamatório, analgésico e antitérmico, porém, devido às irritações e danos causados na boca, esôfago e estômago, a indústria farmacêutica buscou um derivado de eficácia comparável ou superior e que trouxesse menos efeitos adversos. Então, através da acetilação do grupo hidroxila do anel benzênico do ácido salicílico, originou-se o ácido acetilsalicílico (Aspirina®) (VANE; BOTTING, 2003). A Aspirina® é o fármaco mais popular no mundo no combate a dor, além disso, a cada ano surgem mais indicações terapêuticas para este fármaco como um fator protetor de câncer colorretal e câncer de mama e no seu tratamento, diminuindo os riscos de metástase e aumentando a sobrevivência de pacientes (CHEN; HOLMES, 2017; GRANCHER; MICHEL; DI FIORE; SEFRIQUI, 2018).

Sabendo que a complexação de ligantes bioativos com íons metálicos pode potencializar e aumentar o campo de atuação destes compostos, neste trabalho pretendeu-se unir o potencial biológico que os complexos de rutênio vêm apresentando juntamente com as características do ligante ácido salicílico e derivados com o objetivo de obter compostos com maior seletividade e citotoxicidade para as linhagens tumorais de mama.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi selecionar dentre seis diferentes moléculas um novo complexo de rutênio com características de candidato a fármaco antitumoral e avaliar seus efeitos *in vitro* em células de mama e *in vivo* em modelo de câncer de mama em camundongo.

2.2 Objetivos específicos

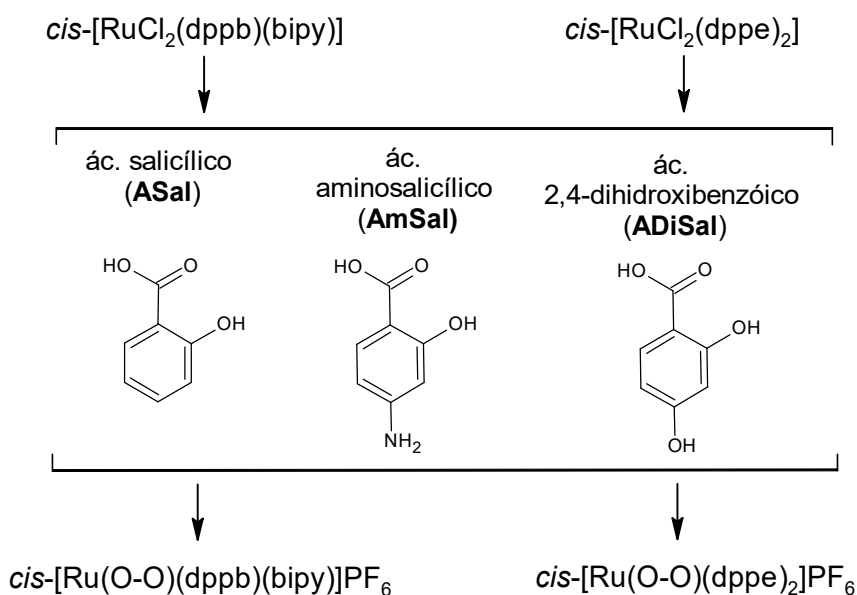
- Avaliar seis complexos de rutênio quanto à citotoxicidade em células da linhagem não tumoral de mama, MCF-10A, e das linhagens tumorais de mama MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 e selecionar o complexo mais seletivo *in vitro*;
- Avaliar o efeito do complexo selecionado em induzir a apoptose e em inibir os passos da cascata metastática nas células da linhagem para o qual o complexo foi mais seletivo;
- Avaliar o efeito citotóxico do complexo selecionado incorporado em microemulsão em células da linhagem tumoral de mama de camundongo 4T1.13ch5T1 e não tumoral L929.
- Avaliar a capacidade do complexo selecionado incorporado em microemulsão em inibir o crescimento do tumor primário e a formação de metástases em modelos de câncer de mama espontâneo e experimental;
- Avaliar a toxicidade do tratamento *in vivo* do complexo selecionado incorporado em microemulsão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Complexos de rutênio

A síntese e caracterização dos complexos de rutênio utilizados neste trabalho foram realizadas pelo Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERCI) do Departamento de Química (DQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sob responsabilidade do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista e Dra. Angélica Ellen Graminha. Os complexos de rutênio II com ácido salicílico e derivados foram sintetizados a partir do *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] e *cis*-[RuCl₂(dppe)₂] com reação ocorrendo pela substituição dos íons cloretos pela coordenação do íon carboxilato do ligante, produzindo complexos com a fórmula geral [Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(O-O)(dppe)₂]PF₆, em que (O-O) representa os ligantes ácido salicílico, ácido aminosalicílico e 2,4 – dihidroxibenzóico (Figura 6). Os complexos de rutênio sintetizados foram: [Ru(ASal)(dppb)(bipy)]PF₆ (**1**), [Ru(AmSal)(dppb)(bipy)]PF₆ (**2**), [Ru(AdiSal)(dppb)(bipy)₂]PF₆ (**3**), [Ru(ASal)(dppe)₂]PF₆ (**4**), [Ru(AmSal)(dppe)₂]PF₆ (**5**) e [Ru(AdiSal)(dppe)₂]PF₆ (**6**).

Figura 6 - Representação da síntese dos complexos [Ru(O-O)(dppb)(bipy)]PF₆ e [Ru(O-O)(dppe)₂]PF₆.



3.1.1 Diluição dos complexos de rutênio

Para os ensaios *in vitro* os complexos foram solubilizados em Dimetil Sulfóxido (DMSO) 100%. As concentrações utilizadas nos ensaios foram preparadas em meio de cultura adequado com a concentração final de DMSO de 0,1% em cada amostra.

3.2 Linhagens celulares e padronização do cultivo *in vitro*

Durante o desenvolvimento deste estudo foram utilizadas diversas linhagens de câncer de mama e de células não tumorais presentes no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) da UFSCar. As células das linhagens tumorais de mama MDA-MB-231, MCF-7 e SK-BR-3 foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). Já a linhagem não tumoral de mama MCF-10A e a linhagem tumoral de mama de camundongo 4T1.13ch5T1 foram obtidas do Laboratório de Metástase do Hospital *Peter MacCallum*, Melbourne - Austrália. As células da linhagem triplo negativa MDA-MB-231 foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e L-glutamina (2mM). As células tumorais de mama humana das linhagens MCF-7 e SK-BR-3 foram cultivadas em meio de cultura RPMI adicionado de 10% de FBS. As células de mama humana não tumorais da linhagem MCF-10A foram cultivadas em meio DMEM/F12, adicionado de 5% de soro de cavalo, EGF (20 ng/mL), hidrocortisona (0,5 µg/mL), insulina (10 µg/mL final) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). A linhagem 4T1.13ch5T1, isolada de um tumor formado espontaneamente em um camundongo Balb/c, foi cultivada em meio Alpha MEM contendo FBS (5%), bicarbonato de sódio (2,2 mg/mL), cloreto de sódio (4 mg/mL), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL).

As linhagens celulares foram mantidas em incubadora úmida com 5% de CO₂ e a 37°C para serem utilizadas nos ensaios ou cultivadas em garrafas de cultura. As passagens celulares foram realizadas por tripsinização das células, que ocorre por incubação com 1mL de solução de tripsina (2,5mg/mL) em incubadora úmida durante 5 minutos. A reação foi parada com a adição de 1mL de meio de cultura seguida de centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos. As células foram homogeneizadas em meio de cultura e utilizadas para a finalidade desejada.

3.3 Ensaios de citotoxicidade

3.3.1 Ensaio de viabilidade celular – Método do MTT

O efeito citotóxico dos complexos sobre as células tumorais de mama das linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e SK-BR-3 e de células não tumorais de mama da linhagem MCF-10A foi determinado através do uso do reagente MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] conforme descrito por Mosmann com modificações (MOSMANN, 1983). As células (1×10^4 células/ 100 μ L) foram semeadas em meio apropriado em placas de 96 poços estéreis. Estas foram mantidas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas em estufa de cultura de células. No dia seguinte, o meio de cultura foi retirado dos poços e diferentes concentrações dos complexos **(1), (2), (3), (4), (5) e (6)** (0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25, 50 e 100 μ M) foram adicionadas aos poços. As células foram incubadas por 24 e 48 horas nas mesmas condições descritas acima. Após o tempo de incubação, uma solução contendo MTT (1 mg/mL) foi adicionada (100 μ L/poço). As placas foram então mantidas durante 4 horas a 37°C e em seguida, os cristais formados foram diluídos em DMSO (100%). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de placa de ELISA (Labtech LT4000) em comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade das células tratadas foi expressa como porcentagem relativa com relação às células incubadas somente com meio de cultura e o veículo utilizado para solubilizar os complexos (DMSO). A determinação do IC₅₀ (concentração que induz 50% de morte celular) dos complexos foi determinada a partir de uma curva de concentração utilizando o *software* GraphPad. O índice de seletividade (IS) foi calculado como a razão do IC₅₀ (célula não tumoral) / IC₅₀ (célula tumoral).

3.3.2 Ensaio de morfologia celular

O complexo **5** foi escolhido para dar continuidade ao trabalho conforme os resultados apresentados no item **4.1**. A partir de agora o complexo **5** será denominado Ru(Amsal) e para avaliar a capacidade do complexo em modificar a morfologia das células tumorais de mama das linhagens MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 e não tumoral de mama MCF-10A, foram semeadas (1×10^5 células/poço) em placas de 12 poços estéreis. Estas foram mantidas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas em estufa de cultura de células. No dia seguinte, o meio de cultura foi retirado dos poços e as células tratadas com diferentes concentrações (0,7; 1,56 e 3,12 e 6,25 μ M) do complexo. As células foram incubadas por 24 e 48 horas nas mesmas condições

descritas acima e imagens foram capturadas com o auxílio de um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000 – 1.3 MP Live Resolution).

3.3.3 Ensaio de formação de colônias

Para avaliar a capacidade do complexo Ru(AmSal) em inibir a formação e/ou diminuir o tamanho das colônias, as células tumorais de mama MDA-MB-231 foram semeadas (3×10^2 células/2000 μ L poço) em meio apropriado em placas de Petri estéreis de 6 cm e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas em estufa de cultura de células. Após o tempo de incubação, foram adicionadas diferentes concentrações do complexo (0,15; 0,3 e 0,6 μ M) e as células foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente por um período de 3 horas. Em seguida, o meio foi removido, as células lavadas suavemente com tampão fosfato salino (PBS) e foi adicionado meio de cultura apropriado. As células foram novamente incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 10 dias. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com uma solução de metanol e ácido acético (3:1) durante 5 minutos e em seguida, coradas com uma solução de metanol e cristal violeta a 5% por 30 min. As placas foram fotografadas e, em seguida, as colônias foram contadas, e seu tamanho foi medido com auxílio do *software* Image J.

3.4 Ensaios relacionados a apoptose

3.4.1 Ensaio de apoptose com anexina V por citometria de fluxo

A atividade apoptótica do complexo Ru(Amsal) sobre as células MDA-MB-231 e MCF-10A foi analisada por citometria de fluxo utilizando o *kit* PE Annexin V Apoptosis Detection (BD Biosciences). As células foram semeadas (5×10^4 células/100 μ L) em placas de 24 poços estéreis e mantidas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas em estufa de cultura de células. No dia seguinte, o meio de cultura foi retirado dos poços e diferentes concentrações (1,2; 2,4; 4,8; e 9,6) do complexo Ru(Amsal) foram adicionadas aos poços, por 4 horas. Em seguida a placa foi centrifugada a 2000 rpm por 5 min a 4°C, lavadas com PBS e ressuspendidas em 200 μ L de tampão de ligação, proveniente do kit. As células foram incubadas com 5 μ L de 7-amino-actinomicina D (7AAD) e 5 μ L de Ficoeritrina (PE) Anexina V por 15 minutos ao abrigo da luz e após o tempo de incubação foi removido o sobrenadante e adicionado aos poços 300 μ L tampão de ligação. As células foram então removidas dos poços com auxílio de um scraper e

transferidas para os tubos de citometria. As amostras foram analisadas no citômetro BD Accuri C6 e a fluorescência quantificada através do *software* CSampler. A porcentagem de apoptose total foi calculada como a soma das células em apoptose recente (quadrante inferior da direita) e em apoptose tardia (quadrante superior da direita). Como controle positivo de morte celular foi utilizada a camptotecina (32 μ M), um quimioterápico indutor de apoptose (ZENG; ZHANG; LIN; YE *et al.*, 2012).

3.4.2 Ensaio de fragmentação nuclear – marcação com DAPI

Para verificar se o complexo Ru(Amsal) induz a fragmentação nuclear, processo que ocorre durante a apoptose, as células tumorais de mama MDA-MB-231 foram semeadas (1×10^4 /100 μ L) em placas de 96 poços estéreis e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas em estufa de cultura de células. Após a incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações 4,8 e 9,6 μ M do complexo Ru(Amsal) durante 4 horas. Então, as células foram lavadas com PBS e, em seguida, fixadas com metanol durante 10 minutos. Após a fixação, as células foram coradas com 1 μ g/mL de DAPI (4',6- diamidino-2-phenylindole) (*Life Technologies*) diluído em PBS por 10 minutos. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS. As imagens foram capturadas com auxílio do microscópio automatizado ImageXpress® Micro XLS System (*Molecular Device*). Como controle positivo de apoptose foi utilizada a estaurosporina na concentração de 0,5 μ M.

3.4.3 Ensaio de ciclo celular

Para verificar se o complexo Ru(Amsal) é capaz de alterar o ciclo celular, as células da linhagem MDA-MB-231, foram semeadas (5×10^5 /1000 μ L) em placas de 6 poços estéreis e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. Após a incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações 0,3; 0,6; 1,2 e 2,4 μ M do complexo Ru(Amsal) durante 24 horas e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, as células foram coletadas, lavadas 2 vezes com PBS e ressuspensas em etanol 70% gelado. Então, as células foram mantidas a -20°C por 24 horas. Após o período, as células foram centrifugadas e ressuspensas em uma solução de RNase A (0,02 mg/mL) em PBS a 37°C por 30 minutos, e então incubadas com tampão de ligação contendo iodeto de propídio (PI) (10 μ g/mL). Finalmente, a quantidade de DNA foi determinada por citometria de fluxo no citômetro Accuri

C6 (*BD Bioscience*) e os dados e a quantificação das fases foram avaliados com o programa *CSampler*. Para o controle positivo foi utilizada a camptotecina (32 μ M).

3.4.4 Ensaio de *Western Blotting*

As células da linhagem MDA-MB-231 foram semeadas (1x10⁶/2000 μ L) em meio apropriado em placas de Petri estéreis de 6 cm e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas em incubadora de cultura de células. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações 1,2; 2,4, 4,8 e 9,6 μ M do complexo Ru(Amsal) por 4 horas. Após período de incubação, as células foram lisadas utilizando o tampão CellLytic™ M (*Sigma-Aldrich*). As concentrações de proteína dos sobrenadantes foram determinadas utilizando o kit *Pierce BCA Protein Assay* (*Thermo Scientific*). As amostras de proteínas (15 μ g) foram aplicadas em géis pré-fabricados Mini-PROTEAN TGXTM 4-20% PAGE (*BioRad*), transferidas para membranas de nitrocelulose (*BioRad*) e incubadas com os anticorpos anti-Caspase-3, anti-Bax e anti-Bcl-2 (*Abcam*) (1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário apropriado conjugado com HRP (1:5000) (*Abcam*). O GAPDH foi utilizado como controle endógeno. A revelação das bandas foi realizada utilizando o substrato Clarity™ Western ECL (*BioRad*) e foram visualizadas e fotografadas com auxílio do fotodocumentador ChemiDoc MP (*BioRad*).

3.4.5 Ensaio de potencial de membrana mitocondrial

A variação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi avaliada através do kit BD™ MitoScreen, utilizando o corante JC-1 (*BD Bioscience*). As células da linhagem MDA-MB-231 foram semeadas (1x10⁵ células/poço) em placas de 12 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas. Após a incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações (0,6; 1,2; 2,4; 4,8 μ M) do complexo Ru(Amsal) por 4 horas. Após este período, as células foram tripsinizadas e incubadas por 15 minutos com JC-1 (10 μ g/mL) ao abrigo da luz e após o tempo de incubação, lavadas duas vezes com PBS gelado. As células foram então ressuspensas em um volume total de 200 μ L do tampão específico e analisadas no citômetro Accuri C6 (*BD Bioscience*) registrando 10.000 eventos. Na análise da fluorescência de JC-1 através do *software CSampler* são utilizados os canais FL-1 e FL-2 para avaliar a fluorescência nos comprimentos de onda verde e vermelho, respectivamente. A estaurosporina na concentração de 0,5 μ M foi utilizada como controle positivo.

3.5 Ensaio relacionado ao transporte de rutênio e sua interação celular.

3.5.1 Ensaio de Transporte do Ru(Amsal) por transferrina

Para avaliar a influência da transferrina no transporte do complexo Ru(Amsal) para o interior celular foram semeadas 1×10^4 células/100 μL células da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 em placas de 96 poços e as mesmas foram mantidas a 37°C em incubadora umidificada com 5% de CO_2 por 24 horas. Após a incubação, as células foram tratadas com uma concentração fixa de $1,2\mu\text{M}$ do complexo Ru(Amsal) e foram adicionadas concentrações crescentes (0,5 a 75 $\mu\text{g/mL}$ / poço) de transferrina humana (apo-Transferrina, *Sigma-Aldrich*). A porcentagem de células viáveis foi determinada através do uso do reagente MTT. A referência de 100% de viabilidade foi determinada pelas células controle (sem tratamento).

3.6 Ensaios relacionados à cascata metastática

3.6.1 Ensaio de migração celular – Câmara de Boyden

Neste ensaio foram utilizados insertos (BD Biosciences) com poros de $8\mu\text{m}$ em placas de 24 poços. As células da linhagem tumoral de MDA-MB-231 foram então semeadas dentro dos insertos na concentração de $0,5 \times 10^5/350\mu\text{L}$ de meio sem adição de FBS. Às células foram adicionadas as concentrações de 0,15; 0,3 e $0,6\mu\text{M}$ do complexo Ru(Amsal). Nos poços da placa onde foram mergulhados os insertos, foi adicionado $750\mu\text{L}$ de meio de cultura com 10% de FBS, o qual agiu como quimioatraente indutor da migração. No controle positivo foi adicionado FBS para funcionar como quimioatraente e no controle negativo foi adicionado apenas meio de cultura sem FBS. Os controles não receberam tratamento com o complexo. As placas contendo os insertos foram incubadas por 22 horas a 37°C , 5% CO_2 e em seguida, as células que não migraram foram removidas do interior do inserto com auxílio de hastes flexíveis de algodão. As células que penetraram pelos poros e migraram para o outro lado da membrana foram fixadas em metanol (100%) e em seguida coradas com uma solução de azul de toluidina (1%) diluído em borato de sódio (1%) em PBS. As membranas de cada inserto foram removidas, preparadas em lâminas de microscopia e contadas integralmente com o auxílio de um microscópio (*Olema* N-120). Fotos representativas de cada membrana foram feitas com auxílio de uma câmera fotográfica (Moticam 1000 – 1.3MP Live Resolution).

3.6.2 Ensaio de migração - *Wound Healing*

As células MDA-MB-231 foram semeadas (1×10^5 células/1000 μ L) em meio apropriado em placas de 12 poços estéreis. Estas foram mantidas a 37°C e 5% CO₂ até a cultura atingir 100% de confluência. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, uma ponteira de 100 μ L e de uma régua, uma risca foi feita no centro de cada poço. Cuidadosamente, cada poço foi lavado com PBS para remover fragmentos celulares e células desaderidas da área riscada. Então, as células foram tratadas com diferentes concentrações (0,15; 0,3 e 0,6 μ M) do complexo Ru(Amsal). Imagens foram capturadas nos tempos de 0 e 24 horas com auxílio de um microscópio invertido (*Nikon Eclipse TS100*) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000 – 1.3 MP Live Resolution).

3.6.3 Ensaio de invasão celular

Para o ensaio de invasão celular foram utilizados insertos do kit *BioCoat Matrigel Invasion Chambers* (BD Biosciences), cuja parte interna possui uma fina camada de Matrigel®, material que simula a matriz extracelular e poros 8 μ m. Os insertos foram previamente hidratados com meio DMEM sem adição de FBS por 2 horas em ambiente úmido a 37°C. Posteriormente, as células MDA-MB-231 (5×10^4 /350 μ L) foram semeadas na câmara superior dos insertos em meio sem FBS e em diferentes concentrações (0,15; 0,3 e 0,6 μ M) do complexo Ru(Amsal). O meio DMEM suplementado com 10% de FBS foi adicionado aos poços da placa onde foram mergulhados os insertos. O FBS atua como quimioatraente para invasão das células tumorais. O controle positivo foi feito sem adição do complexo e com adição do FBS (quimioatraente) e o controle o negativo foi realizado sem adição do complexo e sem adição de FBS. As placas foram mantidas em incubadora úmida com 5% de CO₂ a 37°C por 22 horas. Em seguida, as células que não invadiram pela matrigel no interior do inserto foram removidas com o auxílio de hastes flexíveis de algodão. As células que foram capazes de invadir através da camada de matrigel, atingindo o outro lado da membrana do inserto, foram fixadas com metanol por 5 minutos e coradas com solução de 1% de azul de toluidina. As membranas de cada inserto foram removidas, preparadas em lâminas de microscopia e contadas integralmente com o auxílio de um microscópio (Oleman N-120). Fotos representativas de cada membrana foram retiradas com auxílio de uma câmera fotográfica (Moticam 1000 – 1.3MP Live Resolution).

3.6.4 Zimografia

A técnica de zimografia é utilizada para verificar a presença de MMPs em gel de poliacrilamida a 10% com adição de gelatina. Células da linhagem MDA-MB-231 (1×10^5 /poço) foram plaqueadas em placas de 12 poços e incubadas em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C até a cultura atingir 100% de confluência. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta e ponteira de 100µL, além de uma régua esterilizada, foi feita uma risca vertical no centro de cada poço. Imediatamente as células foram tratadas com as concentrações de 0,15; 0,3 e 0,6µM do complexo Ru(Amsal) em meio sem soro e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 22 horas. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi removido e centrifugado a 1000rpm para a remoção de possíveis células ou restos celulares. Com auxílio do kit BCA® (*Thermo*) foi realizada a quantificação e 30µg de proteína foram aplicados em gel de SDS-PAGE 10%. A corrida de eletroforese foi realizada a 70mV em cuba de eletroforese (*BioRad*) na geladeira. Ao fim da corrida o gel foi lavado duas vezes por 20 minutos em solução de lavagem contendo 2,5% Triton-X e em seguida incubado por 22 horas em tampão de incubação (50mM tris, 5mM CaCl₂, 0,02% NaN₃ e 10mM ZnCl₂) a 37°C. Após a incubação o gel foi corado com corante *comassie blue* e em seguida utilizou-se solução descorante (10% ácido acético, 40% metanol e 80% água) para visualização das bandas. Uma imagem do gel foi registrada com o auxílio do aparelho ChemiDoc (*BioRad*) e a quantificação das bandas foi realizada com o *software* Image Lab.

3.6.5 Ensaio de adesão celular

Para o ensaio de adesão celular foram utilizadas placas de 96 poços com *coating* de colágeno tipo I (10 µg/poço) diluído em ácido acético (0,1%) *overnight* a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com tampão de adesão (tampão HEPES 20mM pH 7,35 com 1mM de MnCl₂, 1mM de MgSO₄, 5mM de KCl e 150mM de NaCl) contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA) por 1 hora e então, os poços foram lavados com 100µL de tampão de adesão. As células MDA-MB-231 (5×10^4 /300 µL) foram incubadas por 30 minutos com diferentes concentrações (0,6; 1,2; 2,4 e 4,8µM) do complexo Ru(Amsal), em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C e então semeadas nas placas e incubadas nas mesmas condições por mais 1 hora. Em seguida, as células não aderidas foram removidas cuidadosamente através de lavagem e as células aderidas fixadas com 100µL de etanol 70% por 10 minutos e coradas com cristal violeta 0,5% por 20 minutos. O excesso de corante foi removido por lavagem com PBS. As células coradas foram diluídas em 100µL de solução de 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), por 30

minutos e foi realizada a leitura das placas em leitor de ELISA (Labtech LT4000) com 540 nm de comprimento de onda.

3.6.6 Ensaio de marcação do citoesqueleto com a faloidina

Para verificar os efeitos do complexo Ru(Amsal) sobre a organização do citoesqueleto em células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231, foi utilizado o marcador Alexa Fluor® 488 Phalloidin (Life Technologies) específico para fibras F-actina. As células da linhagem MDA-MB-231 foram plaqueadas (5×10^4 células/100 μ L) em placas de 96 poços, estéreis, de cor preta, e mantidas a 37°C em incubadora umidificada com 5% de CO₂ por 24 horas. No dia seguinte, as células foram tratadas com diferentes concentrações (2,4; 4,8 e 9,6 μ M) do complexo Ru(Amsal) e incubadas por 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS durante 30 minutos e depois permeabilizadas com Triton-X 100 a 0,1% em PBS durante 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram bloqueadas com BSA a 2% durante 30 minutos, com posterior adição de Alexa Fluor® 488 Phalloidin durante 20 minutos. Em seguida as células foram coradas com 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (Life Technologies) durante 4 minutos e lavadas três vezes com PBS. As imagens foram obtidas com a ajuda do microscópio automatizado ImageXpress® Micro XLS System (Molecular Devices).

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism versão 6.0. Foram calculados a média e o desvio padrão e em seguida foi realizada análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnet para determinar se os resultados foram estatisticamente diferentes em relação aos controles.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito dos complexos de rutênio sobre a citotoxicidade e alterações na morfologia celular

O ensaio de citotoxicidade auxilia na análise de células metabolicamente ativas em uma cultura celular, a fim de avaliar sua atividade qualitativa e quantitativamente. Ensaio de viabilidade celular são frequentemente usados para triagem de moléculas que possuem efeitos na proliferação celular ou efeitos tóxicos que eventualmente podem levar a morte celular. É importante destacar algumas vantagens de ensaios *in vitro* como a redução na utilização de animais de experimentação, são rápidos, reprodutíveis e financeiramente acessíveis (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016; STODDART, 2011).

Este estudo avaliou o potencial biológico de seis complexos de rutênio II contendo ácido salicílico e derivados, no qual, três complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ apresentam uma bipyridina e uma bifosfina (dppb) coordenada e três complexos do tipo $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ apresentam duas bifosfinas (dppe), ambos os grupos com ligantes ácido salicílico, aminosalicílico e 2,4-dihidroxibenzóico. A citotoxicidade dos complexos, foi avaliada em células das linhagens tumorais de mama MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 (linhagem triplo negativa, luminal A e HER2 positiva, respectivamente) e não tumoral de mama MCF-10A em 24 e 48 horas (Tabela 2 e Tabela 3).

