



Universidade de Brasília

Faculdade de Planaltina

Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais

**Síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de
Indazolium trans[tetrachlorobis (1H-indazole) ruthenate (III)]
(KP1019) em células de carcinoma mamário**

Isis Pires Thomé

2016

Universidade de Brasília
Programa de Pós-Graduação Ciências de Materiais

**Síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de Indazolium trans
[tetrachlorobis (1H-indazole) ruthenate (III)] (KP1019) em células de carcinoma
mamário**

ISIS PIRES THOMÉ

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
de Materiais, UnB, como parte dos requisitos
para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. MARCELLA LEMOS BRETTAS CARNEIRO

Planaltina, 2016

Pires Thomé, Isis
PT465s Síntese, caracterização e avaliação da atividade
citotóxica de Indazolium trans [tetrachlorobis (1H
indazole) ruthenate (III)] (KP1019) em células de
carcinoma mamário / Isis Pires Thomé; orientador
Marcella Lemos Brettas Carneiro. -- Brasília, 2016.
72 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciência de
Materiais) -- Universidade de Brasília, 2016.

1. O câncer de mama. 2. Síntese do KP1019. 3.
Caracterização do composto KP1019 por espectrometria
de RMN. 4. Avaliação da citotoxicidade de KP1019 em
cultura de células de carcinoma mamário e
fibroblastos por análise de MTT. 5. Alterações
morfológicas e estruturais induzidas por KP1019 em
células tumorais da linhagem 4T1. I. Lemos Brettas
Carneiro, Marcella, orient. II. Título.

ISIS PIRES THOMÉ

**Síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de Indazolium trans
[tetrachlorobis (1H-indazole) ruthenate (III)] (KP1019) em células de carcinoma
mamário**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro
UnB - FUP
(Orientadora)

Prof. Dr. Alex Fabiano Cortez Campos
UnB - FUP
(membro titular)

Prof^ª. Dra. Tatiana Barbosa Rosado
UnB - FUP
(membro titular)

Prof^ª. Dra. Mônica Pereira Garcia
UnB – GEM - IB
(membro suplente)

Planaltina, maio de 2016

Dedicatória

A Deus, por ter me agraciado com perseverança, paciência e resiliência e pessoas maravilhosas a minha volta que me ajudaram a vencer mais esta etapa.

A minha mãe (in memoriam), pelo amor, carinho, por ter se dedicado ao máximo em minha criação, por ser minha melhor amiga e por estar ao meu lado sempre e ter me trazido à vida.

Ao meu pai que sempre me apoia em meus objetivos, me escuta, aconselha e não me deixou desistir quando desanimei.

Agradecimentos

A Deus e à Meishu-sama, pela vida, oportunidades, proteção, fé e iluminação. Por colocar em minha vida pessoas maravilhosas e situações que me fizeram e me fazem evoluir cada vez mais. Por tornar possível a conclusão deste trabalho, me ajudando a passar por cima de todos os obstáculos que surgiram.

Agradeço a minha família, que é única e também minha fonte de amor incondicional. Em especial a minha mãe Maria Teresa Pires, que foi a melhor mãe que eu poderia ter; Meu pai, Jaime Pires Thomé, homem íntegro, amoroso e cuidadoso a quem também devo minha vida! É o homem da minha vida, sempre me fazendo perceber, com poucas palavras, o quanto sou privilegiada por todas as oportunidades que tenho; E também agradeço a minha irmã, Sarah Pires Thomé, que tem sido solícita e meu braço direito em muitas situações e que até mesmo nos momentos de conflito foi importante para meu aprimoramento. À minha irmãzinha Lavínia Franco Thomé, que mesmo criança me faz querer ser uma pessoa melhor para que sirva de exemplo para seu crescimento! Não poderia faltar também minha querida prima e amiga Andressa Pereira Thomé, que me apoiou principalmente neste final de dissertação, me dando auxílio em outros setores para que eu pudesse me concentrar apenas em escrever. Muito obrigada!

Agradeço profundamente ao meu querido 2º pai, Anderson dos Santos, que há dois anos só tem acrescentado à minha vida, me ensinando como ser uma pessoa melhor, me ensinando o caminho da evolução e do servir, sendo meu orientador espiritual e de todos os outros assuntos. Muito obrigada por nunca desistir de mim e por ter, junto com toda sua família, me acolhido de coração! Muito obrigada! Amo vocês!

