

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

Amanda Blanque Becceneri

**Efeito de um complexo de rutênio em células de câncer de
mama em diferentes modelos 2D e 3D *in vitro* e *in vivo***

São Carlos

2019

Amanda Blaque Becceneri

**Efeito de um complexo de rutênio em células de câncer de
mama em diferentes modelos 2D e 3D *in vitro* e *in vivo***

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

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Amanda Blanque Beceneri, realizada em 18/10/2019:

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti
UFSCar

Profa. Dra. Heloisa Sobreiró Selistre de Araujo
UFSCar

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues
UFSCar

Profa. Dra. Cristina Kurachi
IFSC/USP

Profa. Dra. Natália Mayumi Inada
IFSC/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma maneira para que este trabalho fosse concluído. Primeiramente agradeço a minha família pelo apoio e incentivo constantes, principalmente meus pais, José Carlos e Rossana, meus avós, João, Elza, Angelina, Guilherme (*in memoriam*), meu irmão, Leandro e minha cunhada, Larissa.

Agradeço ao meu amado noivo, João Vítor, pelo companheirismo, apoio e incentivo nestes longos anos. Agradeço também aos meus sogros, Célia e Luís, e a toda sua família e amigos por todo o apoio durante este período.

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dr. Márcia Cominetti, por ser um grande exemplo, mostrar que sempre existem caminhos para melhorar, pela sua confiança, compreensão e orientação em todos os momentos.

Agradeço ao LABEN, que é um laboratório muito especial, me deu muito mais que um local para desenvolver este trabalho e colegas, também me deu amigos, comadres, compadres e um amado afilhado. Agradeço a todos os seus integrantes que estão ou passaram por lá pela convivência, aprendizado e amizade. Cada um foi importante para o desenvolvimento deste trabalho e também para o meu crescimento profissional e pessoal. Especialmente agradeço à Cecília, Angelina, Patrícia, Carol, Angelica, Lia, Liany, Izabela, Marina, Luani, Ideli, Carla, Arthur, Ramon, Júlio, Francine e Ana Luiza.

Agradeço à Profa. Dra. Sophie Lelièvre e ao seu grupo de pesquisa, especialmente à Farzaneh e à Shirisha, pelos ensinamentos durante o estágio no exterior.

Agradeço aos meus amigos que estiveram ao meu lado em bons momentos ao longo destes quatro anos, especialmente Carol, Luíza, Felipe, Daniela, Damiana, Jessyka e Andreza.

Agradeço aos professores e funcionários do Departamento de Gerontologia, especialmente à Dona Neuza pela companhia e conversas e ao Alexandre, secretário do PIPGCF, por toda ajuda.

Agradeço ao Prof. Dr. Alzir Batista por toda ajuda com a parte química e pelos complexos de rutênio. E também agradeço à todos os seus alunos pela ajuda, síntese e caracterização dos complexos, especialmente agradeço à Ana, Kátia, Legna, Tamires e Célis.

Agradeço ao Prof. Dr. Edson Maistro da UNESP por toda ajuda na realização e na análise dos ensaios de cometa e também a sua técnica, Larissa, e seus alunos pela ajuda no ensaio.

Agradeço ao Prof. Dr. Marlus Chorilli da UNESP e suas alunas, Patrícia e Ana Carolina, pela síntese e caracterização do complexo nanoestruturado.

Agradeço ao Prof. Dr. Edson Garcia Soares da USP, campus Ribeirão Preto, por ter me ensinado e ajudado nas análises das lâminas histológicas.

Agradeço à Profa. Dra. Heloísa Sobreiro por ter seu laboratório sempre de portas abertas para nós. Agradeço especialmente Kelly, Wanessa e Grazielle pela ajuda com ensaios e pelas conversas.

Agradeço à Profa. Dra. Marisa Fernandes por sempre nos disponibilizar seus equipamentos e grande ajuda de suas alunas, Marina e Priscila.

Agradeço ao Laboratório Bissell/Berkeley Lab - Califórnia, EUA, e ao Laboratório E-Signal - Universidade de São Paulo, Brasil, por fornecer as células HMT-3522. Agradeço também ao Prof. Dr. Richard Redvers do *Olivia Newton-John Cancer Research Institute* na Austrália pelo fornecimento das células 4T1.13ch5T1. E ao Prof. Dr. Andrei Leitão da USP, *campus* São Carlos, pelas células Balb/C 3T3 clone A31.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento na modalidade doutorado regular (Processo nº 2014/25121-8) e pela bolsa de estágio de pesquisa no exterior (BEPE) (Processo nº 2017/20055-5).

AGRADECIMENTOS ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, processos nº 2014/25121-8 e 2017/20055-5. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

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

RESUMO

O câncer está entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. Especificamente, o câncer de mama é uma doença extremamente heterogênea, sendo composta de diferentes subtipos, e esta heterogeneidade dificulta seu tratamento, pois cada subtipo da doença possui características específicas e requer um tratamento diferenciado. Apesar dos progressos no campo da biologia molecular e celular, o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais ainda é um enorme desafio, pois muitos fármacos utilizados atualmente não apresentam seletividade para células tumorais, tornando o tratamento difícil e gerando indesejáveis efeitos adversos aos pacientes. Os complexos metálicos estão sendo utilizados como alternativa para o tratamento do câncer e de diversas outras doenças, sendo que especificamente os complexos de rutênio vem ganhando destaque para o tratamento do câncer devido as suas características únicas e resultados importantes obtidos. O objetivo do presente trabalho foi selecionar dentre diferentes moléculas um novo complexo de rutênio, o qual pudesse ser candidato a medicamento antitumoral, e avaliar os efeitos do complexo selecionado através de estudos *in vitro* em células de mama em cultura celular bidimensional (2D) e tridimensional (3D) e estudos de toxicidade e genotoxicidade *in vivo*. Os resultados demonstraram que o complexo Ru(ThySMet) foi o mais ativo contra as células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 entre os três complexos após 24 h de incubação e em ensaios *in vitro* em 2D induziu citotoxicidade, inibiu migração, invasão, adesão, alterou a morfologia e induziu a apoptose, danos ao DNA e a fragmentação nuclear de células tumorais MDA-MB-231 em concentrações mais baixas em comparação com células não tumorais MCF-10A, sugerindo ação seletiva deste complexo para células tumorais. Em ensaios *in vitro* em 3D com 24 h de incubação o complexo Ru(ThySMet) também apresentou citotoxicidade maior para as células tumorais T4-2 e MDA-MB-231 em relação as não tumorais de mama S1 e MCF-10A e, induziu a apoptose em diferentes modelos de cultura e danos ao DNA. Ainda, o complexo também reverteu o fenótipo maligno das células de mama tumorais da linhagem T4-2 devido a supressão de proteínas relacionadas a esse processo, como EGFR, p50 NFκB e integrina β1. *In vivo*, o complexo Ru(ThySMet) não induziu toxicidade e causou dano ao DNA apenas na dose mais alta administrada. A análise do efeito do complexo Ru(ThySMet) sintetizado em sistema nanoestruturado do tipo microemulsão, em diferentes células de mama, MDA-MB-231, MCF-10A e 4T1.13ch5T1 e em fibroblastos Balb/C 3T3, demonstrou que com 48 h de incubação houve um aumento da seletividade deste novo complexo e também que este complexo foi capaz de alterar a morfologia e inibir a migração celular das células tumorais com mais especificidade em relação as células não tumorais, porém seu mecanismo de ação foi parcialmente alterado levando as células a sofrerem necrose ao invés de apoptose. Tomados em conjunto os resultados indicam que o complexo Ru(ThySMet) tem potencial na terapia do câncer de mama e mais estudos devem ser realizados para comprovar esse potencial.

Palavras-chave: Câncer. Câncer de mama. Câncer de mama triplo negativo. Complexo de rutênio. Cultura de células 3D.

ABSTRACT

Cancer is among the leading causes of morbidity and mortality in the world. Specifically, breast cancer is an extremely heterogeneous disease, being composed of different subtypes and this heterogeneity makes treatment difficult, since each disease subtype has specific characteristics and requires differentiated treatment. Despite progress in the field of molecular and cellular biology, the development of new antitumor drugs is still a major challenge, as many drugs currently used are not selective for tumor cells, making the treatment difficult and causing unwanted and adverse effects on patients. Metal complexes are being used as an alternative for cancer treatment and several other diseases, and ruthenium complexes have been gaining prominence for cancer treatment due to their unique characteristics and important results. The aim of the present work was to select among different molecules a new ruthenium complex, which would be the candidate for an antitumor drug and to evaluate the effects of the selected complex through *in vitro* studies on breast cells in two-dimensional (2D) and three-dimensional cell culture (3D) and *in vivo* toxicity and genotoxicity studies. The results demonstrated that the complex Ru(ThySMet) was the most active against MDA-MB-231 breast tumor cells among the three complexes after 24 h incubation and in *in vitro* 2D tests induced cytotoxicity, inhibited invasion, adhesion, morphology and apoptosis-induced alteration, DNA damage and nuclear fragmentation of MDA-MB-231 tumor cells in lower concentrations compared to MCF-10A non-tumor cells, suggesting the selective action of this complex for tumor cells. *In vitro* 3D experiments with 24 h incubation with the complex Ru(ThySMet) also show higher cytotoxicity to T4-2 and MDA-MB-231 tumor cells compared to S1 and MCF-10A non-tumoral breast cells and induced apoptosis in different culture models and DNA damage. Also, the complex reverses the malignant phenotype of T4-2 breast cancer cells due to a suppression of substances related to this process, such as EGFR, p50 NF κ B and β 1 integrin. *In vivo*, the complex Ru(ThySMet) does not cause toxicity and caused DNA damage only at the highest dose administered. An analysis of the effect of the complex Ru(ThySMet) synthesized on a microemulsion nanostructured system on different breast cells, MDA-MB-231, MCF-10A and 4T1.13ch5T1 and on Balb/C 3T3 fibroblasts, exhibited that with 48 h of incubation there was an increase in selectivity of this new complex and also that this complex was able to alter the morphology and inhibit cell migration of tumor cells with more specificity than non-tumor cells, but its mechanism of action was altered causing cells to die from necrosis rather than apoptosis. Taken together, the results indicate that the complex Ru(ThySMet) has potential for breast cancer therapy and further studies should be conducted to prove this potential.

Keywords: Cancer. Breast cancer. Triple negative breast cancer. Ruthenium complex. 3D cell culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número estimado dos tipos mais comuns de cânceres em 2018 em ambos os sexos e em todas as idades no mundo. *.....	15
Figura 2 – Características do câncer durante o desenvolvimento de tumores. *.....	16
Figura 3 – Tipo de câncer mais comum por país em mulheres de todas as idades em 2018. *	18
Figura 4 – Rota sintética dos complexos de rutênio trans-[Ru(PPh ₃) ₂ (N,N-dibutyl-N'-benzoylthioureato-k ₂ O,S)(bipy)]PF ₆ (1), trans-[Ru(PPh ₃) ₂ (N,N-dimethyl-N'-thiophenylthioureato-k ₂ O,S)(bipy)]PF ₆ (2), e trans-[Ru(PPh ₃) ₂ (N,N-dimethyl-N'-benzoylthioureato-k ₂ O,S)(bipy)]PF ₆ (3).	27
Figura 5 - Fotos demonstrativas da análise das classes dos cometas: classe 0: nucleoides sem cauda; classe 1: nucleoides com uma cauda menor que o diâmetro do nucleoides; classe 2: nucleoides com cauda de uma a duas vezes maior que o diâmetro do nucleoides; e classe 3: nucleoides com cauda maior que duas vezes o diâmetro do nucleoides. As figuras foram retiradas no aumento de 40 ×.*	36
Figura 6 – Estrutura molecular do complexo Ru(ThySMet).....	39
Figura 7 - Efeitos de citotoxicidade do complexo Ru(ThySMet) (A) Morfologia celular das células MDA-MB231 e MCF-10A examinada após 24 h de tratamento com diferentes concentrações do complexo Ru(ThySMet). (B) Ensaio clonogênico de células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações (0,5, 1 ou 2 µM) do complexo Ru(ThySMet) durante 2 h. (C) Quantificação do número e tamanho das colônias. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado). Barras de escala: 40 µm. (* p≤0,01).....	40
Figura 8 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) na migração celular de células MDA-MB-231 e MCF-10A. (A) Ensaio de migração das câmaras de Boyden com 22 h de tratamento com 1, 2 ou 4 µM do complexo. (B) Ensaio de <i>Wound Healing</i> com 0 e 24 h de tratamento com 1 µM do complexo. O controle positivo (C +) representa células sem qualquer tratamento e o controle negativo (C-) células cultivadas em um meio isento de FBS. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. Barras de escala: 40 µm. (* p≤0,05, ** p≤0,01).	41
Figura 9 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) na invasão celular de células MDA-MB-231 e MCF-10A. Ensaio de invasão celular após 22 h de tratamento com 1, 2 ou 4 µM do complexo. O controle positivo (C +) representa células sem qualquer tratamento e o controle negativo (C-) células cultivadas em um meio isento de FBS. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. (* p≤0,05, ** p≤0,01, *** p≤0,001).	42
Figura 10 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) na adesão celular e no citoesqueleto de células MDA-MB-231. (A) Ensaio de adesão celular com colágeno tipo I, fibronectina, laminina e vitronectina após 1 h e 30 min de tratamento com 2, 4 ou 8 µM do complexo. (B) Ensaio de citoesqueleto com faloidina e DAPI após 2 h de tratamento com 2, 4, 8 ou 16 µM do complexo. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. Os resultados foram comparados com o controle (C-) (não tratado). Barras de escala: 40 µm. (* p≤0,05, ** p≤0,01, *** p≤0,001).	43

Figura 11 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) 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 e MCF -10A após 2 h de tratamento com 2, 4 ou 8 μM do complexo. Os ensaios foram realizados em triplicata. Imagens correspondem a uma das triplicatas. A camptotecina foi utilizada como controle positivo (C +). Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (sem tratamento) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)..... 45

Figura 12 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) no DNA das células MDA-MB-231 e MCF-10A. **(A)** Fragmentação Nuclear após 2 h de tratamento com 2, 4 ou 8 μM do complexo. A estaurosporina foi usada como controle positivo (C +). As setas brancas mostram os núcleos fragmentados. **(B)** Efeitos genotóxicos do complexo em células MDA-MB-231 e MCF-10A após 1 h de tratamento com 2, 4 ou 8 μM do complexo. A cisplatina foi utilizada como controle positivo (C +). Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (sem tratamento). Barras de escala: 40 μm . (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$)..... 47

Figura 13 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) no ciclo celular das células MDA-MB-231 e MCF-10A. **(A)** Efeitos do complexo Ru(ThySMet) no ciclo celular de MDA-MB-231 ou MCF-10A após 2 h de tratamento com 0,5, 1 ou 2 μM do complexo. A camptotecina foi utilizada como controle positivo (C +). **(B)** Histogramas de DNA do ensaio de ciclo celular. PI corresponde ao iodeto de propídio (detectado no canal FL2-A). Células não tratadas (controle negativo, C-) são mostradas em preto e células tratadas com 2 μM do complexo Ru(ThySMet) por 2 h são mostradas em vermelho. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). 48

Figura 14 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) na expressão e no conteúdo proteico de moléculas apoptóticas e anti-apoptóticas de células MDA-MB-231 e MCF-10A. **(A)** qRT-PCR após 2 h de tratamento com as concentrações indicadas e **(B)** Western blotting após 4 h de tratamento com as concentrações indicadas do complexo. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)..... 49

Figura 15 – Esquema de diferentes sistemas de cultura celular em 2D e 3D. * 53

Figura 16 - Esquema comparando a distribuição *in vitro* de agentes terapêuticos usando modelos em 2D e 3D.* 55

Figura 17 – Esquema do cultivo de células S1 e T4-2 em co-cultura no DOC, dispositivo que simula o carcinoma ductal. * 60

Figura 18 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) (4, 8, 16 ou 32 μM) na morfologia celular das estruturas das células T4-2 e S1 em 3D. Imagens representativas das estruturas tratadas com Ru(ThySMet) por 24 h. As imagens foram adquiridas com o aumento de 200 \times ; Barras de escala: 40 μm 62

Figura 19 - Efeitos citotóxicos do complexo Ru(ThySMet) em estruturas das células T4-2 e S1 em 3D no ensaio de citotoxicidade com calceína AM e PI após 24 h de tratamento com Ru(ThySMet) (4, 8, 16 ou 32 μM). **(A)** Imagens de imunofluorescência representativas em que a calceína-AM é mostrada em verde e o PI em vermelho. A conversão de fluorescência verde para vermelha indica morte celular. **(B)** Gráfico apresentando a quantificação da fluorescência

verde (viva) e vermelha (morta). As imagens foram adquiridas no aumento de 200 ×; Barras de escala: 40 μm. As barras mostram média ± SEM e os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (sem tratamento). * p <0,05; ** p <0,001. 64

Figura 20 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) na apoptose de células S1, S2, T4-2 e MDA-MB-231 através da ativação da caspase-3 após 24 h de tratamento. **(A)** Células S1 marcadas com anti-caspase-3 nos microcanais acrílicos **(B)** Células S2 cultivadas *embedded* e marcadas com anti-caspase-3 em colágeno I de rigidez de 1500 Pa. **(C)** T4-2 e células MDA-MB-231 cultivada *on top* marcadas com anti-caspase-3 em Matrigel®. **(D)** células T4-2 e MDA-MB-231 cultivadas *embedded* e coradas com anti-caspase-3 em colágeno I de rigidez de 2020 Pa. Imagens representativas das lâminas foram adquiridas em aumento de 400 ×; Barras de escala: 40 μm. Os núcleos foram corados com DAPI (azul) e a caspase-3 ativa é mostrada em verde. 66

Figura 21 - Células S1 co-cultivadas com estruturas T4-2 nos microcanais acrílicos. **(A)** Imagem confocal representativa de células S1 e T4-2 nos microcanais acrílicos. Núcleos foram corados com DAPI (azul) e T4-2 foram corados com Dil (vermelho). **(B)** células S1 e estruturas T4-2 coradas com anti-caspase-3 em microcanais acrílico. As células foram tratadas durante 24 h com 8 μM do complexo Ru(ThySMet). Imagens representativas das lâminas foram adquiridas com aumento de 400 ×. Barras de escala: 40 μm. 67

Figura 22 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) no rompimento de fita dupla de DNA através da ativação de γ-H2AX. **(A)** células T4-2 marcadas pela ativação de γ-H2AX em Matrigel®. **(B)** células T4-2 marcadas pela ativação em colágeno I de rigidez de 2020 Pa. Imagens representativas das lâminas foram adquiridas com aumento de 400 ×; Barras de escala: 40 μm. Os núcleos foram corados com DAPI (azul) e γ-H2AX é mostrado em rosa. 68

Figura 23 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) na circularidade e área das estruturas de células T4-2. **(A)** Imagens representativas marcando a integrina α6 de células T4-2 cultivadas com o método *on top* com Matrigel®. **(B)** Imagens representativas marcando a integrina α6 de células T4-2 cultivadas com o método *embedded* em colágeno I de rigidez de 2020 Pa. **(C)** Média da área e circularidade de estruturas não tratadas (C-) e tratadas com 8 μM de cultura de células 3D usando o método *on top* com Matrigel®. **(D)** Média da área e circularidade de estruturas não tratadas (C-) e tratadas com 8 μM de cultura de células 3D usando o método *embedded* em colágeno I de rigidez de 2020 Pa. Imagens representativas das lâminas foram adquiridas com aumento de 400 ×; Barras de escala: 40 μm. As barras mostram média ± SEM e os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (sem tratamento). * p <0,001; ** p <0,0001. Os núcleos foram corados com DAPI (azul) e a α6-integrina é mostrada em amarelo. 69

Figura 24 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) no fenótipo das estruturas de células T4-2 e S1. **(A)** Imagens representativas das estruturas T4-2 (painel superior) e S1 (painel inferior) tratadas com o complexo Ru(ThySMet) no momento em que as células foram semeadas. **(B)** Marcação por imunofluorescência das estruturas de células T4-2 (painel superior) e células S1 (painel inferior) com anti-integrina α6 (verde), anti-β-catenina (vermelho) e DAPI (azul). Estruturas representativas foram selecionadas de campos aleatórios. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo (C-) e células tratadas com o PD98059 foram utilizadas como controle positivo (C+). As imagens foram adquiridas com ampliação de 200x; Barras de escala: 40 μm. 70

Figura 25 - Western blotting de proteínas relacionadas ao fenótipo após o tratamento com o complexo Ru(ThySMet). (A) Imagens de western blotting representativas das proteínas integrina β 1, EGFR, p38 MAPK, NF κ B após o tratamento de 24 h com diferentes concentrações de Ru(ThySMet) nas células T4-2 e S1. (B) Gráfico de barras dos níveis de integrina β 1, EGFR, p38 MAPK, NF κ B. As barras mostram média \pm SEM e os resultados foram comparados com o controle negativo (C ⁻) (sem tratamento). Como controle positivo (C ⁺) células tratadas com o PD98059 foram utilizadas. * p <0,05.	71
Figura 26 - Fluxograma do procedimento do ensaio de toxicidade aguda do guia 423 com dose inicial de 50 mg/kg.*.....	75
Figura 27 – Efeitos do complexo Ru(ThySMet) <i>in vivo</i> após o tratamento agudo com 50 ou 300 mg/kg do complexo. (A) Peso dos animais pelo período de 14 dias. (B) Peso dos órgãos dos animais. (C) Análise histológica dos órgãos dos animais corados com HE (D) Análise glomerular. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C ⁻).....	80
Figura 28 - Efeitos genotóxicos do complexo Ru(ThySMet) <i>in vivo</i> após tratamento com 12,5; 25 e 50 mg/kg do complexo. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo (C ⁺). Os resultados foram comparados com o controle negativo (C ⁻) (sem tratamento) (* p \leq 0,05, ** p \leq 0,01).	81
Figura 29 - Efeito do complexo Ru(ThySMet) _{ME} (12,5 μ M) na morfologia das células MDA-MB-231, MCF-10A, 4T1.13ch5T1 e Balb/C 3T3 clone A31 após 24 e 48 h de incubação. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. As figuras foram retiradas no aumento de 10 \times . Barras de escala: 40 μ m.	87
Figura 30 – Efeito do complexo Ru(ThySMet) _{ME} na formação de colônias de células tumorais de mama, MDA-MB-231 e 4T1.13ch5T1. (A) Imagens do ensaio clonogênico de células MDA-MB-231 e 4T1.13ch5T1 tratadas com diferentes concentrações (2, 4 ou 8 μ M) do complexo Ru(ThySMet) _{ME} durante 24 h. (C) Quantificação do número e tamanho das colônias. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C ⁻) (não tratado). (* p<0,05; ** p<0,01 e ***p<0,0001).....	88
Figura 31 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) _{ME} na migração celular, ensaio de <i>Wound Healing</i> , de células MDA-MB-231, MCF-10A, 4T1.13ch5T1 e Balb/C 3T3 clone A31 com 0 e 24 h de tratamento com 1 μ M do complexo Ru(ThySMet) _{ME} . Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. Barras de escala: 40 μ m.....	89
Figura 32 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) _{ME} na apoptose de células MDA-MB-231, MCF-10A e Balb/C 3T3 clone A31. (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 após 24 h de tratamento com 2, 4 ou 8 μ M do complexo. Os ensaios foram realizados em triplicata. Imagens correspondem a uma das triplicatas. A camptotecina foi utilizada como controle positivo (C ⁺). Os resultados foram comparados com o controle negativo (C ⁻) (sem tratamento) (* p \leq 0,05, ** p \leq 0,01).	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	35
Tabela 2 – Atividade citotóxica do complexo Ru(ThySMet) em 2D. IC ₅₀ (μM) dos complexos de rutênio (1-3) nas células MDA-MB-231 e MCF-10A após 24 h de incubação. EP = Erro padrão da média. ^a IS = Índice de seletividade dos complexos. *A cisplatina foi dissolvida em dimetilformamida (#Popolin <i>et al.</i> , 2017).....	38
Tabela 3 - Atividade citotóxica do complexo Ru(ThySMet) em 3D. IC ₅₀ (μM) do complexo Ru(ThySMet) em 2D e em 3D nas células MDA-MB-231, MCF-10A, T4-2 e S1 após 24 h de incubação. DP = Desvio padrão. ^a IS = Índice de seletividade do complexo. * Resultados apresentados no capítulo 2.	62
Tabela 4 - Atividade citotóxica do complexo Ru(ThySMet) e Ru(ThySMet) _{ME} em 2D. IC ₅₀ (μM) do complexo Ru(ThySMet) e Ru(ThySMet) _{ME} nas células MDA-MB-231, MCF-10A, 4T1.13ch5T1 e Balb/C 3T3 clone A31 após 24 h de incubação. DP = Desvio padrão. ^a IS = Índice de seletividade dos complexos. * Resultados apresentados anteriormente no capítulo 2. #Resultados fornecidos pela Dra. Angelica E. Graminha.....	87

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- 2D** – Bidimensional
- 3D** – Tridimensional
- 7AAD** – 7-amino-actinomicina D
- Akt** – Proteína quinase B (*Protein kinase B*).
- ANVISA** – Agência nacional de vigilância sanitária
- BCA** – Ácido bicinchrônico (*BiCinchoninic Acid*)
- BSA** – Albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*)
- CAFs** – Fibroblastos associados ao câncer
- cDNA** – Ácido desoxirribonucleico complementar (*Complimentary DeoxyriboNucleic Acid*)
- CMTN** – Câncer de mama triplo negativo
- CO₂** – Gás carbônico
- Ct** – Ciclo Limiar (*Cycle Threshold*)
- DAPI** – 4',6-diamidino-2-phenylindole (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride*)
- DL₅₀** – Dose letal média
- DMEM** – Meio Dulbecco's modificado (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- DMSO** – Dimetilsulfóxido (*Dimethyl Sulfoxide*)
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico (*DeoxyriboNucleic Acid*)
- EGF** – Fator de crescimento epidermal (*Epidermal Growth Factor*)
- EGFR** – Receptor do fator de crescimento epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor*)
- ER** – Receptor de Estrógeno (*Estrogen Receptor*)
- FBS** – Soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)
- FDA** – *Food and Drug Administration*
- FITC** – Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein IsoThiocyanate*)
- HE** – Hematoxilina e eosina
- HER2** – Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (*Human Epidermal Growth Factor 2 receptor*)
- IC₅₀** – Concentração capaz de induzir 50% de morte celular
- IS** – Índice de Seletividade
- MAPK** – Proteína quinase ativada por mitógeno (*Mitogen Activated Protein Kinases*)
- MB** – Membrana Basal
- MEC** – Matriz Extracelular
- MMPs** – Metaloproteinases de Matriz (*Matrix Metalloproteinases*)
- MMP9** – Metaloproteinases de Matriz 9 (*Matrix Metalloproteinase 9*)
- MTT** – Brometo de dimetiazol-difeniltetrazólio (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*)
- NFKB** – Fator nuclear kappa B (*Nuclear Factor Kappa B*)
- NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*
- OECD** – *Organization for Economic Cooperation and Development*
- 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*)

PI3K – Enzima fosfatidilinositol-3-cinase (*Phosphoinositide 3-kinase*)

RNA – Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

Ru(ThySMet) – trans-[Ru(PPh₃)₂(N,N-dimethylN'-thiophenylthioureato-k₂O,S)(bipy)]PF₆

Ru(ThySMet)_{ME} – Sistema lipídico nanoestruturado do tipo microemulsão (ME) do complexo Ru(ThySMet)

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

TAMs – Macrófagos associados ao tumor

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO..... 15

1.1 CÂNCER	15
1.1.1 BIOLOGIA DO CÂNCER	16
1.1.1.1 Câncer de mama	17
1.1.2 TRATAMENTO DO CÂNCER	19
1.1.2.1 Tratamento do câncer de mama	20
1.1.2.2 Compostos inorgânicos.....	21
1.1.2.2.1 Complexos de rutênio com atividade antitumoral.....	22
1.2 OBJETIVOS	24
1.2.1 OBJETIVO GERAL	24
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO	25

CAPÍTULO 2 – ENSAIOS *IN VITRO* EM 2D..... 26

2.1 CULTURA DE CÉLULAS EM 2D E SUAS APLICAÇÕES.....	26
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.2.1 COMPLEXOS DE RUTÊNIO	27
2.2.1.1 Diluição dos complexos de rutênio	28
2.2.2 LINHAGENS CELULARES.....	28
2.2.3 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	28
2.2.3.1 Ensaio de viabilidade celular – Método do MTT.....	28
2.2.3.2 Ensaio de morfologia celular	29
2.2.3.3 Ensaio de formação de colônias	29
2.2.4 ENSAIOS RELACIONADOS À CASCATA METASTÁTICA.....	30
2.2.4.1 Ensaio de migração celular – Câmara de Boyden.....	30
2.2.4.2 Ensaio de migração - <i>Wound Healing</i>	30
2.2.4.3 Ensaio de invasão celular.....	31
2.2.4.4 Ensaio de adesão celular	31
2.2.4.5 Ensaio de marcação do citoesqueleto com a faloidina	31
2.2.5 ENSAIOS RELACIONADOS A APOPTOSE.....	32
2.2.5.1 Ensaio de apoptose com anexina V por citometria de fluxo.....	32
2.2.5.2 Ensaio de fragmentação nuclear – marcação com DAPI.....	33
2.2.5.3 Ensaio de ciclo celular	33
2.2.5.4 Ensaio de PCR em tempo real.....	33
2.2.5.5 Ensaio de western blotting	35
2.2.6 ENSAIOS PARA VERIFICAÇÃO DE DANOS NO DNA <i>IN VITRO</i>	35
2.2.6.1 Ensaio do cometa <i>in vitro</i>	35
2.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
2.3.1 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	37
2.3.2 ENSAIOS RELACIONADOS À CASCATA METASTÁTICA	40
2.3.3 ENSAIOS RELACIONADOS À APOPTOSE	44

CAPÍTULO 3 – ENSAIOS *IN VITRO* EM 3D..... 51

3.1 CULTURA DE CÉLULAS EM 3D E SUAS APLICAÇÕES	51
3.1.1 SÉRIE DE PROGRESSÃO TUMORAL HMT-3522	52
3.1.2 REVERSÃO TUMORAL.....	54
3.1.3 CULTURA 3D E O TESTE DE NOVOS FÁRMACOS	54
3.1.4 ÓRGÃOS-NO-CHIP.....	56
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.2.1 COMPLEXO DE RUTÊNIO.....	56
3.2.1.1 Diluição dos complexos de rutênio	56
3.2.2 LINHAGENS CELULARES.....	56
3.2.3 CULTIVO DE CÉLULAS EM 3D.....	57
3.2.3.1 Método <i>embedded</i> em colágeno.....	57
3.2.3.2 Método <i>on top</i> com Matrigel®	57
3.2.4 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE CELULAR	58
3.2.4.1 Ensaio de viabilidade celular – Método do MTT.....	58
3.2.4.2 Ensaio de viabilidade celular – Método Calceína/PI.....	58
3.2.4.2 Ensaio de morfologia celular	59
3.2.4.3 Ensaio utilizando o modelo de doença-no-chip (DOC)	59
3.2.5 ENSAIOS RELACIONADOS A APOPTOSE E REVERSÃO TUMORAL.....	60
3.2.5.1 Ensaio de imunofluorescência	60
3.2.5.2 Medição do tamanho e da circularidade das estruturas 3D	60
3.2.5.3 Ensaio de western blotting.....	61
3.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.3.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	61
3.3.3 ENSAIOS RELACIONADOS À APOPTOSE E REVERSÃO TUMORAL.....	64

CAPÍTULO 4 – ENSAIOS *IN VIVO*..... 73

4.1 O USO DE ANIMAIS NAS PESQUISAS E SUA IMPORTÂNCIA.....	73
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	73
4.2.1 COMPLEXO DE RUTÊNIO.....	73
4.2.1.1 Solubilização do complexo Ru(ThySMet)	74
4.2.3 PROCEDIMENTOS ÉTICOS	74
4.2.4 ANIMAIS	74
4.2.5 ENSAIOS DE TOXICIDADE <i>IN VIVO</i>	74
4.2.5.1 Toxicidade aguda	75

4.2.5.2 Análise comportamental	76
4.2.5.3 Análise de peso	76
4.2.5.4 Análise macroscópica e de peso dos órgãos	76
4.2.5.5 Análise histológica do coração, fígado, rim e baço.....	76
4.2.6 ENSAIO PARA VERIFICAÇÃO DE DANOS NO DNA <i>IN VIVO</i>	77
4.2.6.1 Ensaio de cometa <i>in vivo</i>	77
4.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
4.3.1 ENSAIO DE TOXICIDADE.....	78
4.3.2 ENSAIO PARA VERIFICAÇÃO DE DANOS NO DNA.....	80

CAPÍTULO 5 - NANOTECNOLOGIA **82**

5.1 A NANOTECNOLOGIA E SUAS APLICAÇÕES NO TRATAMENTO DE DOENÇAS	82
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	83
5.2.1 SÍNTESE DO SISTEMA LIPÍDICO NANOESTRUTURADO DO TIPO MICROEMULSÃO (ME) DO COMPLEXO RU(THYSMET).....	83
5.2.2 LINHAGENS CELULARES.....	83
5.2.3 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE CITOTOXICIDADE, MIGRAÇÃO E APOPTOSE EM 2D	84
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
5.3.1 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE CITOTOXICIDADE, MIGRAÇÃO E APOPTOSE EM 2D	85

CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS..... **91**

6.1 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	91
-------------------------------------	----

REFERÊNCIAS..... **92**

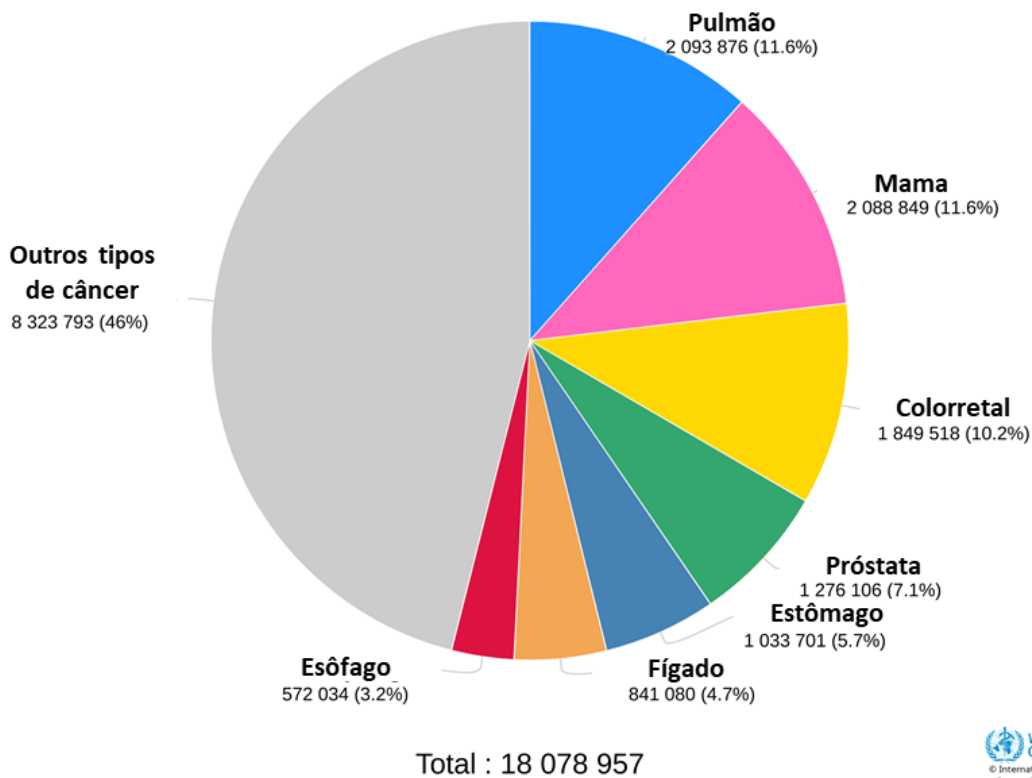
ANEXOS **108**

Capítulo 1 – Introdução

1.1 CÂNCER

O câncer está entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, tendo sido diagnosticado em 2018, 18,1 milhões de novos casos com 9,6 milhões de mortes decorrentes. Entre os tipos mais comuns de câncer no mundo, em ambos os sexos, destacam-se os cânceres de pulmão, mama, colorretal, próstata e estômago (Bray *et al.*, 2018; Who, 2018), como pode ser observado na Figura 1, excluindo os cânceres de pele não-melanoma.