Os resultados demonstraram que o efeito citotóxico dos complexos foi diversificado entre as linhagens testadas. Os complexos (1), (2) e (3) contendo bipyridina e bifosfina $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, exibiram maiores valores de IC_{50} para as linhagens tumorais de mama e baixos índices de seletividade (IS), quando comparados com os complexos (4), (5) e (6) contendo duas bifosfinas $[\text{Ru}(\text{O}-\text{O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ em 24 e 48 horas. O complexo (5) demonstrou ser o mais eficaz entre os seis complexos testados, exibindo o maior IS para a linhagem MDA-MB-231 com valores de 1,72 e 40,8 em 24 e 48 horas, respectivamente. O complexo (5) também apresentou menor IC_{50} para a linhagem triplo negativa MDA-MB-231 de $3,68 \pm 0,15 \mu\text{M}$ em 24 horas e $0,15 \pm 0,004 \mu\text{M}$ em 48 horas. Sobre a linhagem não tumoral de mama MCF-10A, o complexo (5) em 48 horas apresentou uma menor citotoxicidade em relação as linhagens tumorais, com IC_{50} de $6,12 \mu\text{M}$, o que indica uma possível seletividade citotóxica para as células tumorais. O complexo (5) encontra-se coordenado a duas bifosfinas (dppe) e ao ligante ácido aminosalicílico. De acordo com a literatura, as bifosfinas são responsáveis por aumentar a estabilidade dos complexos de rutênio, devido ao seu efeito do anel quelato, além disso, também

possuem atividade citotóxica (PRABHAKARAN; KALAIVANI; POORNIMA; DALLEMER *et al.*, 2012). Estudos anteriores também demonstraram que a presença do ligante bifosfina dppe em complexos de rutênio pode aumentar a citotoxicidade e especificidade de tais complexos, quando comparado a outras bifosfinas, como dppb e dppf (GRAMINHA, 2015; PEREIRA FDE; LIMA; DE LIMA; PIRES *et al.*, 2015). Já em relação ao ligante ácido aminosalicílico, ele possui um fenol livre em sua estrutura após a coordenação, que pode conferir ao complexo potencial antioxidante (RASINES-PEREA; TEISSEDRE, 2017). Assim, o potencial biológico antitumoral que os complexos de rutênio apresentam, juntamente com as características do ligante, podem ter contribuído para que o complexo (5) utilizado neste estudo apresentasse citotoxicidade em todas as linhagens tumorais testadas, com alto IS, principalmente em 48 horas.

Tabela 2 - Atividade citotóxica dos complexos de rutênio em células tumorais de mama MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR-3 e de mama não tumoral MCF-10A após 24 horas de incubação. O experimento foi realizado em triplicata. DP = desvio padrão. *IS = Índice de seletividade dos complexos.

IC ₅₀ (μM) ± DP 24 horas					
Complexo	MDA-MB-231	MCF-7	SK-BR-3	MCF-10A	*IS
1	7,75 ± 0,87	31,65 ± 1,96	>50	7,4 ± 0,57	0,95
2	16,72 ± 1,04	57,72 ± 0,58	>50	11,91 ± 1,01	0,71
3	16,94 ± 1,52	>50	>50	13,42 ± 1,6	0,79
4	4,44 ± 0,85	4,39 ± 0,12	3,1 ± 0,3	5,44 ± 1,03	1,22
5	3,68 ± 0,15	12,31 ± 0,53	3,44 ± 0,05	6,35 ± 0,49	1,72
6	4,08 ± 0,13	8,39 ± 0,74	4,96 ± 0,16	6,88 ± 0,08	1,68

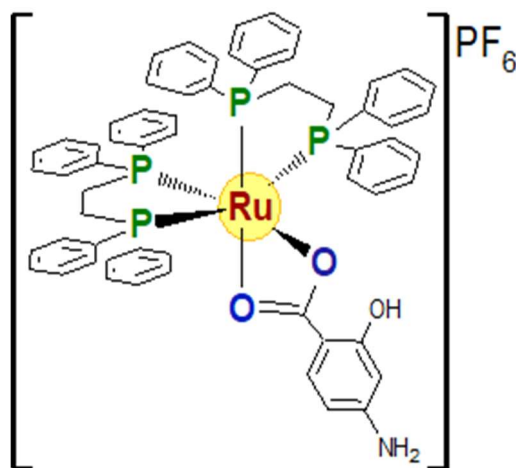
Tabela 3 - Atividade citotóxica dos complexos de rutênio em células tumorais de mama MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR-3 e de mama não tumoral MCF-10A após 48 horas de incubação. O experimento foi realizado em triplicata. DP = desvio padrão. *IS = Índice de seletividade dos complexos.

IC ₅₀ (μM) ± DP 48 horas					
Complexo	MDA-MB-231	MCF-7	SK-BR-3	MCF-10A	IS
1	4,81 ± 0,57	9,53 ± 1,83	11,51 ± 0,84	7,5 ± 0,96	1,55
2	6,03 ± 0,77	29,63 ± 0,67	>50	15,39 ± 0,93	2,55
3	8,53 ± 0,88	16,15	>50	10,68 ± 1,22	1,25
4	0,35 ± 0,01	3,46 ± 0,04	0,79 ± 0,1,53	3,45 ± 0,84	9,85
5	0,15 ± 0,004	3,21 ± 1,35	1,71 ± 0,57	6,12 ± 0,21	40,8
6	3,54 ± 0,64	8,43 ± 0,53	3,81 ± 1,74	4,42 ± 0,63	1,24

Em concordância com os nossos resultados, um trabalho realizado pelo nosso grupo demonstrou que o complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{GA})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ - $\text{Ru}(\text{GA})$ foi mais citotóxico para a linhagem tumoral de mama triplo negativa MDA-MB-231 com IC_{50} de $0,81\mu\text{M}$, em comparação com a linhagem não tumoral de mama MCF-10A ($5,82\mu\text{M}$) em 48 horas, com IS de 7,18 (NAVES; GRAMINHA; VEGAS; LUNA-DULCEY *et al.*, 2019). Iida e colaboradores, descreveram que o complexo $[\text{Ru}(\eta^6\text{-areno})(\text{N}-\text{N})\text{Cl}]^+$ com ligante o-PDA apresentou um IC_{50} de $50\mu\text{M}$ em 48 horas para as linhagens tumorais de mama SK-BR-3 e MCF-7 e de $83\mu\text{M}$ para a linhagem triplo negativa MDA-MB-231. Já para a linhagem não tumoral MCF-10A, o complexo apresentou um $\text{IC}_{50} > 260\mu\text{M}$, corroborando com os resultados deste trabalho (IIDA; BELL-LONCELLA; PURAZO; LU *et al.*, 2016).

De acordo com os resultados apresentados, o complexo (5), a partir de agora denominado $\text{Ru}(\text{Amsal})$ (Figura 7) foi escolhido para dar continuidade ao trabalho devido a sua capacidade de atuar em células tumorais de mama triplo negativo, que são altamente agressivas e metastáticas, com eficiência e seletividade maiores em relação a linhagem não tumoral.

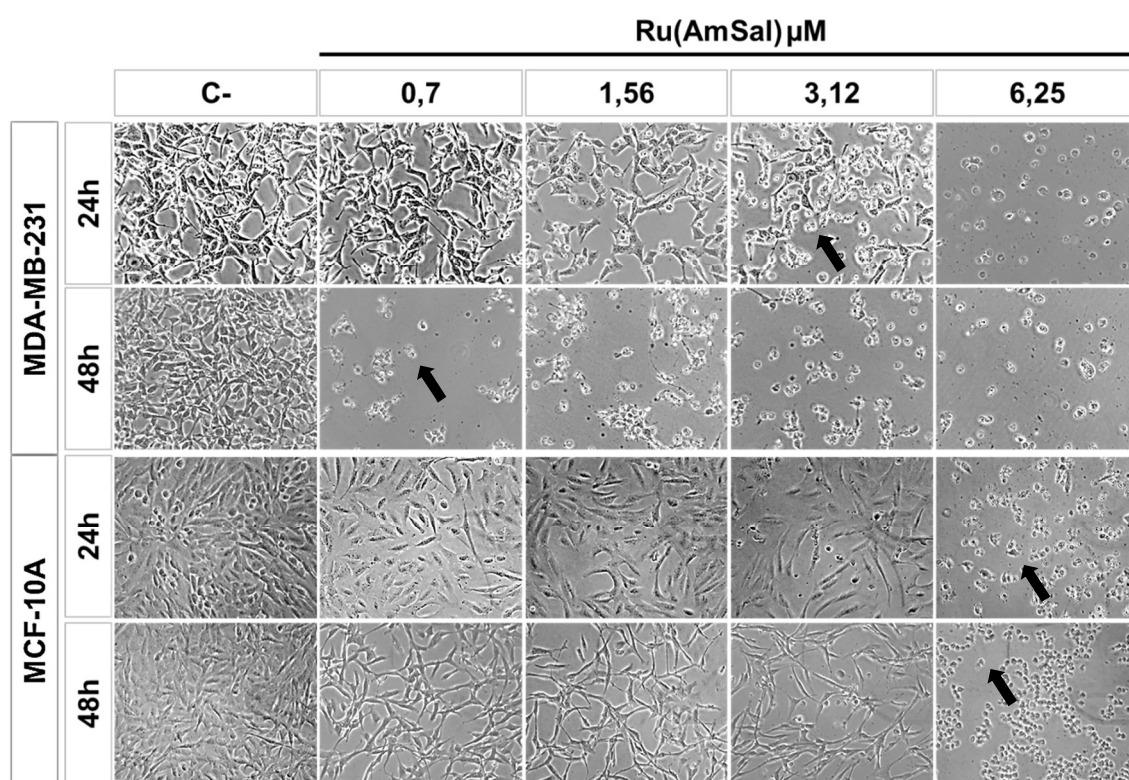
Figura 7 - Estrutura molecular do complexo $\text{Ru}(\text{Amsal})$



O ensaio de morfologia celular foi realizado para avaliar qualitativamente o efeito do complexo de rutênio $\text{Ru}(\text{Amsal})$ sobre as linhagens tumorais de mama MCF7, SK-BR-3, MDA-MB-231 e não tumoral de mama MCF-10A. Esse ensaio foi realizado para, juntamente ao ensaio de citotoxicidade, ser utilizado como parâmetro para os experimentos posteriores. O tratamento com o complexo foi capaz de alterar a morfologia das células MDA-MB-231 em 24 horas a partir da concentração de $3,12\mu\text{M}$. No tempo de 48 horas na menor concentração testada

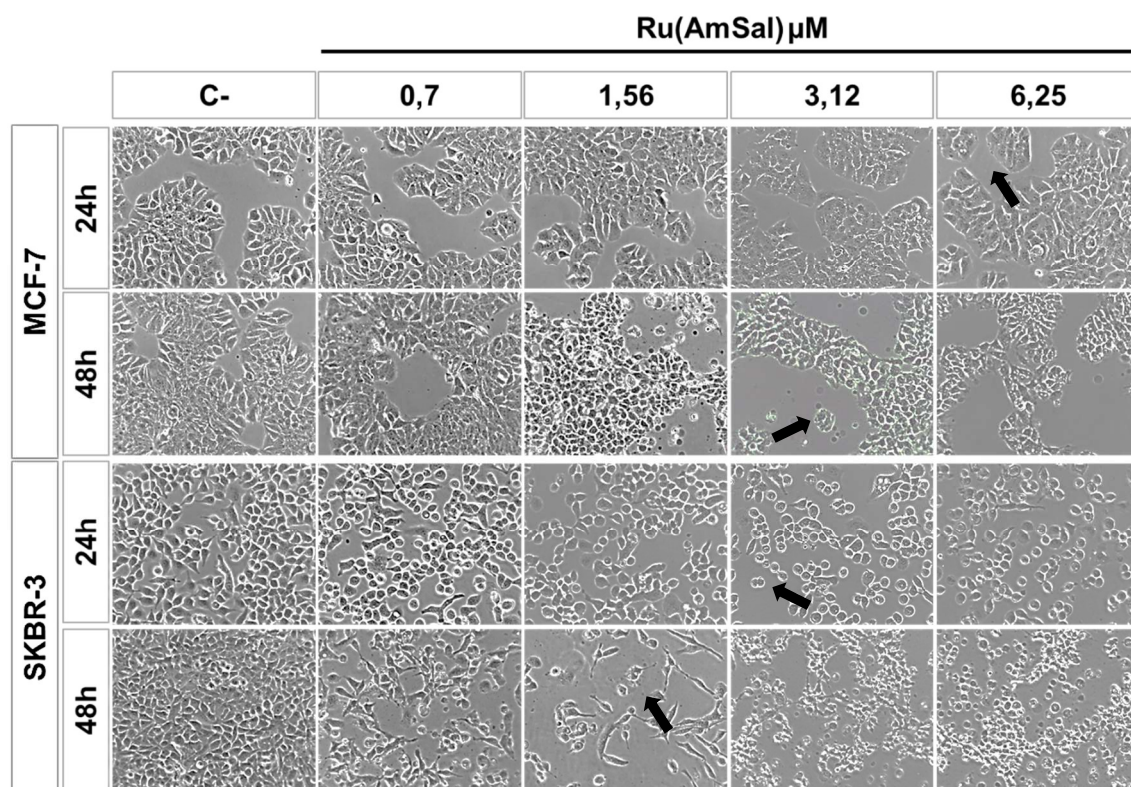
(0,7 μ M), foi observada uma diminuição da densidade celular, formação de estruturas circulares e encolhimento celular, indicando uma provável morte (Figura 8). Por outro lado, as células não tumorais de mama MCF-10A só apresentaram morfologia alterada quando tratadas com 6,25 μ M do complexo Ru(Amsal) nos tempo de 24 e 48 horas, sendo possível observar as células em formatos circulares e parcialmente desaderidas (Figura 8).

Figura 8 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) na morfologia das células da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 e não tumoral de mama MCF-10A. O experimento foi realizado em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas representativas de cada linhagem celular e as setas representam as alterações morfológicas promovidas pelo complexo Ru(Amsal).



O complexo Ru(Amsal) apenas alterou levemente a morfologia das células da linhagem MCF-7 na concentração de 6,25 μ M após 24 horas, porém, no tempo de 48 horas é possível notar na concentração de 3,12 μ M uma diminuição da densidade celular e estruturas circulares. As células da linhagem SK-BR-3 quando tratadas com o complexo Ru(Amsal) apresentaram leves alterações morfológicas na concentração de 3,12 μ M em 24 horas, já na concentração de 1,56 μ M em 48 horas, é possível observar uma diminuição da densidade celular e formação de estruturas circulares parcialmente desaderidas (Figura 9).

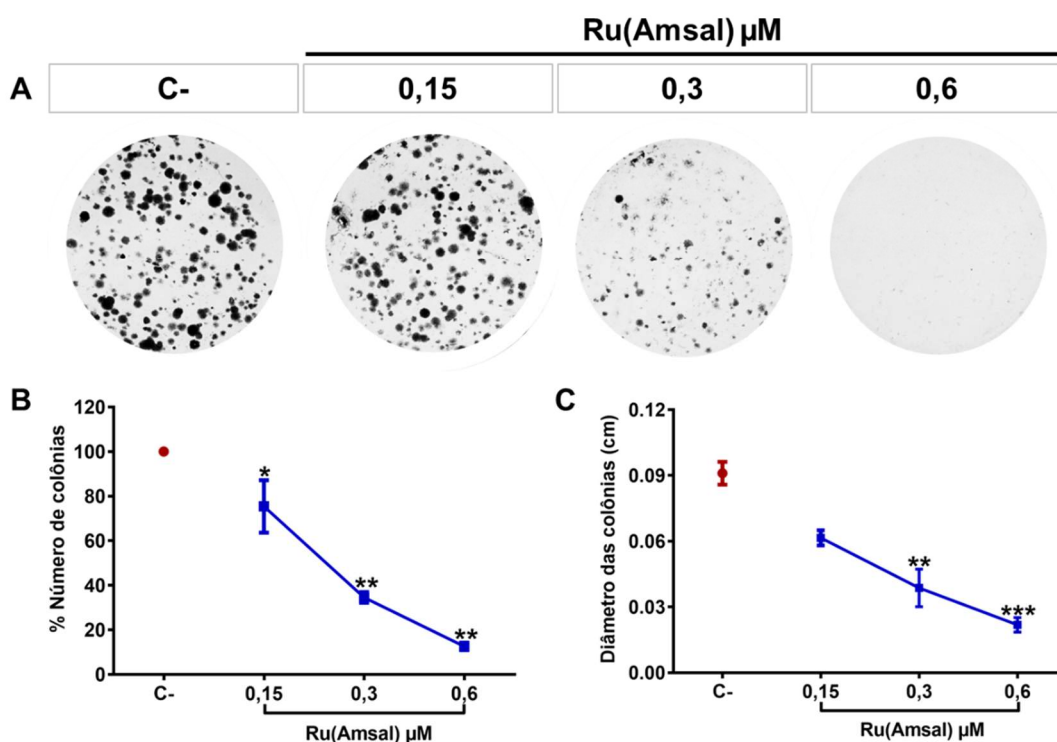
Figura 9 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) na morfologia das células da linhagens tumorais de mama MCF-7 e SK-BR-3. O experimento foi realizado em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas representativas de cada linhagem celular e as setas representam as alterações morfológicas promovidas pelo complexo Ru(Amsal).



O ensaio de formação de colônias avalia a capacidade de uma única célula crescer e formar uma colônia. Esse ensaio é importante, pois leva em consideração a morte reprodutiva das células, que é um critério relevante para ser utilizado na definição de concentrações citotóxicas que podem ser utilizadas de parâmetros para outros ensaios (BRAVATA; CAMMARATA; MINAFRA; MUSSO *et al.*, 2019). Os resultados mostram uma diminuição no número e tamanho das colônias quando tratadas com o complexo Ru(Amsal) (Figura 10). Na concentração de $0,3\mu\text{M}$ é possível observar uma diminuição de aproximadamente 40% do número de colônias quando comparado ao controle (Figura 10A), essa concentração também foi capaz de diminuir o tamanho das colônias (Figura 10B). Esses efeitos demonstram que o complexo Ru(Amsal) possui efeito citotóxico e citostático em células da linhagem MDA-MB-231 por diminuir o número e o tamanho das colônias, respectivamente. Um estudo com complexos de rutênio p-cimeno-Ru(II) com ligante aciltiourea também demonstrou a capacidade desses complexos em inibir significativamente o número de colônias de células da linhagem MDA-MB-231, no qual a maior concentração testada de $30\mu\text{M}$ inibiu totalmente a capacidade das células de formarem colônias (COLINA-VEGAS; LUNA-DULCEY; PLUTIN;

CASTELLANO *et al.*, 2017). Outro estudo com o complexo trans-[Ru(PPh₃)₂(N,N-dimethyl-N'-thiophenylthioureato-k²O,S)(bipy)]PF₆ também demonstrou a capacidade citotóxica e citostática do complexo na mesma linhagem em 2 horas a partir da concentração de 0,5µM (BECCENERI; POPOLIN; PLUTIN; MAISTRO *et al.*, 2018).

Figura 10 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) sobre a formação de colônias em células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. O experimento foi realizado em triplicata. **(A)** Imagem das placas do ensaio de formação de colônias correspondente a uma das triplicatas representativa. **(B)** Gráfico de porcentagem do número de colônias. **(C)** Gráfico do tamanho das colônias. Os resultados foram comparados com os controles sem tratamento. (* p≤ 0,05, ** p≤ 0,01, *** p≤0,001).



4.2 Efeitos sobre a apoptose

A apoptose, ou morte celular programada, é fundamental para a manutenção da homeostase e para a sobrevivência de organismos multicelulares. A desregulação desse processo pode estar envolvida em uma variedade de doenças, como o câncer. Algumas características importantes são aparentes em células no processo de apoptose, como o formato esférico, perda do contato com as células vizinhas, condensação da cromatina, formação de saliências na membrana e fragmentação nuclear. Essas saliências da membrana celular resultam

em pequenas vesículas, conhecidas como corpos apoptóticos (HOTCHKISS; STRASSER; MCDUNN; SWANSON, 2009). A fagocitose de corpos apoptóticos por macrófagos suprime a inflamação pela inibição da produção de citocinas inflamatórias e leva a indução da produção de fatores anti-inflamatórios (HENSON; BRATTON, 2013). A externalização de fosfatidilserina na membrana celular precede a maioria das alterações morfológicas e é considerada um marcador de apoptose. Outra característica importante da morte celular por apoptose é a fragmentação do DNA (HASSAN; WATARI; ABUALMAATY; OHBA *et al.*, 2014).

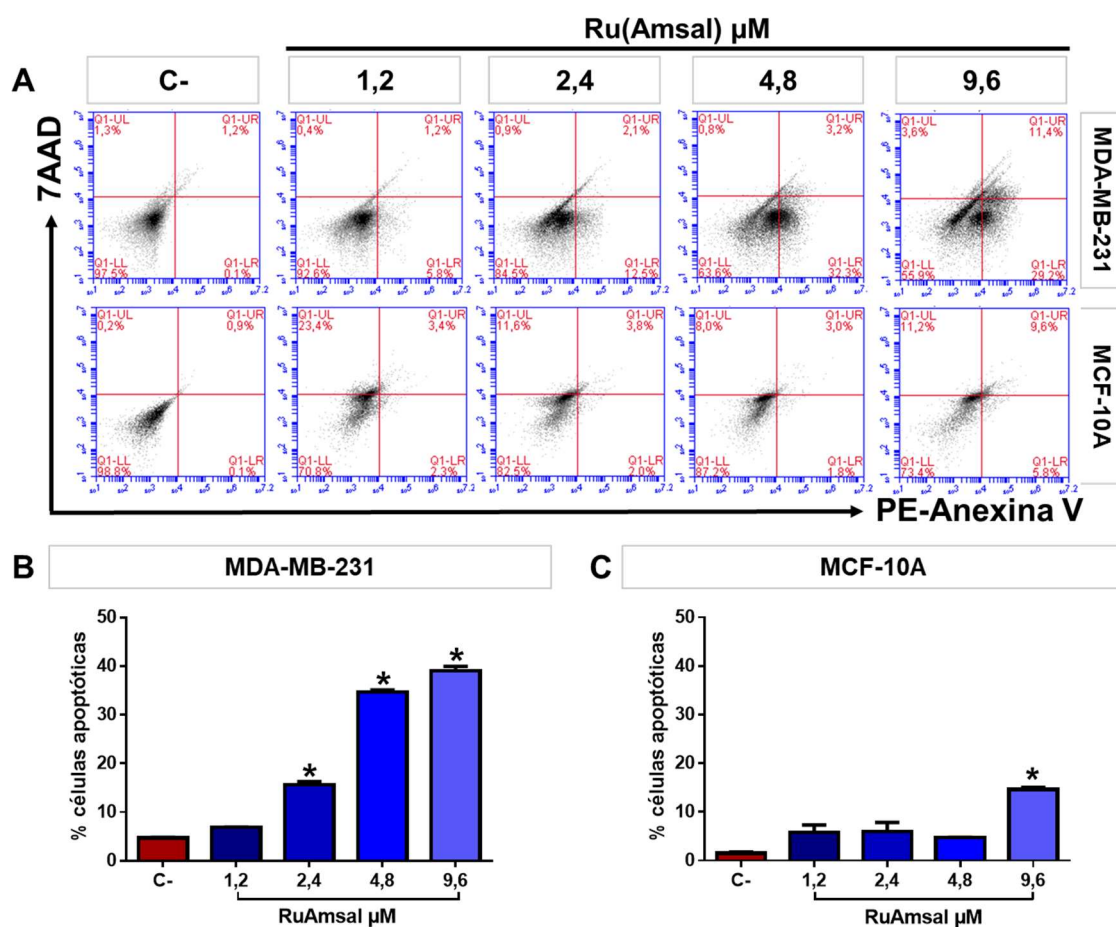
A morte por apoptose possui duas vias principais: a via extrínseca (citoplasmática) ou via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é ativada por receptores de morte celular de superfície, tais como Fas e receptores ligantes de necrose tumoral. O estímulo do ligante promove a agregação de proteínas adaptadoras que se ligam ao domínio intracelular do receptor, que então se liga ao pró-domínio de caspases iniciadoras, resultando na formação do complexo de sinalização de indução de morte (DISC). A ativação da pró-caspase-8 no DISC, é seguida pela clivagem de caspases efetoras, como a caspase-3, levando a apoptose (SAYERS, 2011).

A via intrínseca é desencadeada pela ação de diferentes sinais, incluindo radiação, dano ao DNA, calor, medicamentos citotóxicos, estresse celular e ausência de fatores de crescimento celular, os quais convergem para mitocôndria. A regulação da via mitocondrial é realizada por alguns membros da família Bcl-2, proteínas citoplasmáticas capazes de integrar sinais de sobrevivência ou morte celular gerados no meio intra e extracelular. Essa família subdivide-se em duas classes: pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bok, Bim, Bad e Bid) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl1, Bfl/A-10). A primeira proteína mitocondrial a ser liberada para o citoplasma é 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 a ativação das caspase 3, 6 e 7, resultando na apoptose (PISTRITTO; TRISCIUOGLIO; CECI; GARUFI *et al.*, 2016; SPIERINGS; MCSTAY; SALEH; BENDER *et al.*, 2005).

De acordo com a literatura, diversos fármacos utilizados na quimioterapia como a cisplatina, paclitaxel, entre outros, induzem apoptose em células tumorais *in vitro*. No entanto, alguns tipos de tumores apresentam limitações em relação aos tratamentos quimioterápicos atuais e resistência aos estímulos apoptóticos (BRENES; ARCE; GATJENS-BONICHE; DIAZ, 2007). A compreensão dos mecanismos e alterações das vias apoptóticas e sua correlação com a ocorrência do câncer são importantes para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais.

Os resultados do ensaio de apoptose avaliados com o uso de anexina V e realizados por citometria de fluxo mostram que na linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 o complexo Ru(Amsal) induziu a apoptose de maneira dependente da concentração (Figura 11). Nas concentrações de 4,8 de 9,6 μM a porcentagem de células em apoptose é de aproximadamente 40% maior em relação ao controle sem tratamento (Figura 11B). Já na linhagem não tumoral de mama MCF-10A podemos observar que apenas na maior concentração 9,6 μM do complexo Ru(Amsal) houve um aumento significativo da porcentagem de células em apoptose, cerca de 15% quando comparado com o controle sem tratamento (Figura 11C), demonstrando que o complexo é mais eficaz em induzir a apoptose em células tumorais.