Aos meus amigos queridos que de alguma forma me ajudaram e incentivaram! Em especial à minha querida amiga Priscilla Amaral Guedes, companheira de caminhada, doce menina linda dos olhos verdes, ao meu lado desde antes da faculdade, sempre me auxiliando com paciência e carinho. Muito obrigada! À querida amiga Thainá Cristine de Carvalho, que também me apoiou, foi e está sendo minha companheira de caminhada espiritual e aprimoramento pessoal. Raptou-me nas férias e ensinou que posso ser mais produtiva ainda olhando o mar com uma boa companhia, pois quando temos paz, tudo flui! Muito obrigada, minha

flor! Ao meu primo e amigo Erivelton Angelo, que desde o ano passado tem se preocupado e sempre me cobrando, dizia: "E aí? Quantas páginas você já escreveu hoje?" Muito obrigada pelo apoio!

A minha orientadora, prof^a. Dr^a. Marcella Lemos Bretas, que foi ótima e muito paciente comigo, me auxiliou e não me deixou desistir, sempre otimista. Pessoa dedicada, doce e sempre elegante! Muito obrigada pela orientação e presteza!

Ao prof. Dr. Aparecido de Souza Nunes e colaboradores, pelo auxílio na síntese do composto utilizado neste trabalho! Muito obrigada!

A M^a. Natália Lemos Chaves que com toda a paciência me ensinou a parte experimental e sempre foi simpática, gentil e solícita, me auxiliando o máximo que pôde! Sou muito grata!

A professora Otilie que me auxiliou gentil e prontamente com a interpretação do espectro de RMN sendo de imensa ajuda! MUITÍSSIMO obrigada!

A todos os professores do curso pelos ensinamentos transmitidos no decorrer de todo esse curso! Agradecimento especial aos professores: Dr. Alex Fabiano pelos ensinamentos, simpatia, auxílio sempre que necessário e por aceitar fazer parte da minha banca! Muito obrigada! Dr^a. Renata Aquino da Silva, pelos ensinamentos, motivação, e auxílio, se esforçando sempre pra resolver todas as questões que caem em suas mãos! Muito obrigada!

A banca examinadora, por aceitar o convite de participar da defesa deste trabalho! Muito obrigada!

A UnB, e todo o corpo docente e administrativo, pela oportunidade de subir mais este degrau em minha formação!

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos que muito me ajudou na conclusão deste trabalho!

A todos os meus colegas do mestrado, que de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui! Em especial a Hudson Rodrigues, colega desde a UEG que junto com Priscilla, me ajudou muito com os cálculos matemáticos e físicos! Muito obrigada!

A todos, minha SINCERA gratidão!

“Tudo que há no Universo acha-se em perfeita harmonia. Só há desarmonia para quem vê as coisas superficialmente - é um erro de ponto de vista.”