Figura 1 – Número estimado dos tipos mais comuns de cânceres em 2018 em ambos os sexos e em todas as idades no mundo. *



*Extraído e modificado de: Internacional agency for research on cancer (Iarc, 2018).

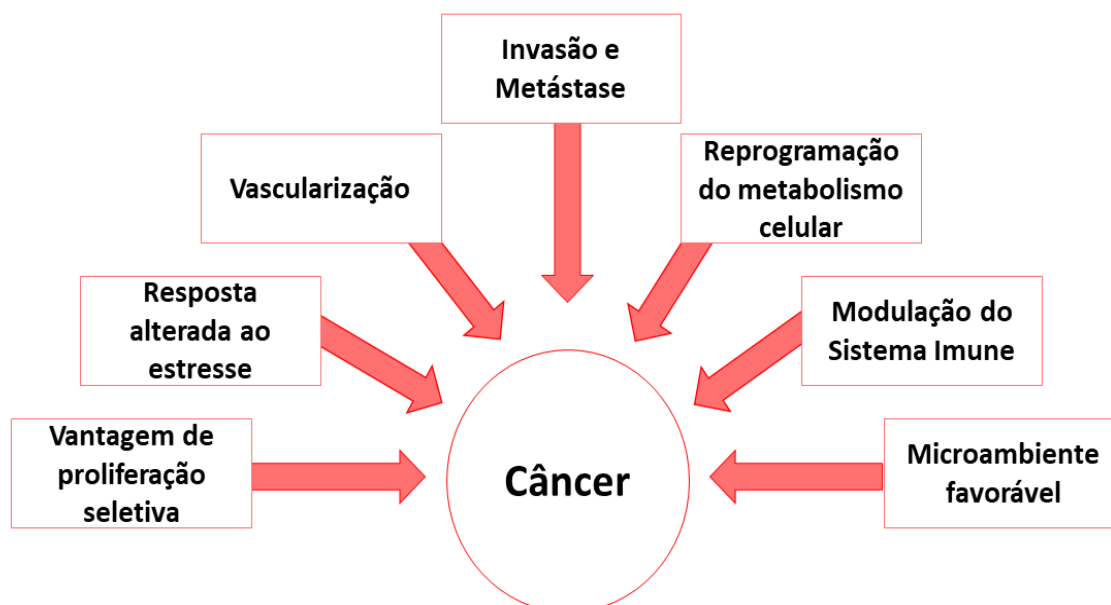
As estimativas brasileiras do Instituto Nacional de Câncer José Gomes Alencar da Silva (INCA) para o biênio de 2018 e 2019 demonstram que o número de casos de câncer por ano continua a aumentar em relação aos biênios anteriores, sendo esperado para este biênio 600 mil novos casos por ano. O tipo mais incidente será o de pele não melanoma entre homens e mulheres, seguido em mulheres pelo câncer de mama com aproximadamente 60.000 novos

casos/ano, e em homens pelo de próstata com aproximadamente 68.000 novos casos/ano (Brasil, 2018). Nos Estados Unidos, o câncer também é considerado um grande problema de saúde pública, já que nos próximos anos os casos de morte decorrentes da doença devem superar os de doenças cardiovasculares (Siegel *et al.*, 2015).

1.1.1 Biologia do câncer

O câncer é uma doença extremamente heterogênea composta por diferentes subtipos que têm em comum o crescimento exacerbado de células (Brasil, 2019b) e surge pelo acúmulo de mutações que levam a aquisição de um conjunto de importantes características, destacadas na Figura 2. Entre estas características estão o crescimento seletivo e a vantagem proliferativa das células tumorais em relação às células não tumorais, resposta ao estresse alterada favorecendo a sobrevivência global, vascularização por diferentes processos, capacidade de invadir e formar metástase, reprogramação metabólica, microambiente favorável e modulação do sistema imune (Hanahan e Weinberg, 2000; Pedraza-Farina, 2006; Hanahan e Weinberg, 2011; Fouad e Aanei, 2017).

Figura 2 – Características do câncer durante o desenvolvimento de tumores. *



*Extraído e modificado de (Fouad e Aanei, 2017).

No processo de desenvolvimento de tumores o microambiente tumoral assume grande importância por garantir muitas das condições necessárias para a progressão tumoral. Este

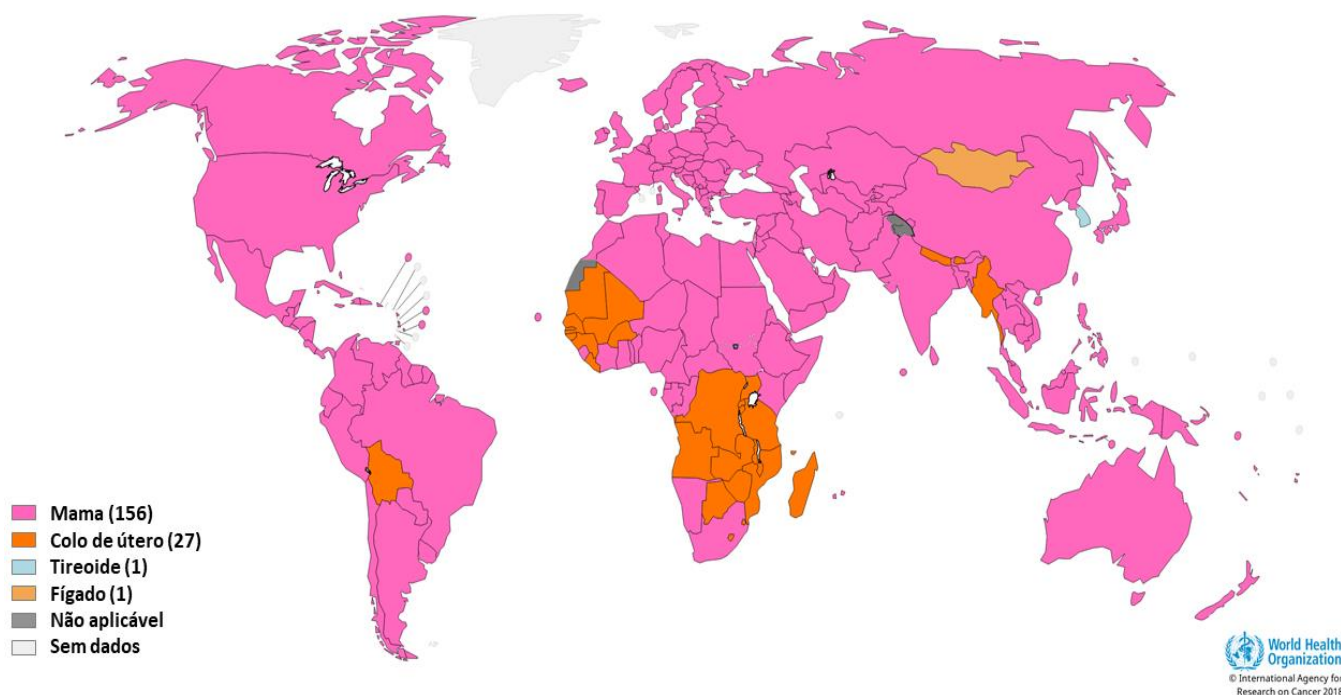
ambiente é bastante complexo e é formado por células estromais e componentes não celulares. Destacam-se as células vasculares endoteliais que são capazes de formar vasos sanguíneos para suprir o crescimento dos tumores; os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) que produzem diferentes fatores de crescimento, dentre eles o endotelial que, por sua vez, favorecem a angiogênese e componentes da matriz extracelular (MEC); e linfócitos, macrófagos e neutrófilos que produzem citocinas que favorecem a imunossupressão. Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) tem um papel bastante importante na imunossupressão e no remodelamento tumoral através da secreção de diferentes metaloproteinases de matriz (MMPs). Além do mais, a MEC também adquire relevância no desenvolvimento do tumor devido a constantes interações com as células tumorais (Adjei e Blanka, 2015). Todas estas características favorecem o aparecimento de metástases que são responsáveis pela maior parte das mortes causadas pelo câncer (AACR, 2018).

Diferentes fatores de risco podem contribuir para o desenvolvimento do câncer, entre os principais fatores em todo o mundo estão: o envelhecimento, uso do tabaco, o consumo de álcool, uma dieta não balanceada e rica em gorduras e o sedentarismo. É importante destacar que uma grande porcentagem, aproximadamente entre 30 e 50%, dos cânceres pode ser evitável adotando-se um estilo de vida ativo e saudável (Who, 2019b). Especificamente, nos Estados Unidos 4 de cada 10 casos de câncer estão relacionados a fatores de riscos que são possíveis de serem prevenidos (Bray *et al.*, 2018).

1.1.1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é um câncer muito comum em mulheres tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento, como pode ser observado na Figura 3, sendo que de uma a cada quatro mulheres diagnosticadas com câncer no mundo será diagnosticada com câncer de mama (WHO, 2019a).

Figura 3 – Tipo de câncer mais comum por país em mulheres de todas as idades em 2018. *



*Extraído e modificado de: Internacional agency for research on cancer (IARC, 2018).

As glândulas mamárias femininas são estruturas bastante complexas. Estas estruturas são compostas de lobos, que por sua vez, são formados de lóbulos compostos por um conjunto de ácinos mamários, que são as unidades funcionais da mama que se diferenciam na presença de hormônios lactantes para produzir leite. Os lobos e os lóbulos estão conectados pelos ductos mamários, que são responsáveis por transportar o leite para o mamilo e que possuem células epiteliais luminiais polarizadas que interagem em sua superfície basal com uma rede de células mioepiteliais contráteis, estas últimas são responsáveis pelo fluxo de leite (Nelson *et al.*, 2006; Butcher *et al.*, 2009; Vidi, Bissell, *et al.*, 2013; NCI, 2019).

Os tipos mais comuns de câncer de mama são aqueles que começam nos lóbulos ou nos ductos mamários sendo chamados respectivamente de carcinoma lobular e ductal *in situ* e correspondem a 40 a 75% dos casos. Estes carcinomas podem adquirir características invasivas tornando-se mais agressivos (Chatterjee e Mccaffrey, 2014).

Essa doença apresenta diferentes subtipos que foram classificados por técnicas moleculares. Os subtipos luminal A e luminal B possuem alta expressão de receptores hormonais e correspondem a 70% dos cânceres de mama invasivos. Outro subtipo muito comum é o que possui amplificação do receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER2), não possui receptores hormonais e corresponde a aproximadamente 15% dos

cânceres de mama. Outro subtipo é o *basal like* que é caracterizado por não possuir receptores hormonais ou de HER2, sendo conhecido como triplo negativo, CMTN, esse corresponde a 15% dos cânceres invasivos, é mais agressivo e seu tratamento é mais difícil por não apresentar uma terapia alvo (Schnitt, 2010; Abramson *et al.*, 2015). Ainda, os CMTN são também heterogêneos, apresentando quatro subtipos moleculares, sendo dois basais (BL1 e BL2), um mesenquimal (M) e um receptor de andrógeno luminal (LAR). Essa heterogeneidade faz com que os CMTNs apresentem diferentes características e diferentes velocidades de progressão (Lehmann *et al.*, 2016). Portanto, o tratamento para o câncer de mama depende da caracterização do subtipo da doença para ser mais eficaz.

O principal fator de risco para desenvolvimento do câncer de mama é a idade avançada. Além desse fator, outros como fatores ambientais e comportamentais, como obesidade, nível de atividade física baixo e dieta não balanceada, também são considerados de risco para o aparecimento desta doença. Além do mais, fatores da história reprodutiva e hormonal, como a nuliparidade e o uso de contraceptivos hormonais; e fatores genéticos e hereditários, devido a alterações genéticas, especialmente nos genes BRCA1 e BRCA2; e histórico de câncer de mama e de ovário na família também estão relacionados (ACS, 2017/2018; Brasil, 2019a).

A detecção inicial do câncer de mama através de exames de mamografia, o autoexame e exame médico, é essencial para garantir melhores taxas de sobrevivência, sendo que a detecção antes do aparecimento dos sintomas pode garantir um melhor tratamento e diminuir o risco de morte do paciente (WHO, 2019a).

A grande heterogeneidade encontrada no câncer de mama dificulta bastante seu tratamento, pois cada subtipo da doença possui características específicas e requer um tratamento diferenciado (Holliday e Speirs, 2011; Rivenbark *et al.*, 2013).

1.1.2 Tratamento do câncer

Apesar dos progressos no campo da biologia molecular e celular nas últimas décadas, o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais ainda é um enorme desafio, pois apenas 10% dos produtos em desenvolvimento clínico são bem-sucedidos (Hait, 2010). Além disso, os custos e o tempo para desenvolvimento de um único fármaco são extremamente elevados, sendo que os gastos ficam em torno de \$648 e \$1395 milhões por cada nova substância testada e o tempo de testes pode demorar aproximadamente de 6 a 15 anos (Dimasi *et al.*, 2016; Prasad e Mailankody, 2017). Após esses longos períodos muitos fármacos são lançados no mercado por preços elevados por indústrias farmacêuticas chegando a ter um custo de mais de \$100.000

dólares por ano de tratamento, o que impossibilita o acesso à maior parte da população (Light e Kantarjian, 2013).

Além dos altos custos, os principais problemas dos agentes quimioterápicos são a aquisição de rápida resistência celular ao tratamento e a impossibilidade de aumentar as doses sem toxicidade letal para o paciente (Chakraborty, 2007; Chari, 2008). Ainda, a maior parte dos medicamentos utilizados atualmente no tratamento do câncer não apresenta seletividade para células tumorais, tornando o tratamento difícil e gerando indesejáveis efeitos adversos aos pacientes, como anemia, fadiga, perda de densidade óssea, mudanças no cabelo, danos ao coração, infertilidade, dor, entre outros (Chari, 2008; ACS, 2016/17).

Devido a todas essas peculiaridades, a busca por compostos candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos antitumorais torna-se uma tarefa desafiadora. Dados recentes demonstram que houve um avanço na prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer e que este foi devido ao progresso alcançado pelas descobertas através de pesquisas. Ainda, dados mostram que nos Estados Unidos houve uma redução de 26% de mortes causadas pelo câncer de 1991 a 2015 (AACR, 2018). Estes dados reforçam cada vez mais a importância do desenvolvimento de novas pesquisas nesta área e a busca por novos tratamentos.

1.1.2.1 Tratamento do câncer de mama

O tratamento do câncer de mama deve ser analisado caso a caso podendo incluir diferentes tipos de procedimentos dependendo do tipo do tumor e do estágio em que a doença foi diagnosticada. Entre os procedimentos, primeiramente está a remoção local do tumor, através de cirurgia, seguida ou não de outros procedimentos, como a radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e/ou terapia alvo (Brasil, 2019c).

O tratamento dos pacientes com CMTN é mais difícil, sendo que o tratamento padrão utilizado para pacientes diagnosticados com o CMTN é a quimioterapia (Bianchini *et al.*, 2016), já que não existe nenhuma terapia alvo, aprovada pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA), para esse tipo subtipo de câncer de mama (Lehmann *et al.*, 2016) e a hormonioterapia não é eficaz. O tempo médio de sobrevivência para pacientes com CMTN metastático é de aproximadamente apenas um ano (Waks e Winer, 2019).

1.1.2.2 Compostos inorgânicos

A química inorgânica medicinal é uma área em crescimento inicialmente alimentada pela descoberta da cisplatina cerca de 40 anos atrás (Van Rijt e Sadler, 2009). Os complexos metálicos vêm sendo utilizados como alternativa para o tratamento do câncer e de diversas outras doenças, como malária e Alzheimer, pois podem reduzir os efeitos adversos, já que muitos elementos metálicos são essenciais ao homem, como é o caso do ferro (Barry e Sadler, 2013).

Estes complexos apresentam características notáveis que podem ser exploradas para o desenvolvimento de novos fármacos. Eles possuem uma grande variedade de números de coordenação e de geometrias e, ainda, são susceptíveis à síntese combinatória de elementos. Estas características fazem com que seja possível combinar elementos já conhecidos com objetivo de buscar uma melhor atividade em relação ao ligante livre (Meggers, 2009). Os compostos tiazolínicos representam uma importante classe de compostos heterocíclicos, os quais possuem um amplo espectro de atividade biológica, tal como atividade antitumoral (Vicini *et al.*, 2003). Os ligantes N,N'-dialquil-N-aciltioureas são muito versáteis, sendo que pequenas mudanças em suas estruturas podem ser facilmente realizadas e levam à diferentes propriedades físicas e químicas. Portanto, o desenho de fármacos antitumorais é uma das mais promissoras estratégias para aumentar a sua eficácia e minimizar a sua toxicidade (Plutín *et al.*, 2014).

A cisplatina e as sucessivas gerações de fármacos antitumorais à base de platina demonstraram que os complexos metálicos podem desempenhar um papel importante no tratamento do câncer. Ainda hoje, a cisplatina é um dos agentes quimioterápicos mais utilizados e eficazes para o tratamento de vários tumores (Hanigan e Devarajan, 2003; Van Rijt e Sadler, 2009). Porém, um dos limitantes de sua dose é a nefrotoxicidade, que é o resultado do transporte de cisplatina para células do epitélio renal, lesão ao DNA nuclear, entre outros (Miller *et al.*, 2010). Apesar de apresentar severos efeitos colaterais, o sucesso clínico obtido pela cisplatina ainda é um grande estímulo para o uso de metais no tratamento do câncer (Ronconi e Sadler, 2007; Bruijninx e Sadler, 2008).

O mecanismo de ação da cisplatina já foi bastante investigado e estudos mostram que está relacionado a sua capacidade de se ligar ao DNA e conseqüentemente interferir nos processos de replicação e transcrição, causar danos a essa biomolécula e conseqüentemente induzir a apoptose (Fuertes *et al.*, 2003; Dasari e Tchounwou, 2014).

Atualmente, é crescente o número de pesquisas que buscam novos tratamentos mais eficazes para os diferentes tipos de câncer, envolvendo principalmente fármacos metálicos a base de platina e outros metais. Os medicamentos a base de platina ainda correspondem a 50% dos medicamentos utilizados na clínica para o tratamento do câncer (Kelland, 2007; Wheate *et al.*, 2010; Ciarimboli, 2012; Barry e Sadler, 2013; Kang *et al.*, 2015). Especificamente, nos casos de CMTN a quimioterapia envolvendo complexos de platina também é muito utilizada (Bianchini *et al.*, 2016).

1.1.2.2.1 Complexos de rutênio com atividade antitumoral

A exploração de complexos contendo outros metais de transição podem resultar em novos fármacos mais eficazes, que podem superar alguns dos inconvenientes associados à terapia com a cisplatina e seus derivados, incluindo a redução de efeitos colaterais (RIJT, SADLER, 2009). Entre os vários metais de transição testados, os complexos de rutênio octaédricos têm atraído grande atenção e destacado interesse. Nas últimas duas décadas estes complexos vem sendo muito estudados para o tratamento do câncer devido as suas características únicas e resultados importantes obtidos (Antonarakis e Emadi, 2010; Barry e Sadler, 2013). Esses complexos apresentam três características que os tornam adequados à aplicação medicinal: alta taxa de troca de ligantes, estados de oxidação acessíveis e a habilidade de “imitar” o ferro para se ligar a biomoléculas (Allardyce, 2001).

A capacidade do rutênio se ligar a biomoléculas, como a transferrina, poderia justificar sua seletividade para células tumorais. Um estudo com o complexo $[\text{Ru}(\text{GA})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ demonstrou sua interação com receptores de transferrina, justificando a seletividade para células tumorais da linhagem MDA-MB-231. Uma maior expressão destes receptores foi observada nestas células em relação as células não tumorais da linhagem MCF-10A (Naves *et al.*, 2019).

Os complexos de rutênio são metais de transição de segunda geração que são descritos na literatura como menos tóxicos e mais seletivos para células tumorais (Antonarakis e Emadi, 2010). Possuem também outras características importantes destacadas na literatura, entre elas estão efeitos antiparasitários e antibióticos (Adams *et al.*, 2013; Pavan *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2014; Gorle *et al.*, 2014).

O número de estudos envolvendo complexos de rutênio com atividade antitumoral cresceu muito nos últimos anos, estimulado principalmente pela entrada de dois complexos de

rutênio, o NAMI-A e o KP1019, em ensaios clínicos. O complexo de rutênio NAMI-A apresenta alta seletividade para metástases oriundas de tumores sólidos e apresenta baixa toxicidade em doses farmacologicamente ativas. Já o KP1019 é utilizado para o tratamento de diferentes tipos de câncer por ter como principal alvo o DNA e também por desencadear a apoptose (Sava e Bergamo, 2000; Antonarakis e Emadi, 2010; Barry e Sadler, 2013; Alessio e Messori, 2018). Outros estudos mostram também a eficiência de diferentes complexos de rutênio no tratamento do câncer de mama *in vitro* e *in vivo* (Popolin *et al.*, 2017).

O número de estudos com esses complexos vem crescendo, um exemplo é o aumento das pesquisas envolvendo complexos de rutênio para o tratamento do câncer de mama nos últimos anos. Ao realizar uma busca no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) em 2019 com as palavras-chaves em inglês “*breast*” e “*cancer*” e “*treatment*” e “*ruthenium*” são encontrados 80 artigos, sendo a maior parte das publicações dos últimos cinco anos, demonstrando o crescente interesse por esses novos complexos metálicos.

Portanto, os complexos de rutênio são candidatos interessantes de estudo, já que podem produzir conhecimento para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais após diferentes testes *in vitro* e *in vivo*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi selecionar dentre diferentes moléculas um novo complexo de rutênio, o qual pudesse ser candidato a medicamento antitumoral, e avaliar os efeitos do complexo selecionado através de estudos *in vitro* em células de mama em cultura celular bidimensional (2D) e tridimensional (3D) e estudos de toxicidade e genotoxicidade *in vivo*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar três complexos de rutênio, através do ensaio de viabilidade celular – método do MTT, o efeito citotóxico dos complexos em células da linhagem não tumoral de mama, MCF-10A, e da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 e selecionar o complexo mais seletivo *in vitro* em 2D;
- Avaliar através de diferentes ensaios *in vitro* em 2D o efeito do complexo selecionado em inibir os passos da cascata metastática, induzir a apoptose e a genotoxicidade nas células MCF-10A e MDA-MB-231;
- Avaliar através de ensaios *in vitro* em diferentes modelos de cultura em 3D o efeito do complexo selecionado em ser citotóxico, induzir a apoptose e reverter o fenótipo tumoral nas células de mama da progressão tumoral HMT-3522;
- Avaliar através de ensaios *in vivo* a toxicidade e a genotoxicidade causada pelo tratamento dos camundongos com o complexo selecionado;
- Avaliar através de diferentes ensaios *in vitro* em 2D os efeitos do complexo selecionado nanoestruturado em ser citotóxico, inibir a migração e induzir a apoptose em células das linhagens não tumorais, MCF-10A e Balb/C 3T3 clone A31, e das linhagens tumorais de mama MDA-MB-231 e 4T1.13ch5T1.

1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO

Este trabalho é dividido em 6 capítulos, dispostos de forma sequencial em relação ao desenvolvimento dos ensaios para análise dos efeitos do complexo de rutênio selecionado. O primeiro capítulo apresenta a introdução ao tema de pesquisa focando em fornecer uma visão geral do tema estudado, além dos objetivos gerais e específicos do trabalho. Os capítulos seguintes apresentam uma introdução mais específica, a metodologia utilizada para os ensaios de análise do complexo de rutênio selecionado, os resultados obtidos e uma discussão a respeito destes. Por fim, no último capítulo são apresentadas as conclusões e perspectivas obtidas a partir de todos os resultados encontrados.

Capítulo 2 – Ensaios *in vitro* em 2D

2.1 CULTURA DE CÉLULAS EM 2D E SUAS APLICAÇÕES

A cultura de células tem sido amplamente utilizada há muitos anos para uma variedade de aplicações (Ravi *et al.*, 2015) por apresentar vantagens em relação aos ensaios *in vivo*. Os métodos *in vitro* são métodos rápidos e permitem diferentes tipos de análises simultâneas (Zips *et al.*, 2005). Além de que ensaios com cultura de células reduzem o número de animais utilizados para pesquisa na fase inicial de testes (Festing e Wilkinson, 2007).

Uma importante aplicação da cultura de células é o estudo dos efeitos de novos fármacos em diferentes tipos de células para o tratamento de várias doenças, incluindo o câncer (Vidi, Bissell, *et al.*, 2013; Antoni *et al.*, 2015; Ravi *et al.*, 2015). Ensaios *in vitro* podem fornecer importantes dados para análise de uma nova substância, sendo possível com estes ensaios selecionar potenciais substâncias para testes mais específicos e obter dados a respeito do seu mecanismo de ação (Zips *et al.*, 2005). Esse método é utilizado também para fabricação de vacinas, produção de biofármacos e tecnologia de reprodução assistida, entre outras importantes aplicações (Yao e Asayama, 2017).

As pesquisas *in vitro* também são importantes para garantir a segurança de um novo medicamento. Os testes de novos compostos com potencial antitumoral devem identificar sua citotoxicidade, seu potencial genotóxico e mutagênico para garantir a segurança de seu uso. Diferentes testes *in vivo* e *in vitro* são recomendados, já que um único teste pode não garantir sua segurança. Normalmente estes testes são rápidos e eficientes. Agências nacionais, como a agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA), e internacionais, como a *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), recomendam diferentes testes para a avaliação de compostos, como o ensaio do cometa (Oecd, 2001b; Witte *et al.*, 2007; Oecd, 2010; Brasil, 2013; Oecd, 2014b; a; Araldi *et al.*, 2015).

Tradicionalmente, as culturas em monocamada (culturas de células 2D) são as mais usadas para realizar estudos *in vitro* e têm sido muito úteis para pesquisas (Vidi, Bissell, *et al.*, 2013; Antoni *et al.*, 2015; Ravi *et al.*, 2015). Porém, já existem diferentes métodos de cultivo de células *in vitro* que apresentam vantagens, como a cultura de célula em 3D e órgãos-no-chip. Contudo, apesar do avanço das tecnologias, os ensaios com cultura de células *in vitro* em 2D ainda são uma importante ferramenta para o desenvolvimento de pesquisa básica, biomédicas e pré-clínicas (Ravi *et al.*, 2015; Baust *et al.*, 2017). Portanto, ensaios com cultura de células

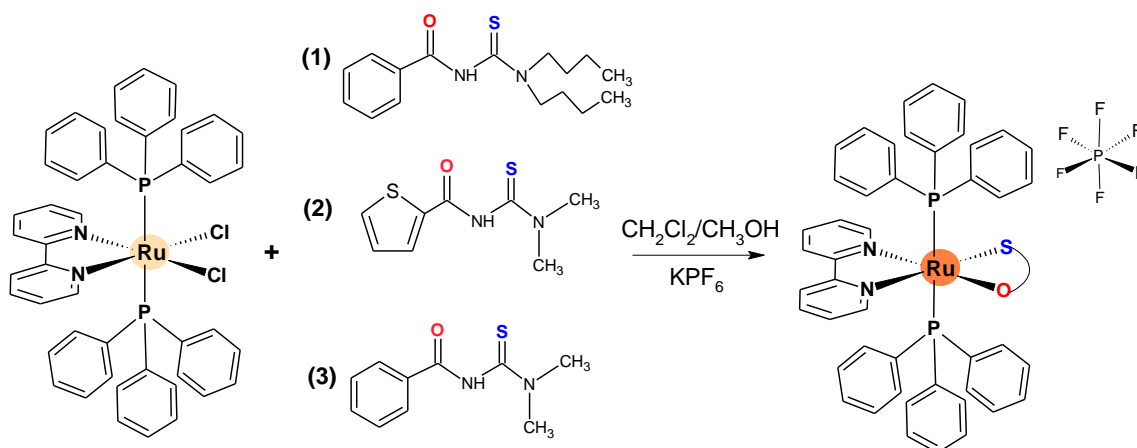
em 2D foram utilizados para realizar a análise inicial dos complexos de rutênio estudados neste trabalho.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Complexos de rutênio

A síntese e caracterização dos complexos de rutênio utilizados 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 Dr. Ana Maria Plutín. Os complexos foram sintetizados de acordo com o método geral anteriormente relatado (Correa *et al.*, 2015) e a sua caracterização completa está descrita em Becceneri *et al.*, 2018 (Becceneri *et al.*, 2018). O procedimento envolveu reações entre o precursor do complexo *cis*-[RuCl₂(PPh₃)₂(bipy)] com derivados de tiourea *N*-Acyl-*N',N'*-disubstituídos produzindo complexos com a fórmula geral *trans*-[Ru(PPh₃)₂(L)(bipy)]PF₆, em que L representa o ligante aniônico (Figura 4). Os complexos de rutênio sintetizados foram: *trans*-[Ru(PPh₃)₂(N,N-dibutyl-*N'*-benzoylthioureato-k₂O,S)(bipy)]PF₆ (1), *trans*-[Ru(PPh₃)₂(N,N-dimethyl-*N'*-thiophenylthioureato-k₂O,S)(bipy)]PF₆ (2), e *trans*-[Ru(PPh₃)₂(N,N-dimethyl-*N'*-benzoylthioureato-k₂O,S)(bipy)]PF₆ (3). A técnica de ressonância magnética nuclear demonstrou que os complexos são estáveis em meio de cultura por 48 h.

Figura 4 – Rota sintética dos complexos de rutênio *trans*-[Ru(PPh₃)₂(N,N-dibutyl-*N'*-benzoylthioureato-k₂O,S)(bipy)]PF₆ (1), *trans*-[Ru(PPh₃)₂(N,N-dimethyl-*N'*-thiophenylthioureato-k₂O,S)(bipy)]PF₆ (2), e *trans*-[Ru(PPh₃)₂(N,N-dimethyl-*N'*-benzoylthioureato-k₂O,S)(bipy)]PF₆ (3).



2.2.1.1 Diluição dos complexos de rutênio

Os complexos para os ensaios *in vitro* foram solubilizados em Dimetil Sulfóxido (DMSO, 100%) e as concentrações foram preparadas utilizando o meio de cultura adequado. A concentração final de DMSO foi de 0,1% em cada amostra. Os poços que não receberam tratamento com os complexos, os controles negativos (C-), receberam 0,1% de DMSO (concentração final). As concentrações utilizadas nos ensaios foram escolhidas a partir de estudos pilotos (dados não apresentados).

2.2.2 Linhagens celulares

As células da linhagem humana de CMTN 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 (2 mM). 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).

As linhagens celulares utilizadas foram mantidas em uma incubadora úmida com 5% de CO₂ e a 37°C e foram obtidas no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN).

2.2.3 Ensaios de citotoxicidade

2.2.3.1 Ensaio de viabilidade celular – Método do MTT

O efeito citotóxico dos complexos sobre as células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 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 x 10⁴ células/ 100 µl) foram semeadas em meio apropriado em placas de 96 poços estéreis. Estas foram mantidas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas (h) em estufa de cultura de células. No dia seguinte, o meio de cultura foi retirado dos poços e diferentes concentrações dos complexos (0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 µM) foram adicionadas aos poços. As células foram incubadas por 24 h nas mesmas condições descritas acima. Após o tempo de incubação, uma solução contendo MTT (1 mg/mL) foi adicionada (100 µL/poço). As placas foram então

mantidas durante 4 h 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).

2.2.3.2 Ensaio de morfologia celular

As células MDA-MB-231 e 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 h em estufa de cultura de células. No dia seguinte, o meio de cultura foi retirado dos poços e as células tratadas com diferentes concentrações (1,56; 6,25 e 12,5 µM) do complexo Ru(ThySMet). As células foram incubadas por 24 h 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).

2.2.3.3 Ensaio de formação de colônias

As células MDA-MB-231 foram semeadas ($3 \times 10^2/2000$ µL) em meio apropriado em placas de Petri estéreis de 6 cm e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 h em estufa de cultura de células. Após o tempo, as células foram incubadas com diferentes concentrações do complexo Ru(ThySMet) por 2 h. 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 durante 10 dias. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com uma solução de metanol e ácido acético (3:1) por 5 minutos (min) e coradas com uma solução de metanol e cristal violeta a 5% por 15 min. As placas foram fotografadas e, em seguida, as colônias foram contadas, e seu tamanho foi medido com auxílio do *software* Image J.

2.2.4 Ensaios relacionados à cascata metastática

2.2.4.1 Ensaio de migração celular – Câmara de Boyden

As células MDA-MB-231 e MCF-10A ($5 \times 10^4/350 \mu\text{L}$) foram semeadas em meio sem FBS e em diferentes concentrações do complexo Ru(ThySMet) na câmara superior de insertos de migração (para placas de 24 poços). As células do controle positivo (C+) foram incubadas somente com meio de cultura sem adição de FBS e o veículo utilizado para solubilizar os complexos, DMSO. Meio DMEM suplementado com 10% de FBS foi adicionado à câmara inferior para agir como quimioatraente da migração, exceto no controle negativo (C-), que não recebeu FBS na câmara inferior. As células foram mantidas em incubadora úmida com 5% de CO_2 a 37°C por 22 h. Em seguida, as células remanescentes na câmara superior foram removidas com o auxílio de hastes flexíveis de algodão. As células que foram capazes de migrar para o outro lado da membrana do inserto foram fixadas com metanol por 5 min 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 (Olema N-120). Fotos representativas de cada membrana foram retiradas com auxílio de uma câmera fotográfica (Moticam 1000 – 1.3MP Live Resolution).

2.2.4.2 Ensaio de migração - *Wound Healing*

As células MDA-MB-231 e MCF-10A foram semeadas (1×10^5 células/1000 μL) em meio apropriado em placas de 12 poços estéreis. Estas foram mantidas a 37°C e 5% CO_2 até a cultura atingir 100% de confluência. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, uma ponteira de 100 μL 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 do complexo Ru(ThySMet). Imagens foram capturadas nos tempos de 0 e 24 h com auxílio de um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) acoplado a uma câmera fotográfica (Moticam 1000 – 1.3 MP Live Resolution).

2.2.4.3 Ensaio de invasão celular

Para o ensaio de invasão celular foram utilizados insertos cuja parte interna possui uma fina camada de Matrigel®, material que simula a MEC. Os insertos foram previamente hidratados com meio sem FBS por 2 h em ambiente úmido a 37°C. Posteriormente, as células MDA-MB-231 e MCF-10A ($5 \times 10^4/350 \mu\text{L}$) foram semeadas na câmara superior dos insertos em meio sem FBS e em diferentes concentrações do complexo Ru(ThySMet). Em seguida, os mesmos passos descritos no item 2.2.4.1 Ensaio de migração celular – Câmara de Boyden foram seguidos.

2.2.4.4 Ensaio de adesão celular

Para o ensaio de adesão celular vitronectina (1 μg), laminina (0,3 μg) ou fibronectina (0,3 μg) foram adicionadas as placas num tampão de adesão celular (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO_4 e 1 mM MnCl_2 pH 7,35) durante a noite a 4°C. Para o colágeno tipo I placas de 96 poços com *coating* de colágeno tipo I (10 μg) (BD Bioscience) foram utilizadas. Em seguida, as placas foram bloqueadas com tampão de adesão (tampão HEPES 20mM pH 7,35 com 1mM de MnCl_2 , 1mM de MgSO_4 , 5mM de KCl e 150mM de NaCl) contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA) por 1 h e em seguida, os poços foram lavados com 100 μL de tampão de adesão. As células MDA-MB-231 ($5 \times 10^4/300 \mu\text{L}$) foram incubadas por 30 min com diferentes concentrações do complexo Ru(ThySMet), em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37°C e então semeadas e incubadas nas mesmas condições por mais 1 h. Em seguida, as células não aderidas foram removidas cuidadosamente através de lavagem e as células aderidas fixadas com 100 μL de etanol 70% por 10 min e coradas com cristal violeta 0,5% por 20 min. O excesso de corante foi removido por lavagem com PBS. As células coradas foram diluídas em 100 μL de solução de 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), por 30 min e foi feita a leitura das placas em leitor de ELISA (Labtech LT4000) com 540 nm de comprimento de onda.