Figura 11 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) na apoptose de células MDA-MB-231 e MCF-10A. **(A)** Ensaio de apoptose com PE-Anexina V (detectada no canal FL2-A) e 7AAD (detectado no canal FL3-A). **(B)** Porcentagens de apoptose induzida pelo complexo nas células MDA-MB-231. **(C)** Porcentagem de apoptose induzida pelo complexo nas células MCF-10A. Os ensaios foram realizados em triplicata. Imagens correspondem a uma das triplicatas. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (sem tratamento). (* $p \leq 0,0001$).



A fragmentação nuclear é uma característica importante do processo de apoptose e para verificar a morfologia nuclear das células MDA-MB-231 tratadas com o complexo Ru(Amsal), foi realizado um ensaio qualitativo através de uma coloração com o corante fluorescente DAPI, fluoróforo com afinidade para o DNA (PAWLOWSKI; KRAFT, 2000). A incubação das células MDA-MB-231 com o complexo Ru(Amsal) promoveu alterações indicativas de apoptose nas maiores concentrações (4,8 e 9,6 μ M), como a formação de corpos apoptóticos e uma diminuição da densidade celular (setas brancas) (Figura 12A).

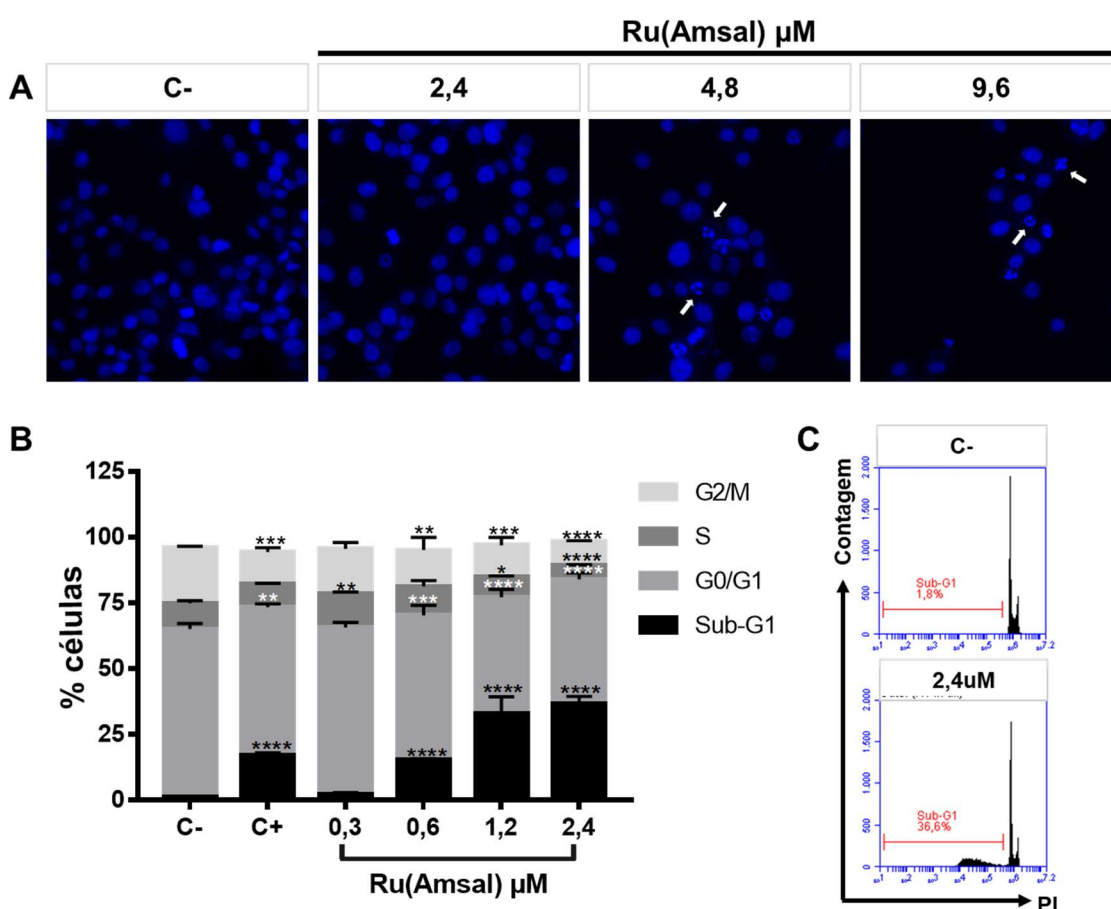
O ciclo celular é um conjunto de eventos monitorados e organizados, responsáveis pela divisão celular adequada. É dividido em duas principais fases: a intérfase e a mitose, processo de divisão nuclear. A intérfase é o período que precede a divisão celular com intensa atividade metabólica e é dividida em três fases: fase G1, S e G2. Na fase G1 a célula está se preparando para a síntese de DNA, que ocorre na fase seguinte, a fase S. Depois a célula segue para fase G2, na qual se prepara para a mitose (M). A progressão ordenada de G1 para S e de G2 para a fase M é controlada por pontos de checagem. Em resposta a danos ao DNA, o ciclo celular pode parar nestes pontos de checagem para que a célula possa tentar repará-lo (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

O ensaio de ciclo celular foi realizado para avaliar a capacidade do complexo Ru(Amsal) de alterar a distribuição do ciclo celular das células tumorais da linhagem MDA-MB-231. Na Figura 12B é apresentado o gráfico da porcentagem de distribuição do ciclo celular em diferentes concentrações do complexo. De acordo com os resultados, é possível observar um aumento considerável do número de células na fase sub-G1 em relação ao controle, indicando fragmentação do DNA. Esses resultados estão de acordo com os resultados do ensaio de apoptose por citometria de fluxo.

Recentemente, outros pesquisadores demonstraram que o complexo de rutênio (II) – Difosfina com ligante Lapachol $[\text{Ru}(\text{Lap})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$ também induziu a apoptose em células da linhagem MDA-MB-231 de forma dependente da concentração, no qual, a porcentagem de células em apoptose foi de 23,2 % e 86,2 quando incubadas com 1,25 e 10 μ M, respectivamente (OLIVEIRA; HONORATO; DEMIDOFF; SCHULTZ *et al.*, 2021). Liu e colaboradores observaram que o tratamento com o complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{DBHIP})](\text{ClO}_4)_2$ provocou um aumento de células com danos no DNA e taxa de células apoptóticas de osteossarcoma humano da linhagem MG-63. O complexo também induziu a parada do ciclo celular na fase G0/G1 (LIU; ZHAO; DENG; WU *et al.*, 2015). Complexos de rutênio(II) polipiridil também foram capazes de induzir apoptose em células humanas de hepatocarcinoma da linhagem BEL-7402, conferindo às células características apoptóticas como a diminuição nuclear, condensação

da cromatina e formação de vesículas com conteúdo citoplasmático. Adicionalmente, o complexo induziu bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 e aumentou a taxa de células em apoptose de forma dependente da concentração (HAN; JIANG; YAO; LI *et al.*, 2015; XIE;; LI; LIN; HUANG *et al.*, 2013).

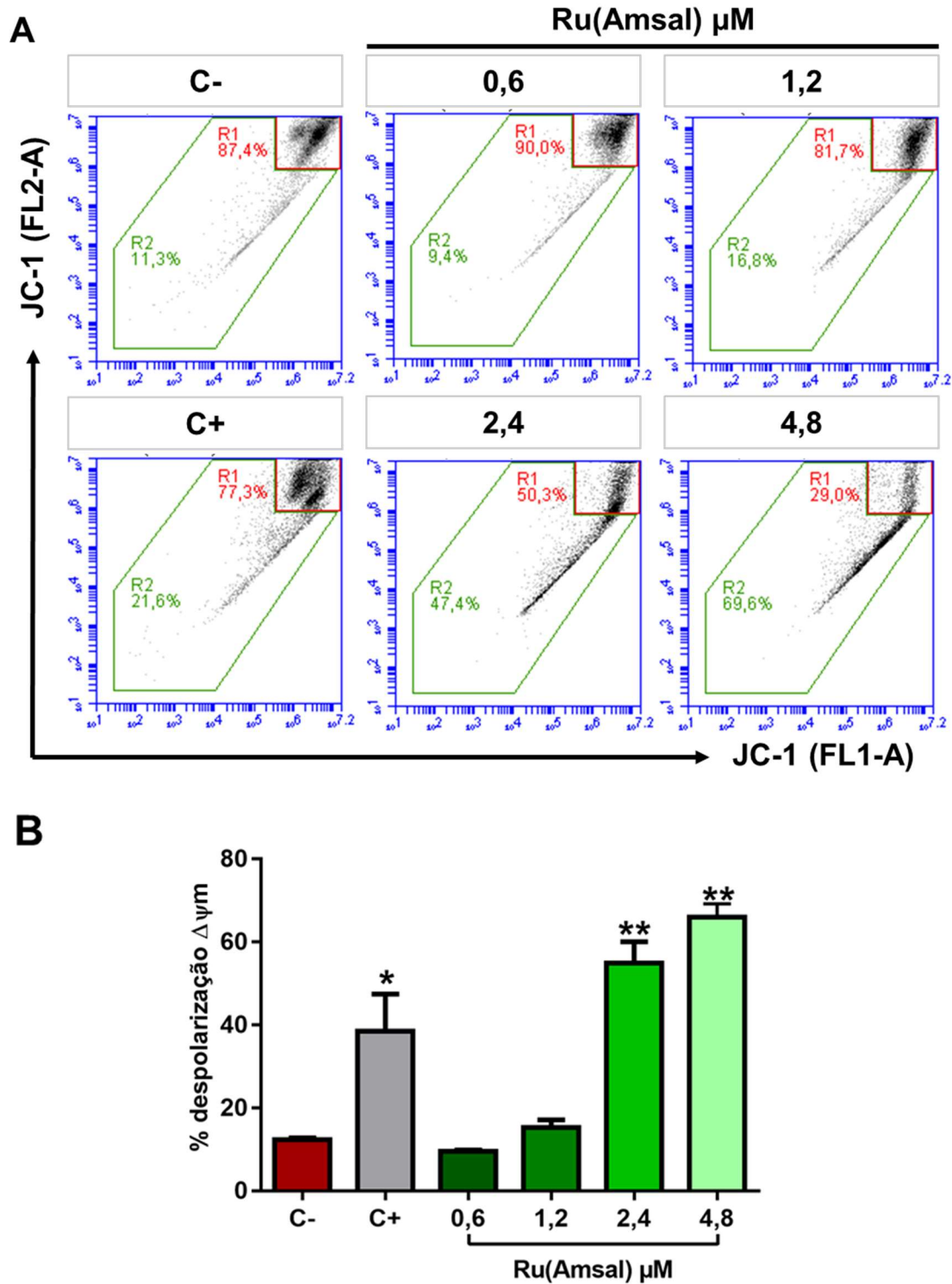
Figura 12 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) no DNA e ciclo celular das células MDA-MB-231. **(A)** Fragmentação Nuclear após 2 horas de tratamento. As setas brancas mostram os núcleos fragmentados. **(B)** Efeitos do complexo Ru(Amsal) no ciclo celular de MDA-MB-231 após o tratamento com (0,3 – 2,4 μ M) do complexo. A camptotecina foi utilizada como controle positivo (C +). Histogramas de DNA do ensaio de ciclo celular. PI corresponde ao iodeto de propídio (detectado no canal FL2-A) **(C)**. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado). (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).



A apoptose é induzida através de vias extrínsecas ou intrínsecas ou ambas estão envolvidas. A via intrínseca é regulada via mitocôndrias e pode ser monitorada pela mudança no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) utilizando o corante fluorescente JC-1 (ACHARYA; MAJI; RUTURAJ; PURKAIT *et al.*, 2019). Nesse sentido, o potencial de membrana mitocondrial das células MDA-MB-231, tratadas com o complexo de rutênio Ru(Amsal), foi analisado por citometria de fluxo empregando o corante catiônico JC-1, o qual

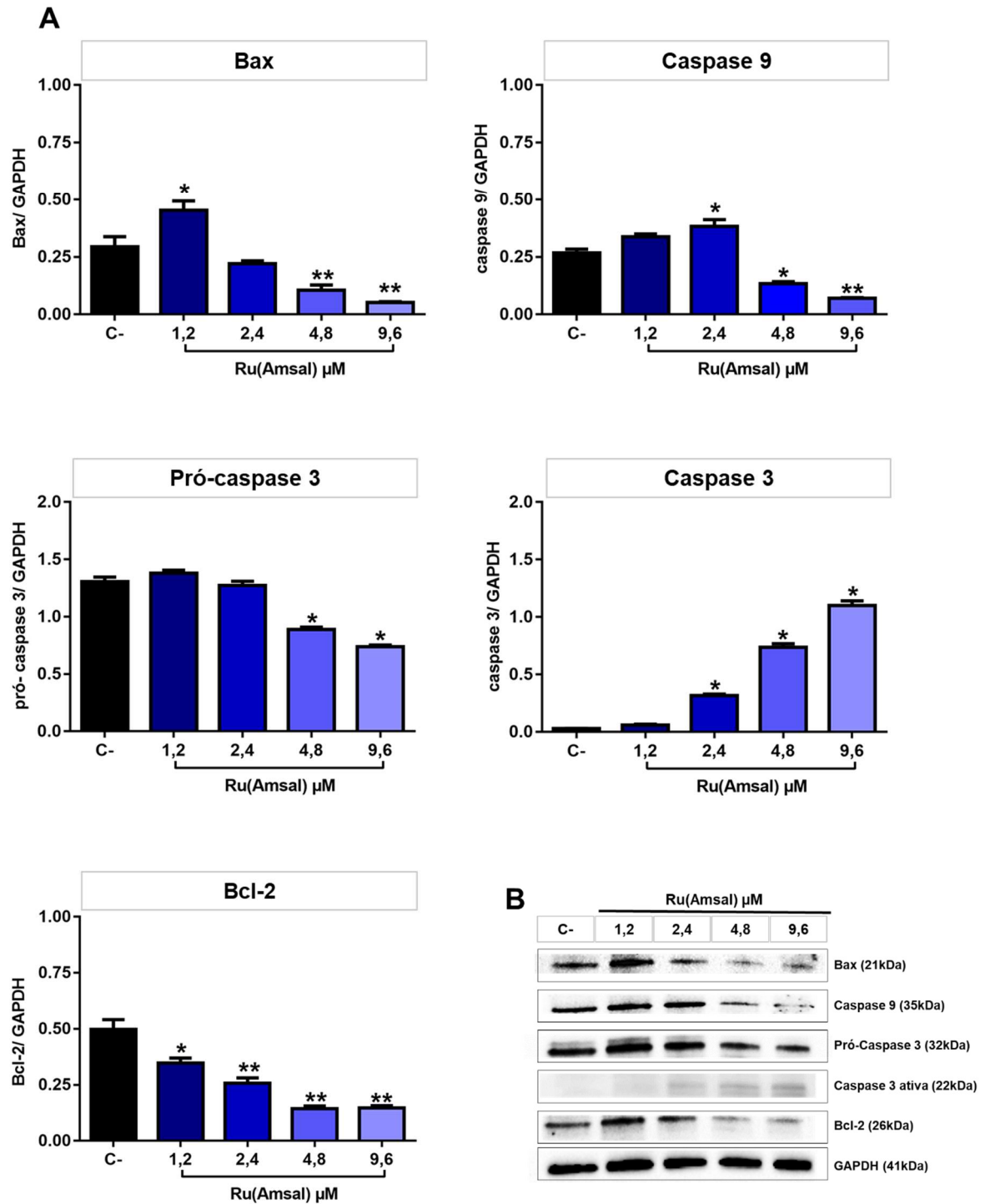
apresenta a habilidade de se acumular dentro da mitocôndria devido à sua natureza catiônica e lipofílica, podendo ser quantificado pela mudança de fluorescência, do verde para o vermelho. Em células saudáveis a mitocôndria apresenta alto potencial mitocondrial, e o corante JC-1 forma agregados com intensa coloração vermelha. Por outro lado, em células não saudáveis, iniciando o processo de apoptose, o potencial mitocondrial é baixo, e o JC-1 permanece na forma monomérica, apresentando uma alta fluorescência verde (SIVANDZADE; BHALERAO; CUCULLO, 2019). De acordo com a Figura 13, as células da linhagem MDA-MB-231 representadas em R1 são as células com o potencial de membrana da mitocôndria intacta, já as células em R2 possuem o potencial de membrana alterado. Os resultados mostram que as células tratadas com 2,4 e 4,8 μ M do complexo Ru(Amsal) apresentaram uma elevada alteração no potencial mitocondrial (54,9 % e 65,9%, respectivamente) em relação ao controle negativo (12,4%). Dessa forma é possível concluir que o complexo Ru(Amsal) foi capaz de diminuir o potencial de membrana da mitocôndria, evidenciando uma via apoptótica por ativação de sinais mitocondriais. Acharya e colaboradores mostraram que complexos de rutênio (II) p-cymene também foram capazes de alterar o potencial de membrana mitocondrial de células da linhagem MDA-MB-231 (ACHARYA; MAJI; RUTURAJ; PURKAIT *et al.*, 2019).

Figura 13 – Efeitos do complexo de rutênio Ru(Amsal) sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). **(A)** O potencial de membrana foi avaliado após o tratamento com diferentes concentrações de Ru(Amsal) no período de 4 horas e monitorado por citometria de fluxo com o marcador JC-1. A estaurosporina (0,5 μ M) foi usada como controle positivo (agente indutor de apoptose). Regiões em vermelho representam células com membranas mitocondriais intactas e os eventos em verde representa células com perda de $\Delta\psi_m$. **(B)** Gráfico representativo da intensidade de despolarização da membrana após os tratamentos com as concentrações indicadas de Ru(Amsal) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).



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 pelo ensaio de *western blotting*. Os resultados da Figura 14 mostram que o tratamento com o complexo Ru(Amsal) nas concentrações de 1,2 e 2,4 μ M promove um aumento na expressão de Bax, Caspase 9 e Pró-caspase 3 em relação ao controle, no entanto, o inverso ocorreu nas maiores concentrações testadas (4,8 e 9,6 μ M). Já os níveis proteicos da caspase-3 aumentaram de forma dependente da concentração, no qual a concentração de 9,6 μ M foi capaz de promover um aumento de aproximadamente 30 vezes em relação ao controle. É importante destacar que a diminuição dos níveis proteicos de bax, caspase 9 e pro-caspase 3 nas maiores concentrações pode estar relacionada com a etapa da cascata apoptótica, ou seja, no tempo em que foi realizado o tratamento e nas maiores concentrações as células já se encontravam em apoptose tardia, o que pode justificar também o aumento concentração-dependente dos níveis de caspase-3. Foram avaliados também os níveis de Bcl-2, sendo possível observar que o tratamento com o complexo Ru(Amsal) mostrou-se eficaz em diminuir a expressão desta proteína. Os níveis proteicos de Bcl-2, quando as células foram tratadas na concentração de 9,6 μ M com Ru(Amsal), foram 3 vezes menores quando comparados ao controle. Estes resultados estão de acordo com os ensaios anteriores relacionados com a apoptose e demonstram que o complexo Ru(Amsal) pode induzir a apoptose de células da linhagem de mama triplo negativa MDA-MB-231 pela ativação da via intrínseca. Jiang e colaboradores (2014) demonstraram que o complexo polipiril de rutênio II, com o ligante dmmpz, $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{dmdppz})](\text{ClO}_4)_2$, induziu a apoptose em células de hepatocarcinoma BEL-7402, devido a capacidade de ativar a via intrínseca da apoptose e regular a expressão de proteínas relacionadas a apoptose. Esse complexo aumenta a expressão de caspase-3 e Bax e diminui a expressão de Bcl-2 (JIANG; ZHENG; YAO; HAN *et al.*, 2014).

Figura 14 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) nos níveis proteicos de moléculas apoptóticas e anti-apoptóticas de células MDA-MB-231. **(A)** Efeito do complexo nos níveis proteicos em células MDA-MB-231. **(B)** Imagem representativa da expressão de proteínas relacionadas à apoptose por análise de *Western Blotting*. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado). (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).

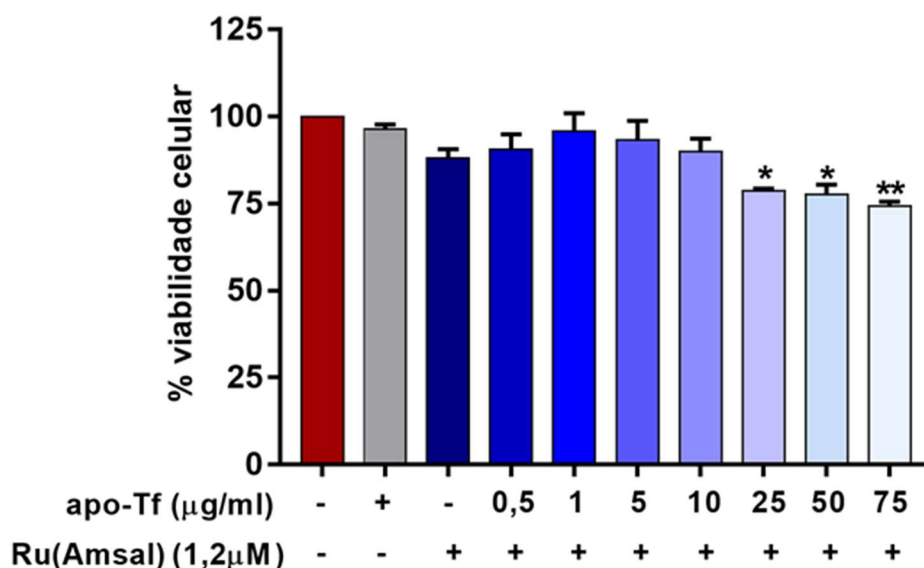


4.3 Efeitos sobre o transporte e interação celular

Estudos prévios demonstraram que complexos de rutênio são capazes de se ligar a biomoléculas de transporte como a transferrina humana (BERGAMO; GAIDDON; SCHELLEN; BEIJNEN *et al.*, 2012; NAVES; GRAMINHA; VEGAS; LUNA-DULCEY *et al.*, 2019). Para avaliar a interferência da transferrina no transporte e interação do Ru(Amsal) com as células, a linhagem MDA-MB-231 foi exposta ao tratamento com o complexo em uma concentração constante próxima do IC₅₀ (1,2μM), juntamente com concentrações crescentes de apo-transferrina humana, por 24 horas. A porcentagem de células viáveis em cada tratamento foi analisada por um ensaio de MTT e a referência de 100% de viabilidade utilizada foram as células controle negativo (sem tratamento). Neste experimento, era esperado observar uma diminuição na viabilidade das células proporcionalmente ao aumento da concentração de transferrina, comparando todos os grupos de tratamento com o controle positivo (células que receberam somente o complexo e ausência da apo-transferrina). Este resultado indica que a transferrina pode aumentar a interação entre as células e o complexo.

De acordo com a Figura 15, é possível observar que quando a concentração de transferrina aumentou, mantendo a concentração do complexo Ru(Amsal) constante, a viabilidade das células MDA-MB-231 diminuiu de forma significativa comparado com as células que foram tratadas somente o complexo Ru(Amsal), indicando que, possivelmente, a transferrina pode ser responsável por transportar o complexo para o interior da célula e também aumentar a interação entre o complexo e as células tumorais .

Figura 15 - Transporte de Ru(Amsal)) por transferrina. As células MDA-MB-231 foram incubadas com 1,2 μ M do complexo Ru(Amsal) por 24 horas. Os resultados foram comparados com o grupo de células tratadas com apenas com o complexo, sem a presença da transferrina. O experimento foi realizado em triplicata. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).



Os resultados encontrados estão em acordo com Naves e colaboradores, no qual o complexo (RuGA) foi capaz de interagir com receptores de transferrina, conforme aumento na concentração de transferrina e concentração do complexo constante, o que também diminuiu a viabilidade das células MDA-MB-231 (NAVES; GRAMINHA; VEGAS; LUNA-DULCEY *et al.*, 2019). Outro estudo com complexos de Ru(II) polipiridil demonstrou que o bloqueio de receptores de transferrina por anticorpos específicos em células tumorais de mama da linhagem MCF-7, inibiu em 53,6% a internalização desses complexos. Esses resultados sugerem que os receptores de transferrina podem ser responsáveis pelo transporte de complexos de rutênio para células tumorais (ZHAO; LUO; WU; ZHENG *et al.*, 2014).

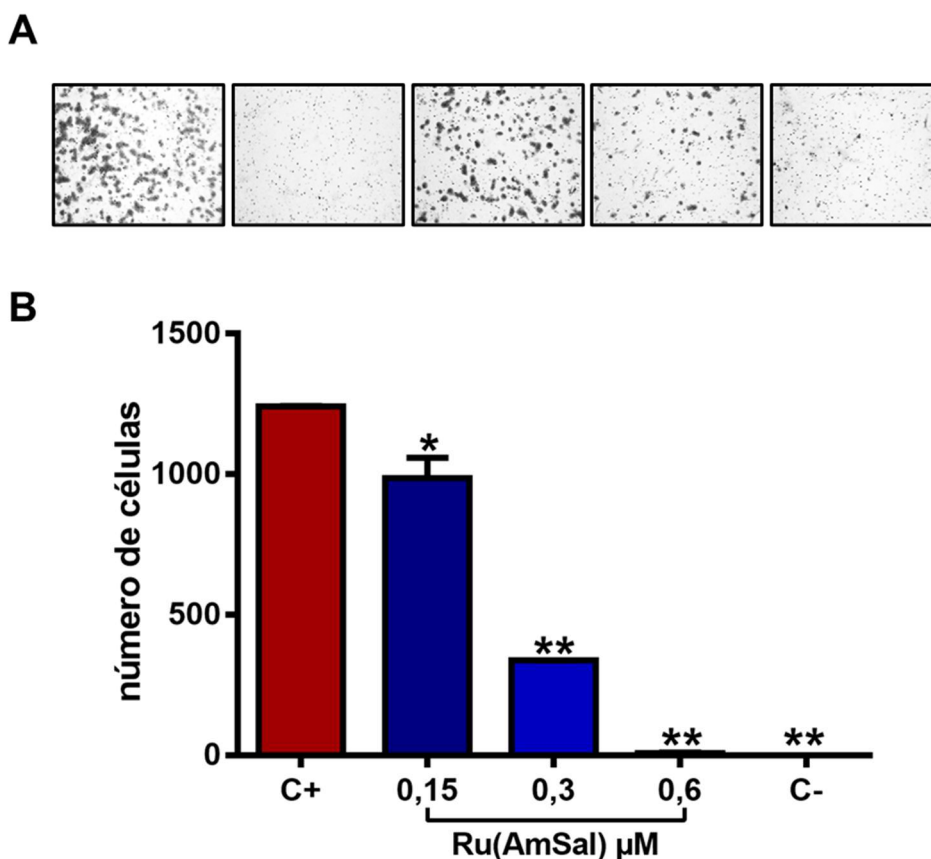
4.4 Efeitos sobre a cascata metastática

A migração celular é uma etapa fundamental do processo metastático. Nem todas as células do organismo são migratórias, no entanto, as que constituem o sistema imune migram de forma individual e conseguem responder rapidamente a estímulos. Outros tipos celulares apresentam migração temporária e dependem de eventos específicos como a cicatrização de feridas, vascularização e inflamação e geralmente esse tipo de migração ocorre na forma de

migração coletiva das células. Na progressão tumoral, as células tumorais podem migrar de forma individual e coletiva (RORTH, 2009). As células tumorais de mama são células migratórias individuais e frequentemente são observadas sozinhas se movimentando linearmente em associação com as fibras da MEC. Independentemente do tipo de migração, todas as células precisam modificar sua morfologia para interagir com a matriz ao seu redor, resultando na sua locomoção (YAMAGUCHI; WYCKOFF; CONDEELIS, 2005). No processo migratório ocorre primeiramente o alongamento células causado pela polarização dos filamentos de actina, já a formação do podossomo ou invadopodia promove a adesão com as fibras da MEC, puxando todo o corpo e cauda para frente (LINDER, 2007). A ligação das células com a MEC acontece, principalmente, por meio de integrinas mediando a interação de seus componentes com a actina do citoesqueleto, fornecendo a tração necessária para o movimento migratório (PARSONS; HORWITZ; SCHWARTZ, 2010).