Meishu-sama

Resumo

O câncer é uma doença muito agressiva que atinge milhões de pessoas no mundo. Entre os vários tipos de câncer, o carcinoma mamário é o segundo mais frequente no mundo e o que mais acomete as mulheres. A quimioterapia é uma abordagem terapêutica bastante empregada, especialmente no caso de doença metastática. Contudo, este tipo de tratamento apresenta limitações como falta de especificidade às células tumorais e ocorrência de quimioresistência. Por isso, faz-se necessário o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes contra esta doença. Com o objetivo de melhorar a eficácia da quimioterapia para aumentar a expectativa de vida dos pacientes, várias propostas têm sido sugeridas. Os complexos metálicos vêm se mostrando agentes antitumorais promissores. Dentre eles, os complexos de Rutênio (Ru), como o KP1019, têm se destacado, pois apresentam (1) capacidade em se ligar à biomoléculas como transferrina; (2) considerável labilidade química; (3) atuação em células que desenvolveram resistência à cisplatina e (4) capacidade em participar de reações de oxirredução permitindo a existência dos mais importantes estados de oxidação em meio biológico. No presente trabalho, foi realizada a síntese do KP1019 e sua caracterização por ressonância magnética nuclear (RMN). Além disso, avaliou-se o efeito citotóxico deste complexo em células murinas de carcinoma mamário (4T1) e normais de fibroblastos (NIH-3T3). A citotoxicidade do KP1019 foi avaliada por testes de viabilidade celular por meio do método colorimétrico de MTT. As células foram tratadas com doses que variaram de 1,25 a 200 μM de KP1019 e cisplatina por períodos de 24, 48 e 72 horas. O KP1019 foi sintetizado e depois caracterizado por RMN e avaliado quanto à sua toxicidade. Após 24 h de tratamento, KP1019 induziu citotoxicidade semelhante à cisplatina em ambas as linhagens celulares. Além disso, notou-se que as linhagens 4T1 e NIH-3T3 tiveram a mesma sensibilidade ao tratamento com KP1019. No período de 48 horas, o KP1019 induziu diferente citotoxicidade nas duas linhagens, sendo que este não apresentou citotoxicidade para 4T1, enquanto que a cisplatina foi mais citotóxica para esta linhagem (doses acima de 12,5 μM). Em contrapartida, o KP1019 foi mais citotóxico para NIH-3T3 em doses a partir de 25 μM . Já no período de 72 horas, ambos os complexos foram similarmente citotóxicos em ambas as linhagens celulares a partir das doses 12,5 μM . Além disso, o efeito citotóxico de KP1019 e cisplatina foram diferentes na linhagem 4T1 (doses 1,25 e 2,5 μM). Ademais, a morfologia das células 4T1 foi analisada em microscópio óptico após tratamento por 24 horas com 20 μM de KP1019 ou cisplatina (IC_{50}) e observou-se várias alterações relacionadas à citotoxicidade como arredondamento das células e aumento na quantidade de vesículas citoplasmáticas. Dessa forma, sugere-se que o efeito citotóxico de KP1019 foi dependente da dose, linhagem celular e tempo avaliados e, esta citotoxicidade está associada a alterações morfológicas provenientes de processo de morte celular, o que reforça o excelente potencial de KP1019 para uso na quimioterapia do câncer de mama.

Palavras-chave: carcinoma mamário; KP1019; complexos de rutênio; citotoxicidade.

Abstract

Cancer is a very aggressive disease that affects millions of people worldwide. Among the various types of cancer, breast cancer is the second most frequent in the world and that most affects women. Chemotherapy is fairly a therapeutic approach employed, particularly for metastatic disease. However, this treatment has limitations such as lack of specificity for tumor cells and occurrence of chemoresistance. Therefore, it is necessary to develop more effective treatments for this disease. In order to improve the effectiveness of chemotherapy to increase the life expectancy of patients, various proposals have been suggested. The metal complexes have shown to be promising antitumor agents. Among them, the complexes of ruthenium (Ru) as the KP1019, have been highlighted as present (1) the ability to bind to biomolecules such as transferrin; (2) substantial chemical lability; (3) operating in cells that have developed resistance to cisplatin and (4) the ability to participate in redox reactions allowing the existence of the most important oxidation states in biological medium. In the present work, the synthesis of KP1019 and its characterization by nuclear magnetic resonance imaging was performed (NMR). In addition, it evaluated the cytotoxic effect of this complex on murine mammary carcinoma cells (4T1) and normal fibroblasts (NIH-3T3). The cytotoxicity of KP1019 was evaluated by cell viability tests using the MTT colorimetric method. Cells were treated with doses ranging from 1.25 to 200 μM of KP1019 and cisplatin for periods of 24, 48 and 72 hours. The KP1019 was synthesized and then characterized by NMR and evaluated for their toxicity. After 24 h of treatment, KP1019 induced cytotoxicity similar to cisplatin in both cell lines. Furthermore, it was observed that the 4T1 and NIH-3T3 lines showed the same sensitivity to treatment with KP1019. Within 48 hours, the KP1019 induced cytotoxicity in two different strains, and this showed no cytotoxicity for 4T1, while cisplatin was more cytotoxic to this strain (over 12.5 μM doses). In contrast, KP1019 was more cytotoxic to NIH-3T3 at doses from 25 μM . In the 72-hour period, both complexes were cytotoxic similar in both cell lines from 12.5 μM doses. Additionally, the cytotoxic effect of cisplatin were KP1019 and different in lineage 4T1 (doses 1.25 and 2.5 μM). Furthermore, the morphology of 4T1 cells was examined under an optical microscope after treatment for 24 hours with 20 μM of KP1019 or cisplatin (IC₅₀) and observed several changes related to cytotoxicity and rounding of the cells and increasing the amount of cytoplasmic vesicles. Thus, it is suggested that the cytotoxic effect of KP1019 was dose-dependent cell line and evaluated time and this cytotoxicity is associated with morphologic changes from cell death process, which enhances the excellent potential KP1019 for use in cancer chemotherapy breast cancer.