2.2.4.5 Ensaio de marcação do citoesqueleto com a faloidina

Os efeitos do complexo Ru(ThySMet) no citoesqueleto de F-actina foram verificados utilizando o anticorpo Alexa Fluor® 488 Phalloidin (Life Technologies). As células de mama da linhagem tumoral MDA-MB-231 (5×10^4 células/100 μL) foram plaqueadas em placas de

96 poços, estéreis, de cor preta, e mantidas a 37°C em incubadora umidificada com 5% de CO₂ por 24 h. Após, as células foram tratadas com diferentes concentrações do complexo Ru(ThySMet) e incubadas por 2 h. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS durante 30 min e depois permeabilizadas com Triton-X 100 a 0,1% em PBS durante 5 min em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram bloqueadas com BSA a 2% durante 30 min, com posterior adição de Alexa Fluor® 488 Phalloidin durante 20 min. Em seguida as células foram coradas com 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) (Life Technologies) durante 4 min e lavadas três vezes com PBS. As imagens foram obtidas com a ajuda do microscópio automatizado ImageXpress® Micro XLS System (Molecular Device).

2.2.5 Ensaios relacionados a apoptose

2.2.5.1 Ensaio de apoptose com anexina V por citometria de fluxo

A atividade apoptótica do complexo Ru(ThySMet) 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 µL) em placas de 24 poços estéreis. Estas foram mantidas a 37°C e 5% CO₂ por 24 h em estufa de cultura de células. No dia seguinte, o meio de cultura foi retirado dos poços e diferentes concentrações do complexo Ru(ThySMet) foram adicionadas aos poços, por 2 h. Em seguida a placa foi centrifugada a 2000 rpm por 5 min a 4°C, lavadas com PBS e ressuspensas em 200 µL de tampão de ligação, proveniente do kit. As células foram incubadas com 5 µL de 7-amino-actinomicina D (7AAD) e 5 µL de Ficoeritrina (PE) Anexina V por 15 min ao abrigo da luz e após o tempo de incubação foi removido o sobrenadante e adicionado aos poços 300 µL 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 apoptose foi utilizada a camptotecina (32 µM), um quimioterápico indutor de apoptose (Zeng *et al.*, 2012).

2.2.5.2 Ensaio de fragmentação nuclear – marcação com DAPI

Para verificar se o complexo Ru(ThySMet) induz a fragmentação nuclear, processo que ocorre durante a apoptose celular. As células MDA-MB-231 e MCF-10A foram semeadas ($1 \times 10^4/100 \mu\text{L}$) em placas de 96 poços estéreis e incubadas a 37°C e 5% CO_2 por 24 h em estufa de cultura de células. Após a incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações do complexo durante 2 h. Então, foram lavadas com PBS e, em seguida, fixadas com metanol durante 10 min. Depois de fixadas, as células foram coradas com $1 \mu\text{g/mL}$ de DAPI diluído em PBS por 10 min. 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 $0,5 \mu\text{M}$.

2.2.5.3 Ensaio de ciclo celular

Para verificar se o complexo Ru(ThySMet) é capaz de alterar o ciclo celular, as células MDA-MB-231 e MCF-10A, foram semeadas ($5 \times 10^5/1000 \mu\text{L}$) em placas de 6 poços estéreis e incubadas a 37°C e 5% CO_2 por 24 h em estufa de cultura de células. Após a incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações do complexo Ru(ThySMet) durante 24 h 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 h. Após o período, as células foram centrifugadas e ressuspensas em uma solução de RNase A ($0,02 \text{ mg/mL}$) em PBS a 37°C por 30 min, e então incubadas com tampão de ligação contendo iodeto de propídio (PI) ($10 \mu\text{g/mL}$). Finalmente, o teor de DNA foi determinado por citometria de fluxo no citômetro Accuri C6 (BD) e os dados e a quantificação das fases foram avaliados com o programa *BD CSampler*. Como controle positivo foi utilizada a camptotecina ($32 \mu\text{M}$).

2.2.5.4 Ensaio de PCR em tempo real

A expressão de genes relacionados a apoptose foi verificada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Para tal, as células MDA-MB-231 e MCF-10A ($1 \times 10^6/2000 \mu\text{L}$) foram semeadas em placas de Petri estéreis de 6 cm e incubadas a 37°C e 5% CO_2 por 24 h em estufa de cultura de células. Após a incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações do complexo Ru(ThySMet) durante 2 h e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após este período, as células foram lisadas com Trizol®

(Invitrogen) e recolhidas em microtubos. Então, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio em cada microtubo e foi realizada agitação por inversão, seguida por uma incubação de 5 min em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 12.000 rpm a 4°C. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos e em seguida foram adicionados 200 μ L de isopropanol e cada tubo foi agitado por inversão. Após incubação por 10 min as amostras foram centrifugadas por 8 min a 12.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi então removido e foi adicionado 1 mL de etanol 75% em cada tubo, as amostras foram agitadas e centrifugadas a 7.500 rpm por 8 min a 4°C. Este procedimento foi repetido por 2 vezes e então o sobrenadante foi removido, aguardou-se tempo necessário para secagem do precipitado, que posteriormente foi dissolvido em 20 μ L de água ultrapura tratada com DEPC (Sigma-Aldrich) e armazenado em freezer -80°C. Para quantificação, as amostras de RNA foram analisadas no equipamento Nanodrop (Thermo Scientific). Apenas RNA nos quais a razão 260/280 e 260/230 encontradas estavam entre 1,9 e 2,1 foram utilizados nos experimentos. O RNA foi reversamente transcrito em cDNA pelo uso do kit Enhanced Avian First Strand Synthesis (Sigma Aldrich). O cDNA foi estocado a -20°C até o momento do uso. A reação de PCR em tempo real incluiu os seguintes reagentes: oligonucleotídeos iniciadores (*primers*, 500 nM), cDNA, SYBR® Green (Sigma Aldrich) e água DEPC. Os *primers* utilizados para amplificação dos genes relacionados a apoptose estão descritos na Tabela 1. As condições da PCR foram ajustadas para cada par de *primer*, dependendo de sua temperatura de *melting* usando o CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System Analyzer (BioRad). Após a amplificação, análises da curva de *melting* foram realizadas entre 72-95°C por monitoramento da fluorescência associada ao aumento da temperatura. Produtos específicos foram determinados como picos únicos em suas curvas de *melting*. O nível comparativo de expressão de cada condição foi calculado como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (método do $\Delta\Delta C_t^1$), aonde $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ amostra - ΔC_t controle. Os valores de C_t das amostras e dos controles foram normalizados pela quantidade de β -actina (ΔC_t do controle ou amostra = C_t do controle ou amostra - C_t β -actina do controle ou amostra). Os *primers* β -actina, Bax (NM_001291428.1) e Bcl-2 (NM_000633.2) foram desenhados e testados com auxílio do programa Genrunner (versão 5.0.63 Beta), com exceção do primer da Caspase-3 (NM_004346.3).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados nas reações de PCR em tempo real

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

2.2.5.5 Ensaio de western blotting

As células MDA-MB-231 foram semeadas ($1 \times 10^6/2000 \mu\text{L}$) em meio apropriado em placas de Petri estéreis de 6 cm e incubadas a 37°C e 5% de CO_2 durante 24 h em incubadora de cultura de células. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações do complexo Ru(ThySMet) por 4 h. Após a incubação, as células foram lisadas utilizando o tampão CelLytic™ M (Sigma-Aldrich). As concentrações de proteína dos sobrenadantes foram determinadas utilizando o Kit de Ensaio de Proteína BCA (Thermo Scientific). As amostras de proteínas (15 μg) 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). A β -actina foi utilizada como controle endógeno. A revelação do substrato foi realizada utilizando o substrato Clarity™ Western ECL (BioRad). Bandas específicas foram visualizadas e fotografadas com auxílio do fotodocumentador ChemiDoc MP (BioRad).

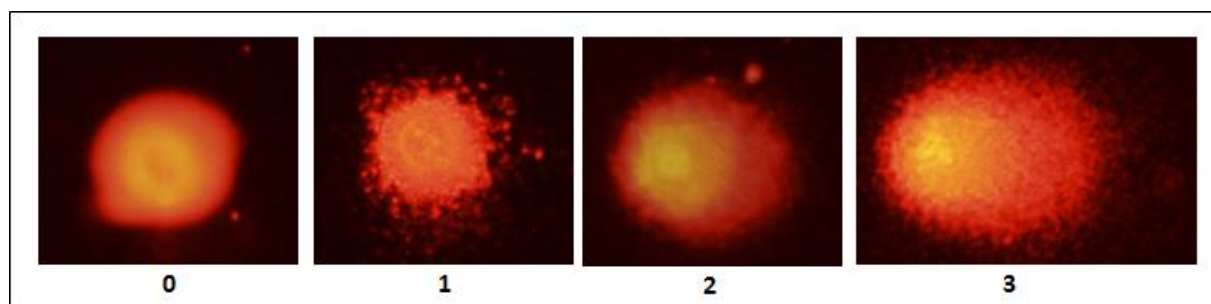
2.2.6 Ensaios para verificação de danos no DNA *in vitro*

2.2.6.1 Ensaio do cometa *in vitro*

O ensaio do cometa com bloqueio da citocinese (Singh *et al.*, 1988), com modificações (Tice *et al.*, 2000), foi realizado para análise dos danos ao DNA induzidos pelo complexo Ru(ThySMet). As células MDA-MB-231 e MCF-10A ($1 \times 10^5/1000 \mu\text{L}$) foram plaqueadas em placas de 12 poços estéreis e após 24 h foi realizado o tratamento de 1 h com diferentes concentrações do complexo Ru(ThySMet) e com o controle positivo, a cisplatina (8 μM). Após este período, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 500 μL de meio de cultura. Em seguida, 20 μL dessa suspensão celular receberam 120 μL de agarose de baixo

ponto de fusão (LMP 0,5%), sendo este material depositado em lâminas pré-gelatinizadas (agarose de ponto de fusão normal 1,5%) e levadas para solução de lise (NaCl 2,5M, Ethylenediamine Tetraacetic Acid (EDTA)-titriplex 100 mM, Tris 10mM, Triton X-100 1%, DMSO 10% (pH 10)) por 1 h. Após desnaturação (20 min) e eletroforese alcalina (25 V, 300 mA, 20 min) as lâminas foram neutralizadas (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5), fixadas (etanol 100%) e mantidas sob refrigeração até o momento da análise. A coloração das lâminas foi realizada com GelRed (Uniscience) e a análise cega dos cometas foi feita visualmente de pelo menos 150 células por grupo (Azqueta *et al.*, 2011) em microscopia de fluorescência com o microscópio Olympus BX61-TRF5 (câmara DP73). Os cometas foram classificados em: *classe 0* – nucleoides que não apresentam cauda; *classe 1* – nucleoides com cauda menor que o diâmetro do nucleoide; *classe 2* – nucleoides com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleoide; *classe 3* – nucleoides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleoide; *classe 4* – nucleoides com todo o DNA na cauda foram desconsideradas pela alta probabilidade de estarem mortas (Hartmann e Speit, 1997) (Figura 5). O índice de dano (ID) foi calculado a cada um dos nucleoides de acordo com a sua classe, a partir da seguinte fórmula: $ID = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$, onde n = número de nucleoides de cada classe analisada.

Figura 5 - Fotos demonstrativas da análise das classes dos cometas: classe 0: nucleoides sem cauda; classe 1: nucleoides com uma cauda menor que o diâmetro do nucleoides; classe 2: nucleoides com cauda de uma a duas vezes maior que o diâmetro do nucleoides; e classe 3: nucleoides com cauda maior que duas vezes o diâmetro do nucleoides. As figuras foram retiradas no aumento de 40 ×.*



*Fotos retiradas pela autora durante a análise de seus dados.

2.2.7 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.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados no *Journal of Inorganic Biochemistry*, volume 186, em 2018, com o título: “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*” (Anexo 1).

2.3.1 Ensaios de citotoxicidade

O potencial dos complexos de rutênio que atuam em etapas importantes do processo metastático em células de câncer de mama já está bem descrito na literatura (Popolin e Cominetti, 2017), porém, nenhum medicamento à base de rutênio está disponível na clínica. Na tentativa de encontrar complexos com melhor atividade e com potencial para serem utilizados na clínica, os efeitos de três complexos *trans*-[Ru(PPh₃)₂(acylthioureato-k²O,S)(bipy)]PF₆ e dos ligantes livres foram investigados nas células de mama da linhagem tumoral MDA-MB-231 e nas células não tumorais da linhagem MCF-10A (Tabela 2). Para comparação, a citotoxicidade da cisplatina também é apresentada, uma vez que é um medicamento antitumoral bem sucedido que ainda é amplamente utilizado na clínica (Kelland, 2007). Os resultados demonstraram que o complexo **(2)** exibiu o maior IS, com o menor IC₅₀ para células MDA-MB-231 (8,81 ± 0,81 μM) e o maior IC₅₀ para as células MCF-10A (14,82 ± 2,50 μM) demonstrando ser o mais eficaz entre os três complexos testados. Os resultados deste ensaio estão de acordo com outro trabalho do nosso grupo em que os ligantes menores foram mais ativos (Plutín *et al.*, 2017). Apesar da cisplatina apresentar melhor IS em comparação com o complexo **(2)**, sua toxicidade é um limitante do seu uso, portanto apesar do complexo **(2)** ter menor IS ele pode apresentar menores efeitos tóxicos, já que apresenta uma maior seletividade para as células tumorais. Essa seletividade pode ser explicada devido a maior expressão de receptores de transferrina nas células tumorais da linhagem MDA-MB-231.

Em concordância com os nossos resultados, outro estudo usando um complexo rutênio areno-PDA, [(p-cym)Ru(o-pda)Cl]PF₆ (o-PDA) demonstra que após 48 h de incubação a inibição do crescimento das células MDA-MB-231 (83 μM) foi mais de três vezes maior do que em células MCF-10A (> 260 μM), mostrando que também apresenta seletividade para células tumorais (Iida *et al.*, 2016). Também, o complexo de rutênio (II) areno, RAWQ11 inibe

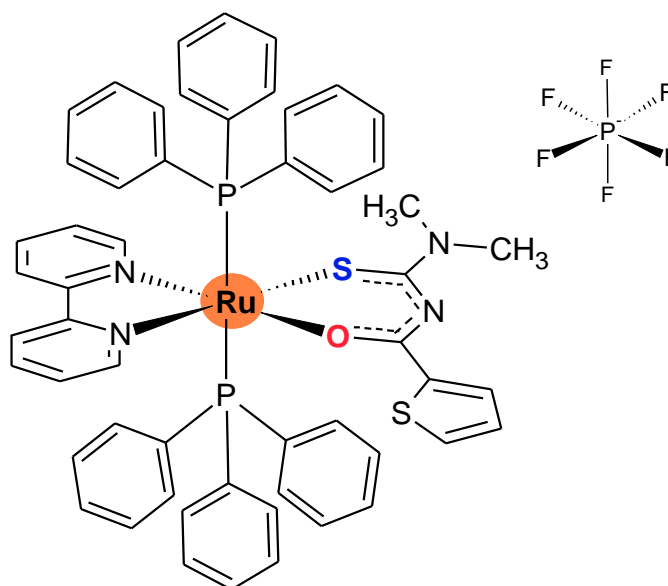
a proliferação celular, após incubação de 24 h, de células tumorais de mama das linhagens MDA-MB-231 (20,8 μM) e MCF-7 (17,9 μM) com maior especificidade em relação às células não tumorais de mama da linhagem MCF-10A ($>300\mu\text{M}$) (Wu *et al.*, 2014).

Outros estudos mostraram que complexos de rutênio com estrutura semelhante ao complexo (2) também possuem atividade citotóxica contra diferentes células tumorais. Quatro complexos de rutênio (II) fosfínico, *trans*-[RuCl₂(dppb)(dpqQX)], *cis*-[RuCl₂(dppb)(dpqQX)], *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(dpqQX)]PF₆ e *ct*-[RuCl₂(PPh₃)₂(dpqQX)] foram citotóxicos para células MDA-MB-231 e MCF-7, especialmente o complexo *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(dpqQX)]PF₆, que demonstrou melhor atividade em comparação à cisplatina (Barolli *et al.*, 2017). Complexos de rutênio (II)/trifenilfosfina, *cis*-[Ru(PPh₃)₂(lap)₂] and *trans*-[Ru(lap)(PPh₃)₂(phen)]PF₆, foram citotóxicos para as células MDA-MB-231, A549 (câncer de pulmão) e V79 (célula não tumoral de pulmão), no entanto, *trans*-[Ru(lap)(PPh₃)₂(phen)]PF₆ tem menor IC₅₀ do que o complexo *cis*-[Ru(PPh₃)₂(lap)₂] e a cisplatina (Oliveira *et al.*, 2017).

Tabela 2 – Atividade citotóxica do complexo Ru(ThySMet) em 2D. IC₅₀ (μM) dos complexos de rutênio (1-3) nas células MDA-MB-231 e MCF-10A após 24 h de incubação. EP = Erro padrão da média. ^aIS = Índice de seletividade dos complexos. *A cisplatina foi dissolvida em dimetilformamida ([#]Popolin *et al.*, 2017).

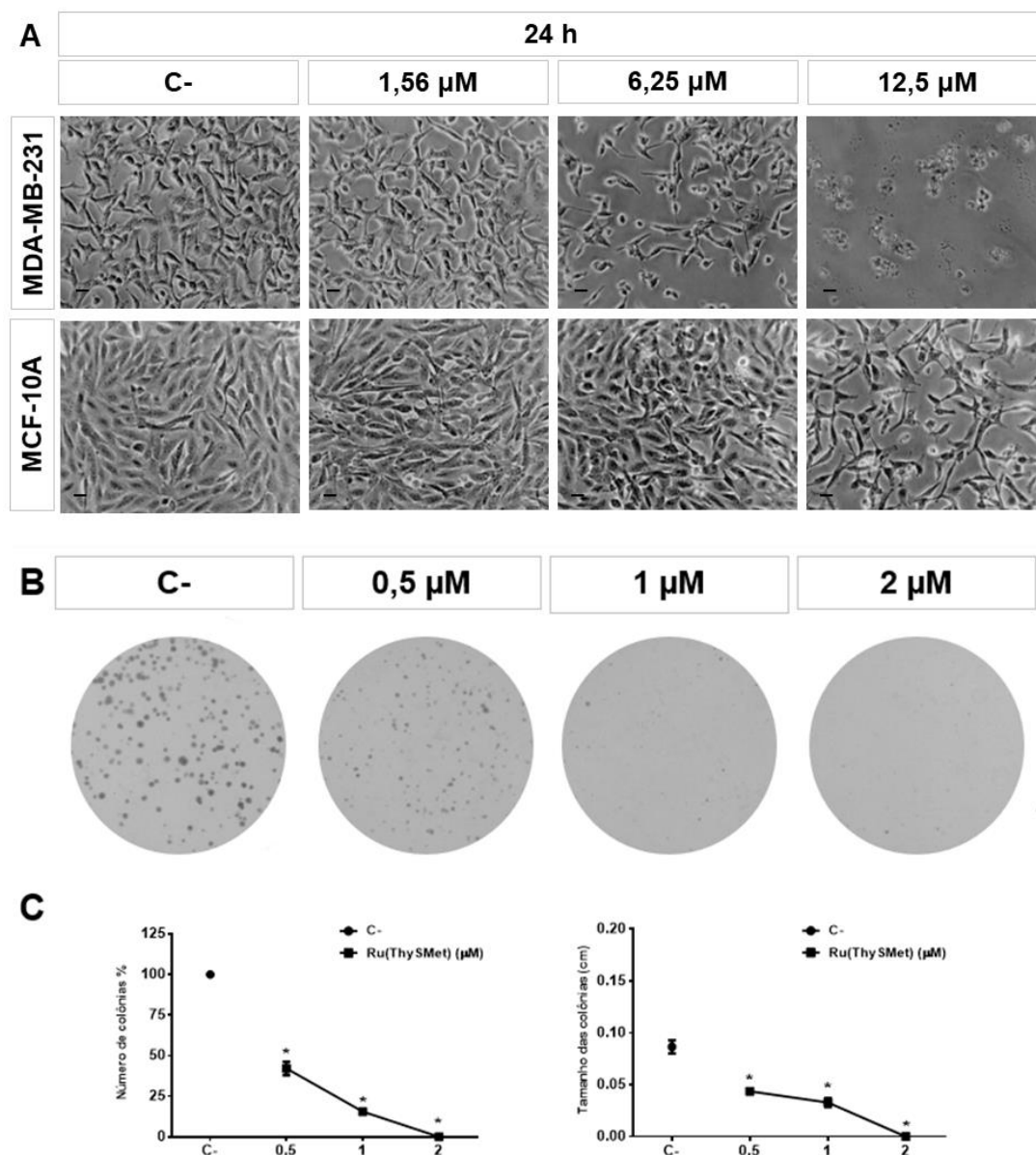
Complexo	IC ₅₀ (μM) \pm EP		
	MDA-MB-231	MCF-10A	^a IS
(1)	21,92 \pm 0,05	7,92 \pm 2,09	0,36
(2)	8,81 \pm 0,81	14,82 \pm 2,50	1,67
(3)	9,33 \pm 0,62	8,82 \pm 0,66	0,94
Cisplatina*	2,43 \pm 0,20 [#]	29,45 \pm 0,85 [#]	12,06 [#]
bipy	> 100	> 100	---
PPh ₃	> 100	> 100	---
acylthiourreas	> 100	> 100	---

De acordo com os resultados apresentados, o complexo escolhido para dar continuidade ao trabalho e ser melhor investigado foi o complexo (2), o Ru(ThySMet) (Figura 6) devido a sua capacidade de inibir as células tumorais com eficiência e devido a sua maior seletividade em relação a linhagem não tumoral.

Figura 6 – Estrutura molecular do complexo Ru(ThySMet).

No ensaio de morfologia celular é possível observar diferentes alterações morfológicas nas células MDA-MB-231, que incluem diminuição da densidade celular, formação de estruturas circulares e encolhimento celular após 24 h de incubação, indicando uma indução de morte celular. Por outro lado, o complexo Ru(ThySMet) apenas alterou levemente a morfologia de células MCF-10A após 24 h na concentração de 12,5 μ M (Figura 7A). Além disso, no ensaio clonogênico, o complexo Ru(ThySMet) inibe completamente a formação de colônias das células tumorais da linhagem MDA-MB-231 na maior concentração (2 μ M) (Figura 7B). Houve também uma diminuição significativa no tamanho e número de colônias nas menores concentrações (0,5 e 1 μ M). Estes resultados demonstram que o complexo Ru(ThySMet) tem efeito citotóxico e citostático em células de CMTN, por diminuir o número e o tamanho das colônias (Figura 7C).

Figura 7 - Efeitos de citotoxicidade do complexo Ru(ThySMet) (A) Morfologia celular das células MDA-MB231 e MCF-10A examinada após 24 h de tratamento com diferentes concentrações do complexo Ru(ThySMet). (B) Ensaio clonogênico de células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações (0,5, 1 ou 2 μM) do complexo Ru(ThySMet) durante 2 h. (C) Quantificação do número e tamanho das colônias. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado). Barras de escala: 40 μm . (* $p \leq 0,01$).

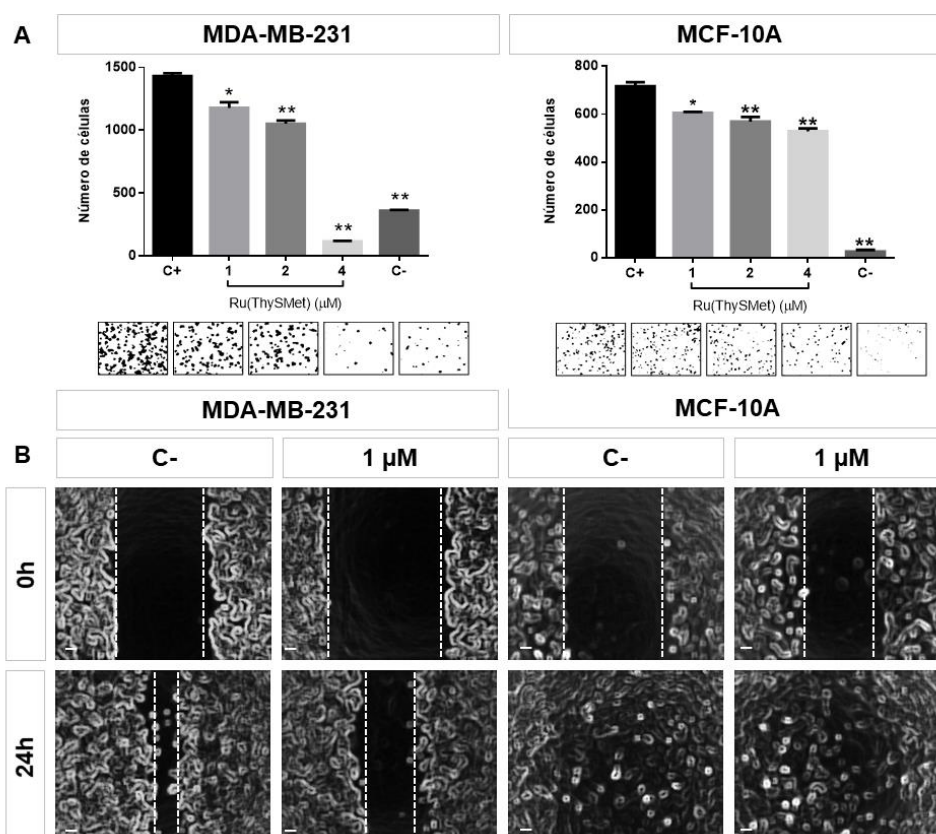


2.3.2 Ensaios relacionados à cascata metastática

A capacidade de migrar e invadir a circulação e outros tecidos deve ser avaliada por diferentes métodos, pois representam etapas chave no processo metastático *in vivo* (Justus *et al.*, 2014). O efeito do complexo Ru(ThySMet) na migração das células MDA-MB-231 e MCF-10A foi investigado através de dois diferentes métodos, o ensaio de migração com câmara de Boyden e o ensaio de *wound healing* (Figura 8). O ensaio de migração com câmara de Boyden

se baseia numa câmara de dois compartimentos preenchidos com meio, separados por uma membrana porosa (Chen, 2005). Os resultados do ensaio com a câmara de Boyden demonstraram que o complexo Ru(ThySMet) inibe significativamente a migração em todas as concentrações testadas (1-4 μM) para células tumorais e não tumorais (Figura 8A). No entanto, ao comparar porcentagens de inibição, pode-se observar que o complexo inibe a migração de células MDA-MB-231 de forma mais eficiente. Na concentração de 4 μM ocorre uma inibição de 90,8% de migração celular das células tumorais, enquanto na mesma concentração a porcentagem de inibição é de apenas 26,2% nas células não tumorais. Para continuar investigando este efeito anti-migratório do complexo Ru(ThySMet) foi realizado o ensaio de *wound healing*, que é também um método bastante utilizado para estudar migração celular (Lampugnani, 1999) (Figura 8B). O complexo foi mais eficiente para inibir a migração de MDA-MB-231 em comparação com a migração de células MCF-10A após 24 h de incubação.

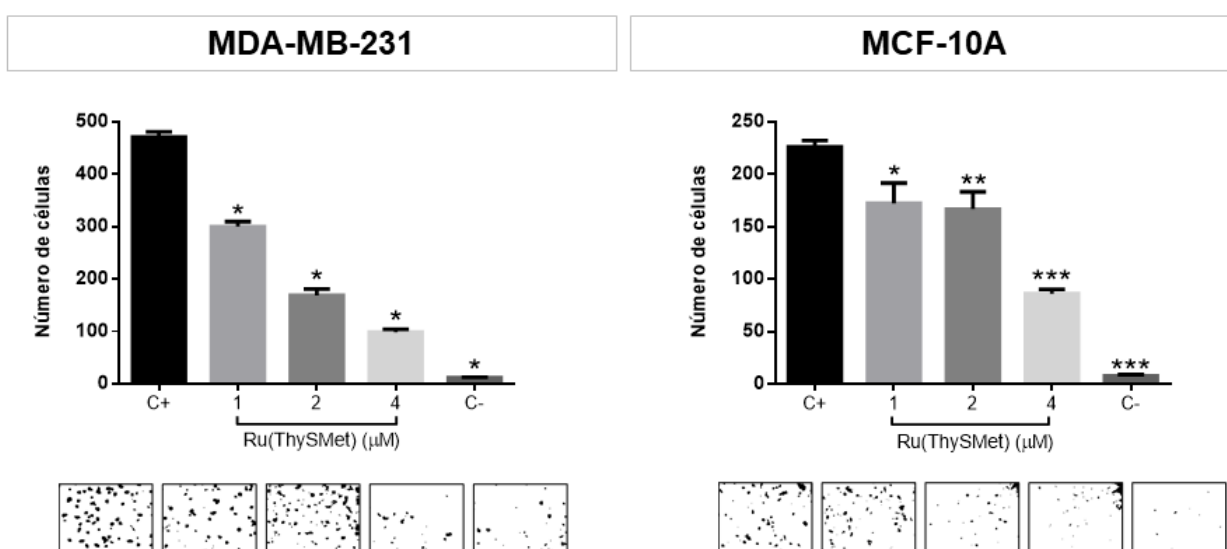
Figura 8 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) na migração celular de células MDA-MB-231 e MCF-10A. **(A)** Ensaio de migração das câmaras de Boyden com 22 h de tratamento com 1, 2 ou 4 μM do complexo. **(B)** Ensaio de *Wound Healing* com 0 e 24 h de tratamento com 1 μM do complexo. O controle positivo (C+) representa células sem qualquer tratamento e o controle negativo (C-) células cultivadas em um meio isento de FBS. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. Barras de escala: 40 μm . (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).



Além disso, o complexo Ru(ThySMet) inibe significativamente a invasão de ambas as células, MDA-MB-231 e MCF-10A, em todas as concentrações testadas (1-4 μM) (Figura 9). No entanto, mais uma vez, foi mais específico para células tumorais (79% de inibição), em comparação com células não tumorais (61%). É importante ressaltar que a incubação do complexo Ru(ThySMet) com 4 μM por 24 h pode causar morte celular, em vez de inibir a migração e a invasão de células tumorais. No entanto, mesmo em concentrações menores e não citotóxicas (1 e 2 μM) o complexo Ru(ThySMet) já inibe significativamente a migração e invasão das células tumorais. Isso certamente indica que o complexo Ru(ThySMet) está prejudicando os processos de migração e invasão nas células tumorais, ao invés de ser citotóxico nesses ensaios.

Ambos os resultados na migração e invasão celular demonstram uma maior especificidade do composto em inibir os passos de migração e invasão para células tumorais, podendo atuar como agente antimetastático. O complexo de rutênio (II) areno, RAWQ11 também inibe a migração e invasão das células MDA-MB-231 de maneira dependente da concentração e causa a parada do ciclo celular na fase S (Wu *et al.*, 2014).

Figura 9 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) na invasão celular de células MDA-MB-231 e MCF-10A. Ensaio de invasão celular após 22 h de tratamento com 1, 2 ou 4 μM do complexo. O controle positivo (C+) representa células sem qualquer tratamento e o controle negativo (C-) células cultivadas em um meio isento de FBS. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

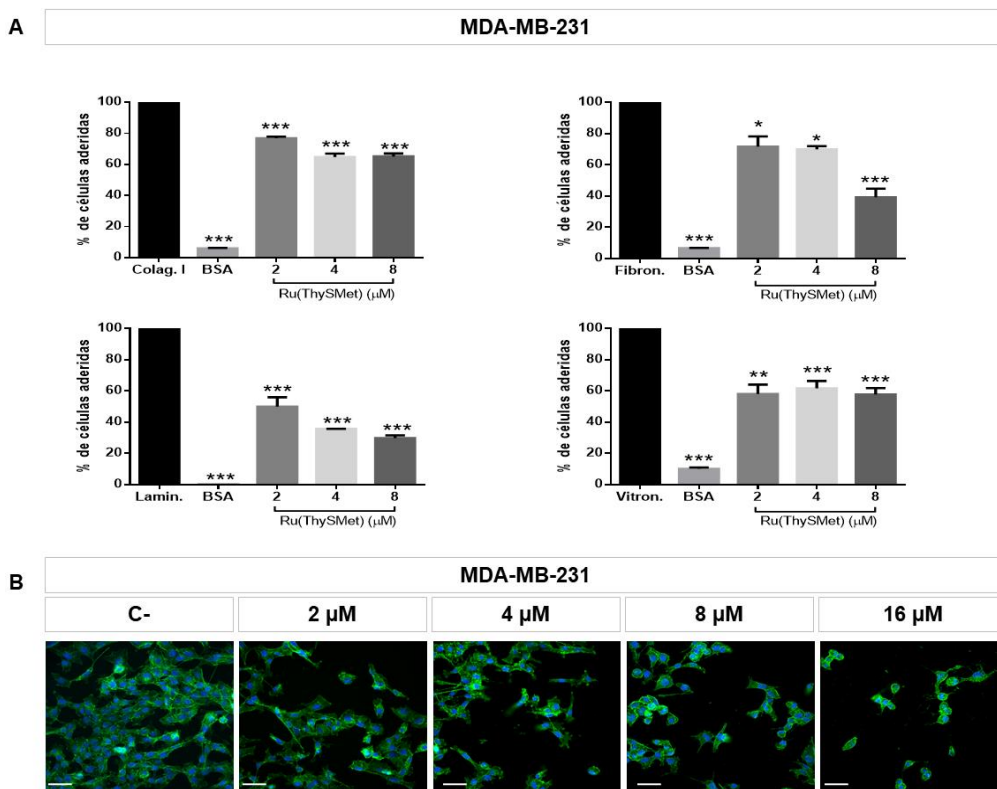


As interações entre as proteínas da MEC, os receptores de adesão e o citoesqueleto de actina estão relacionadas à adesão celular e são importantes na regulação de diversos processos celulares, como crescimento, diferenciação, forma e sobrevivência (Pawlak e Helfman, 2001).

Para verificar o efeito do complexo metálico sobre a adesão celular das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 foi realizado o ensaio de adesão. Nele, a adesão das células sem nenhum tipo de tratamento ao colágeno tipo I, laminina, fibronectina e vitronectina 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 ela. As concentrações escolhidas não são concentrações citotóxicas no tempo de incubação do ensaio.

O complexo Ru(ThySMet) inibiu significativamente a adesão de células MDA-MB-231 a diferentes componentes da MEC, como colágeno tipo I, fibronectina, laminina e vitronectina em todas as concentrações testadas (2, 4 ou 8 μM) (Figura 10A). A marcação com faloidina foi realizada para analisar o efeito do complexo Ru(ThySMet) no citoesqueleto de células MDA-MB-231. O complexo induziu alterações no citoesqueleto de actina com a perda subsequente da formação de fibras de estresse de uma maneira dependente da concentração (Figura 10B).