Neste trabalho, para investigar o efeito do complexo Ru(Amsal) na migração das células da linhagem MDA-MB-231 foram utilizados dois métodos, o ensaio de migração por câmara de Boyden, usado para analisar a capacidade de células únicas migrarem em resposta a quimioatraentes como fatores de crescimento, quimiocinas, lipídios ou nucleotídeos, e o ensaio de wound healing, um dos métodos mais simples e útil para determinar a capacidade de migração coletiva (JUSTUS; LEFFLER; RUIZ-ECHEVARRIA; YANG, 2014). Os resultados do ensaio de migração celular utilizando a câmara de Boyden demonstraram que o complexo Ru(Amsal) inibiu significativamente a migração das células da linhagem MDA-MB-231 em todas as concentrações testadas (0,15-0,6 μ M) (Figura 16). Na concentração de 0,3 μ M é possível observar uma inibição de aproximadamente 75% de migração celular, já a concentração de 0,6 μ M inibiu totalmente a migração das células.

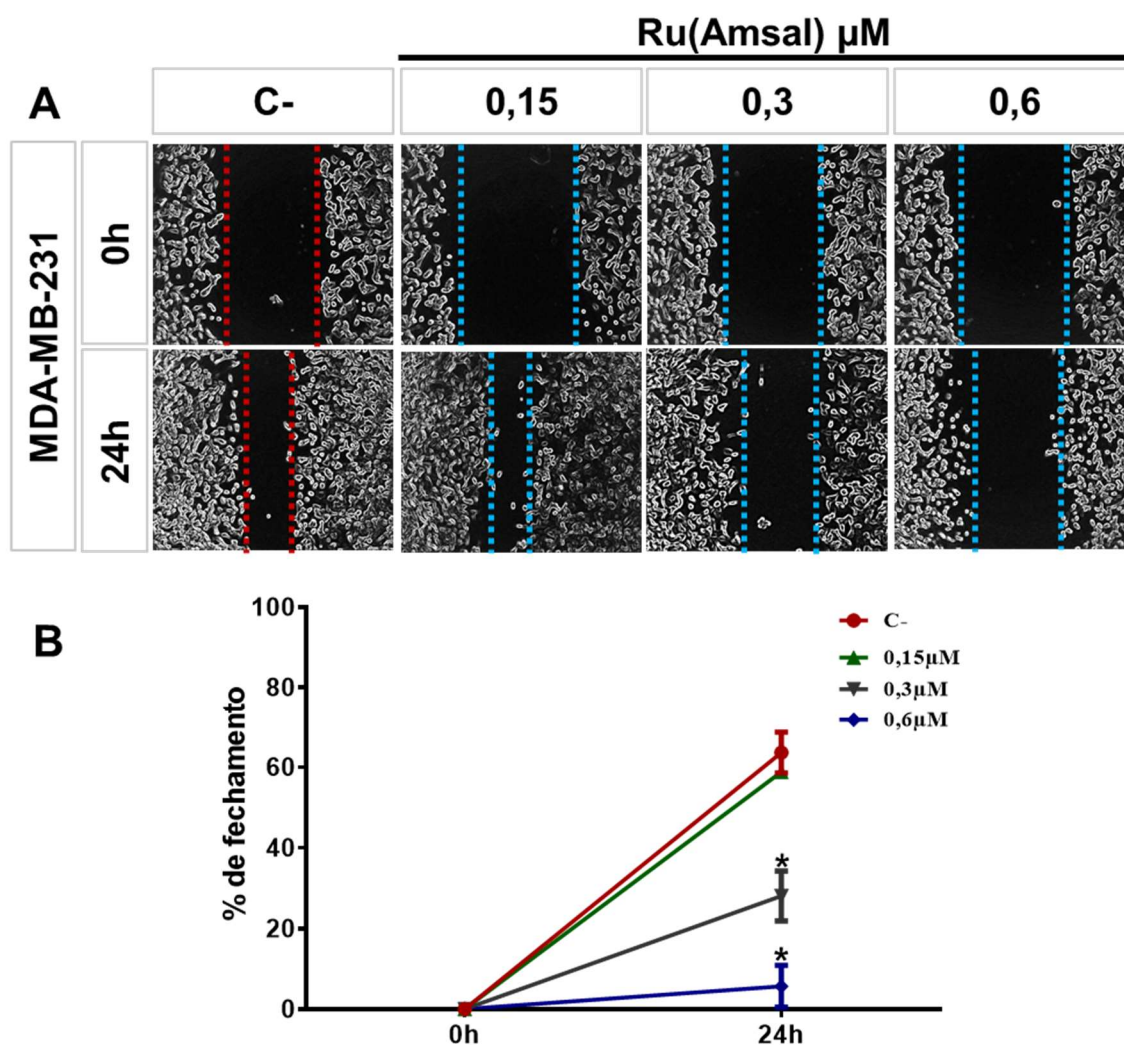
Figura 16 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) sobre a migração das células da linhagem MDA-MB-231 em câmara de Boyden. **(A)** A imagem corresponde a uma das triplicatas. **(B)** O gráfico apresenta a quantidade de células que conseguiram migrar pelos poros do inserto após o tempo de incubação de 22 horas com o complexo Ru(Amsal). Foram utilizados neste ensaio o controle + (sem tratamento e com quimioatraente) e controle – (sem tratamento e sem quimioatraente). O experimento foi realizado em triplicata. (* $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,0001$).



Para continuar investigando o efeito anti-migratório do complexo Ru(Amsal) foi realizado também o ensaio de *wound healing*. Os resultados obtidos neste ensaio mostram que após o tempo de incubação de 24 horas a concentração de $0,3\mu\text{M}$ já é capaz de inibir em aproximadamente 30% o fechamento da risca em comparação com o controle de células sem tratamento. Na concentração de $0,6\mu\text{M}$ houve uma maior inibição do fechamento da risca, em aproximadamente 54% em relação ao controle (Figura 17B). É importante ressaltar que as concentrações utilizadas neste ensaio não foram capazes de alterar a morfologia e não promoveram nenhum efeito citotóxico, conforme os resultados obtidos nos ensaios de morfologia e citotoxicidade. Zhao e colaboradores (2019) investigaram a atividade antimetastática do complexo de rutênio polipiridina $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{BEDPPZ}$ através do ensaio de *wound healing* para verificar a capacidade de migração celular. Os resultados mostraram que o complexo inibiu a migração de células da linhagem MDA-MB-231 nas concentrações de 2 e

4 μ M (ZHAO; LI; YU; ZHANG *et al.*, 2019). Outro trabalho com três complexos de rutênio (II)/ferro (II) [Ru(MIm)(bipy)(dppf)]PF₆, [RuCl(Im)(bipy)(dppf)]PF₆ e [Ru(tzdt)(bipy)(dppf)]PF₆ demonstrou através dos ensaios de *wound healing* e câmara de Boyden, que os complexos inibiram de maneira eficiente a migração de células da linhagem MDA-MB-231, quando comparado ao controle. O complexo [Ru(MIm)(bipy)(dppf)]PF₆ na concentração de 1 μ M apresentou uma inibição da migração de 76% quando comparado ao controle sem tratamento (GUEDES; MELLO-ANDRADE; PIRES; DE SOUSA *et al.*, 2020)

Figura 17 - Efeito de diferentes concentrações do complexo Ru(Amsal) na migração das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 pelo ensaio de *wound healing*. O ensaio foi realizado em triplicata. **(A)** A imagem corresponde a uma das triplicatas. **(B)** Gráfico da porcentagem de fechamento. (* $p \leq 0,0001$).



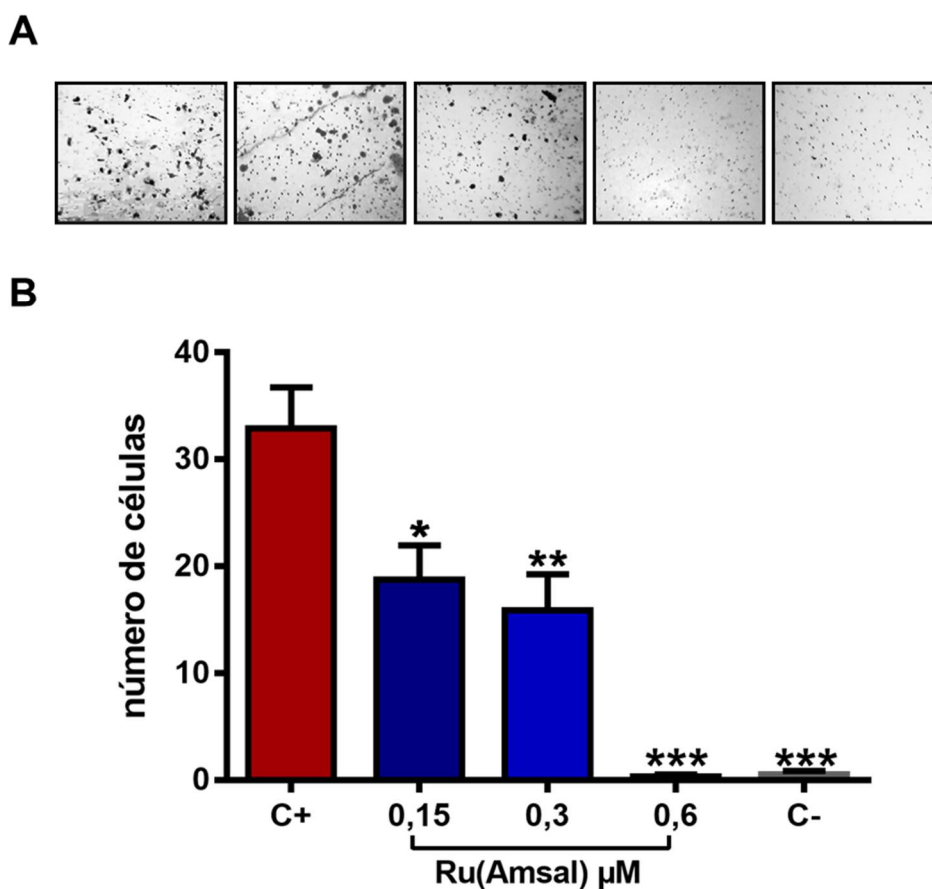
O processo de invasão tumoral é orquestrado por um grande conjunto de células incluindo as próprias células tumorais, as células estromais adjacentes e as células inflamatórias intratumorais, e acredita-se que todas são capazes de expressar uma variedade de MMPs (REUNANEN; KÄHÄRI, 2013). As MMPs pertencem a uma família de enzimas dependentes de zinco envolvidas, principalmente, na degradação de componentes da matriz extracelular (MEC), desempenhando papéis fundamentais em situações fisiológicas como na embriogênese, cicatrização de feridas e angiogênese. São classificadas de acordo com as características determinadas pela sua estrutura e especificidade do substrato, como: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas e metaloproteinases ligadas à membrana (MT-MMP) (KESSENBRÖCK; PLAKS; WERB, 2010). As MMPs são secretadas na sua forma inativa como pro-MMP e são ativadas no espaço extracelular, no qual, uma vez ativa passa a ser regulada principalmente por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (ARPINO; BROCK; GILL, 2015). As MMPs também exercem um papel essencial no desenvolvimento e progressão do câncer, no qual, estão envolvidas na degradação da matriz extracelular e da membrana basal, mediante clivagem do colágeno tipo IV, no rompimento da adesão célula-célula devido à clivagem das E-caderinas (glicoproteínas transmembranas dependentes de cálcio que desempenham papel nas junções intercelulares) e integrinas, facilitando a locomoção e invasão das células tumorais, permitindo que estas alcancem e penetrem os vasos sanguíneos ou linfáticos com consequente metástase (BROWN; MURRAY, 2015).

A MMP-2 e MMP-9 pertencem a classe das gelatinases e são conhecidas na literatura por sua atuação na progressão tumoral. Pesquisadores investigaram a atuação destas MMPs no câncer de mama e verificaram que o aumento de seus níveis/expressão está correlacionado com uma menor sobrevivência de pacientes com câncer de mama (TAURO; LYNCH, 2018). Outros estudos mostram que os níveis de MMP-2 e MMP-9 são significativamente mais elevados nas células tumorais das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 em comparação com as células da linhagem não-tumoral de mama HS578Bst (LI; QIU; LI; WANG, 2017).

De acordo com os resultados do ensaio de invasão celular, observamos que o complexo Ru(Amsal) foi capaz de inibir a invasão das células da linhagem MDA-MB-231 de forma significativa a partir da concentração de $0,15\mu\text{M}$. Na maior concentração testada ($0,6\mu\text{M}$) a inibição foi de aproximadamente 98% em relação ao controle positivo (Figura 18). É importante ressaltar que as concentrações utilizadas neste ensaio não alteraram a morfologia e não foram citotóxicas para as células. Naves e colaboradores (2019) investigaram a atividade do complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{GA})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6 - \text{Ru}(\text{GA})$ na invasão de células da linhagem MDA-MB-231, através do ensaio de invasão em matrigel. Os resultados mostraram que o complexo Ru(GA),

nas concentrações de 1,56 e 3,12 μ M, inibiu significativamente a invasão das células (NAVES; GRAMINHA; VEGAS; LUNA-DULCEY *et al.*, 2019).

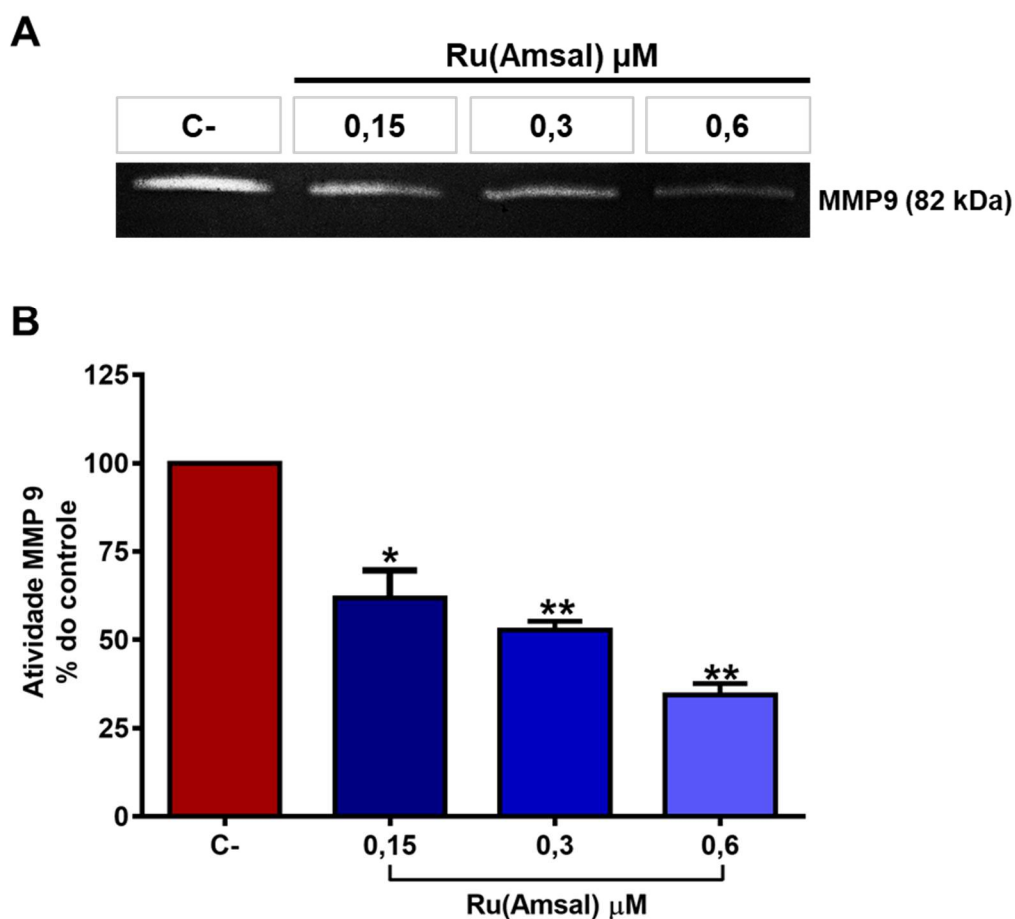
Figura 18 - Efeitos do complexo Ru(Amsal) sobre a invasão de células da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231. O experimento foi realizado em triplicata. **(A)** A imagem corresponde a uma das triplicatas. **(B)** O gráfico apresenta a quantidade de células que conseguiram invadir a matrigel e atravessar os poros do inserto após o tempo de incubação de 22 horas com o complexo Ru(Amsal). Foram utilizados neste ensaio o controle + (sem tratamento e com quimioatraente) e controle - (sem tratamento e sem quimioatraente). (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).



Através da zimografia, apresentada na Figura 19A, é possível visualizar as bandas correspondentes a MMP-9 em gel de acrilamida com adição de gelatina. O corante Commassie cora a gelatina acrescentada ao gel em azul, no entanto, as bandas onde estavam presentes as MMPs aparecem em negativo, pois degradaram a gelatina durante a incubação com o tampão contendo íons de zinco. De acordo com os resultados, é possível notar que todas as concentrações testadas do complexo Ru(Amsal) (0,15-0,6 μ M) inibiram de forma significativa a atividade da MMP-9 quando comparadas ao controle sem tratamento (Figura 19B). Recentemente, outros pesquisadores demonstram o potencial de complexos de rutênio [Os(η 6

-pcym)(bphen)(dca)]PF6 (Os-dca) and [Ru(η^6 -pcym)(bphen)(dca)]PF6 (Ru-dca) na inibição da atividade da MMP-9, especialmente o complexo Os-dca que apresentou maior eficiência em inibir a atividade da MMP-9 na concentração de 2 μ M quando comparado ao complexo Ru-dca (2 μ M) e à cisplatina. Esses resultados estão de acordo com o nosso trabalho e reforçam que a inibição da atividade da MMP-9 desempenha um papel importante nos efeitos anti-migratórios e anti-invasivos desses complexos.

Figura 19 - Efeito do complexo Ru(Amsal) sobre a expressão da MMP9 em células da linhagem MDA-MB-231. (A) Expressão da MMP9 em gel de zimografia. (B) Gráfico da análise da atividade da MMP9. (* $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,0001$).

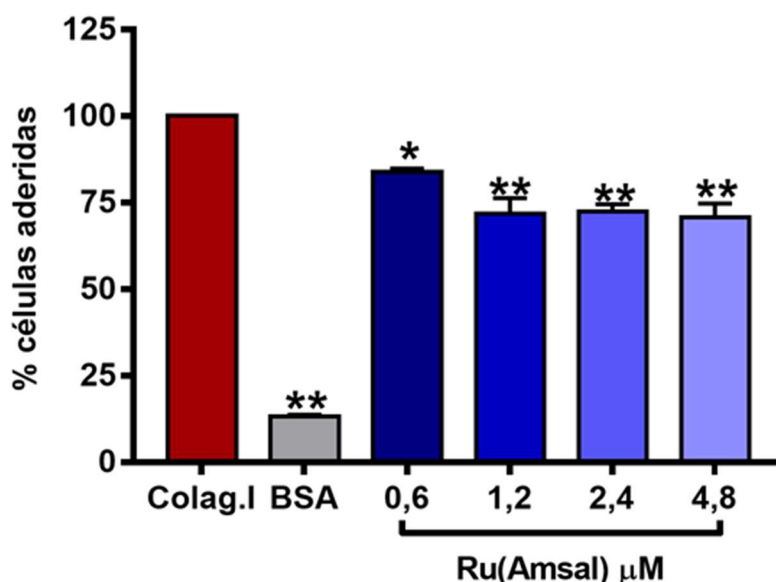


As interações adesivas das células tumorais exercem um papel crítico na disseminação do tumor metastático, uma vez que as moléculas de adesão atuam como moduladores positivos ou negativos deste processo. Na metástase, as células tumorais presentes na corrente sanguínea inicialmente aderem às células endoteliais de determinados órgãos, através de um processo mediado por integrinas (JANISZEWSKA; PRIMI; IZARD, 2020). Em seguida, as células

tumorais metastáticas aderem a elementos da membrana basal subendotelial, tais como laminina e colágeno tipo IV e V. Finalmente, as células tumorais metastáticas realizam a adesão a elementos de tecido conjuntivo, tais como fibronectina e colágeno tipo I, para a movimentação para o estroma subendotelial e subsequente crescimento nesses novos sítios (HIROHASHI; KANAI, 2003). Além disso, para se tornarem células tumorais metastáticas, as células do tumor primário precisam se desprender destas moléculas de adesão presentes no tecido de origem e muitas vezes, uma diminuição na adesão célula-célula e/ou célula-matriz no tumor primário tem sido correlacionada à invasão tumoral e metástase. Assim, a adesão aos componentes do tecido conjuntivo colágenos I e IV, fibronectina e laminina pode atuar de maneira positiva ou negativa, agindo isoladamente ou em conjunto para metástase (BORSIG; LÄUBLI, 2019; OKEGAWA; PONG; LI; HSIEH, 2004).

Para avaliar o efeito do complexo Ru(Amsal) sobre a adesão de células da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 foi realizado o ensaio de adesão celular ao colágeno tipo I. Neste ensaio, a adesão das células sem nenhum tratamento ao colágeno tipo I foi considerada como controle positivo da adesão, e aos valores obtidos foram atribuídos 100% de adesão. A BSA foi considerada o controle negativo da adesão, ou seja, as células plaqueadas sobre este substrato não deveriam se aderir a ele. De acordo com os resultados, todas as concentrações testadas do complexo Ru(Amsal) inibiram significativamente a adesão das células MDA-MB-231 ao colágeno tipo I, quando comparado ao controle sem tratamento (Figura 20). Também é importante ressaltar que as células foram incubadas por 30 minutos com o complexo, e neste tempo as concentrações utilizadas não foram capazes de alterar a morfologia e não foram citotóxicas para as células.

Figura 20 - Efeitos de diferentes concentrações do complexo Ru(Amsal) sobre a adesão celular ao colágeno tipo I das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle sem tratamento (somente colágeno tipo I e células). Também foi utilizado um controle negativo de adesão (BSA). (* $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,0001$).

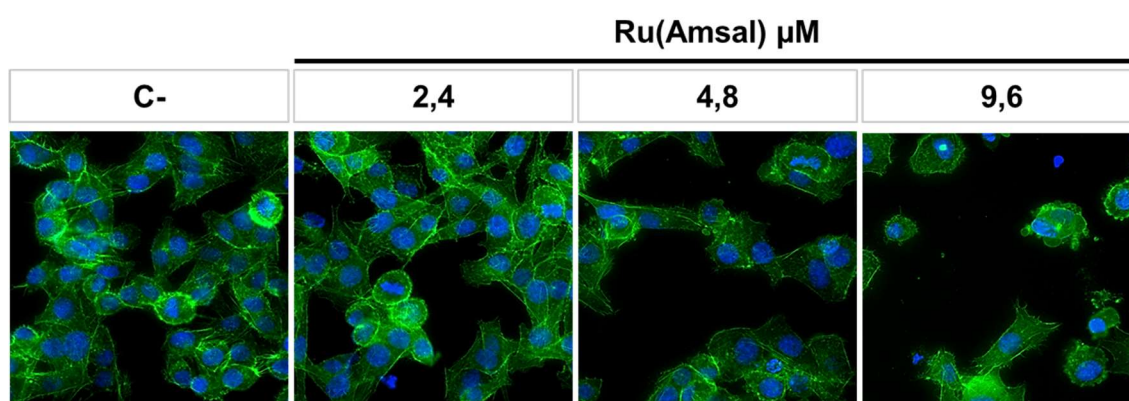


Ao longo de todo o processo metastático, os movimentos celulares e as alterações na forma celular requerem uma reorganização espacial e temporal do citoesqueleto celular. O citoesqueleto celular é uma estrutura formada por diversos tipos de filamentos proteicos que se estendem por todo o citoplasma da célula e que desempenham funções importantes, tais como manter sua integridade estrutural e organizar e controlar seus movimentos internos e externos. O citoesqueleto é composto basicamente por três tipos de filamentos: os filamentos de actina (também conhecidos como microfilamentos), os microtúbulos e os filamentos intermediários (FIFE; MCCARROLL; KAVALLARIS, 2014). O citoesqueleto é, portanto, uma estrutura dinâmica que se mantém em constante estado de reorganização, permitindo à célula promover e manter a ordem interna necessária ao seu equilíbrio ao mesmo tempo em que muda de forma, se locomove ou até mesmo se divide. Os filamentos de actina do citoesqueleto são responsáveis por regular a dinâmica da motilidade celular em todas as células, inclusive em células tumorais de mama (JIANG; ENOMOTO; TAKAHASHI, 2009).

O ensaio de marcação do citoesqueleto foi realizado com o objetivo de verificar os efeitos do complexo Ru(Amsal) sobre a organização do citoesqueleto de células MDA-MB-231, utilizando o marcador Alexa 488 Fluor® Phalloidin específico para fibras F-actina. Podemos observar na concentração de 9,6μM uma diminuição marcante da densidade da

estrutura celular e condensação dos filamentos de actina, quando comparado ao controle (Figura 21). Essa alteração marcante na organização no citoesqueleto das células MDA-MB-231, promovida pelo complexo Ru(Amsal), pode estar relacionada com a inibição da adesão dessas células a proteínas da MEC, bem como a inibição da migração e invasão.