Keywords: breast carcinoma; KP1019; ruthenium complexes; cytotoxicity.

Lista de figuras

Figura 1: Características das células neoplásicas.....	18
Figura 2: Diagrama da evolução mutagênica na reprodução de uma linhagem celular.....	20
Figura 3: Anatomia normal da mama e região com seus componentes internos e estruturais.....	24
Figura 4: Linfonodos da mama e circundantes a mama.....	25
Figura 5: Representação dos Ductos mamários normais e anormais.....	26
Figura 6: Representação esquemática de lóbulos mamários normais e anormais .	26
Figura 7: Pontos de controle do ciclo celular.....	28
Figura 8: Fórmula estrutural da cisplatina.....	32
Figura 9: Estrutura química geral dos carboxilatos de ródio.....	35
Figura 10: Estrutura química do citrato de ródio.....	35
Figura11: Fórmulas estruturais dos complexos de Rutênio (III).....	38
Figura 12: Esquema representando o mecanismo proposto para a ação do KP1019 dentro das células.....	40
Figura 13: Espectro de RMN do KP1019.....	49
Figura 14: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração (1,25µM; 2,5µM; 12,5µM; 25µM; 50µM; 100µM; 200µM) de KP1019 e cisplatina (controle positivo) em linhagens celulares avaliadas após 24h de tratamento.....	51
Figura 15: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração (1,25µM; 2,5µM; 12,5µM; 25µM; 50µM; 100µM; 200µM) de KP1019 e cisplatina (controle positivo) em linhagens celulares avaliadas após 48h de tratamento.....	52
Figura 16: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração (1,25µM; 2,5µM; 12,5µM; 25µM; 50µM; 100µM; 200µM) de KP1019 e cisplatina (controle positivo) em linhagens celulares avaliadas após 72h de tratamento.....	53

Figura 17: Alterações estruturais e morfológicas induzidas por KP1019 em células de carcinoma mamário (4T1) após 24h de tratamento.....56

Lista de abreviaturas

ASC -*American Cancer Society*

B16 - Linhagem de Melanoma

CpG - dinucleotídeo Citosina fosfato Guanina

CDIS - Carcinoma Ductal *in situ*

CD₃OD – Metanol Deuterado

CLIS - Carcinoma Lobular *in situ*

CFL – Cisplatina, 5-fluoruracil e leucovorin

DMEM - *Dulbecos's modified Eagle's médium*

DMSO– Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético bipotássico

GMP – Guanosina-5'-monofosfato

HBL-100 – Célula epitelial não-tumorigênica

HCT116 –Linhagem de carcinoma de cólon

HCC1.1 –Linhagem de carcinoma primário de fígado

HCC1.2 – Linhagem de carcinoma primário de fígado

HEP3B – Linhagem de carcinoma de fígado

¹HRMN – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

ICR – [Imd]{trans-[RuCl₄(Im)₂]}

IC₅₀– Concentração inibitória de 50%

Imd – Imidazólio

Ind - Indazol

INCA - Instituto Nacional do Câncer

KB-3-1 –Linhagem de carcinoma cervical

KP1339 – Sodium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)]