Figura 10 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) na adesão celular e no citoesqueleto de células MDA-MB-231. (A) Ensaio de adesão celular com colágeno tipo I, fibronectina, laminina e vitronectina após 1 h e 30 min de tratamento com 2, 4 ou 8 μM do complexo. (B) Ensaio de citoesqueleto com faloidina e DAPI após 2 h de tratamento com 2, 4, 8 ou 16 μM do complexo. Os ensaios foram realizados em triplicatas. As imagens correspondem a uma das triplicatas. Os resultados foram comparados com o controle (C-) (não tratado). Barras de escala: 40 μm . (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

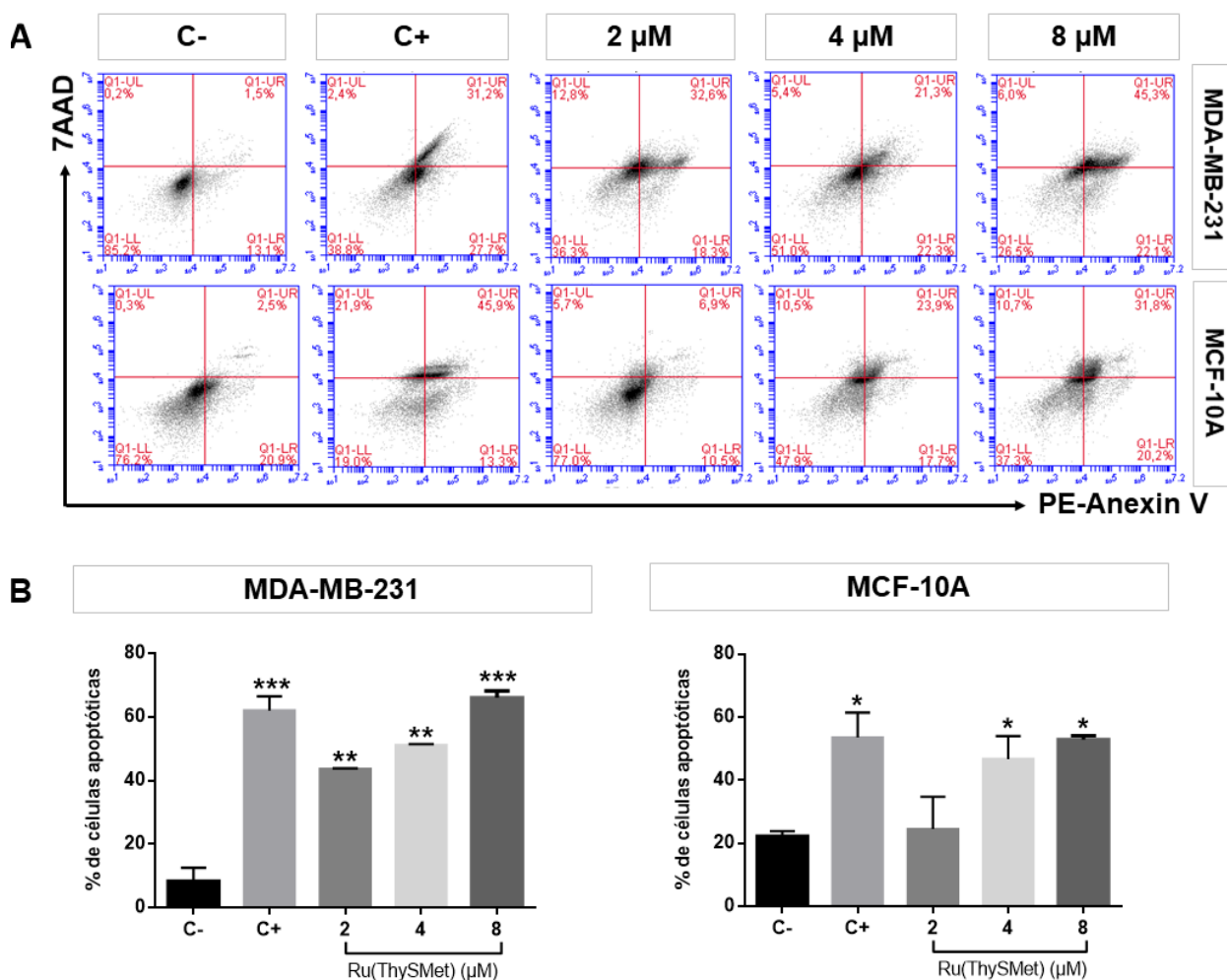


Outro trabalho do nosso grupo demonstrou que um complexo de rutênio com ligantes bifosfina/bipiridina, $[\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CO}_2)(\text{dppb})(\text{bipy})]\text{PF}_6$, também foi capaz de inibir a adesão, migração e invasão e induzir alterações no citoesqueleto de actina nas células de CMTN MDA-MB-231 (Popolin *et al.*, 2017).

2.3.3 Ensaios relacionados à apoptose

A indução da apoptose celular tem sido sugerida como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de fármacos antitumorais (Pistritto *et al.*, 2016). O complexo $\text{Ru}(\text{ThySMet})$ induziu a apoptose tanto das células MDA-MB-231, quanto das células não tumorais de mama da linhagem MCF-10A de maneira dependente da concentração (Figura 11). Na menor concentração (2 μM) o complexo induziu a apoptose em 43% das células tumorais, já nas células não tumorais a indução foi de aproximadamente 24% de células apoptóticas. Nas maiores concentrações (4 e 8 μM) a indução foi significativa, comparado ao controle negativo, para ambas as linhagens. Em 8 μM a porcentagem de células apoptóticas foi de 75% para a linhagem tumoral e de 67% para a não tumoral, demonstrando que o complexo é mais eficaz em induzir a apoptose em células tumorais.

Figura 11 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) 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 e MCF-10A após 2 h de tratamento com 2, 4 ou 8 μM do complexo. Os ensaios foram realizados em triplicata. Imagens correspondem a uma das triplicatas. A camptotecina foi utilizada como controle positivo (C+). Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (sem tratamento) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).



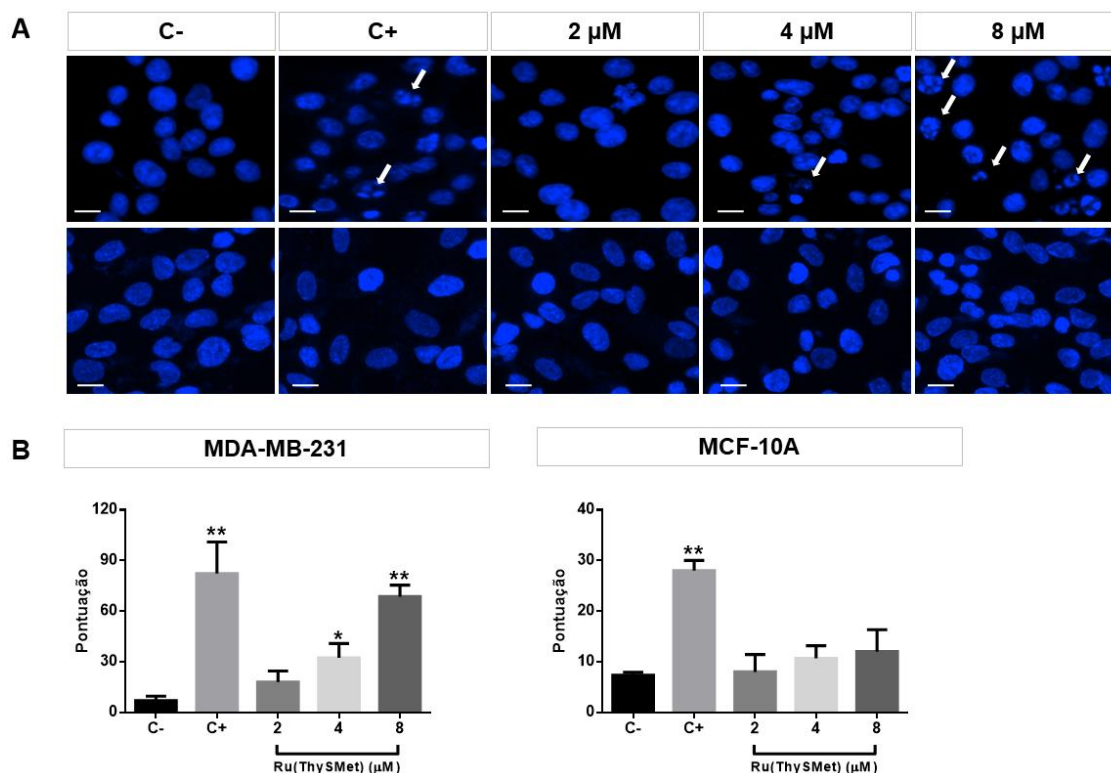
Uma importante característica da apoptose é fragmentação nuclear (Pawlowski e Kraft, 2000). O ensaio com o corante fluorescente de DNA, DAPI, foi utilizado para observar se o complexo Ru(ThySMet) promove alterações e fragmentação no núcleo das células tratadas com diferentes concentrações (Figura 12A). A incubação das células MDA-MB-231 com o complexo Ru(ThySMet) promoveu alterações indicativas de apoptose nas maiores concentrações (8 e 16 μM), como a formação de corpos apoptóticos e uma diminuição da densidade celular (setas brancas). Por outro lado, a incubação das células não tumorais MCF-10A com o complexo Ru(ThySMet) não promove alterações no tempo testado. Esses resultados estão de acordo com os resultados do ensaio de apoptose por citometria de fluxo para linhagem MDA-MB-231, mas não para linhagem MCF-10A, provavelmente porque o complexo

Ru(ThySMet) no tempo de incubação utilizado é capaz de induzir a exposição da fosfatidilserina, mas não de causar alterações permanentes, como a fragmentação nuclear.

Para avaliar o efeito do complexo Ru(ThySMet) sobre a indução de quebras iniciais de DNA de células das linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A o ensaio de cometa com bloqueio da citocinese foi realizado. Esse ensaio é um método simples e sensível para identificar quebras iniciais de DNA de células eucarióticas (Collins, 2004; Olive e Banath, 2006). O ensaio de cometa é assim denominado devido à característica do DNA fragmentado migrar durante a eletroforese formando um rastro, que lembra um cometa (Tice *et al.*, 2000). Os resultados demonstraram que o complexo Ru(ThySMet) induz danos significativos ao DNA das células tumorais da linhagem MDA-MB-231 e nas maiores concentrações utilizadas (4 e 8 μ M), assim como o controle positivo, a cisplatina (8 μ M). Porém, o complexo não causou danos ao DNA nas células não tumorais MCF-10A, apenas a cisplatina induziu os danos à essas células (Figura 12B). Deste modo, é possível inferir que a indução de apoptose causada pelo complexo Ru(ThySMet) nas células MDA-MB-231, verificada em experimentos anteriores, pode estar relacionada a esses danos iniciais causados ao DNA. Portanto, esses resultados demonstram que o complexo Ru(ThySMet) causa maiores danos iniciais as células tumorais, o que é importante para um candidato a quimioterápico.

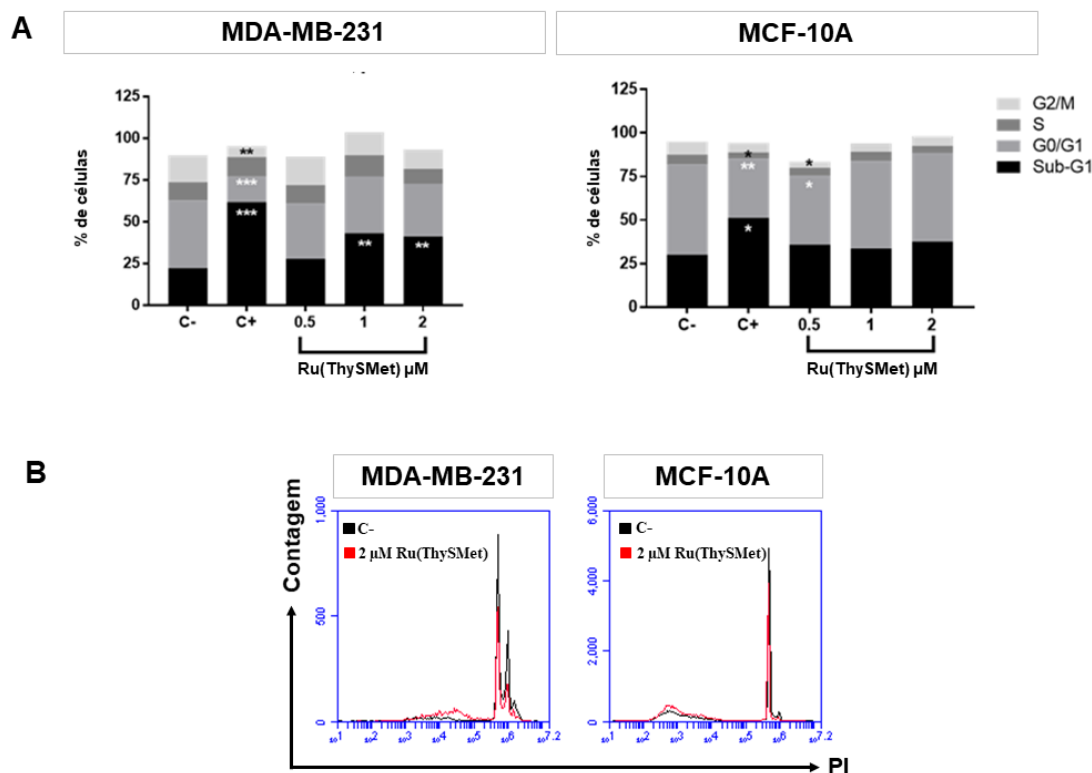
Recentemente, outros pesquisadores demonstraram o potencial de complexos de rutênio em induzir danos ao DNA em diferentes linhagens de células tumorais. Complexos de rutênio polipiridil, [Ru(dmb)₂(DQTT)](ClO₄)₂; [Ru(bpy)₂(DQTT)](ClO₄)₂; e [Ru(dmp)₂(DQTT)](ClO₄)₂, na concentração de 6,25 μ M com 24 h de incubação, induziram a fragmentação do DNA de células tumorais hepáticas BEL-7402 (Zhang *et al.*, 2016). Outros complexos de rutênio polipiridil, [Ru(bpy)₂(FTTP)](ClO₄)₂; Ru(phen)₂(FTTP)](ClO₄)₂; [Ru(bpy)₂(PTTP)](ClO₄)₂ e [Ru(phen)₂(PTTP)](ClO₄)₂ também induziram dano ao DNA em células tumorais hepáticas da linhagem HepG2 depois de 24 h de incubação com 12,5 μ M dos complexos (Wan *et al.*, 2016).

Figura 12 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) no DNA das células MDA-MB-231 e MCF-10A. **(A)** Fragmentação Nuclear após 2 h de tratamento com 2, 4 ou 8 μM do complexo. A estaurosporina foi usada como controle positivo (C+). As setas brancas mostram os núcleos fragmentados. **(B)** Efeitos genotóxicos do complexo em células MDA-MB-231 e MCF-10A após 1 h de tratamento com 2, 4 ou 8 μM do complexo. A cisplatina foi utilizada como controle positivo (C+). Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (sem tratamento). Barras de escala: 40 μm . (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).



O ensaio de ciclo celular foi realizado para avaliar se o complexo induz a parada de alguma fase do ciclo celular e se é capaz de fragmentar o DNA de ambas as linhagens, já que células apoptóticas apresentam baixa fluorescência quando comparadas as células nas outras fases (Nicoletti *et al.*, 1991), pois o DNA já se encontra em degradação. Nas células MDA-MB-231 o complexo Ru(ThySMet) interrompeu significativamente o ciclo celular na fase sub-G1 nas concentrações mais altas, indicando fragmentação do DNA. Nas células MCF-10A, o complexo Ru(ThySMet) só reduziu significativamente a quantidade de DNA em G0/G1 e G2/M na concentração mais baixa (Figura 13). Estes resultados mostram que o complexo Ru(ThySMet) induziu a apoptose em células MDA-MB-231, impedindo também as células de entrarem no ciclo celular. Em acordo com nosso estudo, outro trabalho verificou que dois complexos de rutênio contendo ligantes de aciltiourea também são capazes de induzir parada do ciclo celular na fase sub-G1 e morte celular por apoptose das células MDA-MB-231 (Colina-Vegas *et al.*, 2017).

Figura 13 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) no ciclo celular das células MDA-MB-231 e MCF-10A. (A) Efeitos do complexo Ru(ThySMet) no ciclo celular de MDA-MB-231 ou MCF-10A após 2 h de tratamento com 0,5, 1 ou 2 μ M do complexo. A camptotecina foi utilizada como controle positivo (C+). (B) Histogramas de DNA do ensaio de ciclo celular. PI corresponde ao iodeto de propídio (detectado no canal FL2-A). Células não tratadas (controle negativo, C-) são mostradas em preto e células tratadas com 2 μ M do complexo Ru(ThySMet) por 2 h são mostradas em vermelho. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

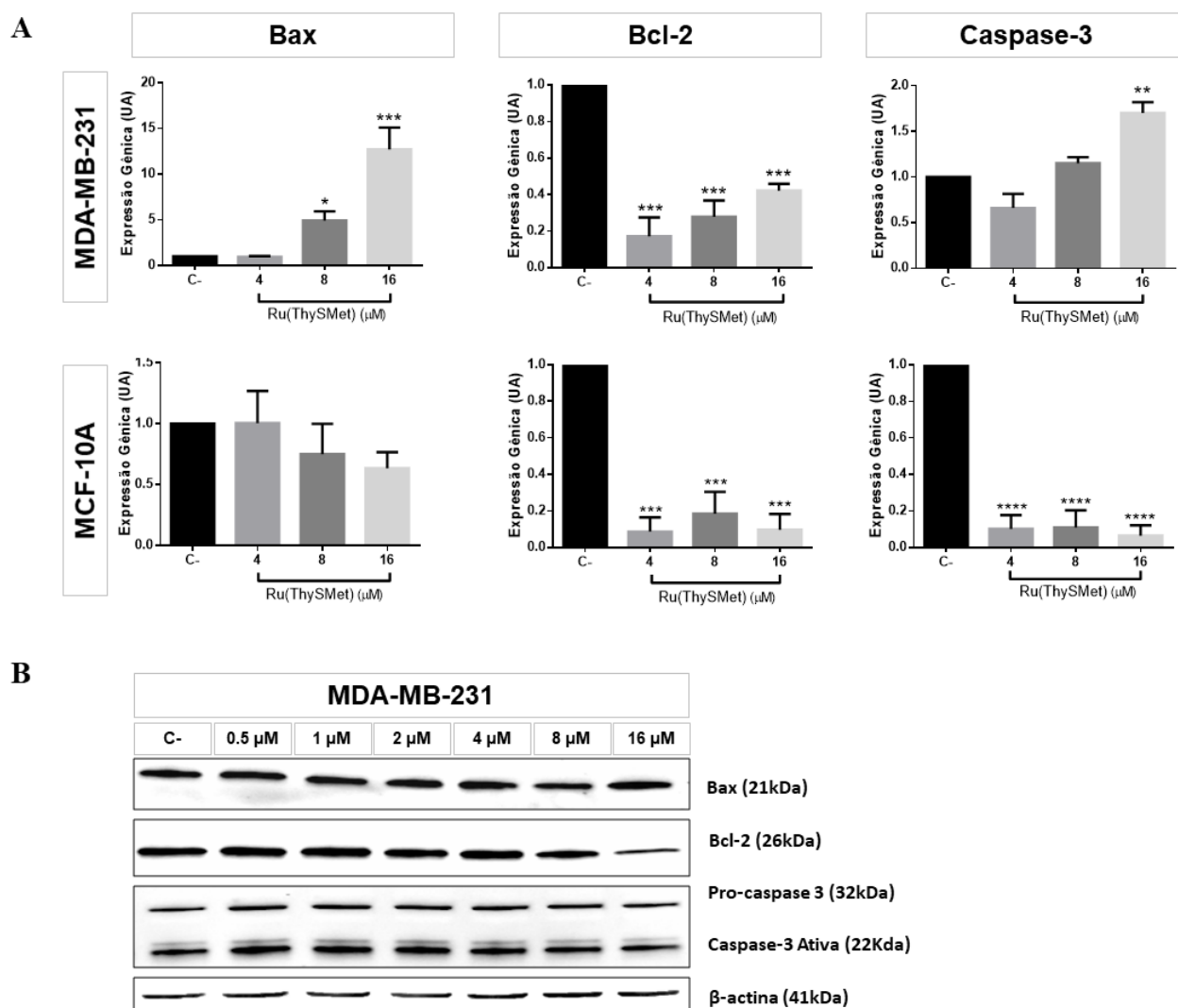


Foram realizados ensaios de PCR para verificar a expressão de genes relacionados à apoptose, dois genes codificam para proteínas pró-apoptóticas (Bax e caspase-3) e um gene codifica para a proteína anti-apoptótica (Bcl-2) (Pawlowski e Kraft, 2000), já que o complexo Ru(ThySMet) apresentou efeito pró-apoptótico, especialmente nas células tumorais (Figura 14A). Nas células tumorais, o complexo aumentou significativamente a expressão de Bax e caspase-3 e diminuiu significativamente a expressão de Bcl-2, comparado com o controle (células não tratadas). Nas células MCF-10A, o complexo não alterou a expressão do gene Bax e diminuiu significativamente a expressão do gene Bcl-2 e caspase-3 em todas as concentrações testadas (4, 8 e 16 μ M). Estes resultados estão de acordo com os nossos ensaios anteriores relacionados com a apoptose e demonstram que nas células MCF-10A o gene codificador da caspase-3, que é o principal agente do processo de apoptose, não está aumentado e pode explicar a integridade nuclear nesta linhagem celular.

Em seguida, a expressão de Bax, Bcl-2 e caspase-3 em células MDA-MB-231 foi investigada (Figura 14B). Após 4 h de tratamento com complexo Ru(ThySMet), a expressão de

Bax aumentou, enquanto o inverso ocorreu com Bcl-2 na concentração mais alta (16 μM). Estes resultados estão de acordo com os dados de qRT-PCR demonstrando que os níveis de Bax estão aumentados e que os níveis de Bcl-2 estão diminuídos após a incubação com o complexo Ru(ThySMet). No entanto, os níveis de proteína da caspase-3 não se alteraram, enquanto sua expressão gênica está aumentada em todas as concentrações testadas, provavelmente devido aos tempos de incubação mais curtos usados nos ensaios de expressão gênica em comparação com os ensaios de western blotting.

Figura 14 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) na expressão e no conteúdo proteico de moléculas apoptóticas e anti-apoptóticas de células MDA-MB-231 e MCF-10A. **(A)** qRT-PCR após 2 h de tratamento com as concentrações indicadas e **(B)** Western blotting após 4 h de tratamento com as concentrações indicadas do complexo. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).



Jiang e colaboradores (2014) demonstraram que o complexo polipiril de rutênio II, com o ligante dmmpz, $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{dmdppz})](\text{ClO}_4)_2$, é citotóxico para células de hepatocarcinoma

BEL-7402 (14,6 μM) 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 *et al.*, 2014). Outro estudo também demonstra que os complexos de rutênio $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{FAMP})](\text{ClO}_4)_2$ e $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{FAMP})](\text{ClO}_4)_2$ induzem alterações relacionadas a apoptose como fragmentação nuclear e condensação da cromatina nas células BEL-7402. E também, através do ensaio de citometria de fluxo, que o complexo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{FAMP})](\text{ClO}_4)_2$ induz 34,65% das células a apoptose na concentração de 25 μM após incubação de 24 h (Xu *et al.*, 2014). A apoptose também é induzida por complexos de rutênio (II) com cloro nas células tumorais de mama da linhagem HCC1937 através da parada do ciclo células nas fases G2/M e aumento da população em sub-G1 (Nhukeaw *et al.*, 2014).

Os estudos em cultura 2D demonstraram que o complexo Ru(ThySMet) possui potencial para o tratamento do câncer de mama. Este complexo apresentou o menor IC_{50} para as células de CMTN MDA-MB-231 e o maior IC_{50} para as células não tumorais MCF-10A, em comparação aos outros dois complexos de rutênio testados. Este complexo 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 em concentrações mais baixas em comparação com células não tumorais MCF-10A, sugerindo ação seletiva deste complexo para células tumorais. Portanto, diante dos interessantes resultados os modelos em 3D foram escolhidos para dar continuidade à análise do complexo Ru(ThySMet) e os resultados estão apresentados no próximo capítulo (capítulo 3).

3.1 CULTURA DE CÉLULAS EM 3D E SUAS APLICAÇÕES

A introdução da cultura tridimensional (3D) há mais de 30 anos tem sido um avanço importante nas técnicas de cultura de células. Células cultivadas como uma monocamada (2D) diretamente sobre superfícies plásticas exibem diferente morfologia, polaridade, expressão de receptores e interação com a MEC comparadas às *in vivo*, não conseguindo reconstituir o complexo microambiente celular de um organismo. Portanto, este novo tipo de cultura ganhou a atenção da comunidade científica nos últimos 10 anos, principalmente devido à demonstração de que imitar o microambiente tumoral encontrado *in vivo* com mais precisão era essencial para identificar mecanismos importantes de comportamento tumoral, e também devido a apresentar perfis de expressão gênica semelhantes aos tumores (Huh *et al.*, 2011; Breslin e O'driscoll, 2013; Vidi, Leary, *et al.*, 2013; Weigelt *et al.*, 2014; Adjei e Blanka, 2015; Ravi *et al.*, 2015).

A MEC é uma estrutura formada por componentes não celulares, principalmente colágeno, que envolvem as células e desempenham diferentes funções como suporte físico e bioquímico, que são muito importantes para que a célula possa crescer, sobreviver, migrar e desenvolver sua função e comportamento normal (Frantz *et al.*, 2010). Os componentes da MEC estão em constante interação com as células através da ligação com receptores de superfície que ativam respostas intracelulares. Ainda, a MEC está em constante remodelamento a fim de garantir a homeostase local (Hynes, 2009; Bonnans *et al.*, 2014). Devido a este remodelamento, as células estão continuamente expostas a diferentes tipos de forças mecânicas em seu citoesqueleto, como forças de tensão e compressão. Estas forças são importantes para o seu desenvolvimento, mas também podem contribuir para o surgimento de algumas doenças, como o câncer, já que podem levar a uma desorganização dos tecidos, o que contribui para a progressão tumoral (Ingber, 2006; Butcher *et al.*, 2009; Miroshnikova *et al.*, 2011). Estudos demonstram que o aumento da densidade do tecido ao redor de tumores pode estar relacionado a um tumor se tornar maligno e também a adquirir maior capacidade de invasão e migração, favorecendo as metástases (Levental *et al.*, 2009).

Para simular a MEC na qual as células estão envolvidas *in vivo*, a cultura de células em 3D usa células primárias ou imortalizadas em hidrogel natural ou sintético. O colágeno tipo I e o Matrigel® são hidrogéis bastante utilizados neste tipo de cultura, mas também outros são

bastante utilizados como a poliacrilamida e agarose (Bissell *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; Butcher *et al.*, 2009; Vidi, Bissell, *et al.*, 2013).

O Matrigel® é uma matriz característica de membrana basal (MB) obtida a partir de um tumor epitelial. Esta matriz é bastante utilizada para o cultivo de células em 3D e outros ensaios *in vitro* e *in vivo*, como de invasão e angiogênese. Porém, uma limitação para estudos com este material é que não é possível saber com exatidão a sua composição e nem alterar sua densidade, impossibilitando o estudo de alguns elementos, como os mecânicos (Benton *et al.*, 2014).

O colágeno é a proteína mais abundante encontrada da MEC e é responsável, principalmente, pela integridade estrutural de vários tecidos e órgãos. Portanto, matrizes de colágeno também são bastante empregadas para o cultivo de células 3D e outros ensaios, como o de adesão devido a sua capacidade de simular as interações que ocorrem com a matriz *in vivo* (Kolacna *et al.*, 2007; Artym e Matsumoto, 2010). *In vitro* é possível alterar a rigidez do colágeno para imitar o que é encontrado *in vivo*, uma vez que os tumores têm uma maior rigidez do que os tecidos normais. Já foi demonstrado que o aumento da rigidez em um tecido pode levar a um aumento da tensão do citoesqueleto, o que pode promover modificações que estimulam o desenvolvimento de um tumor, demonstrando a importância do microambiente na progressão tumoral (Paszek *et al.*, 2005). Interessantemente, outros estudos já demonstraram que existe uma relação entre o aumento da densidade do tecido e a formação de tumores de mama e concluem que o aumento da densidade de colágeno contribui com a iniciação e progressão do câncer de mama (Provenzano *et al.*, 2008).

Com o avanço das tecnologias e melhoria dos materiais utilizados, cada vez mais a cultura 3D vai conseguir mimetizar o que é encontrado *in vivo* de modo a entender melhor a complexa dinâmica dos tumores, conseqüentemente, auxiliando no desenvolvimento de novos tratamentos (Adjei e Blanka, 2015).

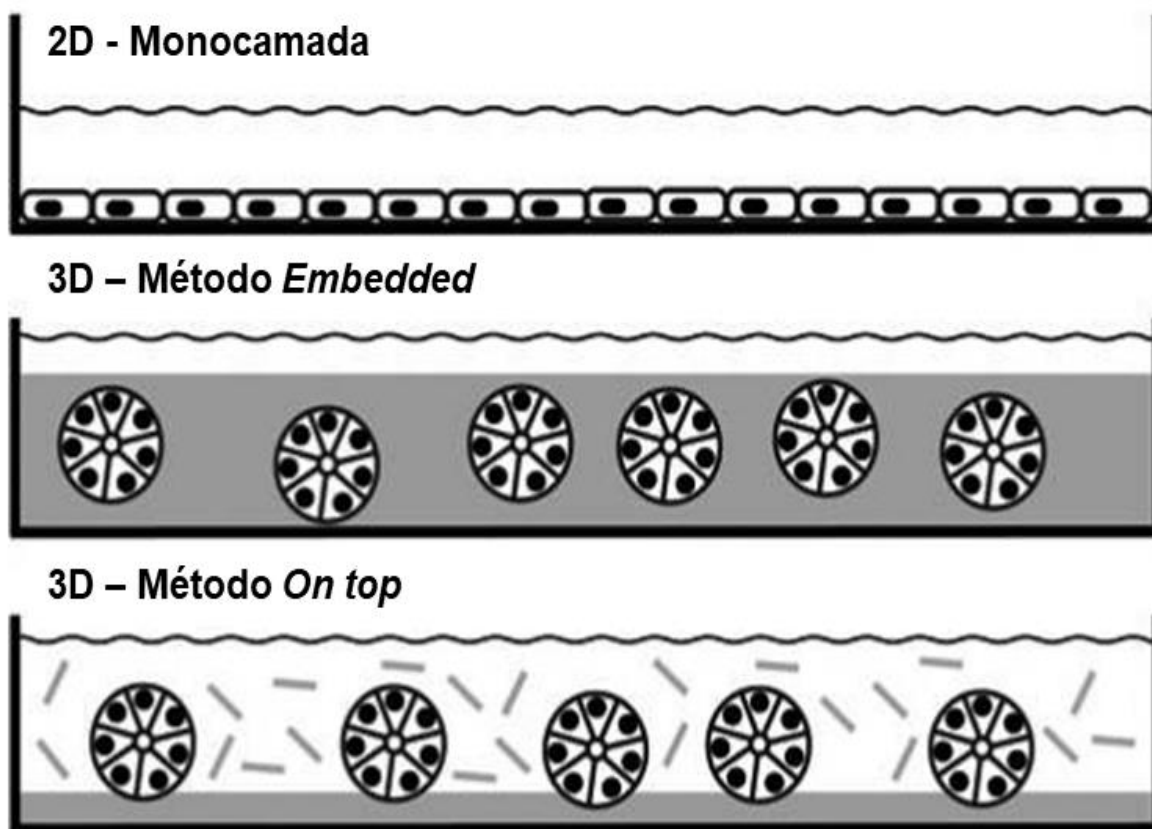
3.1.1 Série de progressão tumoral HMT-3522

Nas últimas décadas, o uso de diferentes linhagens de células tumorais de mama levou a uma maior compreensão desse tipo de câncer (Holliday e Speirs, 2011; Weigelt *et al.*, 2014). Um modelo bastante importante para estudar a progressão do câncer de mama em cultura 3D é a série de progressão HMT-3522. Esta série foi estabelecida a partir de um tecido mamário fibrocístico benigno e da linhagem inicialmente isolada originaram-se diferentes linhagens celulares. A linhagem celular S1 é uma linhagem celular não maligna que se tornou espontaneamente imortalizada, ela depende do fator de crescimento epidermal (EGF) para

proliferação e forma estruturas organizadas que se assemelham a ácinos mamários quando em 3D, devido à basopolaridade encontrada em culturas realizadas na presença de componentes da MB. A retirada do EGF da composição do meio de cultura originou a linhagem celular pré-invasiva S2, que produz tumores com polaridade basal em cultura 3D que se assemelham ao carcinoma ductal *in situ*. Após muitas passagens em cultura, essas células deram origem a tumores *in vivo* a partir dos quais as células foram isoladas e reinjetadas em camundongos, originando a linhagem maligna triplo negativa T4-2, que também forma nódulos em cultura 3D, mas não possui polaridade basal e mimetiza o carcinoma ductal invasivo (Rizki *et al.*, 2008; Vidi, Bissell, *et al.*, 2013).

Existem diferentes métodos para cultivar células em 3D, no entanto, dois métodos muito comuns para cultivar as células HTM-3522 são o método *on top* e *embedded*. No método *on top*, as células são cultivadas em superfície revestida e cobertas por uma fina camada de hidrogel e, no método *embedded*, as células são envolvidas por hidrogel (Petersen *et al.*, 1992; Vidi, Bissell, *et al.*, 2013), como pode ser observado na Figura 15.

Figura 15 – Esquema de diferentes sistemas de cultura celular em 2D e 3D. *



*Extraído e modificado de Vidi, Bissel e Lelièvre, 2013.

3.1.2 Reversão Tumoral

A polaridade celular é responsável pela regulação de características celulares essenciais para promover e preservar as funções especializadas da célula (Drubin e Nelson, 1996; Bazzoun *et al.*, 2013). As interações célula-célula e célula-matriz interferem nas vias metabólicas e desempenham um papel essencial na forma e função dessas células (Bissell *et al.*, 2005; Langhans, 2018; Verjans *et al.*, 2018). A polaridade basoapical é um importante mecanismo na homeostase das células, porém alterações nas proteínas relacionadas com a manutenção da polaridade contribuem para o desenvolvimento do câncer de mama (Chatterjee e Mccaffrey, 2014).

A reversão fenotípica, de fenótipo maligno para um fenótipo normal, é o processo no qual as células malignas recuperam a sua capacidade de formar estruturas polarizadas com crescimento sustentado como células não malignas. Esta reversão pode ocorrer com a restauração de algumas vias de sinalização, através da modulação de mediadores como o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e metaloproteinase de matriz 9 (MMP9) ou integrina $\beta 1$, enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e proteína quinase B (Akt) (Weaver *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002; Furuta *et al.*, 2018). A capacidade de uma substância com potencial antitumoral reverter o fenótipo maligno é de extrema importância, como demonstrado em um estudo anterior, que comprovou que as células que tiveram seu fenótipo revertido têm menos ou nenhum potencial maligno *in vivo* (Weaver *et al.*, 1997).

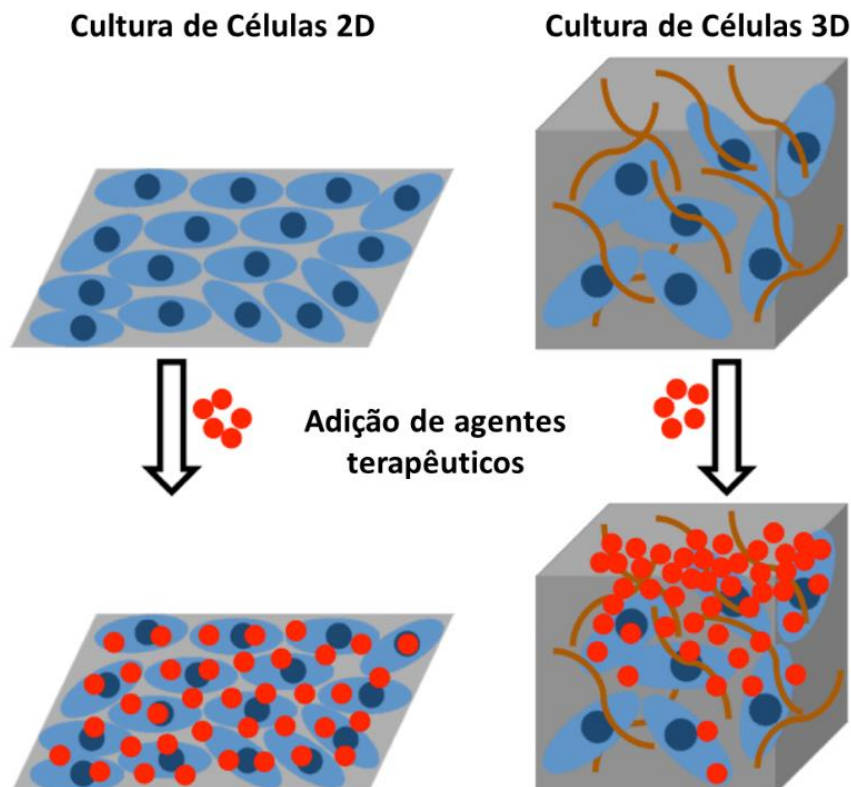
3.1.3 Cultura 3D e o teste de novos fármacos

As técnicas da cultura 3D têm o potencial de serem usadas para a triagem de fármacos e têm sido amplamente utilizadas devido à necessidade de buscar ensaios *in vitro* e *in vivo* mais eficientes, uma vez que os estudos clínicos são extremamente caros e demorados (Weigelt *et al.*, 2014; Imamura *et al.*, 2015).