Figura 21 - Efeito de diferentes concentrações do complexo Ru(Amsal) no citoesqueleto das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. O ensaio foi realizado em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas.



Outro trabalho do nosso grupo demonstrou que o complexo de rutênio trans-[Ru(PPh₃)₂(N,N-dimethyl-N'-thiophenylthioureato-k²O,S)(bipy)]PF₆ também foi capaz de inibir a adesão das células MDA-MB-231 ao colágeno tipo I e induzir alterações no citoesqueleto (BECCENERI; POPOLIN; PLUTIN; MAISTRO *et al.*, 2018). Sava e colaboradores (2004) demonstraram que o complexo NAMI-A foi capaz de modificar a estrutura do citoesqueleto células humanas da linhagem de carcinoma cervical HeLa (SAVA; FRAUSIN; COCCHIETTO; VITA *et al.*, 2004). O complexo de rutênio com o ligante ácido gálico Ru(GAC) foi avaliado quanto a capacidade de alterar o citoesqueleto de células tumorais e não tumorais MDA-MB-231 e MCF-10A, respectivamente. De acordo com os resultados o tratamento com o complexo Ru(GAC), nas maiores concentrações, promoveu uma alteração na estrutura do citoesqueleto, sendo possível observar a condensação dos filamentos de F-actina na células da linhagem MDA-MB-231. Já na linhagem não tumoral de mama MCF-10A, não foram observadas alterações no citoesqueleto em todas as concentrações testadas, sugerindo que essas células são mais resistentes aos efeitos do complexo Ru(GAC) (GRAMINHA; HONORATO; CORREA; COMINETTI *et al.*, 2020). Todos estes resultados estão de acordo com o nosso trabalho, mostrando o potencial dos complexos de rutênio para atuar nas diferentes etapas do processo metastático.

Os estudos *in vitro* demonstraram que o complexo Ru(Amsal) possui potencial para o tratamento do câncer de mama. Este complexo apresentou o menor IC₅₀ para as células da linhagem tumoral MDA-MB-231 e o maior IC₅₀ para as células não tumorais MCF-10A, em comparação aos outros cinco complexos de rutênio testados, sugerindo ação seletiva deste complexo para células tumorais. O complexo Ru(Amsal) também alterou a morfologia, inibiu a migração, a invasão e a adesão e ainda induziu a apoptose, danos ao DNA e promoveu a fragmentação nuclear de células tumorais MDA-MB-231. Portanto, diante dos resultados promissores, o ensaio *in vivo* de modelo de metástase espontânea singênico ortotópico sem cirurgia foi escolhido para avaliar as propriedades do Ru(Amsal) no crescimento do tumor primário e conseqüentemente, nas possíveis metástases formadas.

Capítulo 2 – Nanotecnologia e Ensaios *in vivo*

5 Nanotecnologia

Apesar do alto potencial *in vitro* dos complexos de rutênio, sua baixa solubilidade em água pode dificultar os estudos da atividade biológica *in vivo*. Por este motivo, têm se buscado alternativas para veiculação destes complexos metálicos através de estratégias nanotecnológicas que visam melhorar a solubilidade e comportamento no organismo de diversos grupos de moléculas (MAINARDES; URBAN; CINTO; CHAUD *et al.*, 2006).

A nanotecnologia tem sido apontada como uma das mais promissoras estratégias para melhorar a veiculação de fármacos quimioterápicos, por meio do emprego de nanocarreadores com diâmetro médio entre 10 a 500nm, que apresentam capacidade de penetração intracelular e podem possibilitar o acúmulo do fármaco no sítio tumoral (NARVEKAR; XUE; EOH; WONG, 2014). Os vasos que nutrem o tecido tumoral apresentam poros maiores entre as células, quando comparado ao tecido saudável, o que resulta na maior permeabilidade local, e ainda, devido à ausência de drenagem linfática eficiente, os nanossistemas podem ficar retidos por mais tempo na região do tumor (YINGCHONCHAROEN; KALINOWSKI; RICHARDSON, 2016). Os sistemas de liberação nanoestruturados através da encapsulação, acomodam o fármaco no interior da estrutura e o protege das degradações enzimáticas e hidrolíticas no trato gastrointestinal, direcionando-o ao órgão alvo. Um sistema de liberação “ideal” deve entregar o fármaco de forma exclusiva no seu sítio de ação, ser capaz de modular a velocidade de liberação e a duração do efeito, e além disso, esses sistemas de liberação devem melhorar características indesejáveis do fármaco como a baixa solubilidade, a baixa biodisponibilidade e a instabilidade (DA SILVA; DE FREITAS; BERNEGOSI; GONCALEZ *et al.*, 2016; SATO; DA SILVA; DE SOUZA; DOS SANTOS *et al.*, 2015).

Vários sistemas de liberação têm sido empregados com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade de fármacos e podem ser classificados em diferentes categorias, dentre eles os sistemas lipídicos e poliméricos. Os sistemas lipídicos correspondem às microemulsões, nanoemulsões, lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas. Já os sistemas poliméricos envolvem os hidrogeis, nanopartículas poliméricas e dendrímeros (YINGCHONCHAROEN; KALINOWSKI; RICHARDSON, 2016).

As microemulsões (ME) representam um sistema de água e óleo contendo um tensoativo, criando uma solução líquida termodinamicamente estável. As ME apresentam alta

estabilidade, o que permite diferentes vias de administração e baixo custo de preparação (LAWRENCE; REES, 2000; SATO; DA SILVA; DE SOUZA; DOS SANTOS *et al.*, 2015). Também é importante destacar que as ME podem fazer com que o tempo de liberação dos fármacos em nanoestruturas seja diferente em relação aos fármacos livres, ou seja, a liberação lenta de um fármaco pode garantir um efeito mais prolongado e menos tóxico (DALMORA; DALMORA; OLIVEIRA, 2001).

5.1 Modelos de metástase *in vivo*

O modelo de metástase espontâneo é caracterizado pela formação do tumor primário com consequente entrada das células tumorais na corrente sanguínea para formar metástases em órgãos distantes. Através deste modelo é possível estudar a atuação do fármaco no tumor primário e na inibição da metástase. No modelo singênico as células tumorais usadas são da mesma espécie do animal, ainda, os modelos ortotópicos utilizam células da mesma origem onde serão injetados (ex.: células de mama injetadas na mama do animal) (ECKHARDT; FRANCIS; PARKER; ANDERSON, 2012; KHANNA; HUNTER, 2005).

O modelo utilizado nesse trabalho foi o de metástase espontânea singênico ortotópico sem cirurgia do tumor primário, com injeção das células tumorais de mama de camundongo da linhagem 4T1.13ch5T1 no tecido adiposo da quarta mama de camundongas (IMFP- *Intramamary Fat Pad*) Balb/c. A linhagem 4T1.13ch5T1 é modificada geneticamente, no qual foi inserido em seu DNA genômico uma marcação com a fluorescência “mCherry” que auxilia na detecção de metástases em órgãos como pulmões, coluna vertebral e fêmures através de PCR multiplex em tempo real (CARTER; MICOCCHI; NATOLI; REDVERS *et al.*, 2015).

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Síntese do sistema lipídico nanoestruturado do tipo microemulsão (ME) do complexo Ru(Amsal)

O sistema lipídico nanoestruturado do tipo microemulsão (ME) do complexo Ru(Amsal), abreviado de complexo Ru(Amsal)_{ME}, foi sintetizado e caracterizado pelo Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Sistemas de Liberação de Fármacos Baseados em Nanotecnologia, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *campus* Araraquara, sob responsabilidade do Prof. Dr. Marlus Chorilli e da aluna de pós-doutorado Dr. Patrícia B. Silva, como descrito anteriormente (DE FREITAS; DA SILVA; CHORILLI; BATISTA *et al.*, 2014).

Resumidamente, este sistema apresenta a seguinte composição: 10% de fase oleosa (colesterol), 10% de surfactante (fosfatidilcolina de soja, oleato de sódio e Eumulgin HRE 40 [óleo de ricino de polioxil 40 hidrogenado]; na proporção 3:6:8, respectivamente) e 80% de fase aquosa (tampão fosfato, pH 7,4). Esta mistura foi sonicada (potência de 700 watts e amplitude de 20%) durante 10 minutos com um intervalo de 30 segundos a cada minutos, com banho de gelo durante todo o processo. Posteriormente a obtenção da formulação, incorporou-se os compostos no sistema lipídico nanoestruturado homogeneizando a respectiva massa de composto e o volume adequado de formulação. A mistura foi sonicada nas mesmas condições descritas anteriormente, durante adicionais 2 minutos. Então, após 24 horas do preparo foi realizada a caracterização da formulação através dos ensaios de dispersão de luz dinâmica e do potencial zeta para medição do tamanho das partículas e estabilidade, respectivamente.

6.1.2 Dispersão de luz dinâmica

A determinação do diâmetro e índice de polidispersividade foi realizada pela técnica de correlação de fótons, utilizando-se o equipamento de dispersão dinâmica de luz Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK (SILVAI; SANTANAI; BEDORII; BORBAIL *et al.*, 2009).

6.1.3 Potencial zeta

A análise de potencial zeta foi realizada por meio da determinação da mobilidade eletroforética, em que foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK.

6.2 Linhagens celulares

As células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 foram cultivadas como previamente descrito (item

3.2 Linhagens celulares e padronização do cultivo *in vitro*). As células tumorais de mama de camundongo 4T1.13ch5T1 foram cultivadas em meio *Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification* (α -MEM), contendo FBS (5%), bicarbonato de sódio (2,2 mg/mL), cloreto de sódio (4 mg/mL), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As linhagens celulares utilizadas foram mantidas em uma incubadora úmida com 5% de CO₂ e a 37°C. As células 4T1.13ch5T1 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Richard Redvers do

Olivia Newton-John Cancer Research Institute na Austrália. A linhagem não tumoral de camundongo L929 foi cultivada em meio DMEM - *High Glucose* contendo 5% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos apropriados.

6.3 Ensaio *in vitro* de citotoxicidade

A citotoxicidade do complexo Ru(Amsal)_{ME} e da base do sistema lipídico nanoestruturado do tipo microemulsão (Base)_{ME} foi avaliada em diferentes tipos de células pelo método do MTT, conforme descrito anteriormente. Neste ensaio, além da linhagem tumoral de mama humana, MDA-MB-231, outras duas linhagens de camundongos, 4T1.13ch5T1 (tumoral) e L929 (não tumoral), foram utilizadas para complementar a análise do complexo Ru(Amsal), (Base)_{ME} e do Ru(Amsal)_{ME}.

6.4 Modelo *in vivo* de metástase

6.4.1 Procedimentos éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSCar (CEUA nº 2736071020).

6.4.2 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas Balb/c, entre 6 a 8 semanas de vida, hospedados em gaiolas coletivas em temperatura ambiente controlada a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sob ciclo claro-escuro de 12 horas com comida e água *ad libitum*.

6.4.3 Formação de metástase espontânea do tumor primário

Neste modelo, 1×10^5 células/20µL/camundongo da linhagem 4T1.13ch5T1 foram injetadas no tecido adiposo da quarta mama de camundongos fêmeas Balb/c. A injeção foi realizada com auxílio de uma seringa Hamilton de 50µL nos animais anestesiados com isoflurano. Assim que o tumor tornou palpável (após 8 dias da injeção), os camundongos foram tratados diariamente (segunda a sábado) com o complexo Ru(Amsal)_{ME} (1,5 mg/kg) através de injeções intraperitoneais invertendo os lados das injeções para evitar lesões. Os animais foram divididos em três grupos de tratamento conforme descrito abaixo:

1. **Grupo Salina:** somente tratado com solução salina (**n=15**);
2. **Grupo (Base)_{ME}:** somente tratado com o polímero do nanoencapsulamento (**n=15**);
3. **Grupo Ru(Amsal)_{ME}:** somente tratado com o complexo **RuAmsal** nanoencapsulado (**n=15**);

Após vinte e sete dias da injeção das células tumorais foi realizada a eutanásia dos animais. Durante todo o período do experimento os camundongos foram monitorados através do peso corporal e seu tumor primário foi mensurado com o uso de um paquímetro. Os tumores foram medidos quanto a sua altura e comprimento e estas medidas foram usadas para calcular o volume do tumor e consequentemente, inferir seu peso (volume $\text{mm}^3 = \text{comprimento} \times \text{comprimento} \times \text{altura}$). No dia da eutanásia foram avaliadas as metástases visíveis e coletados os fêmures, coluna espinhal e pulmões para análise da carga tumoral relativa ou *relative tumor burden* (RTB) através de análise do DNA genômico (DNAg). Os órgãos coletados para RTB foram congelados em nitrogênio líquido para posterior extração de DNAg. Os tumores primários, baço e fígado também foram pesados para avaliar de forma indireta indícios de metástases. A RTB foi avaliada após a extração de DNAg utilizando-se a técnica de PCR quantitativo Taqman (Taqman® Fast Universal PCR Master Mix 2x – Applied Biosystems, Life Technologies).

6.4.4 Extração do DNAg

Para a extração do DNAg os órgãos foram homogeneizados em tampão de lise sem SDS (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 100mM EDTA, pH 7,5) em homogeneizador FastPrep®-24 em tubos (MP *tubes*) contendo *beads* de aço inox e/ou cerâmica (1 *bead* grande e duas pequenas para ossos, e 3 *beads* pequenas para tecidos moles). Foram realizados 3 ciclos de homogeneização de 1 minuto com intervalo de 5 minutos (ciclo 6m/s). Parte do homogeneizado foi digerido em tampão de lise contendo SDS, Proteinase K e RNase A (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 100mM EDTA, 1% SDS pH7,5; 2 μL /mL de proteinase K e de RNase A, estoque a 10 mg/mL) a 55°C *overnight*. No dia seguinte, foram adicionados 350 μL de uma solução super-saturada de NaCl ($\geq 5\text{M}$), os tubos foram agitados e incubados no gelo por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 4°C e 16000rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado etanol 100% até a precipitação do DNA. Este DNAg formado foi transferido para um tubo contendo etanol 70% e centrifugado

por 5 minutos a 13000rpm. O *pellet* formado foi lavado novamente com 500µL de etanol 70%, em seguida, o sobrenadante foi colhido por inversão do tubo e o restante de etanol foi retirado com auxílio de uma pipeta. O DNA foi seco em fluxo de ar e em seguida ressuspendido em 200µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0). O DNAg foi quantificado em Nanodrop e 40ng foram utilizados nas reações de PCR em tempo real.

6.4.5 Carga tumoral relativa ou *Relative Tumor Burden* (RTB)

A RTB para cada animal foi calculada através de PCR em tempo real multiplex usando Taqman®. O DNAg foi sujeito ao PCR multiplex para detectar o *cycle Threshold* (Ct), definido logo acima da linha de base dos níveis de fluorescência para vimentina (presente em todos os tecidos dos animais) e mCherry (presente somente nas células tumorais). Através da comparação dos valores de Ct da vimentina e do mCherry em cada amostra, o ΔCt foi calculado pela subtração do Ct mCherry menos o Ct da Vimentina, em seguida, o valor de ΔCt foi usado na seguinte fórmula $RTB = 10.000/2^{\Delta Ct}$. Usando-se essa fórmula os tecidos com valores zero são considerados sem tumor, cujo um tecido com valor de 10.000 é composto totalmente por tumor. Estes dados foram analisados conforme descrito por Sloan e colaboradores para análise da RTB (SLOAN; POULIOT; STANLEY; CHIA *et al.*, 2006). Os *primers* e as *probes* utilizadas foram estão especificados na Tabela 4.

Tabela 4 - Primers e probes utilizados no experimento de PCR em tempo real para determinação da Relative Tumor Burden (RTB).

Probe mVim: VIC-CCT TCA TGT TTT GGA TCT CAT CCT GCA GG – TAMRA
Primer mVim Foward: 5' AGC TGC TAA CTA CCA GGA CAC TAT TG 3'
Primer mVim Reverse: 5'CGA AGG TGA CGA GCC ATC TC 3'
Probe mCherry: 6FAM-CAG CTG CCC GGC GCC TAC A-TAMRA
Primer mCherry Foward: 5' GAC CAC CTA CAA GGC CAA GAA G 3'
Primer mCherry Reverse: 5' AGG TGA TGT CCA ACT TGA TGT TGA 3'

A reação do PCR foi realizada conforme especificado na Tabela 5.

Tabela 5 - Componentes da PCR em tempo real Taqman para os ensaios *in vivo*.

Reação de PCR Taqman	
Reagentes (concentração final)	Volume
Master Mix 2x	5µl
<i>Primers Forward + Reverse Vimentina (1µM)</i>	0,5µl
<i>Probe Vimentina (1µM)</i>	0,5µl
<i>Primers Forward + Reverse Cherry (1µM)</i>	0,5µl
<i>Probe Cherry (1µM)</i>	0,5µl
Água	1µl
DNAg (40ng)	2µl

6.4.6 Análise de peso corporal e dos órgãos

Durante o ensaio de formação de metástases espontâneas os animais foram pesados para acompanhamento do peso. A pesagem foi iniciada no primeiro dia após a injeção das células da linhagem 4T1.13ch5T1 no tecido adiposo da quarta mama dos camundongos e os registros seguiram a cada dois dias até a eutanásia dos animais.

Após a eutanásia o coração, o fígado, o rim e o baço de cada animal foram coletados, analisados macroscopicamente e pesados em balança eletrônica. Esses órgãos foram escolhidos por serem órgãos que podem estar alterados em caso de toxicidade e formação de metástases.

6.4.7 Análise histológica do coração, rim e baço

Os órgãos coletados (coração, rim e baço) foram fixados em 10% de formalina tamponada durante 24 horas e lavados em água corrente por 1 hora. Em seguida, os mesmos foram submetidos a processamento histológico, passando pelas etapas de desidratação (1 hora em cada um dos seguintes banhos: álcool 70%, álcool 80%, álcool 95%, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III), clarificação (1 hora em cada um dos seguintes banhos: xilol I e xilol II) e impregnação (1 hora em banho de parafina I e 2 horas em parafina II). Posteriormente, os órgãos embebidos em parafina (blocos de parafina) e foram cortados no sentido longitudinal utilizando-se um micrótomo rotativo (Leica), obtendo cortes com espessura de 5µm. Em seguida, o processo de coloração com hematoxilina e eosina (HE) foi realizado para análise morfológica e estrutural. As lâminas foram digitalizadas no microscópio *panoramic desk* (3DHISTECH) e as imagens foram analisadas com o *software* 3DHISTECH. A análise foi gentilmente supervisionada pela patologista Dra. Mayara Caroline Rosolem.

6.4.8 Análise Bioquímica

Para as análises bioquímicas, o sangue dos camundongos foi coletado por punção cardíaca e armazenado em tubos contendo anticoagulante (EDTA 10%). Logo após a coleta, o sangue foi armazenado sob refrigeração e centrifugado a 2000rpm por 10 minutos para a obtenção do plasma. Este foi recolhido e parte mantido refrigerado a 4°C, e parte mantido congelado a -20°C de acordo com as indicações dos kits de análises utilizados. As análises para determinação da ureia, creatinina e transaminase oxalacética (TGO) foram realizadas de acordo com instruções dos kits: Transaminase Oxalacética (LABORLAB); Creatinina (LABORLAB) e Ureia CE (LABORLAB). As leituras foram realizadas no fluorímetro Synergy H1 (Biotek), sediado junto ao Laboratório LERCI, localizado no DQ da UFSCar.

6.4.9 Células tumorais circulantes (CTCs)

Este ensaio visa analisar se os tratamentos foram capazes de reduzir o número de células tumorais circulantes nos animais, verificando seu efeito citostático e citotóxico. Para o isolamento das células tumorais circulantes (CTCs), amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo 100µL de EDTA 1%. As amostras foram então centrifugadas a 3500rpm por 5 minutos, ressuspensas em 1mL de tampão de lise de eritrócitos (NH₄Cl 150mM, KHCO₃ 1mM, EDTA 100nM) e incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos. Após o tempo de incubação, foi realizada uma nova centrifugação a 3500rpm por 5 minutos. Finalmente, as amostras foram ressuspensas em 100µL de α -MEM contendo 5% de FBS, 1% de penicilina e estreptomicina, e adicionado 100µL de sangue inicialmente coletado. Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços nos seguintes volumes: 100µL, 50µL e 25µL (poço/animal). As placas foram então incubadas à 37°C a 5% de CO₂ por 10 dias e coradas com cristal violeta para contagem do número de colônias formadas.

6.5 Análise estatística

Para a análise estatística do ensaio *in vitro* foi utilizado o *software* GraphPad Prism versão 6.0. Foram calculados a média e o desvio padrão e em seguida foi realizada análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnet para determinar se os resultados foram

estatisticamente diferentes em relação aos controles. Para os ensaios *in vivo* o test t de Student foi aplicado.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os resultados promissores *in vitro* apresentados até o momento, a realização de estudos *in vivo* se tornou necessária para avanço do conhecimento do potencial do complexo Ru(Amsal), porém um problema encontrado nos testes *in vivo* foi a baixa solubilidade deste complexo em soluções aquosas em altas concentrações. Portanto, uma microemulsão do complexo foi preparada, seguida da avaliação *in vitro* para verificar se seus efeitos permaneceram os mesmos ou se foram atenuados ou potencializados. Posteriormente a obtenção destes resultados, ensaios *in vivo* foram realizados.

7.1 Caracterização físico-química do complexo Ru(Amsal) incorporado em microemulsão

Na composição da microemulsão, além da fosfatidilcolina, foi utilizado também o colesterol que é essencial para a estabilidade e função das membranas celulares. O complexo Ru(Amsal) incorporado à microemulsão (Ru(Amsal)_{ME}) na concentração de 15 mg/mL foi analisado por dispersão de luz dinâmica e quanto ao seu potencial zeta. As análises do tamanho das gotículas sub-microscópicas do complexo Ru(Amsal)_{ME} e somente da microemulsão (Base)_{ME} foram determinadas através da técnica de espalhamento de luz dinâmico, também denominada espectroscopia de correlação de fótons, cuja técnica fornece o raio hidrodinâmico das partículas coloidais. A uniformidade da distribuição do tamanho das gotículas é medida pelo índice de polidispersão (IPD). O baixo valor de IPD do complexo Ru(Amsal)_{ME} demonstrou uma distribuição do tipo monomodal e homogênea das gotículas. Para um sistema ser considerado uma microemulsão é necessário que o tamanho de suas gotículas esteja entre 20 e 500 nm. Portanto, podemos estimar que o sistema seja uma microemulsão (DE FREITAS; DA SILVA; CHORILLI; BATISTA *et al.*, 2014; GUPTA; ERAL; HATTON; DOYLE, 2016).

O potencial zeta é utilizado para medir a carga na superfície da microemulsão, indicando a estabilidade da nanoestrutura a longo prazo. Este é determinado indiretamente usando o princípio da mobilidade eletroforética e os valores do potencial zeta que variam entre $< + 30$ mV ou $> - 30$ mV são considerados bons indicadores de estabilidade a longo prazo. Um valor negativo e elevado do potencial zeta é importante na estabilidade da emulsão, com aumento das forças repulsivas entre as gotículas que evitam a floculação (SINGH; MEHER; RAVAL;

KHAN et al., 2017). Comparando o complexo Ru(Amsal)_{ME} e a Base_{ME} não se observa uma variação significativa do potencial zeta com a incorporação do complexo Ru(Amsal) (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados da caracterização físico-química das microemulsões incorporadas ou não com o complexo de rutênio Ru(Amsal).

Amostra	Tamanho (nm)	Índice de polidispersividade	Potencial zeta (mV)
Base _{ME}	152,2 ± 4,065	0,164 ± 0,021	-34,1 ± 1,75
Ru(Amsal) _{ME}	155,3 ± 1,968	0,362 ± 0,027	-33,5 ± 1,86

7.2 Ensaios *in vitro* de citotoxicidade

Neste ensaio foi avaliada a citotoxicidade do complexo Ru(Amsal)_{ME} na linhagem tumoral de mama humana, MDA-MB-231 e outras duas linhagens de camundongos, 4T1.13ch5T1 (tumoral) e L929 (não tumoral). Para permitir comparações os valores de IC₅₀ do complexo Ru(Amsal) com as células MDA-MB-231 foram representados (Tabela 7).

Os resultados mostram que houve aumento no IC₅₀ após o tratamento das células MDA-MB-231 com o complexo Ru(Amsal)_{ME} nos tempos de 24 e 48 horas (16,67 e 5,28μM), quando comparado com as células que receberam o tratamento com o complexo Ru(Amsal) não formulado (3,68 e 0,15μM). O mesmo aconteceu com as células tumorais de camundongo 4T1.13ch5T1 que quando tratadas com o complexo Ru(Amsal)_{ME} tiveram um aumento do IC₅₀ em 24 e 48 horas (4,88 e 1,62μM) quando comparado com o complexo Ru(Amsal) não formulado (2,32 e 1,24μM). É importante destacar que conforme observado no tratamento das células com o complexo Ru(Amsal), o complexo em microemulsão Ru(Amsal)_{ME} também foi seletivo para a linhagem tumoral de camundongo quando comparado a linhagem não tumoral L929 (IC₅₀ 47,8μM em 24 horas e 6,35μM em 48 horas).

Adicionalmente foram apresentados os resultados dos ensaios de 24 e 48 horas de incubação apenas com a base do sistema lipídico nanoestruturado do tipo microemulsão (Base_{ME}) para verificar se o efeito que estava ocorrendo era devido a combinação com o complexo Ru(Amsal) ou apenas da base_{ME}. Os resultados demonstraram que o IC₅₀ das células tratadas apenas com a base_{ME} é superior ao IC₅₀ encontrado quando se tem a adição do complexo Ru(Amsal), demonstrando assim que o efeito citotóxico encontrado é resultado da

formulação (Tabela 7). A Base_{ME} é um sistema lipídico, e nas maiores concentrações ela forma uma película entre a célula e o meio de cultura, no qual impede o contato da célula com o meio e pode justificar a citotoxicidade apresentada no tempo de 48 horas nas linhagens testadas.

Complexos contendo núcleos dimetálicos de Ru₂(II, III) coordenados a fármacos anti-inflamatórios não esteroides (FAINEs) também demonstraram limitações para seu uso na clínica devido à baixa solubilidade em água e consequente dificuldade de administração intravenosa. Para superar este problema, esses complexos foram encapsulados em nanopartículas lipídicas com o objetivo de melhorar a solubilidade e eficácia desses metalofármacos. Em concordância com nossos resultados, o complexo metálico dessa classe nanoencapsulado Ru₂(NSAID)-SPLNs também mostrou ser citotóxico para as células da linhagem MDA-MB-231 (ALVES RICO; ABBASI; RIBEIRO; AHMED *et al.*, 2017).