MEC – Matriz Extracelular

MCa – Linhagem de carcinoma mamário

MCF-7 – Linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano

MDA-MB-231 – Linhagem de carcinoma mamário altamente invasivo

MTT - Brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio

NAMI – New anti-tumour metastasis inhibitor: Na{trans-[RuCl₄Im(DMSO)]}

NAMI-A – [ImH⁺]{trans-[RuCl₄(Ind)₂]}

NIH-3T3–Linhagem de Fibroblastos

OMS – Organização mundial de saúde

PBS - Solução tamponada de fosfato

P31 –Linhagem de mesotelioma

P31cis –Linhagem de mesotelioma resistente à cisplatina

RMN – Ressonância magnética nuclear

RNA – Ácido ribonucleico

SFB – Soro Fetal Bovino

SW480 –Linhagem de carcinoma de cólon

UFG – Universidade Federal de Goiás

VMC –Linhagem de mesotelioma primário

4T1 – Linhagem de carcinoma mamário

5-MeC – 5-metilcitocina

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Aspectos gerais da biologia do câncer	17
1.2 O Câncer de mama e sua incidência	22
1.3 Ciclo e morte celular	27
1.4 Abordagens terapêuticas para o câncer	30
1.5 O uso de complexos metálicos na quimioterapia	31
1.5.1 Complexos de Rutênio	35
1.5.2 O complexo metálico KP1019	38
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivos gerais	43
3.2 Objetivos específicos	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Síntese do KP1019	44
4.2 RMN: Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	44
4.3 Cultivo e tratamento das células	45
4.4 Análise da viabilidade celular	46
4.5 Alterações estruturais e morfológicas em células de carcinoma mamário 4T1 tratadas com KP1019	47
4.6 Análise estatística	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Síntese do KP1019	48
5.2 Caracterização do composto KP1019 por espectrometria de RMN	48
5.3 Citotoxicidade de KP1019 em cultura de células de carcinoma mamário e fibroblastos	49
5.3.1 Análise de MTT	49
5.3.2 Alterações morfológicas e estruturais induzidas por KP1019 em células tumorais da linhagem 4T1	54
6 DISCUSSÃO	57
6.1 Considerações sobre a síntese e caracterização do complexo KP1019 pelo método Espectroscopia de RMN (Ressonância Magnética Nuclear)	57
6.2 Considerações sobre a citotoxicidade de KP1019 em linhagens celulares de carcinoma mamário 4T1 e fibroblasto NIH-3T3	57
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	63

REFERÊNCIAS	64
--------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da biologia do câncer

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas por proliferação celular anormal e um conjunto de manifestações patológicas. Esta proliferação anormal pode ocasionar metástases devido à capacidade destas células de se espalharem para outros tecidos e órgãos. Este descontrole proliferativo acontece devido às alterações de genes relacionados à diferenciação, proliferação e morte celular (KOOLMAN & ROHM, 2005; PINTO & FELZENSZWALB, 2003; PARMIGIANI & CAMARGO, 2004).

Tumores (também designados neoplasias) são massas de células que se multiplicam anormalmente podendo ser benignos ou malignos (câncer). O tumor benigno, não é chamado de câncer, pois não tem a capacidade de induzir metástase e se trata de um grupo de células que se multiplicam de forma mais lenta, formando uma massa de células parecidas com as células do tecido de origem. Além disso, células tumorais não são invasivas, permanecendo restritos no órgão de origem (ALBERTS et al., 2004; KOOLMAN & ROHM, 2005; KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2005). Já os tumores malignos apresentam capacidade de se espalharem por outros tecidos ocasionando a metástase.

Vários fatores contribuem para o processo de metástase, ou seja, processo de migração das células tumorais para outros tecidos. Todos estes fatores são acompanhados de processos bioquímicos que são ordenados por uma grande variedade de proteínas reguladoras e sinalizadoras (OHNISHI, *et al.*, 1997; DEMUTH & BERENS, 2004), capazes de suportar o movimento celular ativo. Esta mobilidade celular não é exclusiva de células tumorais uma vez que outras células do organismo têm a necessidade de migrar, como por exemplo, as células do sistema imune e grande parte das células durante vários estágios da formação de um embrião. Para que este fenômeno ocorra, a forma e rigidez do corpo celular se modificam para que haja uma interação com a matriz extracelular (MEC), que servirá como substrato para esta migração, ou até mesmo funcione como uma barreira (DEMUTH e BERENS, 2004).

De maneira sucinta, células neoplásicas têm características próprias que as diferem de uma célula normal (**Figura 1**). Essas características são frutos de desordens genóticas que obviamente serão refletidas nos fenótipos dessas células (LIMA, 2014). As células cancerosas, além de proliferarem de forma anormal, também perdem a

capacidade de aderência secretando enzimas que acometem a matriz extracelular, colonizam os tecidos dos órgãos adjacentes e vasos sanguíneos produzindo metástases a praticamente qualquer distância do tumor de origem. Além disso, células cancerosas também secretam substâncias que estimulam a formação de novos vasos capilares (angiogênese) para suprir suas necessidades de maior aporte de oxigênio e nutrientes (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