Vários estudos que avaliaram a citotoxicidade usando diferentes compostos relataram diferenças ao comparar a cultura de células 3D com a tradicional cultura de células 2D. Os estudos demonstraram que as células tumorais parecem ser geralmente menos sensíveis aos agentes quimioterápicos no ambiente 3D, quando comparadas às culturas celulares de monocamada simples (Dhiman *et al.*, 2005; Magdeldin *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015; Perin *et al.*, 2017; Salehi *et al.*, 2017). Isso pode ser explicado, em parte, pelo fato de que a

distribuição do fármaco em células cultivadas em 3D é mais irregular do que em 2D (Adjei e Blanka, 2015), como demonstrado pela Figura 16.

Figura 16 - Esquema comparando a distribuição *in vitro* de agentes terapêuticos usando modelos em 2D e 3D.*



*Extraído e modificado de Creative Biolabs (Biolabs, 2019).

Apesar de muitos estudos demonstrarem que modelos de cultura de células 3D simulam melhor o que ocorre *in vivo*, os dados ainda precisam ser validados *in vivo* com modelos animais (Vidi, Bissell, *et al.*, 2013) que apresentam desafios, como alto custo, complexidade, alta infraestrutura necessária, preocupações éticas, dificuldade de extrapolar os efeitos para os seres humanos devido à especificidade das espécies e também a dificuldade em imitar precisamente o processo de doença maligna encontrado em humanos (Charoen *et al.*, 2014; Saeidnia *et al.*, 2015; Lelievre *et al.*, 2017). Portanto, o desenvolvimento de novas técnicas capazes de superar as deficiências dos modelos tradicionais *in vitro* e *in vivo* é fundamental para permitir resultados confiáveis que possam levar a melhores tratamentos.

3.1.4 Órgãos-no-chip

Órgão-no-chip é um conceito emergente de cultura de células 3D desenvolvido para tentar superar deficiências da cultura 3D clássica, ou seja, impossibilidade de reproduzir certas características arquitetônicas e microambientais essenciais de um tecido ou órgão, e o uso de modelos animais. Órgãos-no-chip são uma forma refinada de cultura de células 3D na qual cada característica do modelo é cuidadosamente escolhida para responder a uma pergunta científica em particular simulando a maneira como os tecidos e órgãos reais funcionam (Vidi *et al.*, 2014; Lelievre *et al.*, 2017). Esta nova área de cultura de células 3D requer novas tecnologias e insumos de engenharia, e também requer validação e caracterização adicionais, mas possui o potencial de apresentar significativo impacto no campo da descoberta de fármacos, pois permite estudar melhor as respostas humanas a elas (Huh *et al.*, 2011).

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Complexo de rutênio

O complexo Ru(ThySMet), sintetizado e caracterizado pelo LERCI, sob responsabilidade do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista da UFSCar, como descrito capítulo 2 desta tese, foi utilizado para os ensaios em 3D.

3.2.1.1 Diluição dos complexos de rutênio

O complexo Ru(ThySMet) para os ensaios *in vitro* foi solubilizado em DMSO (100%) e as concentrações foram preparadas utilizando o meio de cultura adequado. A concentração final de DMSO foi de 0,1% em cada amostra. Os poços que não receberam tratamento com os complexos, os controles negativos (C-), receberam 0,1% de DMSO.

3.2.2 Linhagens celulares

As células MDA-MB-231 e MCF-10A utilizadas nos ensaios em 3D foram cultivadas da mesma maneira como descrito no capítulo 2. As células de mama humana não tumorais da linhagem S1, as células de mama pré-invasivas da linhagem S2 e as células da linhagem humana de CMTN T4-2 pertencem a série de progressão tumoral HMT-3522. Estas células foram

cultivadas no meio definido H14, composto de DMEM-F12 sem soro suplementado de insulina (250 ng/mL), transferrina (10 µg/mL), selenito de sódio (2,6 ng/mL), β-estradiol (10 nM), hidrocortisona (1,4 µM) e prolactina (5 µg/mL). No meio das células S1, além dos demais suplementos, foi adicionado 10 ng/mL de EGF.

As células foram mantidas em uma incubadora úmida com 5% de CO₂ e a 37°C. As células utilizadas durante o estágio no exterior foram fornecidas pela Profa. Dra. Sophie Lelièvre. Já as células utilizadas nos ensaios no Brasil foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Mina Bissel do Berkeley *Lab*, nos Estados Unidos, e pelo Prof. Dr. Alexandre Cardoso do Laboratório e-signal da Universidade de São Paulo (USP), *campus* São Paulo.

3.2.3 Cultivo de células em 3D

3.2.3.1 Método *embedded* em colágeno

A cultura de células 3D utilizando o método *embedded* foi realizada de acordo com o protocolo previamente descrito por Vidi *et al.* (2014), Chittiboyina *et al.* (2017) e Chhetri (2019) utilizando o método *embedded* na presença de colágeno tipo I (Advanced Biomatrix) com rigidez de 2020 Pa para as células T4-2 e MDA-MB-231 e com rigidez de 1500 Pa para as células S2. As células S2 foram recobertas com laminina-111 (133 µg/mL) antes de serem plaqueadas com colágeno tipo I. Esse procedimento é necessário, pois as células S2, diferentemente das células S1, não secretam MB de laminina. Resumidamente, os poços de uma lâmina com quatro poços foram revestidos com 20 µL de colágeno tipo I gelado e espalhados com auxílio de uma ponta de ponteira para evitar bolhas. As células foram contadas e semeadas com colágeno tipo I nas placas revestidas com colágeno tipo I. Então, as placas foram mantidas em incubadora úmida a 37°C e 5% CO₂ por 20 min e após o meio foi cuidadosamente adicionado às células. As células tumorais T4-2 e MDA-MB-231 foram cultivadas por quatro dias e as células S2 por oito dias para permitir a formação de estruturas tridimensionais e tratadas por 24 h com diferentes concentrações do complexo Ru(ThySMet).

3.2.3.2 Método *on top* com Matrigel®

A cultura de células 3D utilizando o método *on top* com Matrigel® foi realizada de acordo com o protocolo descrito anteriormente (Fuzer *et al.*, 2017). Resumidamente, as placas utilizadas foram revestidas com Matrigel® gelado e incubadas para polimerização por 20 min

a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram contadas e semeadas e as placas foram mantidas em incubadora úmida a 37°C e 5% CO₂ por 15 min e após meio com 10% de Matrigel® foi cuidadosamente adicionado às células. As células receberam o tratamento do Ru(ThySMet) por 24 h neste momento ou as células S1 após seis dias de cultivo e as células T4-2 e MDA-MB-231 após quatro dias, de acordo com o ensaio realizado.

3.2.4 Ensaios de citotoxicidade celular

3.2.4.1 Ensaio de viabilidade celular – Método do MTT

A citotoxicidade do complexo Ru(ThySMet) nas células de mama das linhagens MDA-MB-231, MCF-10A, T4-2 e S1 em cultura 3D foi determinada utilizando o método do MTT com adaptações. Brevemente, as células (5×10^3 / 100 µL) foram cultivadas em placas de 96 poços, conforme descrito no item 3.2.3.2 Método *on top* com Matrigel®. Então, as células foram tratadas com diferentes concentrações do complexo Ru(ThySMet) por 24 h. Depois, as células foram colocadas em gelo e cuidadosamente lavadas com PBS. Depois, a placa foi centrifugada e o PBS removido. Em seguida, uma solução de MTT (1 mg/mL) foi adicionada às células e os mesmos passos descrito no item 2.2.3.1 Ensaio de viabilidade celular – Método do MTT foram seguidos.

3.2.4.2 Ensaio de viabilidade celular – Método Calceína/PI

Para continuar a avaliar a viabilidade das células S1 e T4-2 foi realizado o ensaio “vivo/morto”. As células (5×10^3 / 100 µL) foram cultivadas em placas de 96 poços estéreis, conforme descrito no item 3.2.3.2 Método *on top* com Matrigel®. Posteriormente, as células foram tratadas e coradas com calceína acetoximetil-diacetilester (calceína AM) (1 µg/mL) e PI (5 µM/mL) durante 1 h dentro da incubadora (37°C, 5% de CO₂). Em seguida, as células foram imediatamente analisadas com o microscópio automatizado ImageXpress® Micro XLS System (Molecular Devices). Nove fotos foram capturadas aleatoriamente de partes dos poços para proceder à quantificação.

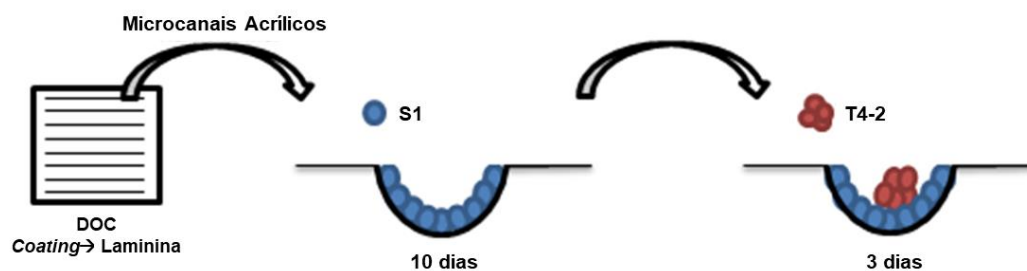
3.2.4.2 Ensaio de morfologia celular

A morfologia das células S1 e T4-2 cultivadas conforme descrito no item 3.2.3.2 Método *on top* com Matrigel® foi avaliada após o tratamento de 24 h. Brevemente, as células ($0,5 \times 10^5$) foram cultivadas em placas de 24 poços estéreis e o tratamento realizado com diferentes concentrações do complexo Ru(ThySMet). 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).

3.2.4.3 Ensaio utilizando o modelo de doença-no-chip (DOC)

O modelo de doença-no-chip (DOC), que é um dispositivo com microcanais acrílicos que simula o carcinoma ductal (Vidi *et al.*, 2014), foi fabricado no *Birck Nanotechnology Center* na Universidade de Purdue, Estados Unidos, e foi utilizado de acordo com o protocolo descrito anteriormente (Chhetri *et al.*, 2019). Brevemente, este dispositivo foi revestido com laminina-111 ($133 \mu\text{g/mL}$) e deixado a 37°C durante 12 h. Em seguida, as células S1 foram semeadas e deixadas proliferar e diferenciar por dez dias. No sétimo dia, o meio foi trocado e meio sem EGF foi adicionado. Os chips com as células foram mantidos em incubadora úmida a 37°C e 5% de CO_2 . Em seguida, as células foram tratadas por 24 h com o complexo Ru(ThySMet). No ensaio de co-cultura, em que foram adicionados os nódulos de T4-2 para simular o câncer de mama ductal, as células T4-2 foram primeiro cultivadas separadamente usando Matrigel® no método *on top* durante dois dias para induzir a formação de tumores pequenos (poucas células). Para isso, placas de Petri (35 mm) foram revestidas com 0,5 mL de Matrigel® gelado. As placas foram mantidas em incubadora úmida a 37°C e 5% de CO_2 por 20 min para polimerização. Em seguida, as células foram contadas e semeadas na matriz; depois adicionou-se meio H14 contendo 10% de Matrigel®. Após dois dias, os nódulos foram descolados, corados com 1 mg/mL de Dil (perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina ('DiI'; DiIC18 (3))), contados e semeados em conjunto com as células S1 durante três dias. Posteriormente, as células foram tratadas por 24 h com o complexo Ru (ThySMet). O esquema da co-cultura está apresentado na Figura 17.

Figura 17 – Esquema do cultivo de células S1 e T4-2 em co-cultura no DOC, dispositivo que simula o carcinoma ductal. *



*Esquema elaborado pela autora.

3.2.5 Ensaios relacionados a apoptose e reversão tumoral

3.2.5.1 Ensaio de imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi realizado com as células em 3D cultivadas nos métodos *embedded*, *on top* e no modelo DOC, conforme descrito anteriormente (Lee *et al.*, 2007; Chittiboyina *et al.*, 2017). Resumidamente, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4% e depois lavadas três vezes com PBS glicina (50 mM). Posteriormente, as lâminas foram bloqueadas em solução de imunofluorescência (IF) com soro de cabra (10%) e fragmentos de anticorpos goat anti-mouse IgG F(ab1)2. Subsequentemente, a marcação foi realizada utilizando anticorpos primários anti-caspase-3 (Cell Signaling Technologies), anti-integrina $\alpha 6$, anti- β -catenina (BD Biosciences) e anti- γ -H2AX (Abcam) seguido pela adição dos anticorpos secundários Alexa Fluor-488 e -568 apropriados. Os núcleos foram marcados com 0,5 μ g/mL de DAPI. As lâminas foram fotografadas com o microscópio Fluorescence Olympus BX61-TRF5 (câmera DP73) ou no multifotômetro confocal LSM 780 Carl Zeiss e as análises foram realizadas com o *software* Image J. O inibidor de MAPK PD98059 foi utilizado como controle positivo de reversão (C+).

3.2.5.2 Medição do tamanho e da circularidade das estruturas 3D

As estruturas 3D foram fotografadas usando o microscópio invertido (Fluorescence Olympus BX61-TRF5) acoplado a uma câmera (DP73) e, em seguida, o tamanho e a circularidade de pelo menos 50 estruturas em locais aleatórios foram analisados com o *software* Image J.

3.2.5.3 Ensaio de western blotting

As células T4-2 e S1 ($0,5 \times 10^5$ / poço) foram semeadas como descrito anteriormente no método 3D – *on top* em placas de 24 poços estéreis e receberam o tratamento com o complexo Ru(ThySMet) por 24 h. Em seguida, as estruturas formadas foram removidas com a adição de PBS contendo EDTA (5 mM), NaVO_4 (1 mM), NaF (1,5 mM) e coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich), como descrito anteriormente (Lee *et al.*, 2007) por 20 min a 4°C. As estruturas coletadas foram agitadas no gelo durante 5 min a 850 rpm. Após, os procedimentos foram os mesmos descritos no item 2.2.5.5 Ensaio de western blotting. Os anticorpos utilizados foram: anti-integrina $\beta 1$, anti-EGFR, anti-p38 MAPK, anti-NF κ B, seguido de incubação com anticorpos secundários conjugados com HRP.

3.2.6 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.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após os resultados obtidos pelos ensaios em cultura *in vitro* em 2D foram também realizados ensaios *in vitro* em 3D, dadas as diferenças observadas em estudos utilizando os dois tipos de cultura e a relevância dos resultados em 3D, já que essa técnica consegue representar melhor o microambiente encontrado *in vivo*. A técnica de cultura 3D foi aprendida e alguns ensaios realizados durante o período de estágio no exterior no laboratório da Profa. Dra. Sophie Lelièvre, na Universidade de Purdue, nos Estados Unidos, e posteriormente ensaios adicionais em 3D foram realizados também no Brasil.

3.3.2 Ensaios de citotoxicidade

A citotoxicidade do complexo Ru(ThySMet) em diferentes tipos de células da mama em 3D foi avaliada pelo método do MTT. Para permitir comparações o mesmo ensaio com as células da série de progressão tumoral HMT-3522 em 2D também foi realizado e os valores de

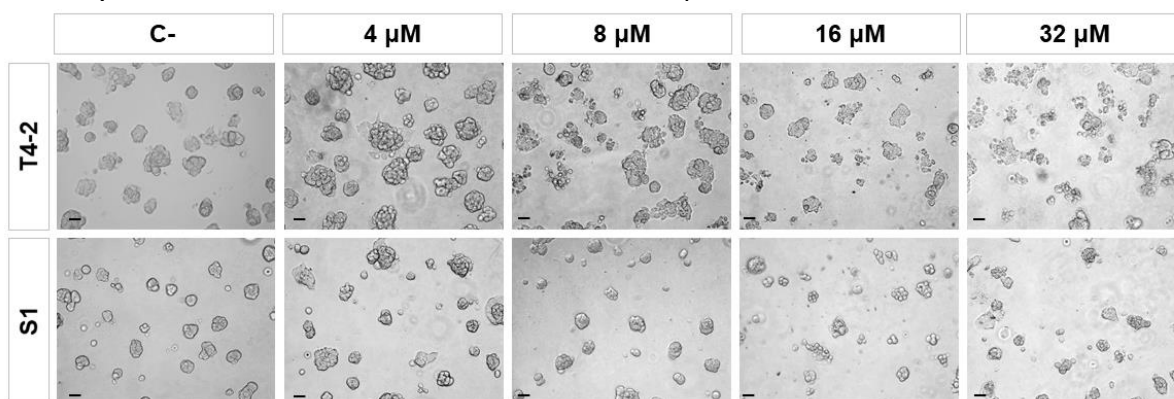
IC₅₀ do complexo Ru(ThySMet) com as células MDA-MB-231 e MCF-10A em 2D foram reapresentados neste capítulo. As células cultivadas em 2D são mais sensíveis ao tratamento que as células cultivadas em 3D (Tabela 3). Também em 3D o complexo Ru(ThySMet) apresentou uma maior especificidade para células tumorais, o que fez o índice de seletividade aumentar. Os resultados apresentados pelo complexo Ru(ThySMet) em 2D e em 3D são bastante diferentes provavelmente porque o modelo 3D apresenta interações célula-célula mais complexas que em 2D. Além de que a distribuição do complexo ocorre de maneira mais heterogênea no modelo em 3D devido à disposição das células.

No ensaio de morfologia em 3D o tratamento de 24 h com o complexo Ru(ThySMet) promoveu mudanças drásticas nas estruturas das células T4-2, mas apenas pequenas alterações nas estruturas das células S1 (Figura 18).

Tabela 3 - Atividade citotóxica do complexo Ru(ThySMet) em 3D. IC₅₀ (μM) do complexo Ru(ThySMet) em 2D e em 3D nas células MDA-MB-231, MCF-10A, T4-2 e S1 após 24 h de incubação. DP = Desvio padrão. ^aIS = Índice de seletividade do complexo. * Resultados apresentados no capítulo 2.

	IC ₅₀ (μM) ± DP					
	MDA-MB-231	MCF-10A	^a IS	T4-2	S1	^a IS
2D	8,81 ± 0,81*	14,82 ± 2,50*	1,68*	4,98 ± 0,44	19,19 ± 2,74	3,85
3D	33,40 ± 1,93	> 100	> 2,99	21,08 ± 3,74	> 100	> 4,74

Figura 18 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) (4, 8, 16 ou 32 μM) na morfologia celular das estruturas das células T4-2 e S1 em 3D. Imagens representativas das estruturas tratadas com Ru(ThySMet) por 24 h. As imagens foram adquiridas com o aumento de 200 ×; Barras de escala: 40 μm.



A calceína-AM é um corante de membrana celular não fluorescente permeável que uma vez incorporada por células viáveis é clivada por esterases, sendo convertida em calceína fluorescente verde (Zhou *et al.*, 2011). Já o PI é um corante fluorescente de DNA que apenas penetra nas células que perderam a integridade da membrana, portanto marcando em vermelho apenas células mortas (Boutonnat *et al.*, 1999). Os resultados deste ensaio mostraram que o

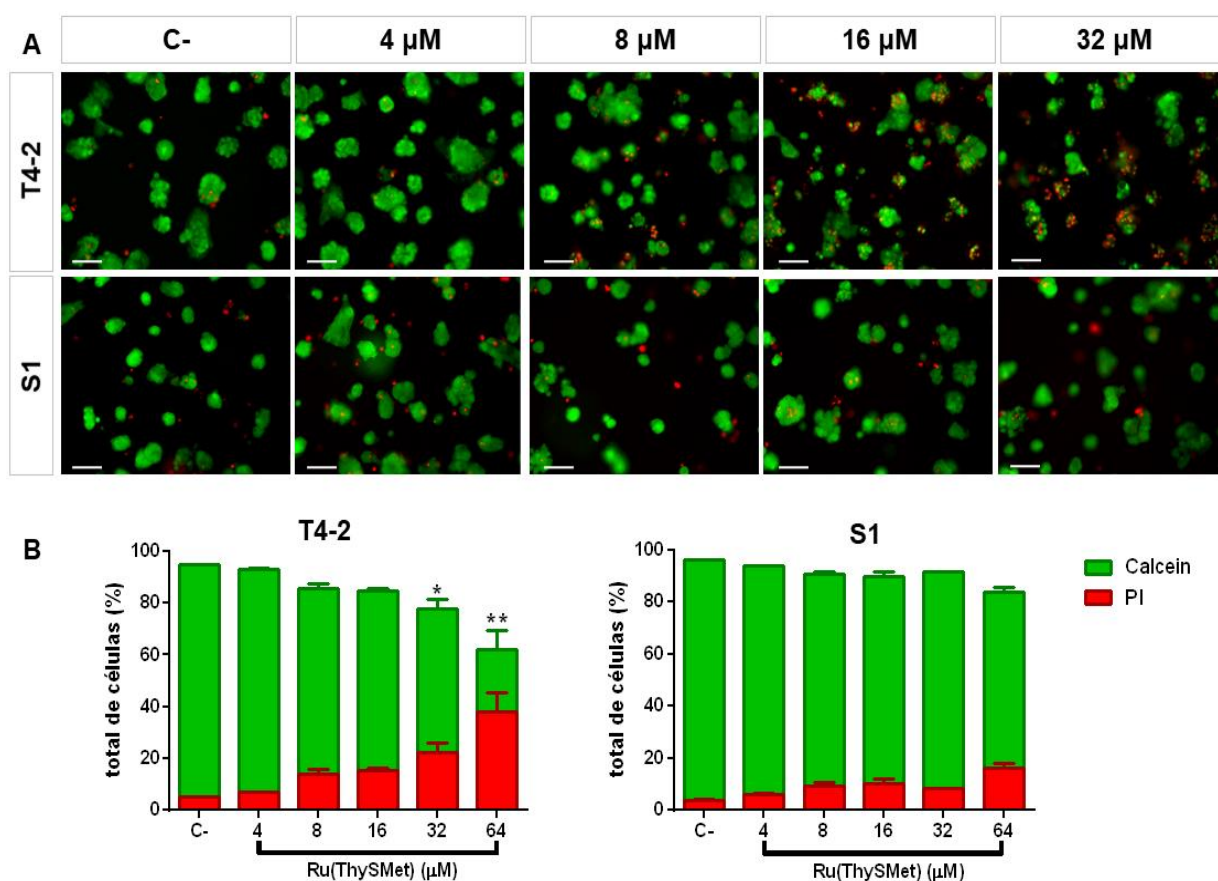
complexo Ru(ThySMet) induz a morte das células T4-2, especialmente na maior concentração (64 μM), na qual aproximadamente 40% das estruturas foram coradas com PI (Figura 19A). Além disso, é possível notar que há uma redução nos tamanhos das estruturas nas concentrações mais altas em relação ao controle negativo (C-). Nas estruturas das células S1 o complexo induz a morte de forma mais atenuada, não excedendo 16% de células marcadas com PI na maior concentração testada (64 μM , Figura 19B). Tomados em conjunto, os resultados indicam que o complexo Ru(ThySMet) induz a morte de células tumorais de maneira concentração dependente e de uma maneira mais específica para estas células.

Vários estudos que avaliaram a citotoxicidade usando diferentes compostos relataram diferenças ao comparar a cultura de células 3D com a tradicional cultura de células 2D. A citotoxicidade dos complexos ciclometalados (1b-4b) rutênio (II) e cisplatina foi avaliada em células HeLa de carcinoma cervical humano. Os resultados demonstraram que os complexos 1b-4b exibem citotoxicidade após 72 h de tratamento contra células HeLa tanto em culturas de células 2D (0,8-3,6 μM) como 3D (2-5 μM), mas os valores de IC_{50} foram ligeiramente superiores na cultura de células 3D. A cisplatina também foi citotóxica para células HeLa em cultura 2D, enquanto que em cultura de células 3D as células HeLa foram mais resistentes à cisplatina com valor IC_{50} quase 10 vezes maior (Huang *et al.*, 2015). Outro estudo avaliou a citotoxicidade de benzimidazo[1,2-a]quinolinas e benzo[b]tieno[2,3-b]pirido[1,2-a]benzimidazóis com cadeias amino em diferentes posições em cultura 2D e 3D em MDA - MB-231, SK-BR-3 e T-47D células de câncer de mama humano (Perin *et al.*, 2017) e como no outro estudo, os resultados demonstraram que a maioria dos compostos testados eram altamente ativos em cultura celular em 2D, mas em cultura de células 3D os mesmos compostos mostraram atividade moderada ou nenhuma atividade.

Outros complexos de rutênio também tiveram sua citotoxicidade testada em 2D e 3D. Os efeitos de citotoxicidade de dois complexos de rutênio contendo piplartina também foram avaliados na linhagem celular HCT116 (carcinoma do colorretal humano) em modelos 2D e 3D após 72 h de incubação. Os resultados demonstraram que as células em 3D eram menos sensíveis aos complexos $[\text{Ru}(\text{piplartine})(\text{dppf})(\text{bipy})](\text{PF}_6)_2$ e $[\text{Ru}(\text{piplartine})(\text{dppb})(\text{bipy})](\text{PF}_6)_2$ com IC_{50} de 7,3 e 8,3 μM , respectivamente, em comparação com IC_{50} de 1,7 e 5,5 μM no modelo 2D (D'sousa Costa *et al.*, 2017). Outro estudo com complexo de rutênio, o $[\text{Ru}(5\text{-FU})(\text{PPh}_3)_2(\text{bipy})]\text{PF}_6$ e a mesma linhagem celular, HTC116, também demonstrou que o tratamento de 72 h pode afetar a viabilidade das células, com IC_{50} de 1,5 μM em 2D e 1,7 μM em 3D e alterou as estruturas em ambiente tridimensional (Silva *et al.*, 2018).

Esses e outros resultados (Dhiman *et al.*, 2005; Magdeldin *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2016; Salehi *et al.*, 2017) demonstram que as células tumorais parecem ser geralmente menos sensíveis aos agentes quimioterápicos no ambiente 3D quando comparadas às culturas celulares em monocamada, demonstrando que os ensaios em 3D são muito importantes no estudo de novos fármacos. Além disso, os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com a literatura, uma vez que o Ru(ThySMet) apresentou maior IC₅₀ em 3D em comparação aos ensaios 2D.

Figura 19 - Efeitos citotóxicos do complexo Ru(ThySMet) em estruturas das células T4-2 e S1 em 3D no ensaio de citotoxicidade com calceína AM e PI após 24 h de tratamento com Ru(ThySMet) (4, 8, 16 ou 32 μ M). **(A)** Imagens de imunofluorescência representativas em que a calceína-AM é mostrada em verde e o PI em vermelho. A conversão de fluorescência verde para vermelha indica morte celular. **(B)** Gráfico apresentando a quantificação da fluorescência verde (viva) e vermelha (morta). As imagens foram adquiridas no aumento de 200 \times ; Barras de escala: 40 μ m. As barras mostram média \pm SEM e os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (sem tratamento). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.



3.3.3 Ensaios relacionados à apoptose e reversão tumoral

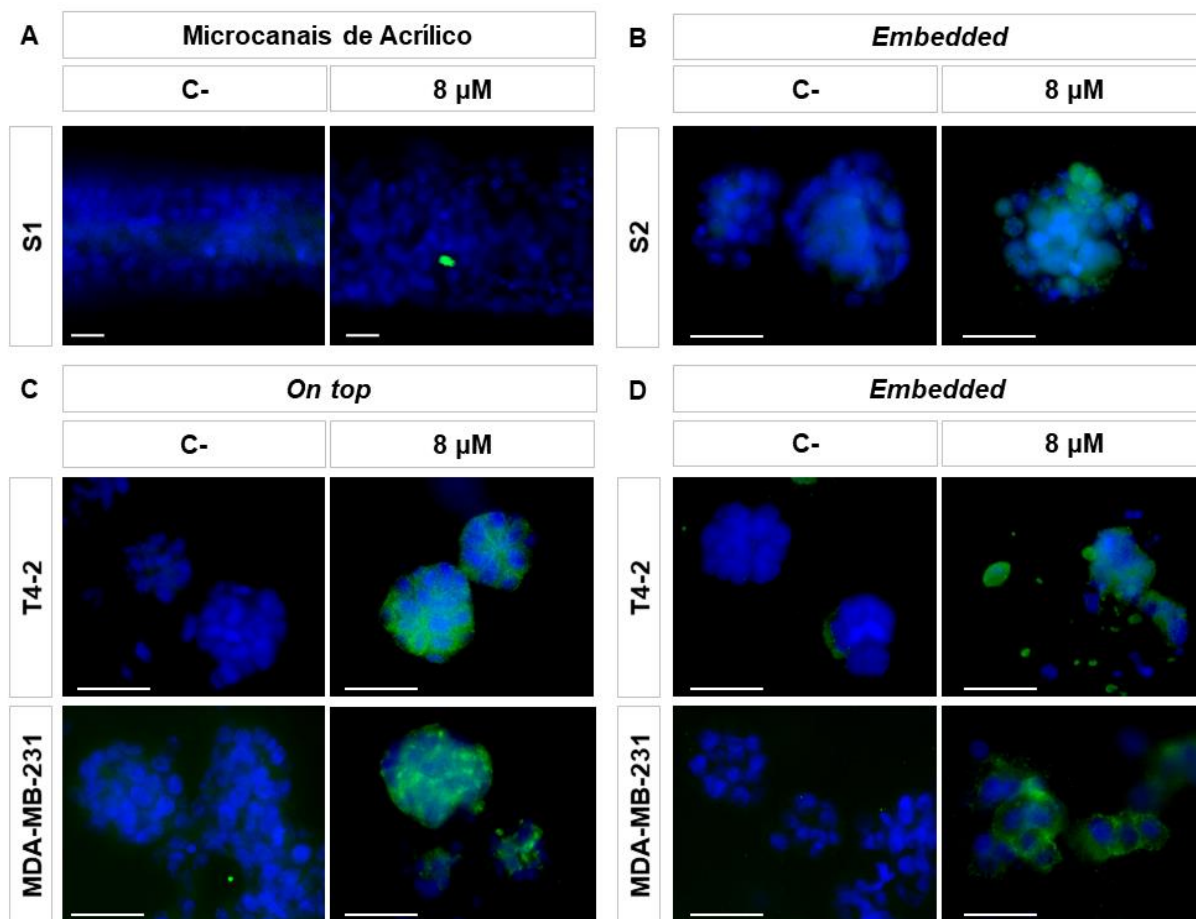
A indução de apoptose pelo complexo Ru(ThySMet) em diferentes tipos de células de mama em cultura 3D foi avaliada utilizando o ensaio de imunofluorescência com o anticorpo

anti-caspase-3 clivada. Para este, três métodos de cultura em 3D foram usados para cultivar as células. No método *embedded*, as células T4-2 e MDA-MB-231 foram cultivadas em colágeno I com rigidez de 2020 Pa e as células S2 foram cultivadas em colágeno I com rigidez de 1500 Pa com 133 µg/mL de laminina 111, para mimetizar condições de carcinoma ductal invasivo e carcinoma ductal *in situ*, respectivamente. No método *on top*, as células T4-2 e MDA-MB-231 foram cultivadas em Matrigel®. As células S1 foram cultivadas no modelo DOC, nos microcanais acrílicos, para formar um epitélio polarizado e depois foram tratadas com o complexo Ru(ThySMet).

Os resultados da imunofluorescência com as células S1 demonstraram que o complexo Ru(ThySMet) não induz de maneira expressiva a ativação da caspase-3 clivada nas células S1 dentro dos microcanais (Figura 20A). A indução de apoptose pelo complexo Ru(ThySMet) também foi analisada na linhagem de células da mama pré-invasivas, S2, para verificar sua capacidade de induzir a apoptose em outros tipos de células da mama. A marcação das estruturas S2 demonstrou que o Ru(ThySMet) é capaz de induzir a ativação da caspase-3 clivada de maneira moderada (Figura 20B).

Em células tumorais, o complexo Ru(ThySMet) induz a ativação da caspase-3 clivada de forma mais intensa nas células MDA-MB-231 e T4-2 em ambos os métodos, mas é possível observar que no método *embedded* as estruturas chegam a se romper (Figura 20CD). Esse efeito pode ser explicado em parte pela presença de laminina no Matrigel®, utilizado no método *on top*, que é conhecida por proteger as células de sofrer apoptose devido a interações entre a laminina e a integrina (Weaver *et al.*, 2002). É importante ressaltar também que havia células não coradas com caspase-3, mas com intenso dano ao DNA. Portanto, concluímos que o complexo Ru(ThySMet) induz a ativação da caspase-3 nas células não tumorais S1 e nas células pré-invasivas S2 de forma menos intensa em comparação com as células tumorais invasivas de CMTN, MDA-MB -231 e T4-2. Além disso, é possível sugerir que quando as células S1 estão nos microcanais elas são menos sensíveis ao tratamento com o complexo Ru(ThySMet) em comparação às linhagens de células tumorais, provavelmente devido à sua diferenciação e também devido à forma curva dos microcanais.

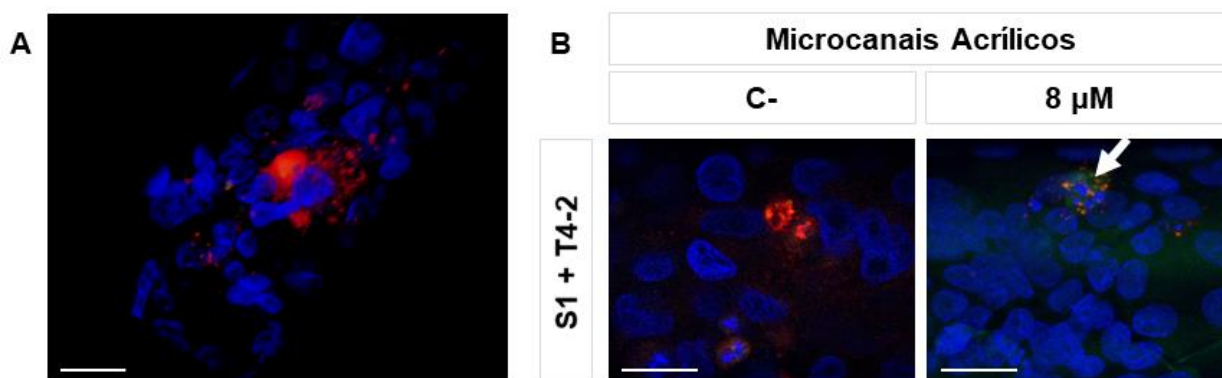
Figura 20 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) na apoptose de células S1, S2, T4-2 e MDA-MB-231 através da ativação da caspase-3 após 24 h de tratamento. **(A)** Células S1 marcadas com anti-caspase-3 nos microcanais acrílicos **(B)** Células S2 cultivadas *embedded* e marcadas com anti-caspase-3 em colágeno I de rigidez de 1500 Pa. **(C)** T4-2 e células MDA-MB-231 cultivada *on top* marcadas com anti-caspase-3 em Matrigel®. **(D)** células T4-2 e MDA-MB-231 cultivadas *embedded* e coradas com anti-caspase-3 em colágeno I de rigidez de 2020 Pa. Imagens representativas das lâminas foram adquiridas em aumento de 400 ×; Barras de escala: 40 μm. Os núcleos foram corados com DAPI (azul) e a caspase-3 ativa é mostrada em verde.



O dispositivo usado, chamado de “doença-no-chip” (DOC), leva em consideração a geometria ductal curva do tecido mamário. Ensaios com este dispositivo demonstraram que as células tumorais co-cultivadas com células não tumorais neste modelo têm sensibilidade diferente aos fármacos em comparação com nódulos cultivados em uma superfície plana ou com outros métodos nos quais nódulos tumorais não têm restrições físicas. Portanto, os ensaios conduzidos com este modelo também podem fornecer resultados mais confiáveis, uma vez que as células tumorais são cultivadas de maneira semelhante à encontrada nos tecidos reais (Vidi *et al.*, 2014). A co-cultura de células S1 com estruturas de células T4-2 também foi avaliada em microcanais acrílicos, no modelo DOC (Figura 21). É possível observar que as células T4-2 são completamente circundadas por células S1 e que isso pode influenciar o comportamento do

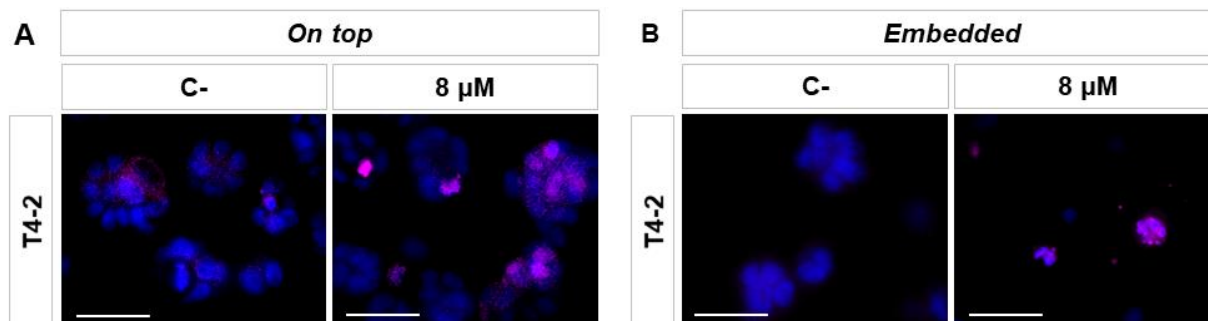
tumor. Após o tratamento com o complexo Ru(ThySMet) as estruturas das células T4-2 aparecem com o DNA fragmentado e também é possível observar uma leve marcação da caspase-3 indicando sua ativação após o tratamento dentro dos microcanais.