Tabela 7 - Atividade citotóxica dos complexo Ru(Amsal), Ru(Amsal)_{ME} e Base_{ME} em células tumorais de mama humano MDA-MB-231, células tumorais de mama de camundongo 4T1.13ch5T1 e não tumoral de camundongo L929, após 24 e 48 horas de incubação. O experimento foi realizado em triplicata. DP = desvio padrão.

Linhagem celular	Tempo (h)	IC ₅₀ ± DP (μM)		
		Ru(AmSal) _{ME}	Base _{ME}	Ru Amsal
MDA-MB-231	24	16,67 ± 1,57	>100	3,68 ± 0,15
	48	5,28 ± 0,86	27,95 ± 1,44	0,15 ± 0,04
4T1.13ch5T1	24	4,88 ± 0,24	>100	2,32 ± 0,99
	48	1,62 ± 0,36	69,72 ± 3,83	1,24 ± 0,14
L929	24	47,8 ± 0,53	----	----
	48	6,35 ± 0,78	----	----

7.3 Ensaios *in vivo* de metástase

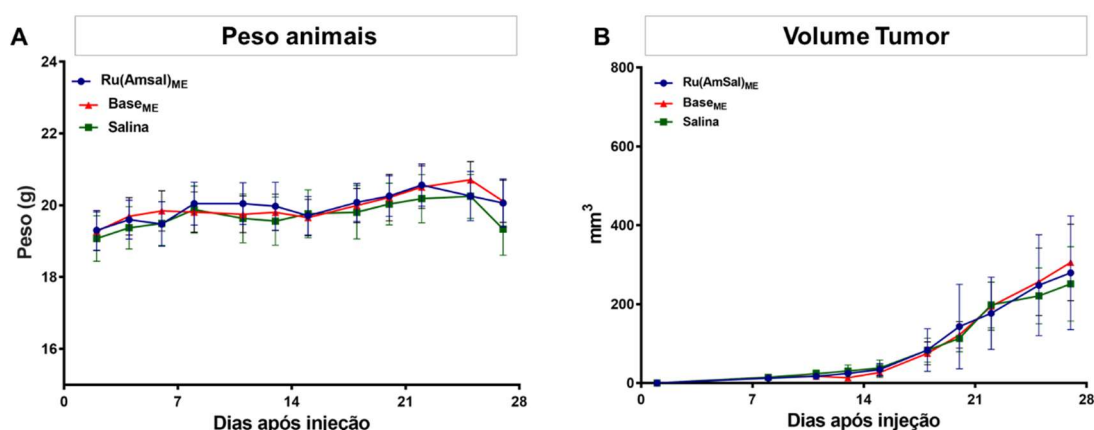
7.3.1 Modelo de formação de metástase espontânea singênico ortotópico sem cirurgia

Para avaliação dos efeitos antitumorais e antimetastáticos *in vivo* do complexo Ru(Amsal)_{ME} foi utilizado o modelo animal ortotópico e singênico de metástase espontânea. As células tumorais da linhagem 4T1.13Ch5 foram injetadas no tecido adiposo da quarta mama de camundongos Balb/c fêmeas e quando os tumores se tornaram palpáveis (8º dia após a injeção das células tumorais), os animais foram tratados com a microemulsão do complexo Ru(Amsal)_{ME} na dose de 1,5 mg/Kg. As doses foram administradas por via intraperitoneal

diariamente de segunda a sábado por 3 semanas, contabilizando 18 doses. As medidas do tamanho e peso dos animais foram realizadas 3 vezes por semana. Para analisar o efeito isolado da base da microemulsão (Base_{ME}) *in vivo*, outro grupo controle com solução salina foi avaliado para efeito comparativo.

Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística entre os grupos experimentais em relação ao peso dos animais e ao volume do tumor. No entanto, é possível observar que os camundongos tratados com salina apresentaram uma pequena redução do peso em relação aos grupos Base_{ME} e $\text{Ru}(\text{Amsal})_{\text{ME}}$ a partir do 24º dia após a injeção (Figura 22).

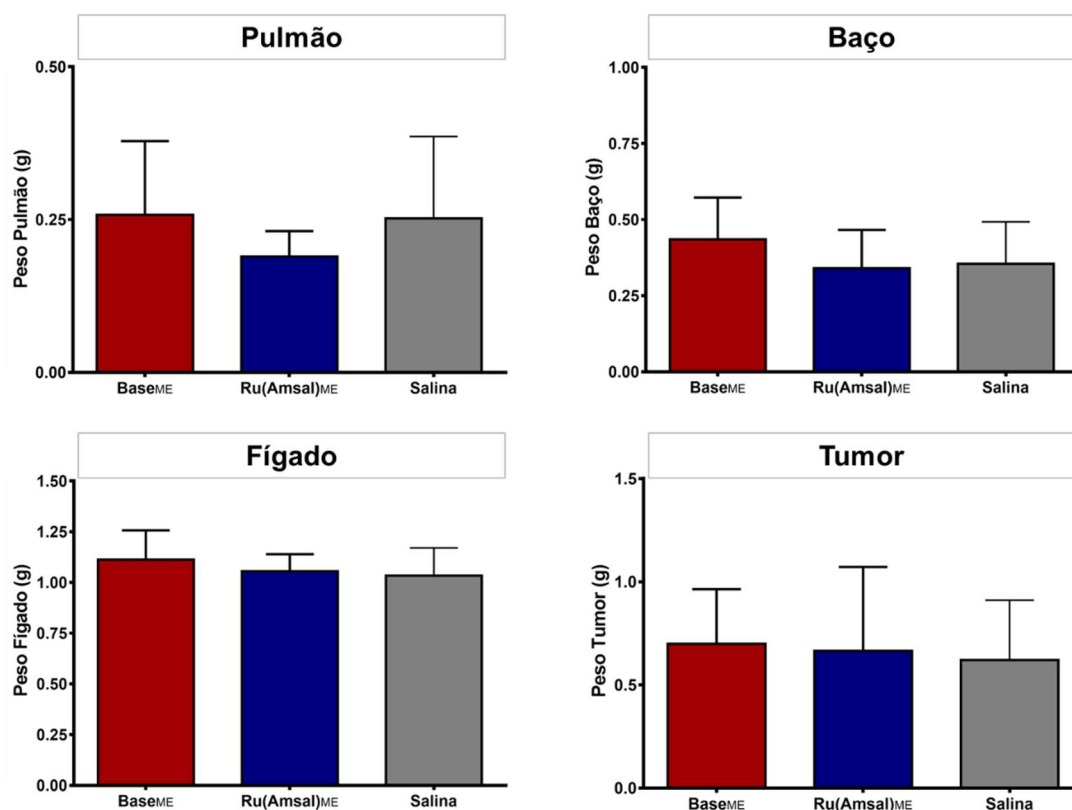
Figura 22 - Efeitos do tratamento do complexo $\text{Ru}(\text{Amsal})_{\text{ME}}$ no peso (g) dos camundongos pelo período de 27 dias (A) Efeitos do complexo $\text{Ru}(\text{Amsal})_{\text{ME}}$ na área (mm^3) do tumor primário dos camundongos após 27 dias (B). Tratamento com o Salina refere-se aos camundongos que receberam apenas salina e o Base_{ME} refere-se aos camundongos que receberam apenas o tratamento com a base da microemulsão.



Neste modelo ortotópico e singênico a progressão tumoral desencadeia processos inflamatórios, levando ao aumento do número de células do sistema imunológico, que em alguns tipos de câncer auxiliam a progressão e infiltração do tumor. Assim como os linfonodos, o baço atua como um filtro sanguíneo que desempenha um papel fundamental no início da resposta imune e nas reações aos patógenos, vírus ou ao câncer. Em média, o peso esplênico dobra em tamanho em camundongos com tumores implantados e este aumento do tamanho do baço reflete a carga tumoral total no animal (LEWIS; WILLIAMS; EISENBARTH, 2019). Em contrapartida, o aumento no tamanho dos pulmões e fígado está relacionado a presença de nódulos tumorais secundários. Visivelmente durante a eutanásia, os baços dos camundongos dos grupos controles (salina e Base_{ME}) e do grupo tratado com $\text{Ru}(\text{Amsal})_{\text{ME}}$ estavam aumentados e alguns pulmões retirados de animais destes grupos apresentavam metástases visíveis. Nenhum órgão (baço, fígado e pulmão) apresentou

diferença significativa de massa entre os controles e o grupo tratado com $\text{Ru(Amsal)}_{\text{ME}}$, apresentando valores médios próximos (Figura 23).

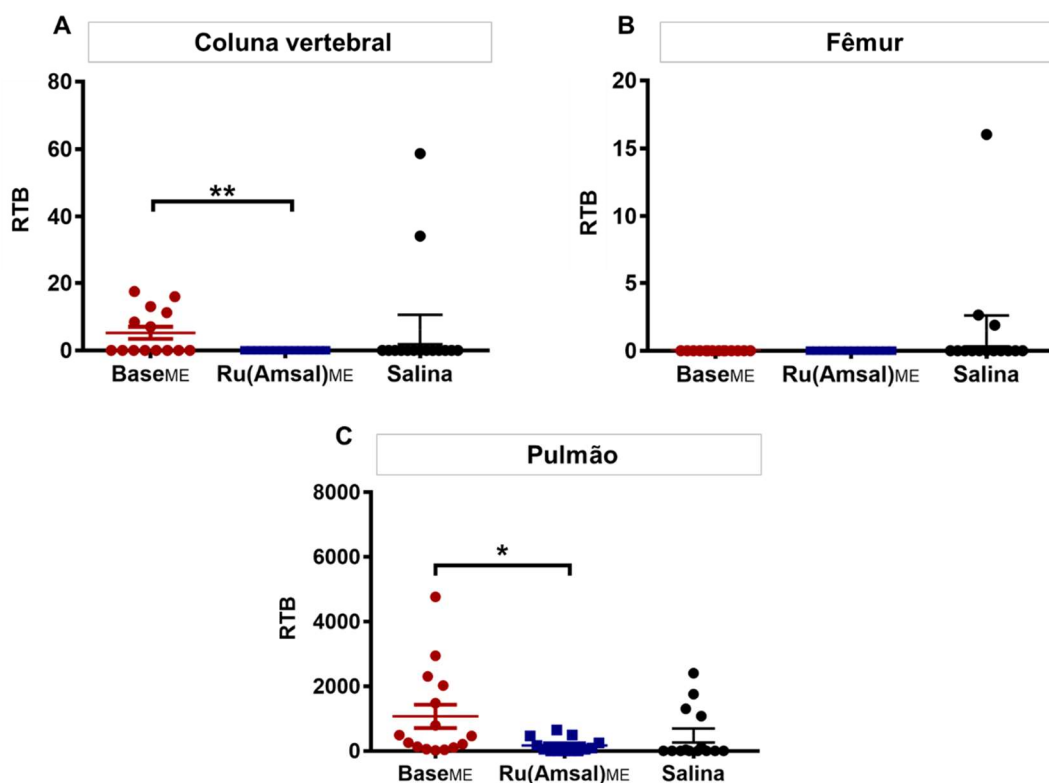
Figura 23 - Efeitos dos tratamentos com o complexo $\text{Ru(Amsal)}_{\text{ME}}$, Base_{ME} e Salina no peso (g) dos órgãos (pulmão, baço, fígado e tumor primário) dos camundongos, coletados no momento da eutanásia.



A fim de se verificar o RTB, um indicador de metástases, órgãos como pulmões, coluna vertebral e fêmures dos animais foram coletados e submetidos à extração de DNAg para a detecção da presença do gene mCherry (exclusivo das células tumorais) e mVimentina (presente em todas as células) nesses órgãos através de PCR multiplex em tempo real. Através dessa técnica, como pode ser observado na Figura 24A, houve redução significativa da RTB na coluna vertebral com o tratamento $\text{Ru(Amsal)}_{\text{ME}}$ comparado aos controles Base_{ME} e Salina, no entanto, não houve diferença entre os grupos na carga tumoral relativa dos fêmures (Figura 24B). Nos pulmões, o tratamento com o complexo $\text{Ru(Amsal)}_{\text{ME}}$ houve redução significativa de RTB quando comparado ao controle Base_{ME} . É possível verificar também que o grupo tratado com solução salina apresentou uma carga tumoral alta nos pulmões em relação ao grupo tratado com o complexo $\text{Ru(Amsal)}_{\text{ME}}$ (Figura 24C). De acordo com os resultados apresentados, é importante ressaltar que o tratamento com complexo $\text{Ru(Amsal)}_{\text{ME}}$ não inibiu o crescimento

do tumor primário mas foi eficaz na inibição do desenvolvimento de metástase pulmonar e óssea.

Figura 24 - Efeito dos tratamentos com o complexo Ru(Amsal)_{ME}, Base_{ME} e Salina na Relative Tumor Burden (RTB) do modelo de formação de metástase espontânea. (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$)

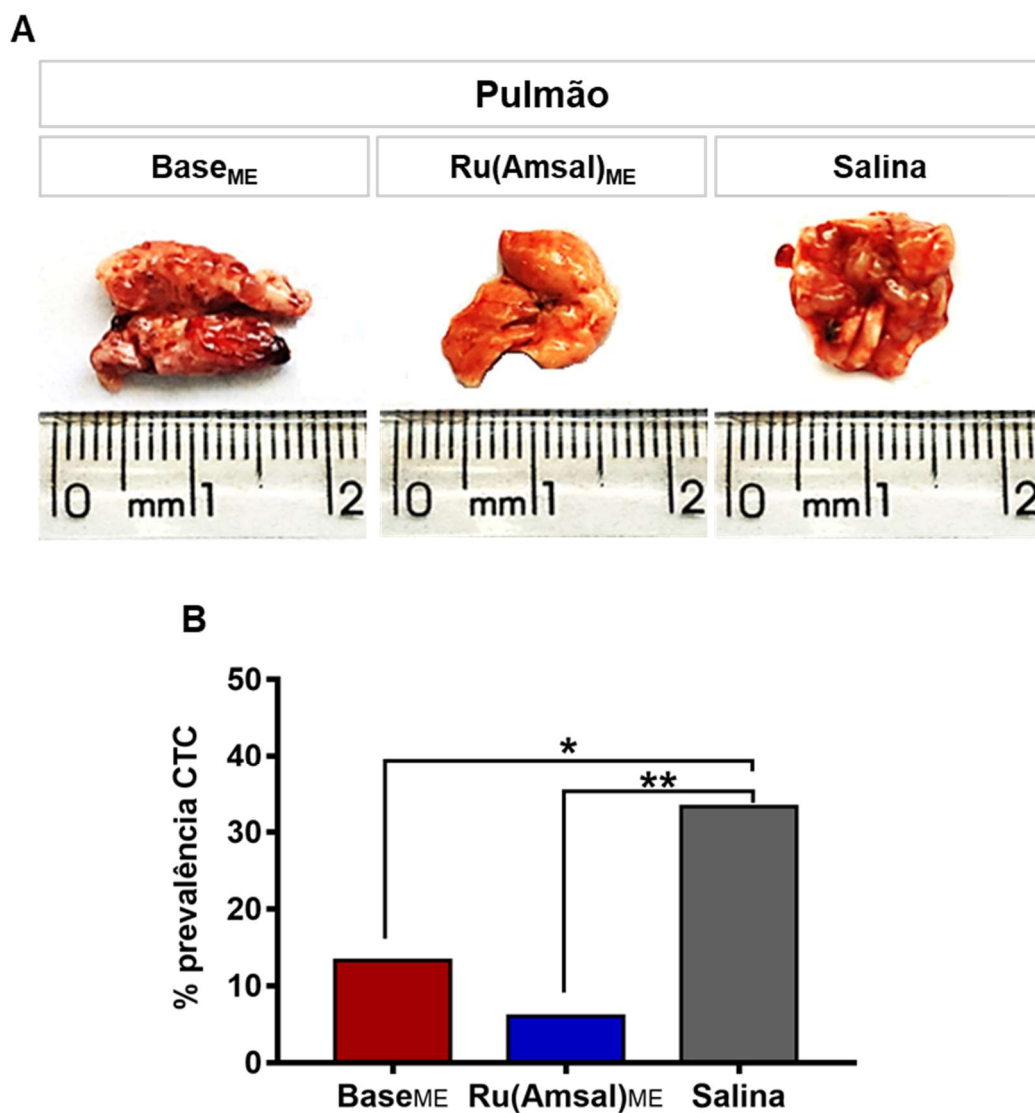


As diferenças mencionadas com relação à carga tumoral puderam ser observadas também através de análise visual. Na Figura 25A podemos observar as metástases pulmonares do grupo Base_{ME}, salina e proeminente redução destas no grupo tratado com o complexo Ru(Amsal)_{ME}.

As células tumorais circulantes (CTCs) são células originárias de tumores primários ou secundários que conseguiram entrar na corrente sanguínea e se disseminar por todo corpo como parte do processo metastático. A identificação de CTCs no sangue periférico é muito importante, pois auxilia na detecção precoce, monitoramento da doença e atualmente é um indicador prognóstico bem estabelecido no câncer de mama metastático (BIDARD; PROUDHON; PIERGA, 2016). Como pode ser observado na Figura 25B, o grupo Salina apresentou maior prevalência de CTCs (33%) quando comparado aos grupos Ru(Amsal)_{ME} (6%) e Base_{ME} (13,3%). A redução dos CTCs pelo complexo Ru(Amsal)_{ME} pode estar

relacionado a capacidade do complexo em inibir etapas específicas do processo metastático como migração, invasão e desta forma impedir a saída das células do tumor primário.

Figura 25 – Efeito do complexo Ru(Amsal) em metástases e células tumorais circulantes. **(A)** Imagem representativa das metástases pulmonares dos tratamentos com o complexo Ru(Amsal)_{ME}, Base_{ME} e Salina. **(B)** Prevalência em % de células tumorais circulantes (* $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,0001$).

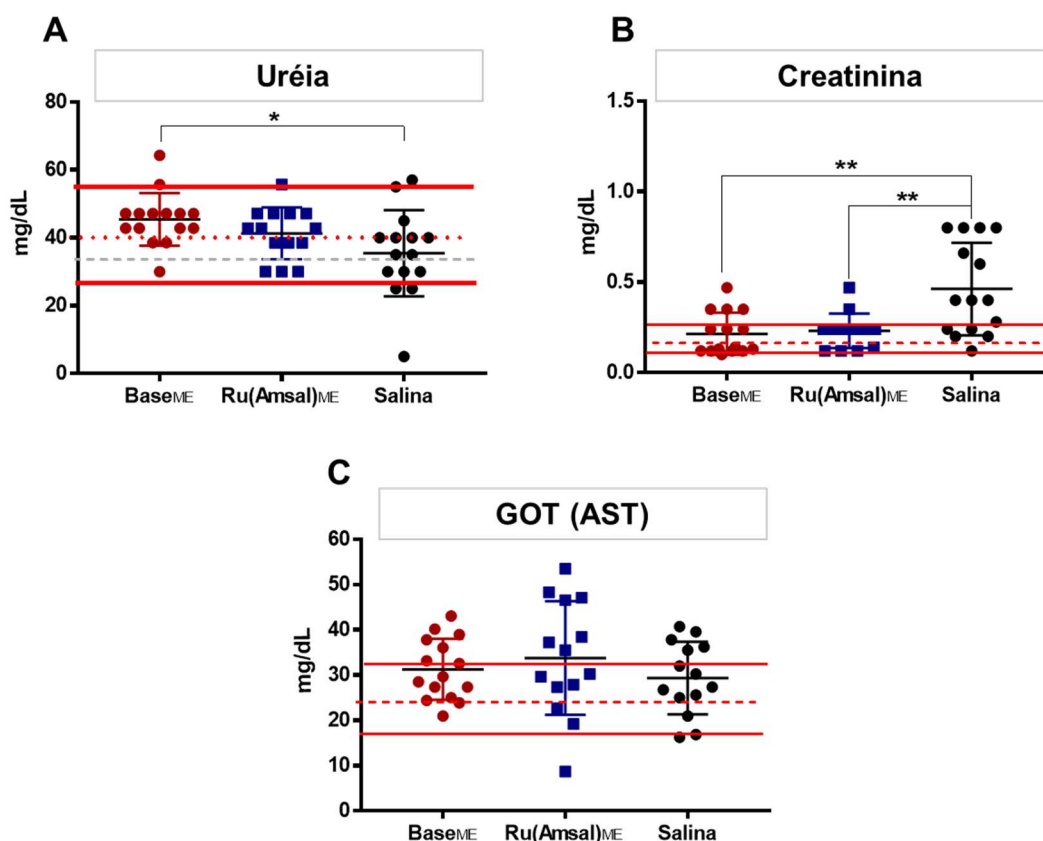


Neste trabalho foram avaliados também os níveis plasmáticos de ureia, creatinina e aspartato aminotransferase (AST) (Figura 26). A quantificação de transaminases auxilia na avaliação da função hepática, já a análise da creatinina, que em geral é realizada em conjunto com a ureia, é útil na avaliação de alterações renais. A AST é uma enzima bilocular (citoplasmática e mitocondrial) amplamente difundida no organismo, presente em maior concentração no fígado e coração. A creatinina é um composto de origem muscular, resultante

da degradação da creatina devido o processo de contração muscular e sua eliminação do organismo ocorre quase exclusivamente por filtração renal. A ureia constitui a fração de nitrogênio não proteico mais importante na maioria dos líquidos biológicos e é o principal produto final do metabolismo proteico. É produzida pelo fígado e excretada pela urina através dos rins e sua elevada concentração pode ser interpretada como uma possível disfunção renal. (PRAXEDES; PIMENTEL; SANTOS; FERNANDES *et al.*, 2018; SODRÉI;; COSTAII;; LIMAI, 2007).

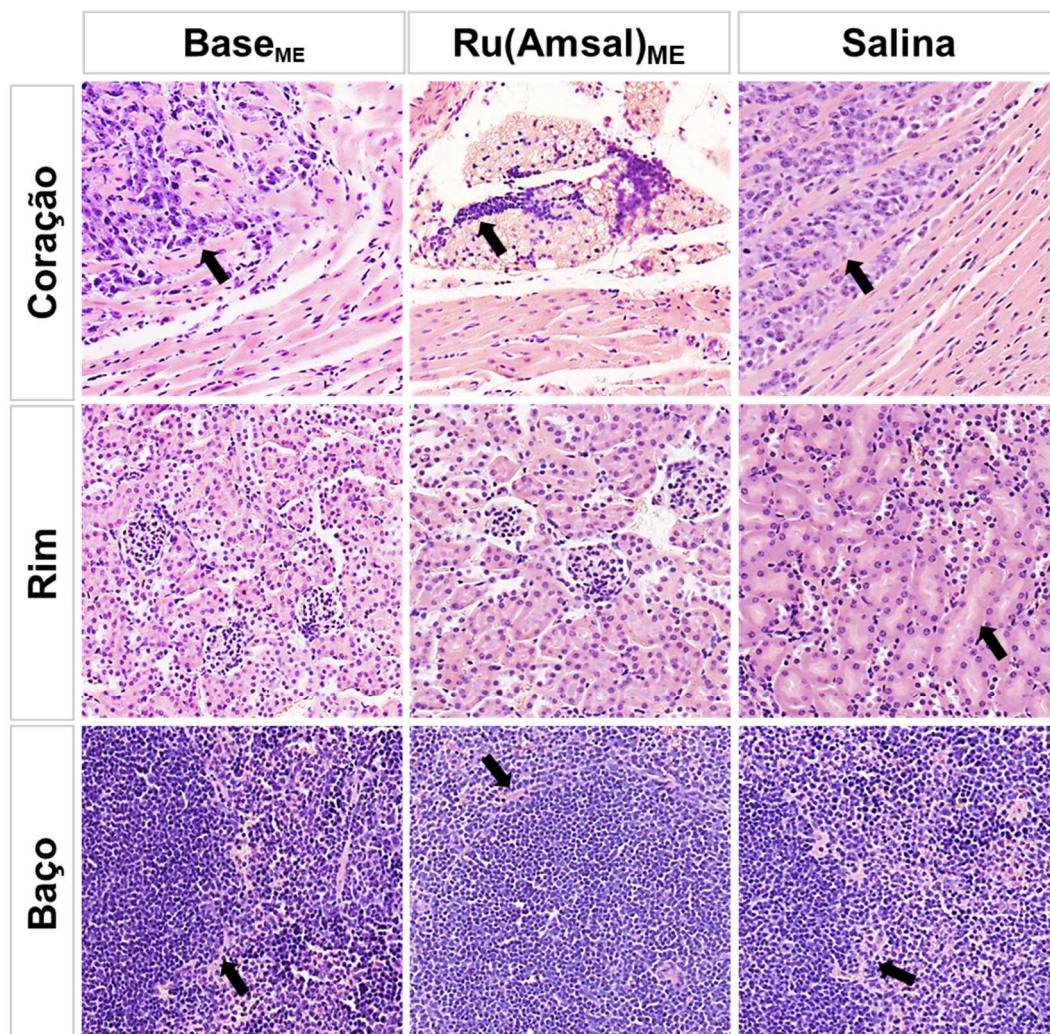
No presente estudo os animais apresentaram variações significativas apenas para dosagem de creatinina, no qual os animais do grupo Salina apresentaram parâmetros elevados em comparação aos valores de referência (indicados em vermelho nos gráficos) (Figura 26B) (SPINELLI;; GODOY;; MOTTA, 2012). Devido a não ocorrência de variações nos valores de ureia (Figura 26A), sugere-se que pela avaliação bioquímica não houve alterações na função renal, apenas a nível muscular. Os animais do grupo Ru(Amsal)_{ME} apresentaram níveis aumentados de AST em comparação aos valores de referência ($25,20 \pm 7,78$ U/L), porém, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 26C), indicando que o tratamento não apresentou sinais de toxicidade nos animais.

Figura 26 - Efeito dos tratamentos com o complexo Ru(Amsal)_{ME}, Base_{ME} e salina nos parâmetros bioquímicos. (A) Toxicidade renal / ureia, (B) Toxicidade renal / creatinina e (C) hepatotoxicidade de GOT (AST). (* $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$)



Na análise histológica foram encontradas alterações morfológicas ou patológicas nos baços, rins e corações analisados (Figura 27). Os animais do grupo Salina e Base ME apresentaram implantação de células ovaladas no coração, com alto pleomorfismo, citoplasmas indistintos, múltiplos nucléolos, cariomegalia, atingindo o pericárdio, epicárdico e miocárdio. Essas características indicam possível metástase cardíaca. Já os animais do grupo Ru(Amsal)_{ME} apresentaram discreto infiltrado inflamatório linfocitário focal, localizado no tecido adiposo no entremeio ao átrio e o ventrículo. Os rins foram os órgãos que menos apresentaram alterações evidentes, no qual apenas os animais do grupo salina apresentaram degeneração tubular aguda, com ausência de núcleos nos túbulos proximais. Na avaliação do baço, todos os grupos apresentaram evidência de muito nódulos linfoides (hiperplasia de polpa branca).