Figura 21 - Células S1 co-cultivadas com estruturas T4-2 nos microcanais acrílicos. **(A)** Imagem confocal representativa de células S1 e T4-2 nos microcanais acrílicos. Núcleos foram corados com DAPI (azul) e T4-2 foram corados com Dil (vermelho). **(B)** células S1 e estruturas T4-2 coradas com anti-caspase-3 em microcanais acrílico. As células foram tratadas durante 24 h com 8 μ M do complexo Ru(ThySMet). Imagens representativas das lâminas foram adquiridas com aumento de 400 \times . Barras de escala: 40 μ m.



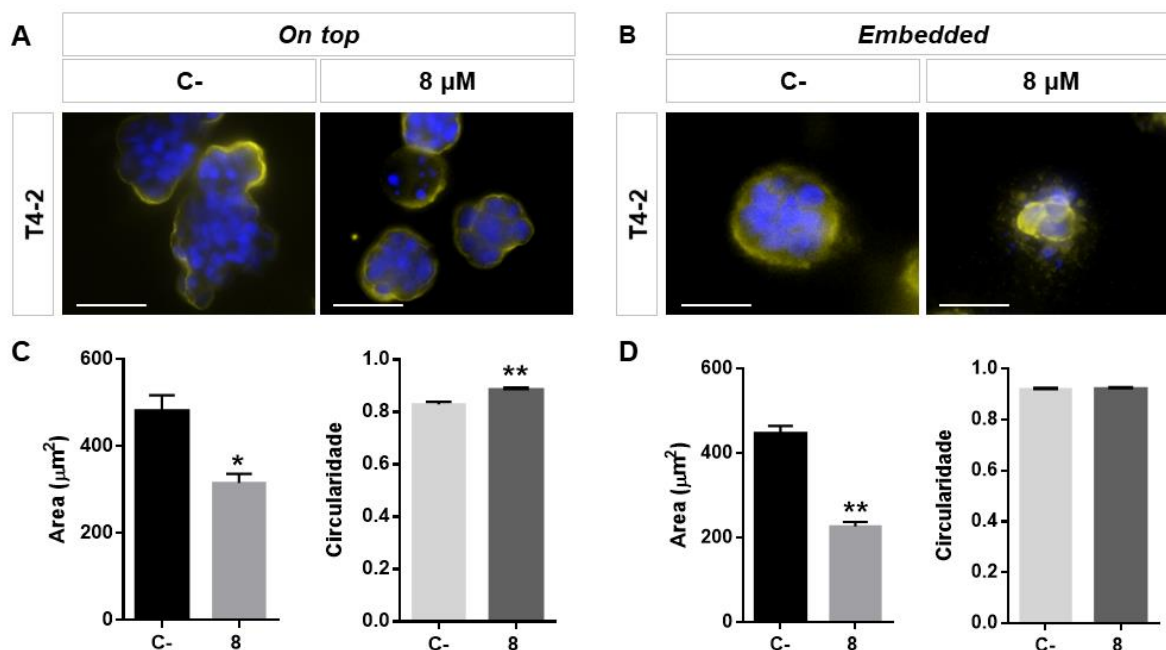
Para analisar o dano ao DNA observado no ensaio de apoptose nas células T4-2 foi utilizado o marcador de dano ao DNA γ -H2AX. O complexo Ru(ThySMet) aumentou a marcação de γ -H2AX quando comparado ao grupo controle em ambos métodos de cultivos (Figura 22). Especificamente, nas estruturas cultivadas no método *embedded* em colágeno é possível observar uma coloração intensa causada por um grande número de quebras de fita dupla e também uma redução no tamanho das estruturas (Figura 22B) em comparação com a célula cultivada no método *on top* (Figura 22A).

Figura 22 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) no rompimento de fita dupla de DNA através da ativação de γ -H2AX. **(A)** células T4-2 marcadas pela ativação de γ -H2AX em Matrigel®. **(B)** células T4-2 marcadas pela ativação em colágeno I de rigidez de 2020 Pa. Imagens representativas das lâminas foram adquiridas com aumento de 400 \times ; Barras de escala: 40 μ m. Os núcleos foram corados com DAPI (azul) e γ -H2AX é mostrado em rosa.



A marcação da integrina $\alpha 6$ foi realizada para analisar o tamanho e a circularidade das estruturas de T4-2 após o tratamento de 24 h com 8 μ M do complexo Ru(ThySMet). Os resultados demonstraram que o tratamento com o complexo, em ambos os métodos, diminuiu significativamente o tamanho das estruturas de T4-2 não tratadas (Figura 23). Por outro lado, a circularidade das estruturas cultivadas com o método *on top* aumenta significativamente após o tratamento (Figura 23AC) enquanto que a circularidade das estruturas T4-2 cultivadas com o método *embedded* quando comparadas com as estruturas não tratadas de T4-2 não altera significativamente (Figura 23BD).

Figura 23 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) na circularidade e área das estruturas de células T4-2. **(A)** Imagens representativas marcando a integrina $\alpha 6$ de células T4-2 cultivadas com o método *on top* com Matrigel®. **(B)** Imagens representativas marcando a integrina $\alpha 6$ de células T4-2 cultivadas com o método *embedded* em colágeno I de rigidez de 2020 Pa. **(C)** Média da área e circularidade de estruturas não tratadas (C-) e tratadas com 8 μM de cultura de células 3D usando o método *on top* com Matrigel®. **(D)** Média da área e circularidade de estruturas não tratadas (C-) e tratadas com 8 μM de cultura de células 3D usando o método *embedded* em colágeno I de rigidez de 2020 Pa. Imagens representativas das lâminas foram adquiridas com aumento de 400 \times ; Barras de escala: 40 μm . As barras mostram média \pm SEM e os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (sem tratamento). * $p < 0,001$; ** $p < 0,0001$. Os núcleos foram corados com DAPI (azul) e a $\alpha 6$ -integrina é mostrada em amarelo.

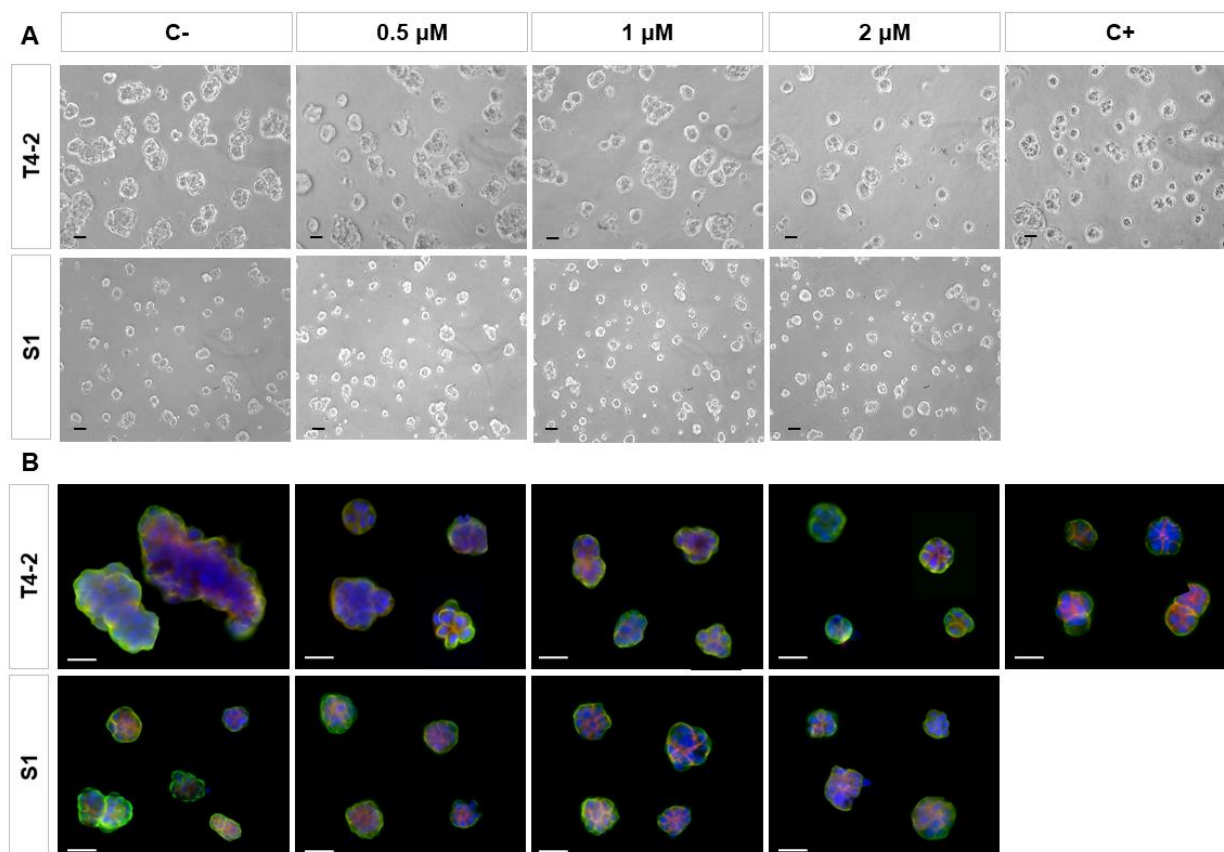


Alterações nas estruturas 3D após a exposição a diferentes substâncias são comuns. O complexo Ru(phen)(bzq)(tbtfpip)(PF₆) foi capaz de diminuir o tamanho da estrutura e causar alterações nos esferoides tumorais multicelulares de células A549R (células de carcinoma de pulmão) com o tratamento de 1 e 2 μM (Zeng *et al.*, 2016). O tratamento por um dia com 8 μM do complexo Ru(ThySMet) resultou no rompimento, na diminuição e no aumento da circularidade das estruturas tumorais 3D. A partir deste resultado tornou-se interessante analisar a capacidade do complexo Ru(ThySMet) em reverter o fenótipo maligno das estruturas de T4-2 em concentrações não citotóxicas.

Para entender melhor esse efeito do complexo Ru(ThySMet) foram realizados ensaios de imunofluorescência e western blotting, nos quais o tratamento ocorreu no momento em que as células foram semeadas. Para análise da polaridade das células T4-2 e S1, estas foram incubadas com os anticorpos anti-integrina $\alpha 6$ e anti- β -catenina. Estes anticorpos foram usados porque reconhecem ambas as proteínas que estão localizadas respectivamente no lado basal e nas junções célula-célula, fornecendo evidências sobre a polaridade da estrutura (Weaver *et al.*, 2002).

Os resultados da morfologia celular e do ensaio de imunofluorescência (Figura 24) sugerem que o complexo Ru(ThySMet) é capaz de reverter o fenótipo maligno das células T4-2 para um fenótipo muito semelhante das células S1. Isto é observado pela redução das estruturas de T4-2 de forma dependente da concentração (Figura 24A) e também pela obtenção de uma estrutura mais organizada (Figura 24B). O PD98059, um inibidor seletivo reconhecido pela sua capacidade de reverter o fenótipo de células malignas pela inibição da MAPKK (proteína quinase ativada por mitógenos) via MEK1/2 (Wang *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2012; Furuta *et al.*, 2018) foi utilizado como controle positivo (C +) da reversão fenotípica.

Figura 24 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet) no fenótipo das estruturas de células T4-2 e S1. **(A)** Imagens representativas das estruturas T4-2 (painel superior) e S1 (painel inferior) tratadas com o complexo Ru(ThySMet) no momento em que as células foram semeadas. **(B)** Marcação por imunofluorescência das estruturas de células T4-2 (painel superior) e células S1 (painel inferior) com anti-integrina $\alpha 6$ (verde), anti- β -catenina (vermelho) e DAPI (azul). Estruturas representativas foram selecionadas de campos aleatórios. Células sem tratamento foram utilizadas como controle negativo (C-) e células tratadas com o PD98059 foram utilizadas como controle positivo (C+). As imagens foram adquiridas com ampliação de 200x; Barras de escala: 40 μ m.

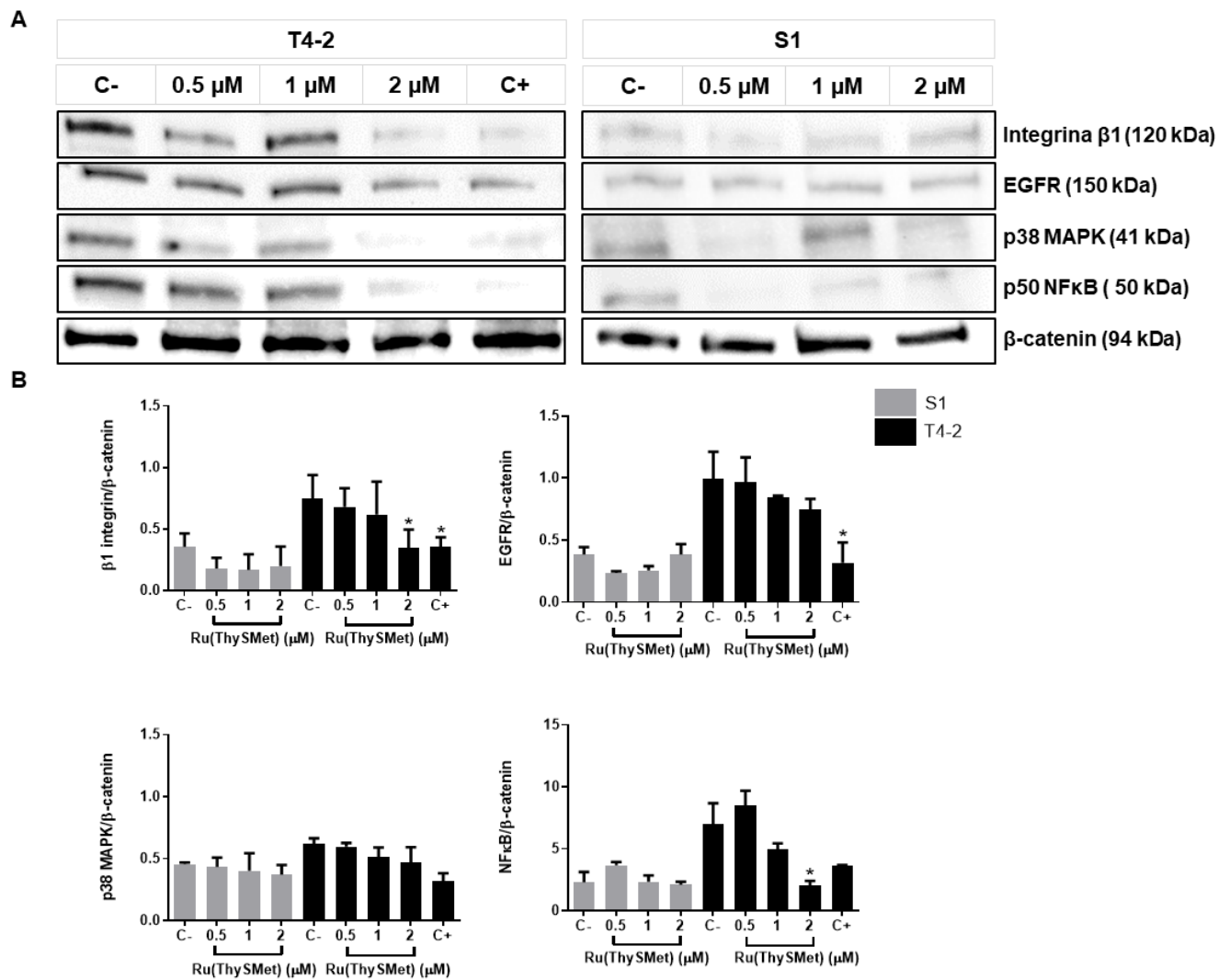


Confirmando os achados dos ensaios anteriores, os resultados de western blotting com proteínas responsáveis pela reversão do fenótipo maligno mostraram que o EGFR, $\beta 1$ -integrina

foram regulados negativamente de forma significativa e a expressão da p38-MAPK e de p50 NFκB não foi alterada significativamente, apesar de uma redução ser observada (Figura 25).

A literatura é escassa em relação aos efeitos dos compostos na reversão do fenótipo maligno na cultura 3D. Um dos poucos estudos é com o [10]-gingerol, um composto natural extraído do gengibre, que é capaz de reverter o fenótipo maligno de células T4-2 diminuindo também os níveis proteicos de EGFR e integrina β1 e também de induzir a apoptose de células T4-2 e MDA-MB-231 (Fuzer *et al.*, 2017).

Figura 25 - Western blotting de proteínas relacionadas ao fenótipo após o tratamento com o complexo Ru(ThySMet). **(A)** Imagens de western blotting representativas das proteínas integrina β1, EGFR, p38 MAPK, NFκB após o tratamento de 24 h com diferentes concentrações de Ru(ThySMet) nas células T4-2 e S1. **(B)** Gráfico de barras dos níveis de integrina β1, EGFR, p38 MAPK, NFκB. As barras mostram média ± SEM e os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (sem tratamento). Como controle positivo (C+) células tratadas com o PD98059 foram utilizadas. * p < 0,05.



Assim como em 2D, os estudos com cultura 3D também demonstraram que o complexo Ru(ThySMet) possui potencial no tratamento do câncer de mama. Em 3D o complexo também apresentou maior seletividade para as células tumorais em relação as células não tumorais, após 24 h de incubação, com aumento do IS. O complexo Ru(ThySMet) também induziu a apoptose e em 3D reverteu o fenótipo maligno das células de mama tumorais da linhagem T4-2 devido a supressão de proteínas relacionadas a esse processo, como EGFR, p50 NFκB e integrina β1. Portanto, diante dos interessantes resultados os ensaios de toxicidade e de genotoxicidade *in vivo* foram escolhidos para dar continuidade à análise do complexo Ru(ThySMet) e os resultados estão apresentados no próximo capítulo (capítulo 4).

4.1 O USO DE ANIMAIS NAS PESQUISAS E SUA IMPORTÂNCIA

No último século, o uso de animais na pesquisa foi muito importante e garantiu avanços médicos e o entendimento e tratamento de várias doenças. Até hoje modelos animais são importantes e utilizados para avaliar os efeitos de fármacos e compostos tóxicos *in vivo* (Festing e Wilkinson, 2007; Saeidnia *et al.*, 2015). É importante destacar que embora o uso de animais em pesquisa ainda não possa ser substituído, um grande movimento para diminuição e descobertas de novas alternativas para reduzir o seu uso está ocorrendo (Festing e Wilkinson, 2007). A cultura de células 2D e 3D, além de novas tecnologias, como os órgãos-no-chip, podem contribuir com a diminuição do uso dos animais nas pesquisas.

Os estudos de toxicidade *in vivo* são muito importantes e necessários para comprovação da segurança de novos compostos que tiveram sua eficiência *in vitro* comprovada (Grozav *et al.*, 2016). O ensaio de toxicidade aguda, no qual doses são administradas em um período de 24 h e os animais observados por 14 dias a fim de identificar possíveis sinais de toxicidade decorrentes da administração é recomendado por agências nacionais, como a ANVISA, e também por agências internacionais, como a OECD, para análise e classificação dos possíveis efeitos tóxicos de um novo composto (Oecd, 2001b; Brasil, 2013). Atualmente, estudos para determinação exata da DL₅₀ não são mais utilizados devido ao grande número de animais empregados. A comunidade científica desenvolveu outros métodos bem aceitos e que utilizam um menor número de animais, como os guias 420, 423 e 425 da OECD, para estimar as faixas onde a letalidade é esperada (Oecd, 2001a; Botham, 2004).

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Complexo de rutênio

O complexo Ru(ThySMet), sintetizado e caracterizado pelo LERCI, sob responsabilidade do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, como descrito no capítulo 2 desta tese, foi utilizado para os ensaios *in vivo*.

4.2.1.1 Solubilização do complexo Ru(ThySMet)

O complexo Ru(ThySMet) utilizado para os testes *in vivo* foi solubilizado em soro fisiológico (0,9%) e em DMSO.

4.2.2 Biotérios

Os ensaios de toxicidade foram realizados na UFSCar no biotério do Departamento de Fisioterapia, com colaboração do Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto. Os ensaios relacionados aos danos ao DNA foram realizados na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), *campus* Marília, com colaboração do Prof. Dr. Edson Maistro.

4.2.3 Procedimentos éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSCar (CEUA nº 1051160315). E também aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESP (protocolo nº 828/2016) (Anexos 2 e 3).

4.2.4 Animais

Os animais utilizados nos experimentos de toxicidade foram camundongos da linhagem *swiss* machos adquiridos junto ao biotério da UFSCar, *campus* São Carlos. Os animais foram aclimatados por 7 dias antes do início dos experimentos no biotério do Departamento de Fisioterapia. Os animais utilizados nos experimentos de danos ao DNA foram também camundongos da linhagem *swiss* machos adquiridos junto ao biotério da UNESP, *campus* Botucatu. Os animais foram aclimatados por 7 dias antes do início dos experimentos no biotério da Faculdade de Filosofia e Ciências da UNESP, *campus* Marília. Os mesmos foram mantidos em condições de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade controladas ($55 \pm 10\%$), 12 h de ciclo claro/escuro e receberam ração sólida e água *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos com animais de aproximadamente 20-25 g de massa corporal.

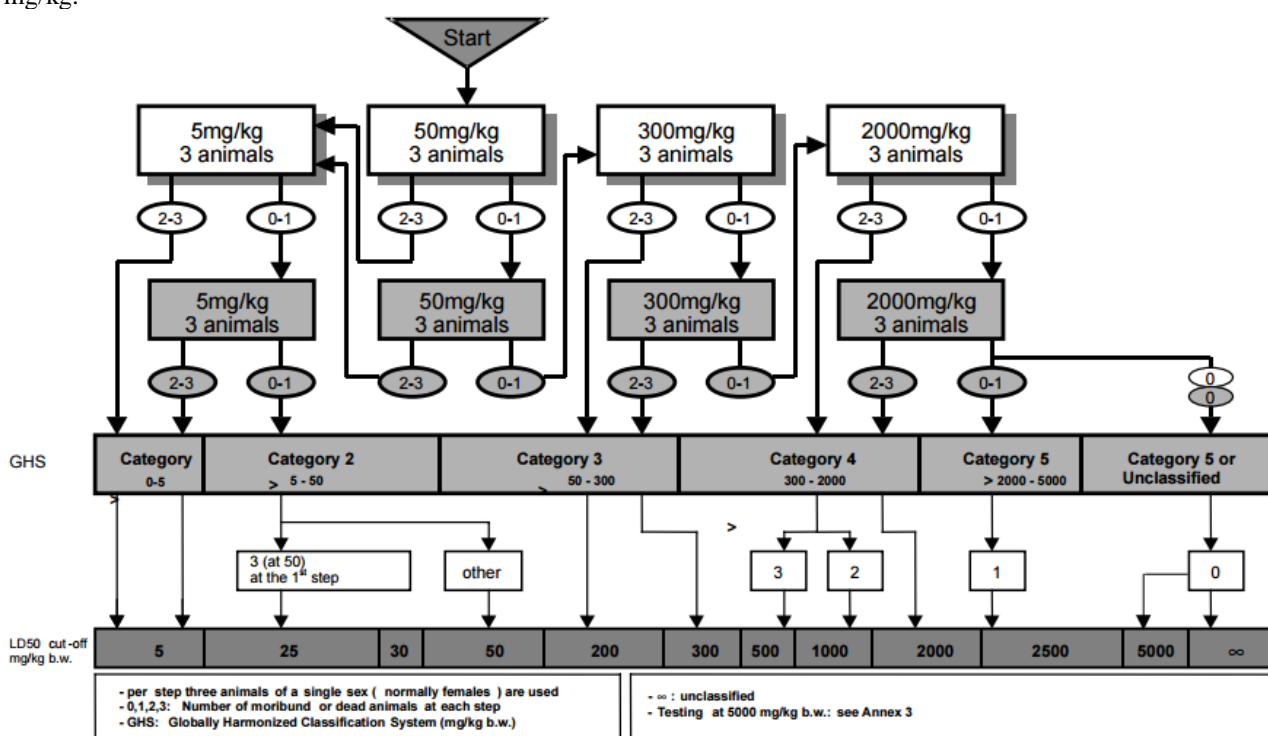
4.2.5 Ensaios de toxicidade *in vivo*

4.2.5.1 Toxicidade aguda

Para determinação da toxicidade aguda foi utilizado como base o *Acute Toxic Class Method*, Guia 423 da OECD de 2001 com adaptações (Oecd, 2001a). Esse guia permite a determinação de intervalos nos quais a letalidade é esperada com a utilização de 3 animais por etapa. As adaptações realizadas no procedimento indicado no guia foram em relação à via de administração e em relação à dose inicial utilizada. As doses foram administradas via intraperitoneal (200µL), e não oralmente, pois nos ensaios seguintes de danos ao DNA foi utilizada essa mesma via de administração. O ensaio foi iniciado com a dose de 50 mg/kg, pois apesar do guia recomendar iniciar pela dose de 300 mg/kg quando não se tem estudos com a substância utilizada não seria possível aumentar essa dose devido à solubilidade máxima do composto ser de 300 mg/kg em 200 µL.

O guia 423 recomenda que a dose deve ser administrada a 3 animais e os mesmos devem ser observados por 24 h, se ocorrer de 0 a 1 morte a dose deve ser repetida em outros 3 animais, mas se ocorrer a morte de 2 a 3 animais a dose deve ser reduzida. Portanto, o fluxograma, apresentado na Figura 26 foi seguido de acordo com o número de mortes observadas em cada etapa (Oecd, 2001a).

Figura 26 - Fluxograma do procedimento do ensaio de toxicidade aguda do guia 423 com dose inicial de 50 mg/kg.*



*Extraído de: *Acute Toxic Class Method*, Guia 423 da OECD de 2001.

4.2.5.2 Análise comportamental

Conforme recomendação do guia 423 da OECD, os animais foram observados individualmente durante os primeiros 30, 60, 120, 180 e 240 min após a administração do complexo Ru(ThySMet) e posteriormente a cada 24 h por 14 dias para identificar possíveis alterações comportamentais decorrentes de toxicidade do complexo Ru(ThySMet). As observações incluíram mudanças na pele e nos pêlos, olhos e membranas, comportamento e movimentação. Além de tremores, salivação, diarreia, letargia e sonolência.

4.2.5.3 Análise de peso

Durante o ensaio de toxicidade aguda os animais foram pesados 5 vezes para acompanhamento do peso após a administração do complexo Ru(ThySMet). A primeira pesagem ocorreu no dia da administração do complexo e as outras pesagens após 5, 8, 12 e 14 dias.

4.2.5.4 Análise macroscópica e de peso dos órgãos

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

4.2.5.5 Análise histológica do coração, fígado, rim e baço

Os órgãos coletados (coração, fígado, rim e baço) foram fixados em 10% de formalina tamponada durante 24 h e lavados em água corrente por 1 h. Em seguida, os mesmos foram submetidos a processamento histológico, no qual passaram pelas etapas de desidratação (1 h em cada um dos seguintes banhos: álcool 70%, álcool 80%, álcool 95%, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III), clarificação (1 h em cada um dos seguintes banhos: xilol I e xilol II) e impregnação (1 h em banho de parafina I e 2 h 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 5 µm. 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 pelo Prof. Dr. Edson Garcia Soares do Departamento de Patologia Legal da Universidade de São Paulo – *campus* Ribeirão Preto.

4.2.6 Ensaio para verificação de danos no DNA *in vivo*

4.2.6.1 Ensaio de cometa *in vivo*

O ensaio de cometa *in vivo* foi realizado com base no *In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay*, Guia TG 489 da OECD (Oecd, 2014a). Os animais foram divididos em grupos com 5 animais. As doses foram administradas via intraperitoneal. O ensaio foi composto de 5 grupos, sendo um grupo controle negativo que recebeu apenas o veículo, um grupo controle positivo que recebeu doxorrubicina (20 mg/kg) diluída em água e 3 grupos de tratamento que receberam 12,5; 25 ou 50 mg/kg do complexo Ru(ThySMet). Os grupos receberam 3 doses do tratamento com intervalo de 24 h entre elas. No terceiro dia após 4 h da aplicação foi realizada a eutanásia para evitar que os danos iniciais no DNA fossem reparados. Então, cerca de 20 µL de sangue foram coletados dos camundongos a partir da veia caudal e foram adicionados a microtubos com agarose LMP. A partir daí os procedimentos foram os mesmos descritos no capítulo 2 desta tese - 2.2.6.1 Ensaio do cometa *in vitro*.

4.2.7 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.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os resultados promissores obtidos com ensaios *in vitro* com cultura de células 2D e 3D tornou-se muito importante a análise *in vivo* do complexo Ru(ThySMet). Os resultados apresentados neste capítulo também foram publicados no *Journal of Inorganic Biochemistry*, volume 186, em 2018, com o título: “The *trans*-[Ru(PPh₃)₂(N,N-dimethyl-N’-

thiophenylthioureato- k_2O,S)(bipy)]PF₆ complex has pro-apoptotic effects on triple negative breast cancer cells and presents low toxicity *in vivo*".

4.3.1 Ensaio de toxicidade

Para realização do ensaio de toxicidade *in vivo* aguda foi utilizado como base o fluxograma fornecido pelo guia 423 da OECD. A dose inicial aplicada via intraperitoneal a 3 animais foi a de 50 mg/kg. Como não ocorreram mortes em 24 h essa mesma dose foi aplicada a outros 3 animais e novamente o resultado foi confirmado com a ausência de mortes. Então, como recomendado pelo guia, a dose foi aumentada para 300 mg/kg para verificar se também nessa dose não existiria sinais de toxicidade ou morte. Como não existiu mortes em 24 h essa dose foi aplicada em mais 3 outros animais e novamente o resultado foi confirmado com a ausência de mortes. Apesar do guia recomendar aumentar a dose para 2000 mg/kg ela não foi aumentada devido à dificuldade de diluição do complexo Ru(ThySMet) em quantidade ideal (200 µL) para aplicação nos animais. Portanto, os resultados demonstram que as doses de 50 e 300 mg/kg não apresentam toxicidade aguda aos animais, porém não foi possível estimar a exata faixa da dose letal que mata 50% dos animais de um grupo (DL₅₀).

O comportamento dos animais foi observado pelo período de 14 dias. Não surgiram alterações comportamentais, de movimentação ou alterações de pele, nos pêlos, olhos e membranas. Os animais também não apresentaram tremores, salivação, diarreia, letargia ou sonolência. Eles exibiram durante todo o período de observação comportamento normal característico da espécie. O peso dos animais foi acompanhado desde o dia da aplicação do complexo até 14 dias depois. Os resultados demonstraram que o complexo Ru(ThySMet) nas doses administradas via intraperitoneal (50 e 300 mg/kg) não alterou significativamente o peso inicial em comparação ao final dos animais em relação ao grupo controle (tratados apenas com o veículo), conforme pode ser observado na Figura 27A.

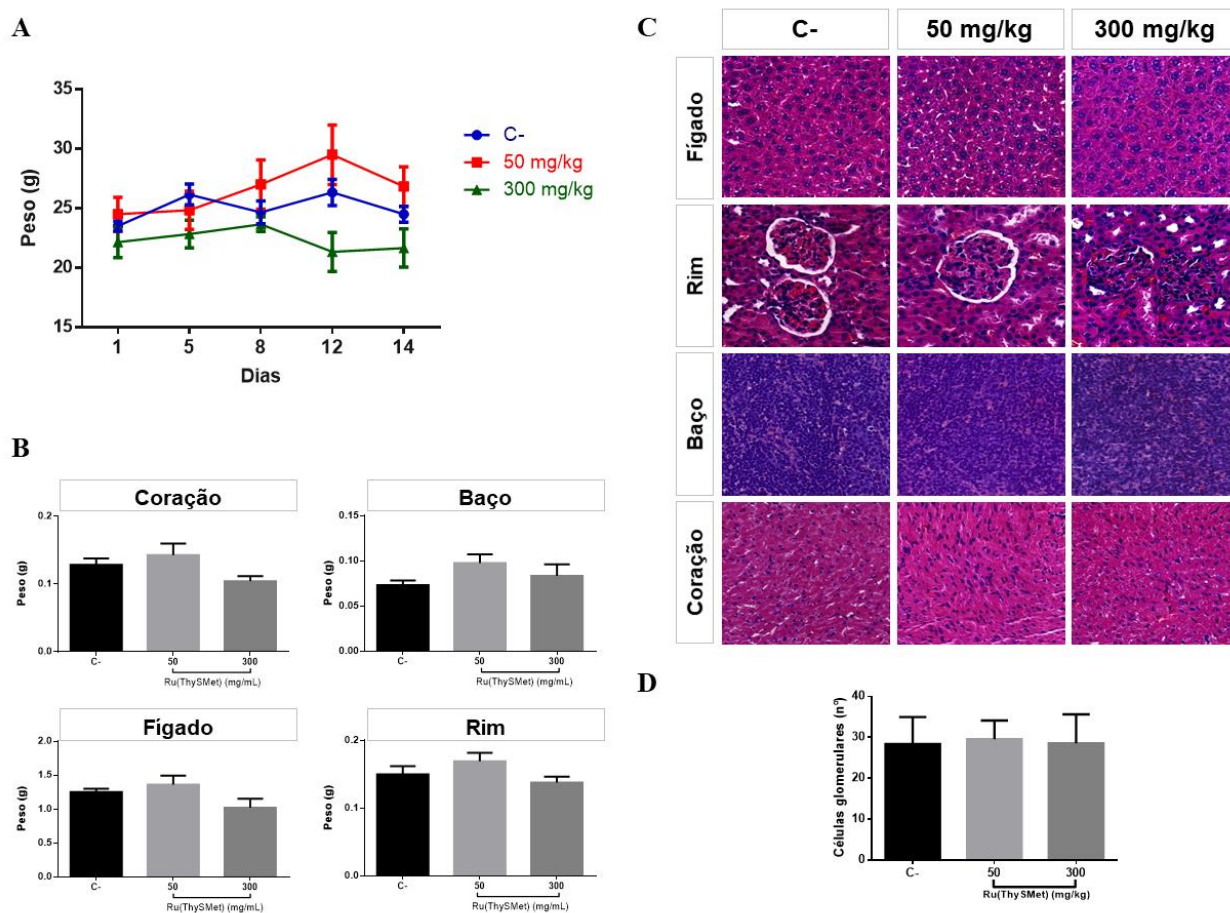
Todos os animais tiveram baço, rim, fígado e coração coletados, analisados macroscopicamente e pesados. A análise macroscópica dos órgãos não identificou diferenças de aspecto e cor entre os órgãos do grupo controle (tratados apenas com o veículo) e dos grupos tratados com o complexo Ru(ThySMet) (50 e 300 mg/kg). O peso dos órgãos do grupo controle e dos grupos tratados com o complexo Ru(ThySMet) também não apresentou diferença estatística, como apresentado na Figura 27B. Lâminas histológicas destes órgãos foram preparadas e analisadas. As análises demonstraram que não foram encontradas alterações morfológicas ou patológicas nos baços, fígados e corações analisados. Os rins não mostraram

sinais de inflamação ou degeneração, no entanto, na dose mais elevada (300 mg/kg), a diminuição do espaço dos glomérulos de Bowman foi percebida (Figura 27C). Para verificar se houve uma alteração na proliferação de células glomerulares, 40 glomérulos em cada grupo foram contados em campos aleatórios. Esta análise demonstrou que não foram encontradas alterações significativas no número destas células entre animais tratados e controles (Figura 27D). Portanto, os resultados confirmam que o complexo Ru(ThySMet) não causou toxicidade aos órgãos.