Figura 27 - Análise histológica dos órgãos dos animais corados com HE. Imagens representativas do coração, rim e baço com os diferentes tratamentos (Base_{ME} , $\text{Ru}(\text{Amsal})_{\text{ME}}$ e Salina). As setas indicam as alterações morfológicas ou patológicas promovidas pelos tratamentos.



É recente na literatura o uso de complexos metálicos em sistemas lipídicos nanoestruturados para o tratamento do câncer. Porém, essas alternativas para veiculação de complexos de rutênio são necessárias devido à baixa solubilidade desses complexos em água, limitando sua aplicação *in vivo* (FERRARO; PICCOLO; MISSO; MAIONE *et al.*, 2020). Shen e colaboradores encapsularam o complexo de rutênio polipiridina $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}](\text{Cl})_2$ em lipossomos (Lipo-RU) a fim de melhorar a biodistribuição e propriedades farmacocinéticas do complexo *in vivo*. Para avaliar a eficácia terapêutica os pesquisadores utilizaram um modelo ortotópico de câncer de mama com células da linhagem triplo negativa MDA-MB-231. O complexo Lipo-Ru foi capaz de diminuir drasticamente o crescimento do tumor primário em

comparação com os grupos PBS e o complexo livre (Ru). Ainda, com a utilização de marcadores específicos, os autores conseguiram demonstrar que os tumores do grupo Lipo-Ru apresentavam níveis muito mais elevados de apoptose do que os grupos de controle. O complexo Lipo-Ru também não causou nenhum sinal de toxicidade aguda aos animais (SHEN; KIM; WOLFRAM; MU *et al.*, 2017). Outro estudo com o complexo HoThyRu em um nanossistema lipossômico, denominado de HoThyRu/DOTAP avaliou a eficácia e segurança *in vivo*, bem como seus efeitos sobre a progressão das células tumorais de mama MCF-7. O tratamento com 15 mg/kg da formulação HoThyRu/DOTAP, uma vez por semana durante 28 dias foi capaz de reduzir de forma significativa o peso e volume dos tumores em comparação ao grupo controle. A sobrevivência dos animais foi de 100% e os pesos corporais também não foram afetados pelo tratamento (PICCOLO; MISSO; FERRARO; RICCARDI *et al.*, 2019). Novos complexos de rutênio derivados de NAMI-A contendo piridina (G26b e G94a) foram sintetizados e testados *in vivo* em modelo de câncer de mama com a linhagem 4T1. Os animais foram tratados com 17,5 mg/Kg dos complexos G26b, G94a e NAMI-A e os resultados demonstraram que o tratamento não suprimiu o crescimento do tumor primário, no entanto, houve diminuição significativa de metástases pulmonares pelos complexos G26b, G94a. Não foram registrados toxicidade de retina ou hepatotoxicidade nos camundongos tratados com os complexos (GU; LI; RAN; KANG *et al.*, 2016).

Os resultados descritos na literatura estão de acordo com nosso trabalho mostrando que o tratamento com o complexo Ru(Amsal)_{ME} não foi capaz de diminuir o crescimento do tumor primário, porém inibiu de maneira eficaz o desenvolvimento de metástases pulmonares e ósseas em modelo de câncer de mama *in vivo* com a linhagem celular 4T1.

Capítulo 3 – Considerações finais

8 CONCLUSÕES

Neste trabalho, seis complexos de rutênio com fórmula geral $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{O-O})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ em que (O-O) representa os ligantes ácido salicílico, ácido aminosalicílico e 2,4 – dihidroxibenzóico, foram sintetizados e tiveram sua atividade citotóxica avaliada em células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231, MCF-7 e SK-BR-3 e não tumoral de mama MCF-10A. Todos os complexos testados foram citotóxicos frente as linhagens estudadas, no entanto, o complexo $[\text{Ru}(\text{AmSal})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$, denominado neste trabalho de Ru(Amsal), foi o mais eficaz entre os seis complexos testados e exibiu maior seletividade para a linhagem tumoral de mama triplo negativa MDA-MB-231. Diante desses resultados, o complexo Ru(Amsal) foi selecionado para o estudo do possível mecanismo de ação.

O complexo Ru(Amsal) alterou a morfologia das células MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3 e MCF-10A, apresentando maior efeito sobre as células MDA-MB-231. Além disso, através do ensaio de formação de colônias o complexo reduziu o número e tamanho de colônias das células MDA-MB-231. O Ru(Amsal) também induziu a morte celular por apoptose de maneira depende da concentração, promoveu a fragmentação nuclear e despolarização do potencial de membrana da mitocôndria de células da linhagem MDA-MB231. O complexo também alterou o ciclo celular, aumentando a porcentagem dessas células na fase sub-G1, indicando uma parada do ciclo nesta fase. Através da análise de proteínas relacionadas a cascata apoptótica pelo ensaio de *western blotting*, o complexo Ru(Amsal) promoveu um aumento na expressão de Bax, Caspase-9 e Caspase-3 e diminuição de Bcl-2, sugerindo atuação por ativação da via intrínseca da apoptose. O Ru(Amsal) mostrou-se capaz de atuar em diferentes etapas do processo metastático *in vitro*, inibindo de maneira eficaz a atividade de MMPs, a migração, invasão e adesão celular. Além disso, o complexo alterou a organização do citoesqueleto das células tumorais de mama MDA-MB-231. A análise *in vivo* do complexo Ru(Amsal) sintetizado em sistema nanoestruturado do tipo microemulsão, $\text{Ru(Amsal)}_{\text{ME}}$, em modelo de metástase espontânea singênico ortotópico sem cirurgia, demonstrou que o complexo não inibiu o tumor primário, porém reduziu de maneira significativa as metástases pulmonares e ósseas, sem causar sinais de toxicidade nos animais.

Portanto, o complexo Ru(Amsal) apresenta-se como um promissor candidato a agente terapêutico para o câncer de mama triplo negativo. Entretanto, mais estudos devem ser

realizados a fim de investigar a inserção de ligantes na estrutura do complexo para melhorar sua captação e especificidade ao tumor primário.

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, V. G.; LEHMANN, B. D.; BALLINGER, T. J.; PIETENPOL, J. A. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. **Cancer**, 121, n. 1, p. 8-16, Jan 1 2015.
- ACHARYA, S.; MAJI, M.; RUTURAJ; PURKAIT, K. *et al.* Synthesis, Structure, Stability, and Inhibition of Tubulin Polymerization by Ru(II)-p-Cymene Complexes of Trimethoxyaniline-Based Schiff Bases. **Inorg Chem**, 58, n. 14, p. 9213-9224, Jul 15 2019.
- ACS. American Cancer Society. Cancer Treatment & Survivorship. Facts & Figures. 2020a.
- ACS. BREAST CANCER EARLY DETECTION AND DIAGNOSIS / BREAST BIOPSY. 2020b.
- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Curr Pharm Biotechnol**, 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016.
- ADJEI, I. M.; BLANKA, S. Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: a biomaterials approach. **J Funct Biomater**, 6, n. 1, p. 81-103, Feb 17 2015.
- ALESSIO, E.; MESSORI, L. NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry. **Molecules**, 24, n. 10, May 24 2019.
- ALLARDYCE, C. S. D., P. J. Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects. **Platinum Metals Review**, 45, n. 2, p. 62-69, 2001.
- ALVES RICO, S. R.; ABBASI, A. Z.; RIBEIRO, G.; AHMED, T. *et al.* Diruthenium(ii,iii) metallodrugs of ibuprofen and naproxen encapsulated in intravenously injectable polymer-lipid nanoparticles exhibit enhanced activity against breast and prostate cancer cells. **Nanoscale**, 9, n. 30, p. 10701-10714, Aug 3 2017.
- ANDERSON, R. L.; BALASAS, T.; CALLAGHAN, J.; COOMBES, R. C. *et al.* A framework for the development of effective anti-metastatic agents. **Nat Rev Clin Oncol**, 16, n. 3, p. 185-204, Mar 2019.
- ANTONIOU, A.; PHAROAH, P. D.; NAROD, S.; RISCH, H. A. *et al.* Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. **Am J Hum Genet**, 72, n. 5, p. 1117-1130, May 2003.
- ARPINO, V.; BROCK, M.; GILL, S. E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. **Matrix Biol**, 44-46, p. 247-254, May-Jul 2015.
- BARTSCH, R.; BERGEN, E.; GALID, A. Current concepts and future directions in neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. **Memo**, 11, n. 3, p. 199-203, 2018.
- BECCENERI, A. B.; POPOLIN, C. P.; PLUTIN, A. M.; MAISTRO, E. L. *et al.* The trans-[Ru(PPh₃)₂(N,N-dimethyl-N'-thiophenylthioureato-k(2)O,S)(bipy)]PF₆ complex has pro-

apoptotic effects on triple negative breast cancer cells and presents low toxicity in vivo. **J Inorg Biochem**, 186, p. 70-84, Sep 2018.

BERGAMO, A.; GAIDDON, C.; SCHELLENS, J. H.; BEIJNEN, J. H. *et al.* Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **J Inorg Biochem**, 106, n. 1, p. 90-99, Jan 2012.

BIDARD, F. C.; PROUDHON, C.; PIERGA, J. Y. Circulating tumor cells in breast cancer. **Mol Oncol**, 10, n. 3, p. 418-430, Mar 2016.

BORSIG, L.; LÄUBLI, H. Cell Adhesion During Tumorigenesis and Metastasis. **Encyclopedia of Cancer (Third Edition)** p. 307-314, 2019.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Ministério da Saúde. Tratamento do Câncer. . 2020a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). 2020b.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA).** Estimativa câncer 2020, 2020c. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao>. Acesso em: 29 de novembro de 2020.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA).** Detecção precoce do câncer de mama, 2020d. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-de-mama/acoes-de-controlado/deteccao-precoce>. Acesso em: 29/12/2020.

BRAUNSTEIN, M.; LIAO, L.; LYTTLE, N.; LOBO, N. *et al.* Downregulation of histone H2A and H2B pathways is associated with anthracycline sensitivity in breast cancer. **Breast Cancer Res**, 18, n. 1, p. 16, Feb 6 2016.

BRAVATA, V.; CAMMARATA, F. P.; MINAFRA, L.; MUSSO, R. *et al.* Gene Expression Profiles Induced by High-dose Ionizing Radiation in MDA-MB-231 Triple-negative Breast Cancer Cell Line. **Cancer Genomics Proteomics**, 16, n. 4, p. 257-266, Jul-Aug 2019.

BRENES, O.; ARCE, F.; GATJENS-BONICHE, O.; DIAZ, C. Characterization of cell death events induced by anti-neoplastic drugs cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil on human hepatoma cell lines: Possible mechanisms of cell resistance. **Biomed Pharmacother**, 61, n. 6, p. 347-355, Jul 2007.

BRENTON, J. D.; CAREY, L. A.; AHMED, A. A.; CALDAS, C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? **J Clin Oncol**, 23, n. 29, p. 7350-7360, Oct 10 2005.

BROWN, G. T.; MURRAY, G. I. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. **J Pathol**, 237, n. 3, p. 273-281, Nov 2015.

CAO, Y.; GIOVANNUCCI, E. L. Alcohol as a Risk Factor for Cancer. **Semin Oncol Nurs**, 32, n. 3, p. 325-331, Aug 2016.

CARTER, R. Z.; MICOCCI, K. C.; NATOLI, A.; REDVERS, R. P. *et al.* Tumour but not stromal expression of beta3 integrin is essential, and is required early, for spontaneous dissemination of bone-metastatic breast cancer. **J Pathol**, 235, n. 5, p. 760-772, Apr 2015.

CHATTERJEE, S. J.; MCCAFFREY, L. Emerging role of cell polarity proteins in breast cancer progression and metastasis. **Breast Cancer (Dove Med Press)**, 6, p. 15-27, 2014.

CHEN, S. H.; CHANG, J. Y. New Insights into Mechanisms of Cisplatin Resistance: From Tumor Cell to Microenvironment. **Int J Mol Sci**, 20, n. 17, Aug 24 2019.

CHEN, W. Y.; HOLMES, M. D. Role of Aspirin in Breast Cancer Survival. **Curr Oncol Rep**, 19, n. 7, p. 48, Jul 2017.

COLINA-VEGAS, L.; LUNA-DULCEY, L.; PLUTIN, A. M.; CASTELLANO, E. E. *et al.* Half sandwich Ru(II)-acylthiourea complexes: DNA/HSA-binding, anti-migration and cell death in a human breast tumor cell line. **Dalton Trans**, 46, n. 38, p. 12865-12875, Oct 03 2017.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**, 1830, n. 6, p. 3670-3695, Jun 2013.

DA SILVA, P. B.; DE FREITAS, E. S.; BERNEGOSI, J.; GONCALEZ, M. L. *et al.* Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Treatment of Tuberculosis--A Review. **J Biomed Nanotechnol**, 12, n. 2, p. 241-260, Feb 2016.

DALMORA, M. E.; Dalmora, S. L.; OLIVEIRA, A. G. Inclusion complex of piroxicam with beta-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. **Int J Pharm**, 222, n. 1, p. 45-55, Jul 3 2001.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol**, 740, p. 364-378, Oct 5 2014.

DE FREITAS, E. S.; DA SILVA, P. B.; CHORILLI, M.; BATISTA, A. A. *et al.* Nanostructured lipid systems as a strategy to improve the in vitro cytotoxicity of ruthenium(II) compounds. **Molecules**, 19, n. 5, p. 5999-6008, May 9 2014.

ECKHARDT, B. L.; FRANCIS, P. A.; PARKER, B. S.; ANDERSON, R. L. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. **Nat Rev Drug Discov**, 11, n. 6, p. 479-497, Jun 1 2012.

FALANDRY, C.; BONNEFOY, M.; FREYER, G.; GILSON, E. Biology of cancer and aging: a complex association with cellular senescence. **J Clin Oncol**, 32, n. 24, p. 2604-2610, Aug 20 2014.

FARES, J.; FARES, M. Y.; KHACHFE, H. H.; SALHAB, H. A. *et al.* Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduct Target Ther**, 5, n. 1, p. 28, Mar 12 2020.

FENG, Y.; SPEZIA, M.; HUANG, S.; YUAN, C. *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes Dis**, 5, n. 2, p. 77-106, Jun 2018.

FERRARO, M. G.; PICCOLO, M.; MISSO, G.; MAIONE, F. *et al.* Breast Cancer Chemotherapeutic Options: A General Overview on the Preclinical Validation of a Multi-Target Ruthenium(III) Complex Lodged in Nucleolipid Nanosystems. **Cells**, 9, n. 6, Jun 5 2020.

FIFE, C. M.; MCCARROLL, J. A.; KAVALLARIS, M. Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. **Br J Pharmacol**, 171, n. 24, p. 5507-5523, Dec 2014.

FISCHER, B.; HEFFETER, P.; KRYEZIU, K.; GILLE, L. *et al.* Poly(lactic acid) nanoparticles of the lead anticancer ruthenium compound KP1019 and its surfactant-mediated activation. **Dalton Trans**, 43, n. 3, p. 1096-1104, Jan 21 2014.

FLOREA, A. M.; BUSSELBERG, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. **Cancers (Basel)**, 3, n. 1, p. 1351-1371, 2011.

GRAMINHA, A. E. **Produtos naturais e derivados, complexação com o rutênio visando aumento da atividade citotóxica**. 2015. - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos.

GRAMINHA, A. E.; HONORATO, J.; CORREA, R. S.; COMINETTI, M. R. *et al.* A novel ruthenium(II) gallic acid complex disrupts the actin cytoskeleton and inhibits migration, invasion and adhesion of triple negative breast tumor cells. **Dalton Trans**, Dec 11 2020.

GRANCHER, A.; MICHEL, P.; DI FIORE, F.; SEFRIQUI, D. [Aspirin and colorectal cancer]. **Bull Cancer**, 105, n. 2, p. 171-180, Feb 2018.

GU, L.; LI, X.; RAN, Q.; KANG, C. *et al.* Antimetastatic activity of novel ruthenium (III) pyridine complexes. **Cancer Med**, 5, n. 10, p. 2850-2860, Oct 2016.

GUEDES, A. P. M.; MELLO-ANDRADE, F.; PIRES, W. C.; DE SOUSA, M. A. M. *et al.* Heterobimetallic Ru(II)/Fe(II) complexes as potent anticancer agents against breast cancer cells, inducing apoptosis through multiple targets. **Metallomics**, 12, n. 4, p. 547-561, Apr 1 2020.

GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTON, T. A.; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, 12, n. 11, p. 2826-2841, Mar 21 2016.

HAN, B. J.; JIANG, G. B.; YAO, J. H.; LI, W. *et al.* DNA interaction, antioxidant activity, and bioactivity studies of two ruthenium(II) complexes. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, 135, p. 840-849, Jan 25 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 4 2011.

HARTINGER, C. G.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; JAKUPEC, M. A.; KYNAST, B. *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**, 100, n. 5-6, p. 891-904, May 2006.

HASSAN, M.; WATARI, H.; ABUALMAATY, A.; OHBA, Y. *et al.* Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **Biomed Res Int**, 2014, p. 150845, 2014.

HENSON, P. M.; BRATTON, D. L. Antiinflammatory effects of apoptotic cells. **J Clin Invest**, 123, n. 7, p. 2773-2774, Jul 2013.

HIROHASHI, S.; KANAI, Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. **Cancer Sci**, 94, n. 7, p. 575-581, Jul 2003.

HOTCHKISS, R. S.; STRASSER, A.; MCDUNN, J. E.; SWANSON, P. E. Cell death. **N Engl J Med**, 361, n. 16, p. 1570-1583, Oct 15 2009.

IARC. World Cancer Day 2021: Breast cancer overtakes lung cancer as leading cause of cancer worldwide. 2021.

IIDA, J.; BELL-LONCELLA, E. T.; PURAZO, M. L.; LU, Y. *et al.* Inhibition of cancer cell growth by ruthenium complexes. **J Transl Med**, 14, p. 48, Feb 12 2016.

JANISZEWSKA, M.; PRIMI, M. C.; IZARD, T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. **J Biol Chem**, 295, n. 8, p. 2495-2505, Feb 21 2020.

JIANG, G. B.; ZHENG, X.; YAO, J. H.; HAN, B. J. *et al.* Ruthenium(II) polypyridyl complexes induce BEL-7402 cell apoptosis by ROS-mediated mitochondrial pathway. **J Inorg Biochem**, 141, p. 170-179, Dec 2014.

JIANG, P.; ENOMOTO, A.; TAKAHASHI, M. Cell biology of the movement of breast cancer cells: intracellular signalling and the actin cytoskeleton. **Cancer Lett**, 284, n. 2, p. 122-130, Nov 1 2009.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev Cancer**, 9, n. 4, p. 239-252, Apr 2009.

JUSTUS, C. R.; LEFFLER, N.; RUIZ-ECHEVARRIA, M.; YANG, L. V. In vitro cell migration and invasion assays. **J Vis Exp**, n. 88, Jun 01 2014.

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

KHANNA, C.; HUNTER, K. Modeling metastasis in vivo. **Carcinogenesis**, 26, n. 3, p. 513-523, Mar 2005.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv Drug Deliv Rev**, 45, n. 1, p. 89-121, Dec 6 2000.

LEHMANN, B. D.; JOVANOVIC, B.; CHEN, X.; ESTRADA, M. V. *et al.* Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. **PLoS One**, 11, n. 6, p. e0157368, 2016.

LEWIS, S. M.; WILLIAMS, A.; EISENBARTH, S. C. Structure and function of the immune system in the spleen. **Sci Immunol**, 4, n. 33, Mar 1 2019.

LI, C.; IP, K. W.; MAN, W. L.; SONG, D. *et al.* Cytotoxic (salen)ruthenium(iii) anticancer complexes exhibit different modes of cell death directed by axial ligands. **Chem Sci**, 8, n. 10, p. 6865-6870, Oct 1 2017.

LI, H.; QIU, Z.; LI, F.; WANG, C. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. **Oncol Lett**, 14, n. 5, p. 5865-5870, Nov 2017.

LINDER, S. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. **Trends Cell Biol**, 17, n. 3, p. 107-117, Mar 2007.

LIU, S. H.; ZHAO, J. H.; DENG, K. K.; WU, Y. *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**, 140, p. 202-209, Apr 5 2015.

MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C.; CINTO, P. O.; CHAUD, M. V. *et al.* Liposomes and micro/nanoparticles as colloidal carriers for nasal drug delivery. **Curr Drug Deliv**, 3, n. 3, p. 275-285, Jul 2006.

MAO, Y.; KELLER, E. T.; GARFIELD, D. H.; SHEN, K. *et al.* Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. **Cancer Metastasis Rev**, 32, n. 1-2, p. 303-315, Jun 2013.

MASOOD, S. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancers. **Womens Health (Lond)**, 12, n. 5, p. 480-491, Sep 2016.

MILLER, R. P.; TADAGAVADI, R. K.; RAMESH, G.; REEVES, W. B. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. **Toxins (Basel)**, 2, n. 11, p. 2490-2518, Nov 2010.

MONNERET, C. Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. **Ann Pharm Fr**, 69, n. 6, p. 286-295, Nov 2011.

MORENO-ASPITIA, A.; PEREZ, E. A. Treatment options for breast cancer resistant to anthracycline and taxane. **Mayo Clin Proc**, 84, n. 6, p. 533-545, Jun 2009.

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

NARVEKAR, M.; XUE, H. Y.; EOH, J. Y.; WONG, H. L. Nanocarrier for poorly water-soluble anticancer drugs--barriers of translation and solutions. **AAPS PharmSciTech**, 15, n. 4, p. 822-833, Aug 2014.

NAVES, M. A.; GRAMINHA, A. E.; VEGAS, L. C.; LUNA-DULCEY, L. *et al.* Transport of the Ruthenium Complex [Ru(GA)(dppe)₂]PF₆ into Triple-Negative Breast Cancer Cells Is Facilitated by Transferrin Receptors. **Mol Pharm**, 16, n. 3, p. 1167-1183, Mar 4 2019.

NCI. NATIONAL CANCER INSTITUTE - Cancer causes and prevention. 2020a. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>. Acesso em: 03 de dezembro de 2020.

NCI. National Cancer Institute. Cancer types. 2020b.

NEOPHYTOU, C. M.; KYRIAKOU, T. C.; PAPAGEORGIS, P. Mechanisms of Metastatic Tumor Dormancy and Implications for Cancer Therapy. **Int J Mol Sci**, 20, n. 24, Dec 6 2019.

NHS, N. H. S.-. Treatment -Breast cancer in women. 2019.

OBENAU, A. C.; MASSAGUE, J. Surviving at a Distance: Organ-Specific Metastasis. **Trends Cancer**, 1, n. 1, p. 76-91, Sep 2015.

OKEGAWA, T.; PONG, R. C.; LI, Y.; HSIEH, J. T. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. **Acta Biochim Pol**, 51, n. 2, p. 445-457, 2004.

OLIVEIRA, K. M.; HONORATO, J.; DEMIDOFF, F. C.; SCHULTZ, M. S. *et al.* Lapachol in the Design of a New Ruthenium(II)-Diphosphine Complex as a Promising Anticancer Metallodrug. **J Inorg Biochem**, 214, p. 111289, Jan 2021.

PARSONS, J. T.; HORWITZ, A. R.; SCHWARTZ, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 11, n. 9, p. 633-643, Sep 2010.

PAWELEC, G. Immunosenescence and cancer. **Biogerontology**, 18, n. 4, p. 717-721, Aug 2017.

PAWLOWSKI, J.; KRAFT, A. S. Bax-induced apoptotic cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97, n. 2, p. 529-531, Jan 18 2000.

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

PEREIRA FDE, C.; LIMA, B. A.; DE LIMA, A. P.; PIRES, W. C. *et al.* Cis-[RuCl(BzCN)(N-N)(P-P)]PF₆ complexes: Synthesis and in vitro antitumor activity: (BzCN=benzonitrile; N-N=2,2'-bipyridine; 1,10-phenanthroline; P-P=1,4-bis(diphenylphosphino) butane, 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane, or 1,1'-(diphenylphosphino)ferrocene). **J Inorg Biochem**, 149, p. 91-101, Aug 2015.

PEROU, C. M.; SORLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, 406, n. 6797, p. 747-752, Aug 17 2000.

- PICCOLO, M.; MISSO, G.; FERRARO, M. G.; RICCARDI, C. *et al.* Exploring cellular uptake, accumulation and mechanism of action of a cationic Ru-based nanosystem in human preclinical models of breast cancer. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 7006, May 7 2019.
- PICKUP, M. W.; MOUW, J. K.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. **EMBO Rep**, 15, n. 12, p. 1243-1253, Dec 2014.
- PISTRITTO, G.; TRISCIUOGLIO, D.; CECI, C.; GARUFI, A. *et al.* Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies **8**, 4, 2016.
- PIZARRO, A. M.; SADLER, P. J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. **Biochimie**, 91, n. 10, p. 1198-1211, Oct 2009.
- POPOLIN, C. P.; COMINETTI, M. R. A Review of Ruthenium Complexes Activities on Breast Cancer Cells. **Mini Rev Med Chem**, 17, n. 15, p. 1435-1441, 2017.
- POURTEIMOOR, V.; MOHAMMADI-YEGANEH, S.; PARYAN, M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. **Tumour Biol**, 37, n. 11, p. 14479-14499, Nov 2016.
- PRABHAKARAN, R.; KALAIVANI, P.; POORNIMA, P.; DALLEMER, F. *et al.* One pot synthesis of structurally different mono and dimeric Ni(II) thiosemicarbazone complexes and N-arylation on a coordinated ligand: a comparative biological study. **Dalton Trans**, 41, n. 31, p. 9323-9336, Aug 21 2012.
- PRAXEDES, É. A.; PIMENTEL, M. M. L.; SANTOS, F. A. d.; FERNANDES, D. P. *et al.* Valores hematológicos e bioquímicos de camundongos imunossuprimidos BALB/c NUDE E C57BL/6 SCID. **Acta Scientiae Veterinariae**, 46, n. 1603, 2018.
- QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med**, 19, n. 11, p. 1423-1437, Nov 2013.
- RASINES-PEREA, Z.; TEISSEDRE, P. L. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. **Molecules**, 22, n. 1, Jan 1 2017.
- REUNANEN, N.; KÄHÄRI, V. Matrix Metalloproteinases in Cancer Cell Invasion. **In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]**, 2013.
- REYMOND, N.; D'AGUA, B. B.; RIDLEY, A. J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. **Nat Rev Cancer**, 13, n. 12, p. 858-870, Dec 2013.
- RORTH, P. Collective cell migration. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 25, p. 407-429, 2009.
- RUSSNES, H. G.; LINGJAERDE, O. C.; BORRESEN-DALE, A. L.; CALDAS, C. Breast Cancer Molecular Stratification: From Intrinsic Subtypes to Integrative Clusters. **Am J Pathol**, 187, n. 10, p. 2152-2162, Oct 2017.