Na literatura foram encontrados outros estudos sobre a toxicidade de complexos de rutênio. Em um trabalho onde a toxicidade do complexo de rutênio $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{L})\text{Cl}]\text{Cl}$ (L = 1-(2-(2-(3-chlorobenzylidene)hydrazinyl)-4-methylthiazol-5-yl)ethanone) foi testada *in vivo* em fêmeas de ratos *Wistar*, com base no guia 423 da OECD, as doses (50, 300 e 2000 mg/kg) foram administradas oralmente em um grupo e via intraperitoneal em outro e os animais observados por 14 dias. Os resultados demonstraram que o complexo testado oralmente apresentou DL_{50} maior que 2000 mg/kg e que não existiram alterações comportamentais, hematológicas, histopatológicas e de peso nos animais no período de observação. Já os resultados para o teste com o complexo administrado via intraperitoneal demonstraram que não existiram alterações hematológicas e de peso, porém o valor de DL_{50} ficou entre 300 e 2000 mg/kg e existiram alterações histopatológicas, uma linfocitose moderada no baço, no grupo que recebeu a dose de 2000 mg/kg (Grozav *et al.*, 2016).

Em outro estudo, seis complexos de rutênio, SCAR 1, 2, 4, 5, 6 e 7, foram avaliados em relação à toxicidade aguda oral em fêmeas de camundongos C57BL/6. De acordo com os pesquisadores, o ensaio foi realizado com base em um guia da OECD de 2001. A concentração inicial utilizada foi a de 2000 mg/kg e quando esta causava morte em mais de 50% do grupo de 6 animais outra dose menor era administrada (1000 e 500 mg/kg). Os resultados demonstraram que apenas o SCAR 1 e 4 possuem baixa toxicidade nas doses testadas (2000, 1000 e 500 mg/kg) (Pavan *et al.*, 2013).

Figura 27 – Efeitos do complexo Ru(ThySMet) *in vivo* após o tratamento agudo com 50 ou 300 mg/kg do complexo. (A) Peso dos animais pelo período de 14 dias. (B) Peso dos órgãos dos animais. (C) Análise histológica dos órgãos dos animais corados com HE (D) Análise glomerular. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-).



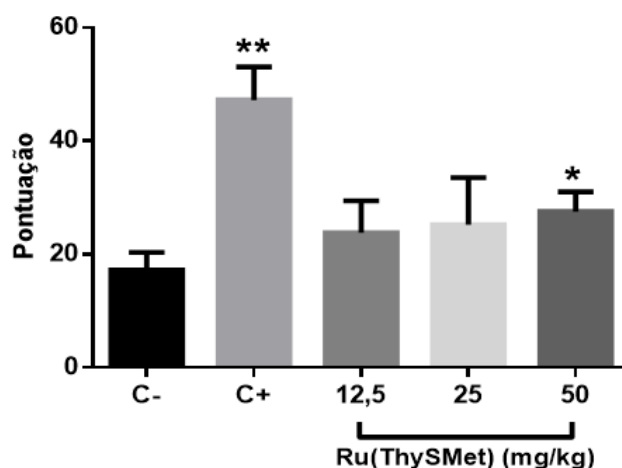
4.3.2 Ensaio para verificação de danos no DNA

O efeito *in vivo* do complexo Ru(ThySMet) sobre a indução inicial de quebras de DNA de camundongos foi analisado através do ensaio de cometa. Os resultados demonstram que apenas o grupo de animais tratados com a maior dose do complexo Ru(ThySMet) (50 mg/kg) e os animais tratados com o controle positivo, a doxorubicina (20 mg/kg), apresentaram diferença estatística em relação ao grupo de animais controle, tratados apenas com o veículo (Figura 28). Portanto, esses resultados demonstram que o complexo Ru(ThySMet) é capaz de causar danos iniciais apenas com uma dose elevada (50 mg/kg). A doxorubicina é comumente usada como controle positivo para ensaios cometa, porque é reconhecida por causar danos ao DNA (Terrazas *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2015; Leffa *et al.*, 2016). É importante destacar que, embora o dano ao DNA significativo tenha sido observado na dose mais alta, o dano ao

DNA nas células (nucleoides) foi predominantemente menor (classe 1 - dados não apresentados), com apenas algumas células mostrando uma grande quantidade de dano (classes 2 e 3).

Outro estudo avaliou o potencial genotóxico do complexo, *ct*-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF₆, *in vivo* através do ensaio do cometa. Foi avaliado o potencial desse complexo em hepatócitos de camundongos *swiss* tratados via intraperitoneal por 24 h com as doses de 5; 2,5; 1,25 e 0,625 mg/kg. Os resultados demonstraram que apenas a maior dose utilizada apresentou efeito genotóxico (Souza, 2014).

Figura 28 - Efeitos genotóxicos do complexo Ru(ThySMet) *in vivo* após tratamento com 12,5; 25 e 50 mg/kg do complexo. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo (C+). Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (sem tratamento) (* p≤0,05, ** p≤0,01).



Esses resultados demonstram que os complexos de rutênio devem ser melhores investigados *in vivo*, já que alguns possuem potencial para tratamentos do câncer, apresentando menor toxicidade e potencial mutagênico em relação aos tratamentos existentes. Um limitante encontrado para a realização de testes adicionais *in vivo* foi a baixa solubilidade do complexo, portanto para continuar avaliando este complexo o uso da nanotecnologia foi empregado e os resultados estão apresentados no próximo capítulo (capítulo 5).

5.1 A NANOTECNOLOGIA E SUAS APLICAÇÕES NO TRATAMENTO DE DOENÇAS

Muitos fármacos com potencial para o tratamento de diferentes doenças, entre elas o câncer, apresentam limitações durante os testes para seu desenvolvimento por apresentarem baixa solubilidade em soluções aquosas e alta lipofilicidade. O uso da nanotecnologia tem potencial para a criação de novos tratamentos e aparece como uma alternativa para o uso de complexos metálicos *in vivo* (Narvekar *et al.*, 2014).

Os nanossistemas devem ser capazes de superar as barreiras que são encontradas nos tratamentos existentes, entre estas barreiras estão a capacidade de direcionar o fármaco ao alvo e também a capacidade de manter o fármaco mais estável no organismo (Sato *et al.*, 2015; Da Silva *et al.*, 2016). Além disso, estudos demonstram que o uso da nanotecnologia pode melhorar os efeitos de novos compostos, tornando-os mais ativos (Sato *et al.*, 2015).

Existem diferentes sistemas envolvendo a nanotecnologia para a formulação de novos medicamentos, como as nanopartículas poliméricas, sistemas de cristal líquido e as microemulsões (ME) (Bonifacio *et al.*, 2014). Estas últimas, as ME, são definidas como um sistema de água e óleo contendo um tensoativo, gerando uma solução líquida termodinamicamente estável. As ME apresentam algumas vantagens em relação a outros tipos de sistemas, entre essas vantagens destacam-se a alta estabilidade, administração por diferentes vias e o baixo custo para preparação (Lawrence e Rees, 2000; Sato *et al.*, 2015). Outra importante vantagem das ME é que elas podem fazer com que o tempo de liberação dos fármacos envolvidos por elas seja diferente em relação aos fármacos livres e isso pode conferir características interessantes, pois a liberação lenta de um fármaco pode garantir um efeito mais prolongado e menos tóxico (Dalmora *et al.*, 2001).

O sistema lipídico nanoestruturado é capaz de melhorar a solubilidade e conseqüentemente melhorar a atividade e biodisponibilidade de um composto a ser administrado *in vivo* (De Freitas *et al.*, 2014). Ainda, o uso da nanotecnologia pode ajudar também na melhor distribuição e na entrega de um fármaco de uma maneira mais específica ao alvo (Farokhzad e Langer, 2009).

Existem diferentes desafios que precisam ser superados no campo da nanotecnologia e medicamentos, especialmente na entrega do fármaco dentro de um organismo, entre eles a

capacidade de ter sistemas com múltiplas funções para atender diferentes requisitos terapêuticos, aumentar a eficiência das nanopartículas para os seus alvos e atender a padrões de qualidade internacionais (Bonifacio *et al.*, 2014).

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Síntese do sistema lipídico nanoestruturado do tipo microemulsão (ME) do complexo Ru(ThySMet)

O sistema lipídico nanoestruturado do tipo microemulsão (ME) do complexo Ru(ThySMet), abreviado de complexo Ru(ThySMet)_{ME}, foi sintetizado e caracterizado pelo Laboratório do Prof. Dr. Marlus Chorilli da UNESP, *campus* Araraquara, sob responsabilidade da aluna de pós-doutorado Dr. Patrícia B. Silva e da aluna de iniciação científica Ana Carolina Lopes, como descrito anteriormente (De Freitas *et al.*, 2014). Brevemente, 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 min com um intervalo de 30 segundos a cada min, 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 min. Então, após 24 h 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.

5.2.2 Linhagens celulares

As células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 e as células não tumorais de mama da linhagem MCF-10A foram cultivadas como previamente descrito (item 2.2.2 Linhagens celulares).

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). Os fibroblastos de camundongo da linhagem Balb/C 3T3 clone A31 foram cultivadas em meio DMEM como descrito no item 2.2.2 Linhagens celulares.

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. E as células Balb/C 3T3 clone A31 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Andrei Leitão da USP, *campus* São Carlos.

5.2.3 Ensaios *in vitro* de citotoxicidade, migração e apoptose em 2D

Para os ensaios em 2D de viabilidade celular – método do MTT, morfologia celular e formação de colônias; para o ensaio de migração celular – método *wound healing*; e para o ensaio de apoptose por citometria de fluxo, os mesmos métodos descritos no capítulo 2, com pequenas modificações, foram utilizados para possibilitar comparações. As modificações foram que o tratamento das células neste capítulo foi realizado com o complexo Ru(ThySMet)_{ME}, que nos ensaios de formação de colônias e apoptose o tempo de incubação foi de 24 h e que no ensaio de formação de colônias as concentrações utilizadas foram maiores (2, 4 e 8 µM).

5.2.4 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.

5. 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

5.3.1 Ensaios *in vitro* de citotoxicidade, migração e apoptose em 2D

A citotoxicidade do complexo Ru(ThySMet)_{ME} em diferentes tipos de células da mama em 2D foi avaliada pelo método do MTT. Neste ensaio, além das linhagens humanas de mama, MDA-MB-231 e MCF-10A, outras duas linhagens de camundongos, 4T1.13ch5T1 e Balb/C 3T3 clone A31, foram utilizadas para complementar a análise do complexo Ru(ThySMet) e do Ru(ThySMet)_{ME} (Tabela 4). Para permitir comparações os valores de IC₅₀ do complexo Ru(ThySMet) com as células MDA-MB-231 e MCF-10A foram reapresentados neste capítulo.

Os resultados demonstraram que as células que receberam o tratamento de 24 h com o complexo Ru(ThySMet)_{ME} aumentaram o IC₅₀ em relação às células que receberam o tratamento com o complexo Ru(ThySMet), porém o índice de seletividade permaneceu bastante próximo tanto nas células humanas (1,68 e 1,60) quanto nas de camundongos (0,87 e 0,72). Contudo, para continuar a análise o tempo de incubação com os complexos foi aumentado, e os resultados com 48 h de incubação demonstraram que os índices de seletividade aumentaram bastante nas células das duas espécies demonstrando que o complexo Ru(ThySMet)_{ME} necessita de um tempo maior para apresentar seus efeitos nas células. Ainda, com a incubação de 48 h o complexo Ru(ThySMet)_{ME} apresentou maior índice de seletividade tanto nas células humanas (7,41) quanto nas de camundongos (1,46) em comparação com índice de seletividade com a incubação de 24 h, que foram 1,40 e 0,72 nas células humanas e de camundongos, respectivamente. Adicionalmente foram apresentados os resultados de ensaios com 48 h 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(ThySMet) 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(ThySMet) demonstrando assim que o efeito citotóxico encontrado vem da combinação.

No ensaio de morfologia celular foi possível observar que o tratamento de 24 h com 12,5 µM do complexo Ru(ThySMet)_{ME} promoveu mudanças em todas as células analisadas, especialmente nas células tumorais. É possível observar nas células MDA-MB-231 e 4T1.13ch5T1 a diminuição da densidade celular e a aquisição do formato circular. Já nas células não tumorais é possível observar apenas redução da densidade celular. No entanto, no tempo de 48 h foi possível observar mudanças mais severas nas células tumorais, MDA-MB-231 e 4T1.13ch5T1, em comparação com as células não tumorais, MCF-10A e Balb/C 3T3 clone

A31, sendo possível notar que nas células não tumorais houve um aumento da densidade celular de 24 h para 48 h de tratamento, demonstrando que o tratamento não impediu a proliferação destas (Figura 29).

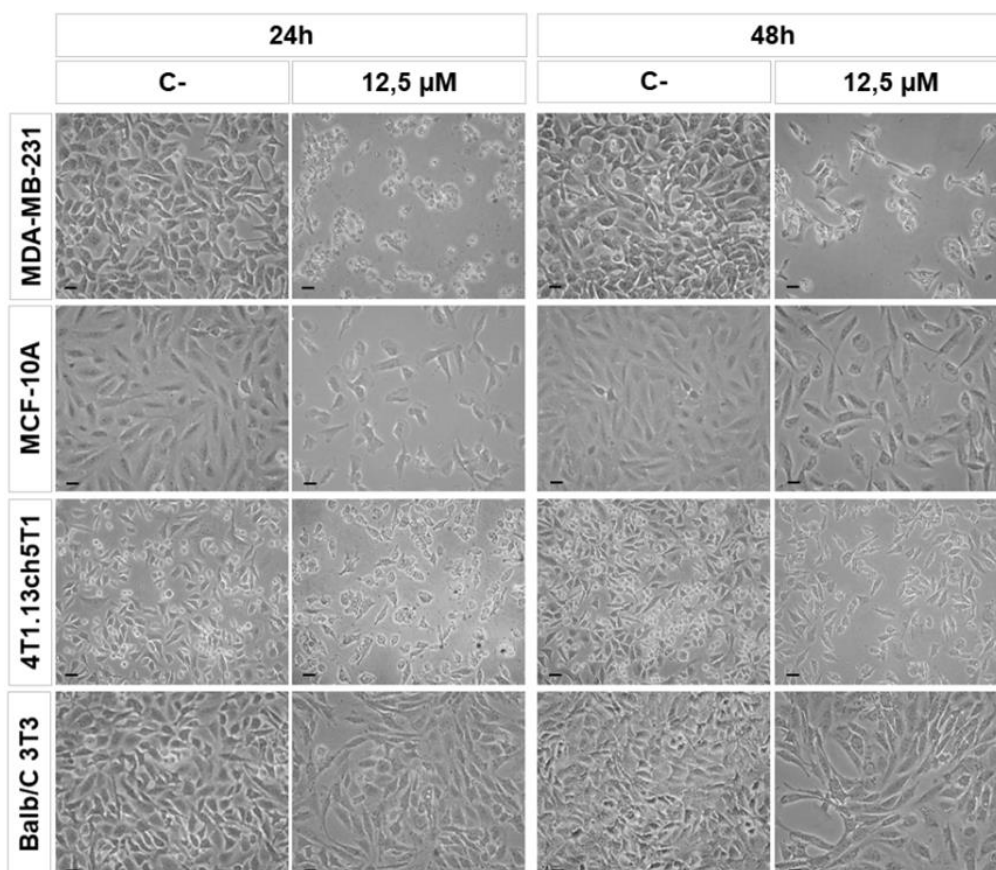
A incorporação de complexos metálicos em sistemas lipídicos nanoestruturados vem sendo avaliada em diferentes estudos. Autores demonstraram que complexos de cobre II tiveram sua atividade antibacteriana aumentada quando nanoestruturados (Silva *et al.*, 2015). Outro estudo demonstrou que os complexos de rutênio, SCAR1 ([Ru(pic)(dppb)(bipy)]PF₆), SCAR2 ([Ru(pic)(dppb)(Me-bipy)]PF₆) e SCAR4 ([Ru(pic)(dppb)(phen)]PF₆) após serem nanoestruturados em sistemas lipídicos tiveram sua atividade contra *M. tuberculosis* mantida e diminuíram a toxicidade, o que é interessante para novos tratamentos contra tuberculose (De Freitas *et al.*, 2014).

Pouco ainda foi apresentado sobre os complexos metálicos em sistemas lipídicos nanoestruturados no tratamento do câncer. Um estudo utilizou uma formulação de nanopartículas lipídicas de tripalmitina juntamente com o medicamento já bastante utilizado paclitaxel e demonstrou que a atividade antitumoral foi aumentada contra as células tumorais de mama das linhagens MCF-7, MDA-MB-231, SKBR3 e T47D, sendo que o IC₅₀ chegou a ser diminuído cerca de 40 vezes na linhagem T47D, além de se apresentar mais específico para células tumorais em relação a linhagem não tumoral MCF-10A. Esta formulação também foi capaz de aumentar a atividade antitumoral em algumas linhagens de câncer de pulmão também em cultura de células em 2D. Em cultura de células em 3D, essa nova formulação foi capaz de diminuir o tamanho dos esferoides e induzir a apoptose (Leiva *et al.*, 2017).

Tabela 4 - Atividade citotóxica do complexo Ru(ThySMet) e Ru(ThySMet)_{ME} em 2D. IC₅₀ (μM) do complexo Ru(ThySMet) e Ru(ThySMet)_{ME} nas células MDA-MB-231, MCF-10A, 4T1.13ch5T1 e Balb/C 3T3 clone A31 após 24 h de incubação. DP = Desvio padrão. ^aIS = Índice de seletividade dos complexos. * Resultados apresentados anteriormente no capítulo 2. [#]Resultados fornecidos pela Dra. Angelica E. Graminha.

		IC ₅₀ (μM) ± DP					
		MDA-MB-231	MCF-10A	^a IS	4T1.13ch5T1	Balb/C 3T3	^a IS
Ru(ThySMet)	<u>24h</u>	8,81 ± 0,81*	14,82 ± 2,50*	1,68*	6,13 ± 0,46	5,35 ± 0,34	0,87
Ru(ThySMet)	<u>48h</u>	6,19 ± 0,29	12,35 ± 1,31	1,99	3,08 ± 0,19	5,32 ± 0,79	0,86
Ru(ThySMet)_{ME}	<u>24h</u>	10,65 ± 2,28	17,05 ± 3,32	1,60	18,62 ± 2,93	13,53 ± 3,67	0,72
Ru(ThySMet)_{ME}	<u>48h</u>	3,36 ± 0,42	24,90 ± 0,95	7,41	8,17 ± 2,36	12,00 ± 1,22	1,46
Base_{ME}[#]	<u>48h</u>	27,95 ± 1,44 [#]	48,62 ± 1,28 [#]	1,73	69,72 ± 3,83 [#]	62,55 ± 4,15 [#]	0,94

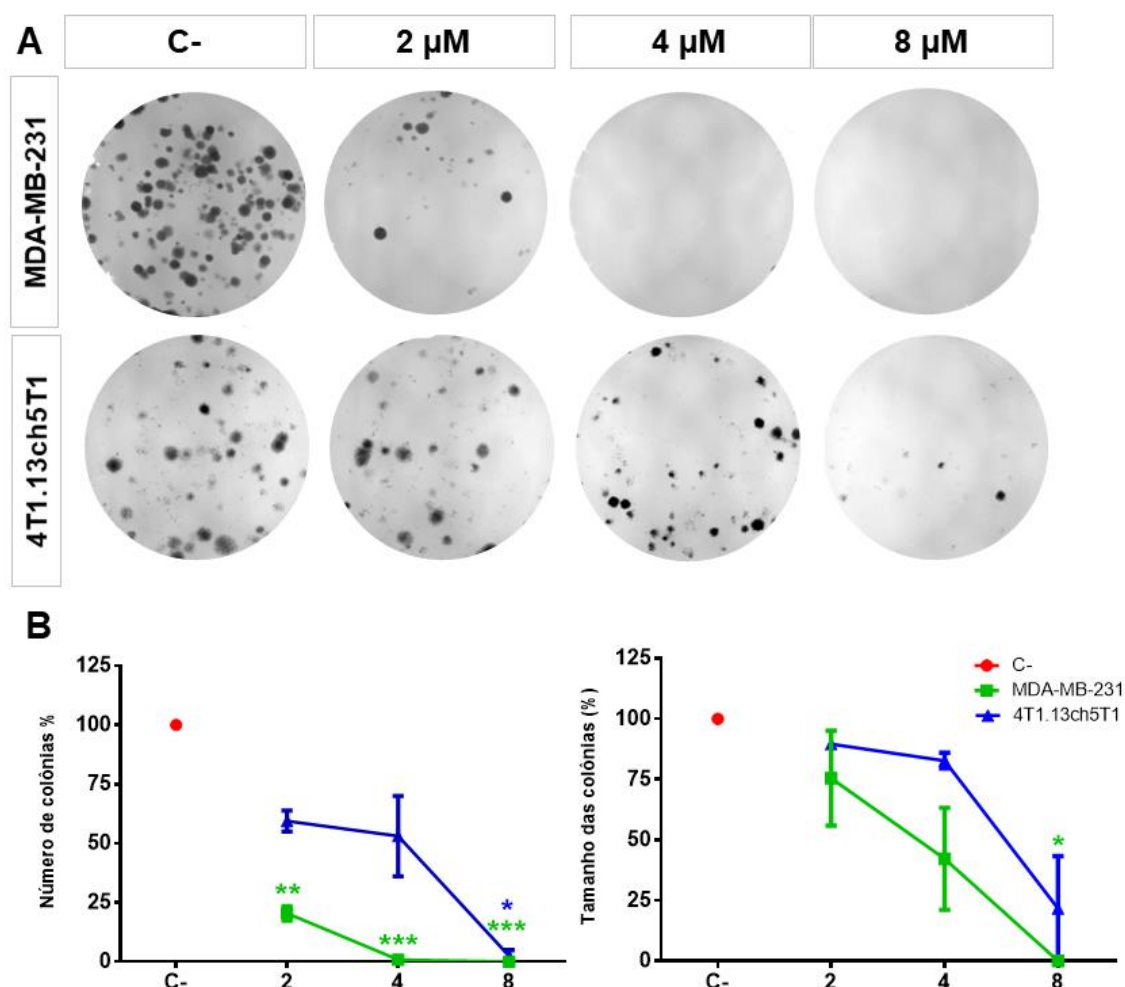
Figura 29 - Efeito do complexo Ru(ThySMet)_{ME} (12,5 μM) na morfologia das células MDA-MB-231, MCF-10A, 4T1.13ch5T1 e Balb/C 3T3 clone A31 após 24 e 48 h de incubação. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. As figuras foram retiradas no aumento de 10 ×. Barras de escala: 40 μm.



No ensaio de formação de colônias o complexo Ru(ThySMet)_{ME} foi capaz de inibir significativamente o número de colônias das células tumorais da linhagem MDA-MB-231 e 4T1.13ch5T1 na maior concentração (8 μM) (Figura 30), demonstrando efeito citotóxico.

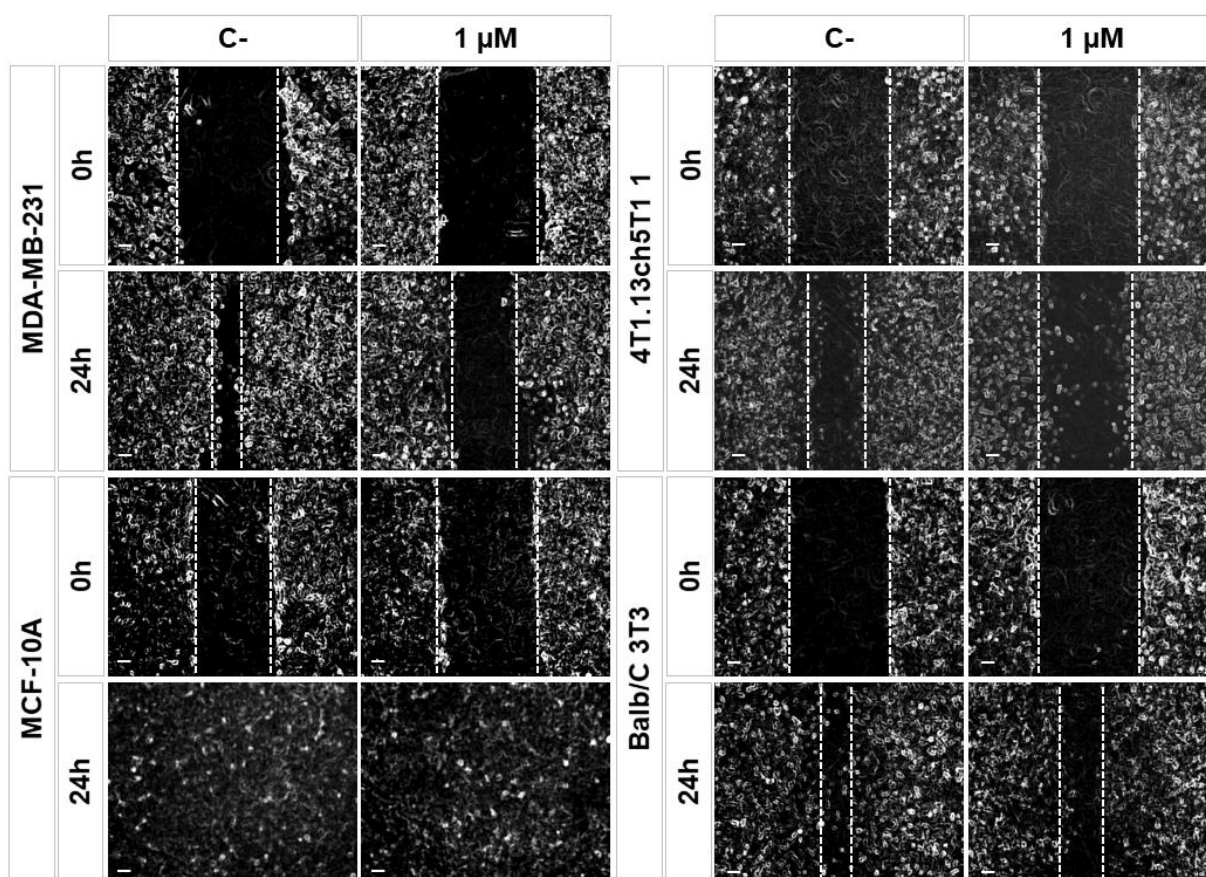
Houve também uma diminuição significativa no tamanho nas células MDA-MB-231 na maior concentração, demonstrando também efeito citostático nestas células. É interessante destacar que no tempo de incubação de 24 h o complexo teve maior efeito nas células humanas quando comparado as células de camundongos. Ainda, ao comparar estes resultados das células MDA-MB-231 com os anteriores resultados do ensaio de formação de colônias com o complexo Ru(ThySMet) do capítulo 2, é possível observar que maiores concentrações do complexo Ru(ThySMet)_{ME} e maior tempo de incubação precisaram ser utilizados para atingir o mesmo efeito do complexo Ru(ThySMet), possivelmente devido a um maior tempo necessário para a liberação do complexo do sistema lipídico nanoestruturado após sua internalização pelas células.

Figura 30 – Efeito do complexo Ru(ThySMet)_{ME} na formação de colônias de células tumorais de mama, MDA-MB-231 e 4T1.13ch5T1. (A) Imagens do ensaio clonogênico de células MDA-MB-231 e 4T1.13ch5T1 tratadas com diferentes concentrações (2, 4 ou 8 μ M) do complexo Ru(ThySMet)_{ME} durante 24 h. (C) Quantificação do número e tamanho das colônias. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (não tratado). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$).



Para continuar investigando os efeitos do complexo Ru(ThySMet)_{ME} o ensaio de *wound healing* foi realizado (Figura 31). Os resultados demonstraram que o complexo foi mais eficiente para inibir a migração das células MDA-MB-231 e 4T1.13ch5T1 em comparação com a migração de células MCF-10A e Balb/C 3T3 clone A31 (quadrados brancos) após 24 h de incubação na concentração de 1 µM, sendo capaz de fechar completamente a risca na linhagem MCF-10A. Estes resultados foram bastante semelhantes aos resultados com o complexo Ru(ThySMet), apresentados no capítulo 2.

Figura 31 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet)_{ME} na migração celular, ensaio de *Wound Healing*, de células MDA-MB-231, MCF-10A, 4T1.13ch5T1 e Balb/C 3T3 clone A31 com 0 e 24 h de tratamento com 1 µM do complexo Ru(ThySMet)_{ME}. Os ensaios foram realizados em triplicata. As imagens correspondem a uma das triplicatas. Barras de escala: 40 µm.

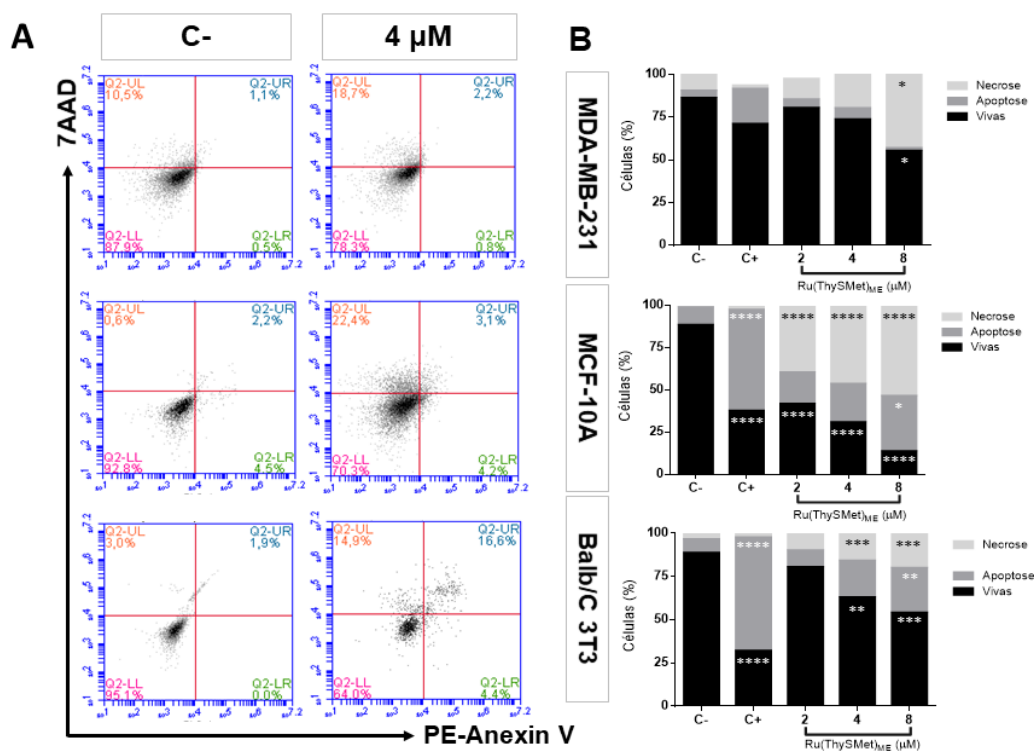


Um dos objetivos da quimioterapia é induzir a morte de células tumorais por apoptose, em vez de necrose, que é um processo que desencadeia uma resposta inflamatória causando o derramamento de constituintes citosólicos no espaço intercelular através da membrana plasmática danificada (Chaabane *et al.*, 2013). Para avaliar se o complexo Ru(ThySMet)_{ME} também induz a apoptose foi utilizado o *kit* PE Annexin V Apoptosis Detection (BD

Biosciences) (Figura 32). Os resultados demonstram que o complexo Ru(ThySMet)_{ME} não induz a apoptose das células MDA-MB-231 nas concentrações testadas, porém induz a necrose significativamente na maior concentração testada. Já nas células não tumorais das linhagens MCF-10A e Balb/C 3T3 clone A31, o complexo Ru(ThySMet)_{ME} induziu a apoptose na maior concentração (8 μ M), porém é capaz de induzir também a necrose significativamente nas menores concentrações.

Estes resultados são diferentes em relação aos resultados com o complexo Ru(ThySMet), conforme apresentado no capítulo 2, que induz a apoptose tanto das células tumorais, quanto das não tumorais, porém sendo mais eficaz para as células tumorais. Portanto, é possível concluir que o complexo Ru(ThySMet) tem seu mecanismo de ação alterado depois de ter sido sintetizado em sistema nanoestruturado do tipo microemulsão. Portanto, fica clara necessidade da utilização de um outro tipo de tecnologia para nanoencapsular o complexo devido a alteração de seu mecanismo de ação.

Figura 32 - Efeitos do complexo Ru(ThySMet)_{ME} na apoptose de células MDA-MB-231, MCF-10A e Balb/C 3T3 clone A31. **(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 após 24 h de tratamento com 2, 4 ou 8 μ M do complexo. Os ensaios foram realizados em triplicata. Imagens correspondem a uma das triplicatas. A camptotecina foi utilizada como controle positivo (C +). Os resultados foram comparados com o controle negativo (C-) (sem tratamento) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).



6.1 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Três complexos *trans*-[Ru(PPh₃)₂(acylthioureato-k²O,S)(bipy)]PF₆ foram sintetizados e tiveram sua atividade citotóxica avaliada em células de mama tumorais da linhagem MDA-MB-231 e não tumorais da linhagem MCF-10A. Verificou-se que o complexo *trans*-[Ru(PPh₃)₂(*N,N*-dimethyl-*N'*-thiophenylthioureato-k²O,S)(bipy)]PF₆, o Ru(ThySMet), foi o mais ativo contra as células de CMTN MDA-MB-231 entre os três complexos após 24 h de incubação. O complexo Ru(ThySMet) em ensaios *in vitro* em 2D induziu citotoxicidade, inibiu migração, invasão, adesão, ainda alterou a morfologia e induziu a apoptose, danos ao DNA e a fragmentação nuclear de células tumorais MDA-MB-231 em concentrações mais baixas em comparação com células não tumorais MCF-10A, sugerindo ação seletiva deste complexo para células tumorais.

Além dos importantes resultados encontrados utilizando os ensaios *in vitro* em 2D, o complexo Ru(ThySMet) também apresentou resultados bastante interessantes em ensaios *in vitro* em 3D. O complexo apresentou citotoxicidade maior para as células tumorais, MDA-MB-231 e T4-2, em relação as não tumorais de mama, MCF-10A e S1, após 24 h de incubação, com aumento do IS, induziu a apoptose em diferentes modelos de cultura, inclusive quando as células foram cultivadas em dispositivos com microcanais acrílicos, e também induziu danos ao DNA. Ainda, o complexo reverteu o fenótipo maligno das células de mama tumorais da linhagem T4-2 devido a supressão de proteínas relacionadas a esse processo, como EGFR, p50 NFκB e integrina β1. *In vivo*, o complexo Ru(ThySMet) não induziu toxicidade e causou dano ao DNA apenas na dose mais alta administrada.

A análise do complexo Ru(ThySMet) sintetizado em sistema nanoestruturado do tipo microemulsão, Ru(ThySMet)_{ME}, demonstrou que com 48 h de incubação houve um aumento da seletividade deste novo complexo e também que os efeitos na morfologia e migração celular foram mais seletivos para células tumorais, porém seu mecanismo de ação foi parcialmente alterado levando as células a sofrerem necrose ao invés de apoptose.

Os resultados indicam que o complexo Ru(ThySMet) tem potencial na terapia do câncer de mama com base em seus efeitos citotóxicos e de indução de apoptose *in vitro* e também na sua baixa toxicidade e genotoxicidade *in vivo*. Tomados em conjunto os resultados obtidos neste trabalho indicam que mais estudos precisam ser realizados para demonstrar seus efeitos *in vivo* no tratamento do câncer de mama através de modelos animais.

REFERÊNCIAS

AACR. American Association for Cancer Research. Cancer Progress Report. 2018.

ABRAMSON, V. G. et al. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. **Cancer**, v. 121, n. 1, p. 8-16, Jan 01 2015. ISSN 1097-0142 (Electronic) 0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043972> >.

ACS. American Cancer Society. Cancer Treatment & Survivorship. Facts & Figures. 2016/17. Disponível em: < <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/cancer-treatment-and-survivorship-facts-and-figures/cancer-treatment-and-survivorship-facts-and-figures-2016-2017.pdf> >.