SATO, M. R.; DA SILVA, P. B.; DE SOUZA, R. A.; DOS SANTOS, K. C. *et al.* Recent advances in nanoparticle carriers for coordination complexes. **Curr Top Med Chem**, 15, n. 4, p. 287-297, 2015.

SAVA, G.; FRAUSIN, F.; COCCHIETTO, M.; VITA, F. *et al.* Actin-dependent tumour cell adhesion after short-term exposure to the antimetastasis ruthenium complex NAMI-A. **Eur J Cancer**, 40, n. 9, p. 1383-1396, Jun 2004.

SAYERS, T. J. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. **Cancer Immunol Immunother**, 60, n. 8, p. 1173-1180, Aug 2011.

SCENEAY, J.; SMYTH, M. J.; MOLLER, A. The pre-metastatic niche: finding common ground. **Cancer Metastasis Rev**, 32, n. 3-4, p. 449-464, Dec 2013.

SCHNITT, S. J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Mod Pathol**, 23 Suppl 2, p. S60-64, May 2010.

SHEN, J.; KIM, H. C.; WOLFRAM, J.; MU, C. *et al.* A Liposome Encapsulated Ruthenium Polypyridine Complex as a Theranostic Platform for Triple-Negative Breast Cancer. **Nano Lett**, 17, n. 5, p. 2913-2920, May 10 2017.

SILVAI, J. A. d.; SANTANAIL, D. P. d.; BEDORII, D. G. C.; BORBAIL, V. F. d. C. *et al.* Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química nova**, 32, n. 6, 2009.

SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KHAN, F. A. *et al.* Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **J Control Release**, 252, p. 28-49, Apr 28 2017.

SIVANDZADE, F.; BHALERAO, A.; CUCULLO, L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. **Bio Protoc**, 9, n. 1, Jan 5 2019.

SLOAN, E. K.; POULIOT, N.; STANLEY, K. L.; CHIA, J. *et al.* Tumor-specific expression of alphavbeta3 integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. **Breast Cancer Res**, 8, n. 2, p. R20, 2006.

SODRÉI, F. L.; COSTAIL, J. C. B.; LIMAI, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 43, 2007.

SORLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, n. 19, p. 10869-10874, Sep 11 2001.

SPIERINGS, D.; MCSTAY, G.; SALEH, M.; BENDER, C. *et al.* Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. **Science**, 310, n. 5745, p. 66-67, Oct 7 2005.

SPINELLI, M. O.; GODOY, R. J. C. C. M. S.; MOTTA, M. C. Comparação dos parâmetros bioquímicos de camundongos criados em diferentes condições sanitárias. **SCIENTIA PLENA**, 8, 2012.

- STODDART, M. J. Cell viability assays: introduction. **Methods Mol Biol**, 740, p. 1-6, 2011.
- SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, Feb 4 2021.
- TAURO, M.; LYNCH, C. C. Cutting to the Chase: How Matrix Metalloproteinase-2 Activity Controls Breast-Cancer-to-Bone Metastasis. **Cancers (Basel)**, 10, n. 6, Jun 5 2018.
- URBAN, L. A. B. D.; CHALA, L. F.; BAUAB, S. d. P.; SCHAEFER, M. B. *et al.* Recomendações do Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem, da Sociedade Brasileira de Mastologia e da Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia para o rastreamento do câncer de mama. **Radiologia Brasileira**, 4, 50, 2017.
- VANE, J. R.; BOTTING, R. M. The mechanism of action of aspirin. **Thromb Res**, 110, n. 5-6, p. 255-258, Jun 15 2003.
- VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif**, 36, n. 3, p. 131-149, Jun 2003.
- VIDAL, S. J.; RODRIGUEZ-BRAVO, V.; GALSKY, M.; CORDON-CARDO, C. *et al.* Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. **Oncogene**, 33, n. 36, p. 4451-4463, Sep 4 2014.
- XIE, Y.-Y.; LI, Z.-Z.; LIN, G.-J.; HUANG, H.-L. *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**, 405, p. 228-234, 2013.
- YAMAGUCHI, H.; WYCKOFF, J.; CONDEELIS, J. Cell migration in tumors. **Curr Opin Cell Biol**, 17, n. 5, p. 559-564, Oct 2005.
- YINGCHONCHAROEN, P.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come. **Pharmacol Rev**, 68, n. 3, p. 701-787, Jul 2016.
- ZENG, C. W.; ZHANG, X. J.; LIN, K. Y.; YE, H. *et al.* Camptothecin induces apoptosis in cancer cells via microRNA-125b-mediated mitochondrial pathways. **Mol Pharmacol**, 81, n. 4, p. 578-586, Apr 2012.
- ZHAO, X.; LI, L.; YU, G.; ZHANG, S. *et al.* Nucleus-enriched Ruthenium Polypyridine Complex Acts as a Potent Inhibitor to Suppress Triple-negative Breast Cancer Metastasis In vivo. **Comput Struct Biotechnol J**, 17, p. 21-30, 2019.
- ZHAO, Z.; LUO, Z.; WU, Q.; ZHENG, W. *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**, 43, n. 45, p. 17017-17028, Dec 7 2014.

ANEXOS

Anexo A – Artigo publicado em 2017

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.in

Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2017, 17, 999-1008

1

REVIEW ARTICLE

A Review of Ruthenium Complexes Activities on Breast Cancer Cells

Cecília P. Popolin and Márcia R. Cominetti*

Departamento de Geriatria, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luís, Km 235, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: November 16, 2016
Revised: December 05, 2016
Accepted: January 11, 2017DOI:
[10.1080/13616768.2017.1285555](https://doi.org/10.1080/13616768.2017.1285555)

Abstract: Cancer is one of the main causes of death worldwide. Breast cancer is the most prevalent type of cancer in women and the leading cause of cancer deaths due to its high metastasis to the lymph nodes, lungs, bones and brain. Interactions with the stromal microenvironment surrounding tumor cells facilitate tumor cell migration and invasion of tissues and dissemination to other organs, to form metastasis. The development of antineoplastic metal-based drugs was originated with the discovery of cisplatin; however, its severe side effects represent a limitation for its clinical use. Ruthenium complexes (Ru) with different ligands have been successfully studied as promising antitumor drugs. In this review, we focused on the effects of Ru complexes on breast cancer cells and its impact on different steps of the metastatic process.

Keywords: Apoptosis, breast cancer, metastasis, migration, proliferation, ruthenium complexes.

1. INTRODUCTION

Breast cancer is the second most common cancer in the world and the most prevalent type of cancer in women. Over the last few years, metastatic breast cancer has been one of the leading causes of death in women due to the metastasis formation in lymph nodes, lungs, bones and brain [1].

Metastasis is an exceedingly complex process, which occurs through a series of sequential steps that include the invasion of adjacent tissues, intravasation, transport through the circulatory system, arrest at a secondary site, extravasation and growth in a secondary organ. Metastases are the cause of 90% of human cancer deaths [2]. A small proportion of cancer cells from a primary tumor acquires invasive and migratory properties. The acquisition of invasive behavior is one of the first steps in the metastatic process and it is driven by cycles of actin polymerization, cell adhesion and acto-myosin contraction. There are different modes of motility and some tumor cells can switch between them. Such plasticity can enable tumor cells to continue moving even when one type of motility has been prevented by pharmacological means [3].

Cells that leave a primary tumor invade their surrounding tissues using one of several types of invasion, and some of the cells will migrate towards the neighboring blood vessels. Cancer cells enter the bloodstream in a process called

intravasation, in which cells migrate through endothelial cell (EC) junctions. It has been described that tumor areas with numerous moving breast cancer cells also have high numbers of tumor-associated macrophages (TAM) [4]. TAM can promote the invasive behavior of the cancer cells by producing epidermal growth factor (EGF) [5] and often cluster around blood vessels and the tumor margin, establishing EGF gradients within the tumor environment that attract tumor cells towards vessels and thereby promote intravasation [4].

Using the bloodstream to spread throughout the body, cancer cells then leave the circulation in a process called extravasation at potential secondary tumor sites. It is likely that many of the same molecular functions required for cell motility in the primary tumor will be required for extravasation [1]. Cancer cells then translocate through the endothelial barrier in a process called transendothelial migration (TEM), and afterwards invade the basement membrane that surrounds the blood vessels. Cells can next undergo apoptosis within 24 hours, be cleared by immune cells [3], enter a state of dormancy or proliferate within this new microenvironment, where a few of them will give rise to micrometastases and then macrometastases [6, 7].

Treatment of breast cancer has as main objectives to increase survival and improve the quality of life. Surgery and radiotherapy are treatments used for local control of breast cancer; on the other hand, systemic treatment is made by hormone therapy and chemotherapy [8-10]. Drugs used in chemotherapy cause resistance and damage to DNA, not only from tumor, but also from normal cells.

*Address correspondence to this author at Departamento de Geriatria, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luís, Km 235, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil; Tel: +55 34 1361-6663; E-mail: marcominetti@ufscar.br

Anexo B – Artigo publicado em 2017



RESEARCH ARTICLE

Cytotoxicity and anti-tumor effects of new ruthenium complexes on triple negative breast cancer cells

Cecilia P. Popolin¹, João P. B. Reis², Amanda B. Becceneri³, Angélica E. Graminha¹, Márcio A. P. Almeida², Rodrigo S. Corrêa⁴, Legna A. Collina-Vegas², Javier Eflendi⁵, Aldir A. Batista², Márcia R. Cominetti^{1*}

¹ Departamento de Gerontologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil,

² Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil,

³ Departamento de Química, Universidade Federal do Maranhão, Bacanga, São Luís, Maranhão, Brazil,

⁴ Departamento de Química, Universidade Federal de Ouro Preto, Monó de Cruzeiro, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil,

⁵ Departamento de Física e Ciência Interdisciplinar, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil

* cominetti@ufscar.br



OPEN ACCESS

Citation: Popolin CP, Reis JPB, Becceneri AB, Graminha AE, Almeida MAP, Corrêa RS, et al. (2017) Cytotoxicity and anti-tumor effects of new ruthenium complexes on triple negative breast cancer cells. PLOS ONE 12(9): e0183275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183275>

Editor: Amin Alizadeh, University of South Alabama Medical Center Institute, UNITED STATES

Received: May 12, 2017

Accepted: August 1, 2017

Published: September 12, 2017

Copyright: © 2017 Popolin et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. Coordinates and other crystallographic data have been deposited with the deposition codes: CCDC 1438891, 1438892, 1438893 and 1477183 for complexes 1, 2, 3 and 4, respectively and can be accessed at the following link: www.ccdc.cam.ac.uk/

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2013/06798-2 and 2015/04940-5.

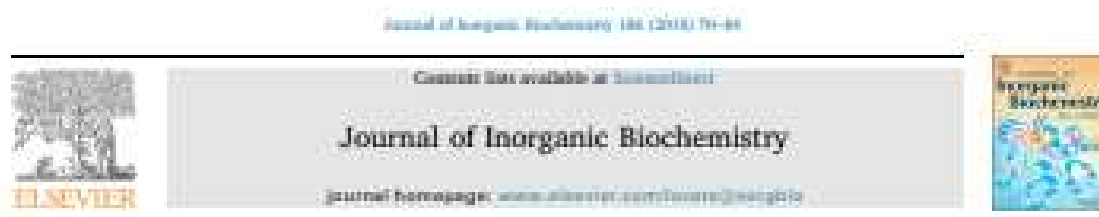
Abstract

Triple-negative breast cancer (TNBC) is a highly aggressive breast cancer subtype. The high rate of metastasis associated to the fact that these cells frequently display multidrug resistance, make the treatment of metastatic disease difficult. Development of antitumor metal-based drugs was started with the discovery of cisplatin, however, the severe side effects represent a limitation for its clinical use. Ruthenium (Ru) complexes with different ligands have been successfully studied as prospective antitumor drugs. In this work, we demonstrated the activity of a series of biphosphine bipyridine Ru complexes (1) [Ru(SO₄)(dppb)(bipy)], (2) [Ru(CO₃)(dppb)(bipy)], (3) [Ru(C₂O₄)(dppb)(bipy)] and (4) [Ru(CH₃CO₂)(dppb)(bipy)](PF₆) [where dppb = 1,4-bis(diphenylphosphino)butane and bipy = 2,2'-bipyridine], on proliferation of TNBC (MDA-MB-231), estrogen-dependent breast tumor cells (MCF-7) and a non-tumor breast cell line (MCF-10A). Complex (4) was most effective among the complexes and was selected to be further investigated on effects on tumor cell adhesion, migration, invasion and in apoptosis. Moreover, DNA and HSA binding properties of this complex were also investigated. Results show that complex (4) was more efficient inhibiting proliferation of MDA-MB-231 cells over non-tumor cells. In addition, complex (4) was able to inhibit MDA-MB-231 cells adhesion, migration and invasion and to induce apoptosis and inhibit MMP-9 secretion in TNBC cells. Complex (4) should be further investigated in vivo in order to establish its potential to improve breast cancer treatment.

Introduction

Breast cancer is the most prevalent type of cancer in women and the second leading cause of cancer death worldwide [1]. Chemotherapy is one of the most extensively methods used to

Anexo C – Artigo publicado em colaboração/ 2018



The *trans*-(Ru(PPh₃)₂(*N,N*-dimethyl-*N'*-thiophenylthioureato-k²O,S)(bipy)) PF₆ complex has pro-apoptotic effects on triple negative breast cancer cells and presents low toxicity *in vivo*

Amanda Blaque Bacceneri^a, Cecília Patrícia Popolin^a, Ana Maria Platin^b, Edson Luis Maistro^c,
Eduardo Ernesto Castellano^d, Aldir Azevedo Batista^a, Márcia Regina Comasseti^{a,*}

^a Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rod. Washington Luís, Km 235, Rio de Janeiro, RJ 21545-060, Brazil

^b Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

^c Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina e Odontologia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Av. Dr. Ugoeto Mont'Albani, 715, Baurista, SP 17023-900, Brazil

^d Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 785, CEP 13588-870 São Carlos, SP, Brazil

^e Departamento de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rod. Washington Luís, Km 235, Rio de Janeiro, RJ 21545-060, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

Triple negative breast cancer

Ruthenium complex

Apoptosis

In vivo studies

Apoptosis

ABSTRACT

Triple negative breast cancer (TNBC) is a heterogeneous subtype of breast cancer that does not exhibit the expression of estrogen and progesterone receptors, neither the amplification of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) gene. Despite all the advances in cancer treatment, the development of new anticancer drugs for TNBC tumors is still a challenge. There is an increasing interest in new agents to be used in cancer treatment. Ruthenium is a metal that has unique characteristics and important *in vivo* and *in vitro* results achieved for cancer treatment. Thus, in this work, with the aim to develop anticancer drugs, three new ruthenium complexes containing azobenzene ligands have been synthesized and characterized: *trans*-(Ru(PPh₃)₂(*N,N*-dimethyl-*N'*-thiophenylthioureato-k²O,S)(2,2'-bipyridine)) PF₆ (1), *trans*-(Ru(PPh₃)₂(*N,N*-dimethyl-*N'*-thiophenylthioureato-k²O,S)(bipy)) PF₆ (2) and *trans*-(Ru(PPh₃)₂(*N,N*-dimethyl-*N'*-thiophenylthioureato-k²O,S)(bipy)) PF₆ (3). Then, the cytotoxicity of these three new ruthenium complexes was investigated in TNBC, MCF-10F2.3 and in non-tumor MCF-10A cells. Complex (2) was the most selective compound and was chosen for further studies to verify its effects on cell morphology, adhesion, migration, invasion, induction of apoptosis and DNA damage *in vitro*, as well as its toxicity and capacity of causing DNA damage *in vivo*. Complex (2) inhibited proliferation, migration, invasion, adhesion, changed morphology and induced apoptosis, DNA damage and nuclear fragmentation of TNBC cells at lower concentrations compared to non-tumor MCF-10A cells, suggesting an effective action for this complex on tumor cells. Finally, complex (2) did not induce toxicity or caused DNA damage *in vivo* when low doses were administered to mice.

1. Introduction

Triple negative breast cancer (TNBC) is a heterogeneous subtype of breast cancer tumors that does not exhibit the expression of estrogen and progesterone receptors, neither the amplification of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) gene. TNBC is more aggressive to patients and has a worse prognosis when compared to other subtypes of the disease [1–3].

Despite all the advances in cancer treatment the development of new anticancer drugs for TNBC tumors is still a challenge due to the lack of specific targets. Therefore, surgery, radiotherapy and systemic

chemotherapy are the only available therapeutic options. Thus, it is pivotal to identify possible targets and to develop new treatments, which could be more specific for TNBC and have fewer side effects [1–3]. In this sense, and due to the previous success of the treatment with platinum-based drugs, such as cisplatin, there is increasing interest in new agents, especially metalodrugs, to be used in cancer treatment. Although cisplatin has presented good results in the treatment of some types of cancer, its use is limited by its severe adverse effects, such as cardiotoxicity, nephrotoxicity, ototoxicity and neurotoxicity [4–7].

Ruthenium is a metal that is receiving attention in the latest decades due to its unique characteristics and good results, *in vivo* and *in vitro*.

*Corresponding author.

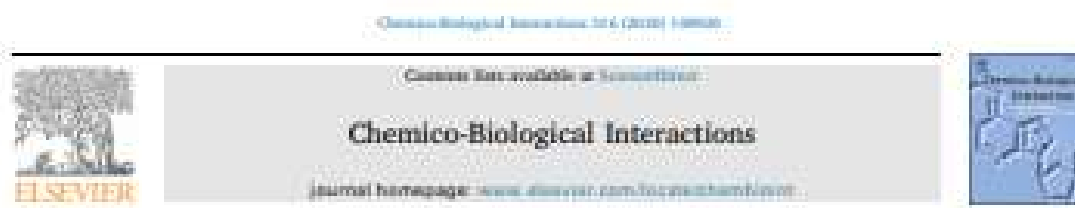
E-mail address: mcomasseti@ufrrj.br (M.R. Comasseti).

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.05.007>

Received 8 March 2018; Received in revised form 18 May 2018; Accepted 29 May 2018
Available online 24 May 2018

0162-0134/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Anexo D – Artigo publicado em colaboração/ 2020



Acetylation of cedrelone increases its cytotoxic activity and reverts the malignant phenotype of breast cancer cells in 3D culture

Amanda Blaque Becceneri^{a,b,1}, Angelina Maria Fuxer^{a,b,1}, Cecília Patrícia Popolin^a,
Cristiane de Melo Casal^b, Vanessa de Cássia Domingues^c, João Batista Fernandes^c,
Paulo Cesar Vieira^d, Marcia Regina Cominetti^a

^aDepartment of Chemistry, Federal University of São Carlos, Rod. Washington Luís, Km 239 - São Carlos, SP, Brazil

^bFederal Institute of Education, Rodovia 027-080 Km 01 - Jd. Santa Rita, SP, Brazil

^cDepartment of Chemistry, Federal University of São Carlos, Rod. Washington Luís, Km 239 - São Carlos, SP, Brazil

^dSchool of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. do Café, 1515 Maracanã, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Cancer
Breast cancer
3D cell culture
Natural products
Chemical

ABSTRACT

Cedrelone is a limonoid isolated from the plant *Trichilia catigua* (Meliaceae). Previous studies have demonstrated that cedrelone (1) has several damaging effects on triple negative breast cancer (TNBC) cell line MDA-MB-231. In this work we investigated two new derivatives of cedrelone, the acetate (1a) and the oxaphate (1b), to examine whether their effects are improved in comparison to the lead molecule. Cedrelone acetate (1a) was the most cytotoxic compound on TNBC cells and was chosen for additional analyses in traditional two-dimensional (2D) monolayer cultures and three-dimensional (3D) assays. In 2D, 1a induced cell cycle arrest, apoptosis and inhibited essential steps of the metastatic process of the MDA-MB-231 cells, *in vitro*. However, 1a was able to revert the malignant phenotype of the T4-2 cells in 3D. These effects were accompanied with the downregulation of MMP9, E-cadherin and phospho-Akt, which could have resulted in a decrease of AktR levels and MMP9 activity. These results suggest that 1a could be used as an important model for the design of a new drug to be applied in cancer treatment and be further studied *in vivo* for its antitumor and antimetastatic effects.

1. Introduction

Cancer remains a leading cause of death worldwide despite all the advances in prevention and treatment [1]. Recently, an increase in the number of cancer survivors was observed, mainly due to better diagnosis and treatment [2]. However, the existing therapies still present some deficiencies and many adverse effects to patients; therefore, the search for more effective treatments continues [3].

Natural products are an indispensable source of new compounds and are widely used for the treatment and prevention of several diseases, including cancer. Several natural products are being successfully used or were the basis for the synthesis of anticancer agents; these include podophyllin, vincristine, vinorelbine, docetaxel, and topotecan, among others [4–6]. They act inhibiting important mechanisms of tumor cells, like proliferation, invasion, migration, and metastasis through the induction of apoptosis and other pathways [7].

Phenotypic reversion is a process in which malignant cells recover their ability to form growth arrested polarized structures in non-

malignant cells, with the restoration of some signaling pathways [8–11]. This phenomenon was discovered using the syngeneic DMF-3523 human breast epithelial cell line series, composed by S1, S2 e T4-2. The non-transformed S1 cells depend on epidermal growth factor (EGF) for growth and its continuous culturing in the absence of this factor gave rise to the still nonmalignant S2 cell population. These cells, after inoculation into mice produced a rare tumor referred to as T4-2 [12]. The details of phenotypic reversion process involve the down modulation of different cross talked oncogenic pathways, accompanied by a restoration of cell-ECM correct interactions [8,13]. Nuclear factor kappa B (NFkB) and Homeobox D10 (HOXD10) are the transcription factors involved in this reversion. Upregulation of HOXD10 or down-regulation of NFkB also promotes the reversion from a malignant to a non-malignant phenotype in breast cancer cells growing in three-dimensional laminin-rich extracellular matrix (3D LRCM) [8,13–15].

Limonoids are secondary metabolites from Meliaceae and Rutaceae plant families [16]. Cedrelone is a limonoid isolated from a Brazilian native plant *Trichilia catigua* (Meliaceae), commonly used in popular

¹ Corresponding authors.

E-mail address: amanda@frc.usc.br (A.B. Becceneri).

² Both authors equally contributed to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.cb.2020.109508>

Received 21 September 2019; Received in revised form 6 December 2019; Accepted 16 December 2019

Available online 16 December 2019

0899-2797/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Anexo E – Artigo publicado em colaboração/ 2020



jnatprod.org/jnp

Article

Structure Elucidation and Absolute Configuration Determination of Nortriterpenoids from *Picramnia glazioviana*

Leila Gímenes,^a Liany Luna-Dulcey,^a João M. Batista, Jr.,^a Fernando M. dos Santos, Jr.,^a Cecília P. Popolin,^a Marcia R. Cominetti,^a João B. Fernandes,^b and Dan Staerk^{a*}

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.3c00048>

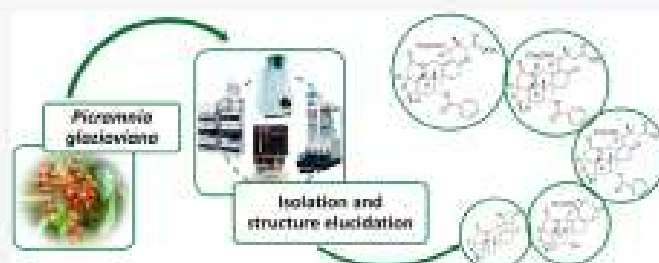
Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information



ABSTRACT: In this study, HPLC-PDA-HRMS-SPE-NMR data were used for initial analysis of the CH_2Cl_2 fraction of an EtOH extract of the leaves of *Picramnia glazioviana*. The HRMS, UV, and NMR data obtained from the HPLC-PDA-HRMS-SPE-NMR analysis were used to direct semipreparative HPLC isolation toward nortriterpenoids, which resulted in the isolation of 19 new and highly oxygenated nortriterpenoids (1–3, 5–10, 12–19, and 21), named picramnanes C–T. Their structures were determined on the basis of analysis of UV, HRMS, and 2D NMR spectroscopic data, including determination of the relative configuration on the basis of coupling pattern analysis and nuclear Overhauser effect correlations. The absolute configurations of compounds 7, 9, 10, 14, 15, 17, 18, 19, and 21 were assigned using electronic circular dichroism data, and the cytotoxicity of compounds 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, and 21 was evaluated against MDA-MB-231 triple-negative breast cancer, SKBR-3 Her2-overexpressing breast cancer, and A549 lung cancer cell lines. The isolated compounds contain a hitherto undescribed modification of the terminal backbone and/or E-ring, and a possible biosynthetic pathway for their formation is proposed.

Natural products continue to play an important role in drug discovery and have proven especially successful for the discovery of new anticancer and antibacterial drugs. Thus, among all the small-molecule new chemical entities registered as anticancer and antibacterial drugs in the period 1982–2014,¹ 83% and 73%, respectively, were natural products, natural product derivatives, or synthetic compounds inspired by a natural product pharmacophore. This success is to a large degree due to the drug likeness of natural products, i.e., typically characterized by many heteroatoms acting as hydrogen acceptors and/or donors, complex ring systems, chirality, and a favorable molecular weight range according to Lipinski's rule.^{1,2} Natural products have typically also multiple targets, and although this makes them less selective, it also makes them ideal as lead structures in drug discovery.

Picramnia is a small genus of shrubs or small trees in the Picramniaceae family and consists of approximately 40 species (according to *The Plant List*) found in tropical regions from Florida in North America through Central America to northern Argentina in South America.³ *Picramnia* sp. have traditionally

been used for the treatment of skin diseases^{4,5} and as vermicides,⁶ and phytochemical studies have shown *Picramnia* to contain anthraquinones, anthrones, anthrone glycosides, flavonoids, and triterpenoids.^{7–11} A recent study showed that *Picramnia glazioviana* also contains limonoid-type nortriterpenoids with a new skeleton and with moderate cytotoxicity against a triple-negative breast cancer cell line.¹²

To accelerate natural product-based drug discovery, analytical methods for full structural elucidation of major and minor bioactive constituents directly from crude plant extracts and/or for guiding (semi)preparative-scale HPLC isolation are needed. Thus, the HPLC-PDA-HRMS-SPE-NMR method-

Received: January 13, 2020