_____. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018. **Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2017.**, 2017/2018.

ADAMS, M. et al. The synthesis and antiparasitic activity of aryl- and ferrocenyl-derived thiosemicarbazone ruthenium(II)-arene complexes. **Dalton Trans**, v. 42, n. 13, p. 4677-85, Apr 7 2013. ISSN 1477-9234 (Electronic) 1477-9226 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23361649> >.

ADJEI, I. M.; BLANKA, S. Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: a biomaterials approach. **J Funct Biomater**, v. 6, n. 1, p. 81-103, Feb 17 2015. ISSN 2079-4983 (Print) 2079-4983 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25695337> >.

ALESSIO, E.; MESSORI, L. The Deceptively Similar Ruthenium(III) Drug Candidates KP1019 and NAMI-A Have Different Actions. What Did We Learn in the Past 30 Years? **Met Ions Life Sci**, v. 18, Feb 5 2018. ISSN 1559-0836 (Print) 1559-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29394024> >.

ALLARDYCE, C. S. D., P. J. Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects. **Platinum Metals Review**, v. 45, n. 2, p. 62-69, 2001.

ANTONARAKIS, E. S.; EMADI, A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 66, n. 1, p. 1-9, May 2010. ISSN 1432-0843 (Electronic) 0344-5704 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20213076> >.

ANTONI, D. et al. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 3, p. 5517-27, Mar 11 2015. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25768338> >.

ARALDI, R. P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomed Pharmacother**, v. 72, p. 74-82, May 2015. ISSN 1950-6007 (Electronic) 0753-3322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26054678> >.

ARTYM, V. V.; MATSUMOTO, K. Imaging cells in three-dimensional collagen matrix. **Curr Protoc Cell Biol**, v. Chapter 10, p. Unit 10 18 1-20, Sep 2010. ISSN 1934-2616 (Electronic) 1934-2616 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20853341> >.

AZQUETA, A. et al. The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. **Mutagenesis**, v. 26, n. 3, p. 393-9, May 2011. ISSN 1464-3804 (Electronic) 0267-8357 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21227901> >.

BARBOSA, M. I. et al. Antiparasitic activities of novel ruthenium/lapachol complexes. **J Inorg Biochem**, v. 136, p. 33-9, Jul 2014. ISSN 1873-3344 (Electronic) 0162-0134 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24727183> >.

BAROLLI, J. P. et al. Polypyridyl Ruthenium Complexes: Novel DNA-Intercalating Agents against Human Breast Tumor. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 10, p. 1879-1889, 2017.

BARRY, N. P.; SADLER, P. J. Exploration of the medical periodic table: towards new targets. **Chem Commun (Camb)**, v. 49, n. 45, p. 5106-31, Jun 7 2013. ISSN 1364-548X (Electronic) 1359-7345 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23636600> >.

BAUST, J. M. et al. Best practices in cell culture: an overview. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 53, n. 8, p. 669-672, Sep 2017. ISSN 1543-706X (Electronic) 1071-2690 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28808859> >.

BAZZOUN, D.; LELIEVRE, S.; TALHOUK, R. Polarity proteins as regulators of cell junction complexes: implications for breast cancer. **Pharmacol Ther**, v. 138, n. 3, p. 418-27, Jun 2013. ISSN 1879-016X (Electronic) 0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23458609> >.

BECCENERI, A. B. 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**, v. 186, p. 70-84, Sep 2018. ISSN 1873-3344 (Electronic) 0162-0134 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29857173> >.

BENTON, G. et al. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 79-80, p. 3-18, Dec 15 2014. ISSN 1872-8294 (Electronic) 0169-409X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24997339> >.

BIANCHINI, G. et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 13, n. 11, p. 674-690, Nov 2016. ISSN 1759-4782 (Electronic) 1759-4774 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27184417> >.

BIOLABS, C. 2D vs 3D., 2019. Disponível em: < <https://www.creative-biolabs.com/adc/2d-vs-3d.htm> >.

BISSELL, M. J.; KENNY, P. A.; RADISKY, D. C. Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 70, p. 343-56, 2005. ISSN 0091-7451 (Print) 0091-7451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16869771> >.

BONIFACIO, B. V. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014. ISSN 1178-2013 (Electronic) 1176-9114 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24363556> >.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 12, p. 786-801, Dec 2014. ISSN 1471-0080 (Electronic) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25415508> >.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity--prospects for tiered testing strategies. **Toxicol In Vitro**, v. 18, n. 2, p. 227-30, Apr 2004. ISSN 0887-2333 (Print) 0887-2333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757114> >.

BOUTONNAT, J. et al. Optimized fluorescent probe combinations for evaluation of proliferation and necrosis in anthracycline-treated leukaemic cell lines. **Cell Prolif**, v. 32, n. 4, p. 203-13, Aug 1999. ISSN 0960-7722 (Print) 0960-7722 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10614710> >.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. n. 2, 2013.

_____. Instituto Nacional de Câncer José Gomes Alencar da Silva. Estimativas 2018. Incidência do Câncer., 2018. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/index.asp> >.

_____. Instituto Nacional de Câncer José Gomes Alencar da Silva. Ministério da Saúde. Câncer de Mama., 2019a.

_____. Instituto Nacional de Câncer José Gomes Alencar da Silva. Ministério da Saúde. Câncer., 2019b.

_____. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Ministério da Saúde. Tratamento do Câncer. . 2019c. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/tratamento> >.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov 2018. ISSN 1542-4863 (Electronic) 0007-9235 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593> >.

BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 18, n. 5-6, p. 240-9, Mar 2013. ISSN 1878-5832 (Electronic) 1359-6446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23073387> >.

BRUIJNINCX, P. C.; SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Curr Opin Chem Biol**, v. 12, n. 2, p. 197-206, Apr 2008. ISSN 1367-5931 (Print) 1367-5931 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18155674> >.

BUTCHER, D. T.; ALLISTON, T.; WEAVER, V. M. A tense situation: forcing tumour progression. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 2, p. 108-22, Feb 2009. ISSN 1474-1768 (Electronic) 1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19165226> >.

CHAABANE, W. et al. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 61, n. 1, p. 43-58, Feb 2013. ISSN 1661-4917 (Electronic) 0004-069X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23229678> >.

CHAKRABORTY, B. S. Cancer Drug Development - Key Regulatory Considerations. **Health Administrator**, v. v. 20, n. 1-2, p. 29-36, 2007.

CHARI, R. V. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. **Acc Chem Res**, v. 41, n. 1, p. 98-107, Jan 2008. ISSN 1520-4898 (Electronic) 0001-4842 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17705444> >.

CHAROEN, K. M. et al. Embedded multicellular spheroids as a biomimetic 3D cancer model for evaluating drug and drug-device combinations. **Biomaterials**, v. 35, n. 7, p. 2264-71, Feb 2014. ISSN 1878-5905 (Electronic) 0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24360576> >.

CHATTERJEE, S. J.; MCCAFFREY, L. Emerging role of cell polarity proteins in breast cancer progression and metastasis. **Breast Cancer (Dove Med Press)**, v. 6, p. 15-27, 2014. ISSN 1179-1314 (Print) 1179-1314 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24648766> >.

CHEN, H. C. Boyden chamber assay. **Methods Mol Biol**, v. 294, p. 15-22, 2005. ISSN 1064-3745 (Print) 1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15576901> >.

CHHETRI, A. et al. Cell Culture and Coculture for Oncological Research in Appropriate Microenvironments. **Curr Protoc Chem Biol**, v. 11, n. 2, p. e65, Jun 2019. ISSN 2160-4762 (Electronic) 2160-4762 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31166658> >.

CHITTIBOYINA, S. et al. Gradient-on-a-Chip with Reactive Oxygen Species Reveals Thresholds in the Nucleus Response of Cancer Cells Depending on the Matrix Environment. **ACS biomaterials science & engineering**, 2017.

CIARIMBOLI, G. Membrane transporters as mediators of Cisplatin effects and side effects. **Scientifica (Cairo)**, v. 2012, p. 473829, 2012. ISSN 2090-908X (Electronic) 2090-908X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24278698> >.

COLINA-VEGAS, L. 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**, v. 46, n. 38, p. 12865-12875, Oct 03 2017. ISSN 1477-9234 (Electronic) 1477-9226 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28920989> >.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Mol Biotechnol**, v. 26, n. 3, p. 249-61, Mar 2004. ISSN 1073-6085 (Print)

1073-6085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004294> >.

CORREA, R. S. et al. Ru(II)-based complexes with N-(acyl)-N',N'-(disubstituted)thiourea ligands: Synthesis, characterization, BSA- and DNA-binding studies of new cytotoxic agents against lung and prostate tumour cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 150, p. 63-71, Sep 2015. ISSN 0162-0134. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000366344800007 >.

D'SOUSA COSTA, C. O. et al. Novel piplartine-containing ruthenium complexes: synthesis, cell growth inhibition, apoptosis induction and ROS production on HCT116 cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 61, p. 104367-104392, Nov 28 2017. ISSN 1949-2553 (Electronic) 1949-2553 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262647> >.

DA SILVA, P. B. et al. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Treatment of Tuberculosis--A Review. **J Biomed Nanotechnol**, v. 12, n. 2, p. 241-60, Feb 2016. ISSN 1550-7033 (Print) 1550-7033 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27305759> >.

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**, v. 222, n. 1, p. 45-55, Jul 3 2001. ISSN 0378-5173 (Print) 0378-5173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404031> >.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol**, v. 740, p. 364-78, Oct 5 2014. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25058905> >.

DE FREITAS, E. S. et al. Nanostructured lipid systems as a strategy to improve the in vitro cytotoxicity of ruthenium(II) compounds. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5999-6008, May 9 2014. ISSN 1420-3049 (Electronic) 1420-3049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24818578> >.

DHIMAN, H. K.; RAY, A. R.; PANDA, A. K. Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. **Biomaterials**, v. 26, n. 9, p. 979-86, Mar 2005. ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15369686> >.

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. **J Health Econ**, v. 47, p. 20-33, May 2016. ISSN 1879-1646 (Electronic) 0167-6296 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26928437> >.

DRUBIN, D. G.; NELSON, W. J. Origins of cell polarity. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 335-44, Feb 9 1996. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608587> >.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS Nano**, v. 3, n. 1, p. 16-20, Jan 27 2009. ISSN 1936-086X (Electronic) 1936-0851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19206243> >.

FESTING, S.; WILKINSON, R. The ethics of animal research. Talking Point on the use of animals in scientific research. **EMBO Rep**, v. 8, n. 6, p. 526-30, Jun 2007. ISSN 1469-221X (Print)

1469-221X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17545991> >.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **Am J Cancer Res**, v. 7, n. 5, p. 1016-1036, 2017. ISSN 2156-6976 (Print)

2156-6976 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28560055> >.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 24, p. 4195-200, Dec 15 2010. ISSN 1477-9137 (Electronic)

0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21123617> >.

FUERTE, M. A. et al. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. **Curr Med Chem**, v. 10, n. 3, p. 257-66, Feb 2003. ISSN 0929-8673 (Print)

0929-8673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12570712> >.

FURUTA, S. et al. Laminin signals initiate the reciprocal loop that informs breast-specific gene expression and homeostasis by activating NO, p53 and microRNAs. **Elife**, v. 7, Mar 21 2018. ISSN 2050-084X (Electronic)

2050-084X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29560860> >.

FUZER, A. M. et al. [10]-Gingerol Reverts Malignant Phenotype of Breast Cancer Cells in 3D Culture. **J Cell Biochem**, v. 118, n. 9, p. 2693-2699, Sep 2017. ISSN 1097-4644 (Electronic)

0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28112417> >.

GORLE, A. K. et al. Tri- and tetra-nuclear polypyridyl ruthenium(II) complexes as antimicrobial agents. **Dalton Trans**, v. 43, n. 44, p. 16713-25, Nov 28 2014. ISSN 1477-9234 (Electronic)

1477-9226 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271478> >.

GROZAV, A. et al. Acute toxicity evaluation of a thiazolo arene ruthenium (II) complex in rats. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 80, p. 233-40, Oct 2016. ISSN 1096-0295 (Electronic)

0273-2300 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27375008> >.

HAIT, W. N. Anticancer drug development: the grand challenges. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 4, p. 253-4, Apr 2010. ISSN 1474-1784 (Electronic)

1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20369394> >.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> >.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HANIGAN, M. H.; DEVARAJAN, P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. **Cancer Ther**, v. 1, p. 47-61, 2003. ISSN 1543-9135 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18185852> >.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicol Lett**, v. 90, n. 2-3, p. 183-8, Feb 07 1997. ISSN 0378-4274 (Print) 0378-4274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9067486> >.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Res**, v. 13, n. 4, p. 215, Aug 12 2011. ISSN 1465-542X (Electronic) 1465-5411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884641> >.

HUANG, H. et al. Comparison between polypyridyl and cyclometalated ruthenium(II) complexes: anticancer activities against 2D and 3D cancer models. **Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 715-25, Jan 07 2015. ISSN 1521-3765 (Electronic) 0947-6539 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25388328> >.

HUH, D.; HAMILTON, G. A.; INGBER, D. E. From 3D cell culture to organs-on-chips. **Trends Cell Biol**, v. 21, n. 12, p. 745-54, Dec 2011. ISSN 1879-3088 (Electronic) 0962-8924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22033488> >.

HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1216-9, Nov 27 2009. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19965464> >.

IARC. Internacional agency for research on cancer. Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, breast, females, all ages., 2018. Disponível em: < https://gco.iarc.fr/today/home?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&rotate=%255B10%252C0%255D >.

IIDA, J. et al. Inhibition of cancer cell growth by ruthenium complexes. **J Transl Med**, v. 14, p. 48, Feb 12 2016. ISSN 1479-5876 (Electronic) 1479-5876 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26867596> >.

IMAMURA, Y. et al. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. **Oncol Rep**, v. 33, n. 4, p. 1837-43, Apr 2015. ISSN 1791-2431 (Electronic) 1021-335X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25634491> >.

INGBER, D. E. Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development. **Int J Dev Biol**, v. 50, n. 2-3, p. 255-66, 2006. ISSN 0214-6282 (Print) 0214-6282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16479493> >.

JIANG, G. B. et al. Ruthenium(II) polypyridyl complexes induce BEL-7402 cell apoptosis by ROS-mediated mitochondrial pathway. **J Inorg Biochem**, v. 141, p. 170-9, Dec 2014. ISSN 1873-3344 (Electronic)

0162-0134 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25268891> >.

JUSTUS, C. R. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **J Vis Exp**, n. 88, Jun 01 2014. ISSN 1940-087X (Electronic)
1940-087X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24962652> >.

KANG, X. et al. Advances in drug delivery system for platinum agents based combination therapy. **Cancer Biol Med**, v. 12, n. 4, p. 362-74, Dec 2015. ISSN 2095-3941 (Print)
2095-3941 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26779373> >.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 8, p. 573-84, Aug 2007. ISSN 1474-175X (Print)
1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17625587> >.

KOLACNA, L. et al. Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix. **Physiol Res**, v. 56 Suppl 1, p. S51-60, 2007. ISSN 0862-8408 (Print)
0862-8408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17552894> >.

LAMPUGNANI, M. G. Cell migration into a wounded area in vitro. **Methods Mol Biol**, v. 96, p. 177-82, 1999. ISSN 1064-3745 (Print)
1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10098136> >.

LANGHANS, S. A. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. **Front Pharmacol**, v. 9, p. 6, 2018. ISSN 1663-9812 (Print)
1663-9812 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29410625> >.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 45, n. 1, p. 89-121, Dec 6 2000. ISSN 0169-409X (Print)
0169-409X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104900> >.

LEE, G. Y. et al. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. **Nat Methods**, v. 4, n. 4, p. 359-65, Apr 2007. ISSN 1548-7091 (Print)
1548-7091 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17396127> >.

LEE, S. Y. et al. FAM83A confers EGFR-TKI resistance in breast cancer cells and in mice. **J Clin Invest**, v. 122, n. 9, p. 3211-20, Sep 2012. ISSN 1558-8238 (Electronic)
0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22886303> >.

LEFFA, D. D. et al. Anesthetic Ketamine-Induced DNA Damage in Different Cell Types In Vivo. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 8, p. 5575-81, Oct 2016. ISSN 1559-1182 (Electronic)
0893-7648 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26476838> >.

LEHMANN, B. D. et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0157368, 2016. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27310713> >.

LEIVA, M. C. et al. Tripalmitin nanoparticle formulations significantly enhance paclitaxel antitumor activity against breast and lung cancer cells in vitro. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 13506, Oct 18 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29044153> >.

LELIEVRE, S. A.; KWOK, T.; CHITTIBOYINA, S. Architecture in 3D cell culture: An essential feature for in vitro toxicology. **Toxicol In Vitro**, Mar 30 2017. ISSN 1879-3177 (Electronic)

0887-2333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28366709> >.

LEVENTAL, K. R. et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 891-906, Nov 25 2009. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19931152> >.

LIGHT, D. W.; KANTARJIAN, H. Market spiral pricing of cancer drugs. **Cancer**, v. 119, n. 22, p. 3900-2, Nov 15 2013. ISSN 1097-0142 (Electronic)

0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24002792> >.

MAGDELDIN, T. et al. The efficacy of cetuximab in a tissue-engineered three-dimensional in vitro model of colorectal cancer. **J Tissue Eng**, v. 5, p. 2041731414544183, 2014. ISSN 2041-7314 (Print)

2041-7314 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25383169> >.

MARQUES, E. S.; SALLES, D. B.; MAISTRO, E. L. Assessment of the genotoxic/clastogenic potential of coumarin derivative 6,7-dihydroxycoumarin (aesculetin) in multiple mouse organs. **Toxicol Rep**, v. 2, p. 268-274, 2015. ISSN 2214-7500 (Print)

2214-7500 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28962359> >.

MEGGERS, E. Targeting proteins with metal complexes. **Chem Commun (Camb)**, n. 9, p. 1001-10, Mar 7 2009. ISSN 1359-7345 (Print)

1359-7345 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19225621> >.

MILLER, R. P. et al. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. **Toxins (Basel)**, v. 2, n. 11, p. 2490-518, Nov 2010. ISSN 2072-6651 (Electronic)

2072-6651 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22069563> >.

MIROSHNIKOVA, Y. A. et al. Engineering strategies to recapitulate epithelial morphogenesis within synthetic three-dimensional extracellular matrix with tunable mechanical properties. **Phys Biol**, v. 8, n. 2, p. 026013, Apr 2011. ISSN 1478-3975 (Electronic)

1478-3967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21441648> >.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983. ISSN 0022-1759 (Print)

0022-1759 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682> >.

NARVEKAR, M. et al. Nanocarrier for poorly water-soluble anticancer drugs--barriers of translation and solutions. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 4, p. 822-33, Aug 2014. ISSN 1530-9932 (Electronic)

1530-9932 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24687241> >.

NAVES, M. A. 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**, v. 16, n. 3, p. 1167-1183, Mar 4 2019. ISSN 1543-8392 (Electronic) 1543-8384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30633527> >.

NCI. National Cancer Institute. Dictionary of Cancer Terms. Mammary Gland., 2019. Disponível em: < <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/mammary-gland> >.

NELSON, C. M. et al. Tissue geometry determines sites of mammary branching morphogenesis in organotypic cultures. **Science**, v. 314, n. 5797, p. 298-300, Oct 13 2006. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17038622> >.

NHUKEAW, T. et al. Cellular responses of BRCA1-defective and triple-negative breast cancer cells and in vitro BRCA1 interactions induced by metallo-intercalator ruthenium(II) complexes containing chloro-substituted phenylazopyridine. **BMC Cancer**, v. 14, p. 73, 2014. ISSN 1471-2407 (Electronic) 1471-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24507701> >.

NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 139, n. 2, p. 271-9, Jun 3 1991. ISSN 0022-1759 (Print) 0022-1759 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1710634> >.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline on acute oral toxicity testing. 2001a. Disponível em: < [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2001\)4&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2001)4&doclanguage=en) >.

_____. ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the Testing of Chemicals, 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. 2001b.

_____. ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. 2010.

_____. ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, TG 489. 2014a.

_____. ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. 2014b.

OLIVE, P. L.; BANATH, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nat Protoc**, v. 1, n. 1, p. 23-9, 2006. ISSN 1750-2799 (Electronic) 1750-2799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406208> >.

OLIVEIRA, K. M. et al. Ruthenium(II)/triphenylphosphine complexes: An effective way to improve the cytotoxicity of lapachol. **Polyhedron**, v. 130, p. 108-114, 2017.

PASZEK, M. J. et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. **Cancer Cell**, v. 8, n. 3, p. 241-54, Sep 2005. ISSN 1535-6108 (Print) 1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169468> >.

PAVAN, F. R. et al. In vitro and in vivo activities of ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes (SCAR) against Mycobacterium tuberculosis. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64242, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23724039> >.

PAWLAK, G.; HELFMAN, D. M. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. **Curr Opin Genet Dev**, v. 11, n. 1, p. 41-7, Feb 2001. ISSN 0959-437X (Print) 0959-437X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163149> >.

PAWLOWSKI, J.; KRAFT, A. S. Bax-induced apoptotic cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 2, p. 529-31, Jan 18 2000. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639111> >.

PEDRAZA-FARINA, L. G. Mechanisms of oncogenic cooperation in cancer initiation and metastasis. **Yale J Biol Med**, v. 79, n. 3-4, p. 95-103, Dec 2006. ISSN 1551-4056 (Electronic) 0044-0086 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17940619> >.

PERIN, N. et al. Antiproliferative activity of amino substituted benzo[b]thieno[2,3-b]pyrido[1,2-a]benzimidazoles explored by 2D and 3D cell culture system. **Eur J Med Chem**, v. 125, p. 722-735, Jan 05 2017. ISSN 1768-3254 (Electronic) 0223-5234 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27721156> >.

PETERSEN, O. W. et al. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 19, p. 9064-8, Oct 1 1992. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1384042> >.

PISTRITTO, G. et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies **8**, v. 4, 2016.

PLUTÍN, A. M. et al. Palladium(II)/N,N-disubstituted-N'-acylthioureas complexes as anti-Mycobacterium tuberculosis and anti-Trypanosoma cruzi agents. **Polyhedron**, v. 132, p. 70-77, 2017.

POPOLIN, C. P.; COMINETTI, M. R. A review of ruthenium complexes activities on different steps of the metastatic process in breast cancer cells. **Mini Rev Med Chem**, Feb 06 2017. ISSN 1875-5607 (Electronic) 1389-5575 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28176627> >.

POPOLIN, C. P. et al. Cytotoxicity and anti-tumor effects of new ruthenium complexes on triple negative breast cancer cells. **PLoS One**, v. 12, n. 9, p. e0183275, 2017. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28898246> >.

PRASAD, V.; MAILANKODY, S. Research and Development Spending to Bring a Single Cancer Drug to Market and Revenues After Approval. **JAMA Intern Med**, v. 177, n. 11, p. 1569-1575, Nov 1 2017. ISSN 2168-6114 (Electronic) 2168-6106 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28892524> >.

PROVENZANO, P. P. et al. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. **BMC Med**, v. 6, p. 11, Apr 28 2008. ISSN 1741-7015 (Electronic) 1741-7015 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18442412> >.

RAVI, M. et al. 3D cell culture systems: advantages and applications. **J Cell Physiol**, v. 230, n. 1, p. 16-26, Jan 2015. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24912145> >.

RIVENBARK, A. G.; O'CONNOR, S. M.; COLEMAN, W. B. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. **Am J Pathol**, v. 183, n. 4, p. 1113-1124, Oct 2013. ISSN 1525-2191 (Electronic) 0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23993780> >.

RIZKI, A. et al. A human breast cell model of preinvasive to invasive transition. **Cancer Res**, v. 68, n. 5, p. 1378-87, Mar 1 2008. ISSN 1538-7445 (Electronic) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18316601> >.

RONCONI, L.; SADLER, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 13-14, p. 1633-1648, Jul 2007. ISSN 0010-8545. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248268500004 >.

SAEIDNIA, S.; MANAYI, A.; ABDOLLAHI, M. From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons. **Curr Drug Discov Technol**, v. 12, n. 4, p. 218-24, 2015. ISSN 1875-6220 (Electronic) 1570-1638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26778084> >.

SALEHI, F. et al. Monitoring ZEO apoptotic potential in 2D and 3D cell cultures and associated spectroscopic evidence on mode of interaction with DNA. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 2553, May 31 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28566685> >.

SATO, M. R. et al. Recent advances in nanoparticle carriers for coordination complexes. **Curr Top Med Chem**, v. 15, n. 4, p. 287-97, 2015. ISSN 1873-4294 (Electronic) 1568-0266 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25579344> >.

SAVA, G.; BERGAMO, A. Ruthenium-based compounds and tumour growth control (review). **Int J Oncol**, v. 17, n. 2, p. 353-65, Aug 2000. ISSN 1019-6439 (Print) 1019-6439 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10891547> >.

SCHNITT, S. J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Mod Pathol**, v. 23 Suppl 2, p. S60-4, May 2010. ISSN 1530-0285 (Electronic) 0893-3952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20436504> >.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 1, p. 5-29, Jan-Feb 2015. ISSN 1542-4863 (Electronic) 0007-9235 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25559415> >.

SILVA, P. B. et al. A Nanostructured Lipid System as a Strategy to Improve the in Vitro Antibacterial Activity of Copper(II) Complexes. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22534-45, Dec 16 2015. ISSN 1420-3049 (Electronic) 1420-3049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26703537> >.

SILVA, V. R. et al. A ruthenium-based 5-fluorouracil complex with enhanced cytotoxicity and apoptosis induction action in HCT116 cells. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 288, Jan 10 2018. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29321581> >.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, n. 1, p. 184-91, Mar 1988. ISSN 0014-4827 (Print) 0014-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3345800> >.

SOUZA, A. P. C. **Complexos de rutênio (II) de interesse biológico: avaliação in vitro e in vivo do potencial antitumoral e genotóxico**. 2014. Departamento de Química, UFSCar

TERRAZAS, P. M. et al. Benzophenone guttiferone A from *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) presents genotoxic effects in different cells of mice. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e76485, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24250785> >.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, n. 3, p. 206-21, 2000. ISSN 0893-6692 (Print) 0893-6692 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737956> >.

VAN RIJT, S. H.; SADLER, P. J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug Discov Today**, v. 14, n. 23-24, p. 1089-97, Dec 2009. ISSN 1878-5832 (Electronic) 1359-6446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19782150> >.

VERJANS, E. T. et al. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort? **J Cell Physiol**, v. 233, n. 4, p. 2993-3003, Apr 2018. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28618001> >.

VICINI, P. et al. Synthesis and biological evaluation of benzo[d]isothiazole, benzothiazole and thiazole Schiff bases. **Bioorg Med Chem**, v. 11, n. 22, p. 4785-9, Nov 3 2003. ISSN 0968-0896 (Print) 0968-0896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14556794> >.

VIDI, P. A.; BISSELL, M. J.; LELIEVRE, S. A. Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why. **Methods Mol Biol**, v. 945, p. 193-219, 2013. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23097109> >.

VIDI, P. A.; LEARY, J. F.; LELIEVRE, S. A. Building risk-on-a-chip models to improve breast cancer risk assessment and prevention. **Integr Biol (Camb)**, v. 5, n. 9, p. 1110-8, Sep 2013. ISSN 1757-9708 (Electronic) 1757-9694 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23681255> >.

VIDI, P. A. et al. Disease-on-a-chip: mimicry of tumor growth in mammary ducts. **Lab Chip**, v. 14, n. 1, p. 172-7, Jan 07 2014. ISSN 1473-0189 (Electronic) 1473-0189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24202525> >.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. **JAMA**, v. 321, n. 3, p. 288-300, Jan 22 2019. ISSN 1538-3598 (Electronic) 0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30667505> >.

WAN, D. et al. Synthesis, characterization and anticancer effect of the ruthenium (II) polypyridyl complexes on HepG2 cells. **J Photochem Photobiol B**, v. 165, p. 246-255, Dec 2016. ISSN 1873-2682 (Electronic) 1011-1344 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27816647> >.

WANG, F. et al. Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts. **J Natl Cancer Inst**, v. 94, n. 19, p. 1494-503, Oct 2 2002. ISSN 0027-8874 (Print) 0027-8874 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359858> >.

WANG, F. et al. Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 25, p. 14821-6, Dec 8 1998. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9843973> >.

WEAVER, V. M. et al. beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. **Cancer Cell**, v. 2, n. 3, p. 205-16, Sep 2002. ISSN 1535-6108 (Print) 1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12242153> >.

WEAVER, V. M. et al. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. **J Cell Biol**, v. 137, n. 1, p. 231-45, Apr 7 1997. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9105051> >.

WEIGELT, B.; GHAJAR, C. M.; BISSELL, M. J. The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 69-70, p. 42-51, Apr 2014. ISSN 1872-8294 (Electronic) 0169-409X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412474> >.

WHEATE, N. J. et al. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Trans**, v. 39, n. 35, p. 8113-27, Sep 21 2010. ISSN 1477-9234 (Electronic) 1477-9226 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20593091> >.

WHO. World Health Organization. Cancer - Key Facts., 2018. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> >.

_____. Breast Cancer. 2019a. Disponível em: < <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/> >.

_____. World Health Organization. <https://www.who.int/cancer/prevention/en/>. **Cancer: Fact Sheet**, 2019b. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> >. Acesso em: 20 de Fevereiro de 2016.

WITTE, I. et al. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part III: the comet assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicol Sci**, v. 97, n. 1, p. 21-6, May 2007. ISSN 1096-6080 (Print) 1096-0929 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17204584> >.

WU, Q. et al. Arene ruthenium(ii) complex, a potent inhibitor against proliferation, migration and invasion of breast cancer cells, reduces stress fibers, focal adhesions and invadopodia. **Metallomics**, v. 6, n. 12, p. 2204-12, Dec 2014. ISSN 1756-591X (Electronic) 1756-5901 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25142071> >.

XU, L. et al. Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity, and apoptosis-inducing properties of ruthenium(II) complexes. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96082, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24804832> >.

YAO, T.; ASAYAMA, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. **Reprod Med Biol**, v. 16, n. 2, p. 99-117, Apr 2017. ISSN 1445-5781 (Print) 1445-5781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29259457> >.

ZENG, C. W. et al. Camptothecin induces apoptosis in cancer cells via microRNA-125b-mediated mitochondrial pathways. **Mol Pharmacol**, v. 81, n. 4, p. 578-86, Apr 2012. ISSN 1521-0111 (Electronic) 0026-895X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22252650> >.

ZENG, L. et al. Ruthenium(II) Complexes with 2-Phenylimidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline Derivatives that Strongly Combat Cisplatin-Resistant Tumor Cells. **Sci Rep**, v. 6, p. 19449, Jan 14 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26763798> >.

ZHANG, C. et al. Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity and anticancer effects of ruthenium(II) complexes on BEL-7402 cells. **J Inorg Biochem**, v. 157, p. 62-72, Apr 2016. ISSN 1873-3344 (Electronic) 0162-0134 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26828285> >.

ZHOU, S.; CUI, Z.; URBAN, J. Dead cell counts during serum cultivation are underestimated by the fluorescent live/dead assay. **Biotechnol J**, v. 6, n. 5, p. 513-8, May 2011. ISSN 1860-7314 (Electronic) 1860-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21305696> >.

ZIPS, D.; THAMES, H. D.; BAUMANN, M. New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation. **In Vivo**, v. 19, n. 1, p. 1-7, Jan-Feb 2005. ISSN 0258-851X (Print) 0258-851X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15796152> >.

ANEXOS

Anexo 1

Journal of Inorganic Biochemistry 186 (2018) 70–84



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinorgbio

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 Blanque Becceneri^a, Cecília Patrícia Popolin^a, Ana Maria Plutin^b, Edson Luis Maistro^c, Eduardo Ernesto Castellano^d, Alzir Azevedo Batista^e, Márcia Regina Cominetti^{a,*}

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

^b Facultad de Química, Universidad de la Habana, Zapata s/n entre G y Carlitos Aguirre, 10400 Habana, Cuba

^c Departamento de Fonoaudiologia, Faculdade de Filosofia e Ciências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Av. Hygino Muzzi Filho, 737, Marília, SP 17525-900, Brazil

^d Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, CEP 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Triple negative breast cancer
Ruthenium complexes
Acylthiourea ligands
In vivo studies
Apoptosis

ABSTRACT

Triple negative breast cancer (TNBC) is a heterogeneous subtype of breast 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. Despite all the advances in cancer treatments, 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 acylthiourea ligands have been synthesized and characterized: *trans*-[Ru(PPh₃)₂(*N,N*-dibutyl-*N'*-benzoylthioureato-k²O,S)(2,2'-bipyridine (bipy))]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'*-benzoylthioureato-k²O,S)(bipy))]PF₆ (3). Then, the cytotoxicity of these three new ruthenium complexes was investigated in TNBC MDA-MB-231 and in non-tumor MCF-10A cells. Complex (2) was the most selective complex 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 of all the advances in cancer treatments 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 metallodrugs, 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: mcominetti@ufscar.br (M.R. Cominetti).

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.05.011>

Received 8 March 2018; Received in revised form 18 May 2018; Accepted 19 May 2018

Available online 24 May 2018

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

Anexo 2

Pró Reitoria
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Atividade Antitumoral e Potencial Mutagênico de Novos Complexos de Rutênio", protocolado sob o CEUA nº 1051160315, sob a responsabilidade de **Amanda Blaque Becceneri** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 24/04/2015.

We certify that the proposal "Antitumor Activity and Mutagenic potential of ~~Novo~~ Ruthenium Complexes", utilizing 50 isogenics mice (50 males), protocol number CEUA 1051160315, under the responsibility of **Amanda Blaque Becceneri** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 04/24/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2015 a 05/2018** Área: **Gerontologia**

Procedência:	Biotério Central da UFSCAR		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos
		Idade:	30 a 40 dias
		N:	50
Linhagem:	Swiss	Peso:	30 a 35 g

Resumo: O câncer está entre as maiores causas de morte do mundo. O tratamento do câncer requer uma cuidadosa seleção de um ou mais métodos de intervenção. A maioria das drogas usadas em quimioterapia atualmente provoca danos no DNA, tanto das células tumorais, como também das células normais, portanto o desenvolvimento de novos quimioterápicos é um desafio, já que esses quimioterápicos devem ser capazes de agir seletivamente para matar ou inibir o crescimento apenas de células tumorais. A química inorgânica medicinal é uma área em crescimento, inicialmente alimentada pela descoberta da cisplatina cerca de 40 anos atrás. A cisplatina e as sucessivas gerações de fármacos antitumorais à base de platina demonstraram que os complexos metálicos podem desempenhar um papel importante no tratamento do câncer. Esses complexos possuem características notáveis, que podem ser exploradas para o desenvolvimento de novos fármacos. Os complexos de rutênio octaédricos têm atraído grande atenção e destacado interesse, já que apresentam características que os tornam adequados à aplicação medicinal. A atividade de ions metálicos pode ser melhorada através da ligação com compostos biologicamente ativos. Os ligantes N,N'-dialquil-N-clitoureas são muito versáteis, sendo que pequenas mudanças em suas estruturas podem ser facilmente realizadas e levam à diferentes propriedades físicas e químicas. O desenho de fármacos antitumorais é uma das mais promissoras estratégias para aumentar a sua citotoxicidade e para minimizar a sua toxicidade. Diante do exposto, o objetivo do projeto é selecionar dentre diferentes moléculas, um novo e potente complexo de rutênio, o qual possa ser candidato a medicamento antitumoral através de estudos *in vitro* e *in vivo*.

Local do experimento: Biotério do Laboratório de Recursos Terapêuticos

São Carlos, 11 de abril de 2016

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Anexo 3



CERTIFICADO 003/2016

Certificamos que a proposta intitulada "ATIVIDADE ANTITUMORAL E POTENCIAL MUTAGÊNICO DE NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO", registrada sob o protocolo nº 828/2016, sob a responsabilidade de Edson Luis Maistro, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da FFC – UNESP do Campus de Marília, em reunião de 16/06/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De 2016 a 2017
Espécie/inhagem/raça	Camundongos/Swiss/albino
Nº de animais	48
Peso/Idade	20g/5 semanas
Sexo	M
Origem	Biotério da UNESP de Botucatu

Marília, 16 de Junho de 2016.

Dra. Luciana Pisato
Coordenadora da CEUA-FFC da UNESP-
Campus de Marília