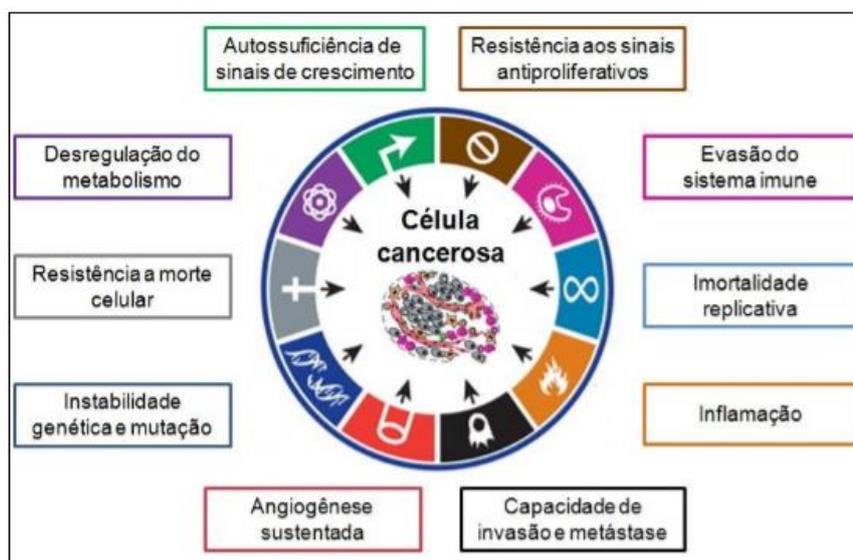


Figura 1: Características das células neoplásicas. A resistência aos sinais antiproliferativos é uma das principais características de uma célula neoplásica, fazendo-a se proliferar continuamente, se destacar do tumor de origem e se espalhar pelo organismo formando as chamadas metástases, que podem se instalar nas regiões próximas à do tumor inicial como também em órgãos distantes dele. **Fonte:** LIMA, 2014.

Sabe-se que para que uma célula se torne maligna basta que uma única célula tenha seu DNA danificado. Dessa forma, a mutação inicial é transmitida para as células-filhas que vão acumulando tais mutações nas gerações seguintes. Depois que esta linhagem de células tenha cerca de cinco ou seis mutações sucessivas, ela dá origem a uma célula cancerosa. Porém, todos os dias, milhões de células sofrem divisão celular normalmente em um ser humano adulto e a cada divisão celular existe a possibilidade de sofrermos o efeito de vários carcinógenos ambientais. Contudo, o aparecimento de uma célula tumoral, de fato, é algo relativamente raro, pois, para isso, a célula em questão deve também conseguir escapar do eficiente sistema de controle do ciclo celular, que será explanado a seguir (WARD, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

Os diferentes tipos de câncer têm uma extensa variedade devido à correspondência aos diferentes tipos de células existentes no corpo. Existem dois tipos principais de câncer: 1º) carcinoma que se refere a tumores oriundos de células epiteliais e 2º) sarcoma que se refere a tumores oriundos de tecidos conjuntivos ou células musculares. Alguns tumores não se enquadram em nenhum tipo citado, como por exemplo, as leucemias (ALBERTS *et al.*, 2010).

A maioria dos cânceres tem sua origem a partir de uma única célula anormal, que pode ter sua mutação devido a fatores de origem interna ou externa ao organismo, sendo as duas relacionadas, ou seja, os fatores genéticos (fatores internos) e/ou ambientais (fatores externos). A relação entre estes fatores aumenta a probabilidade de células normais se tornarem malignas (ALBERTS *et al.*, 2004). Além disso, para uma célula se tornar tumoral é necessário que ocorram várias mutações com o decorrer do tempo na mesma linhagem celular, como mostrado no diagrama da **figura2** (SOUZA, 2014; ALBERTS *et al.*, 2010; KOOLMAN & ROHM, 2005).

Alterações genéticas (mutações) podem causar a ativação de oncogenes (genes estimuladores de divisão celular) ou acarretar perda da função de genes supressores de tumor (bloqueadores ou protetores do ciclo celular) e estas mutações nestes genes são responsáveis pela formação de neoplasias (MIRACCO *et al.*, 1998; OTAKE, 2005; WARD, 2002). Ainda, pode haver anormalidades gênicas que predisõem ao câncer no caso de mutações de origem hereditária. Esses casos representam entre 10 a 20% dos casos de câncer (INCA, 2014; WARD, 2002).

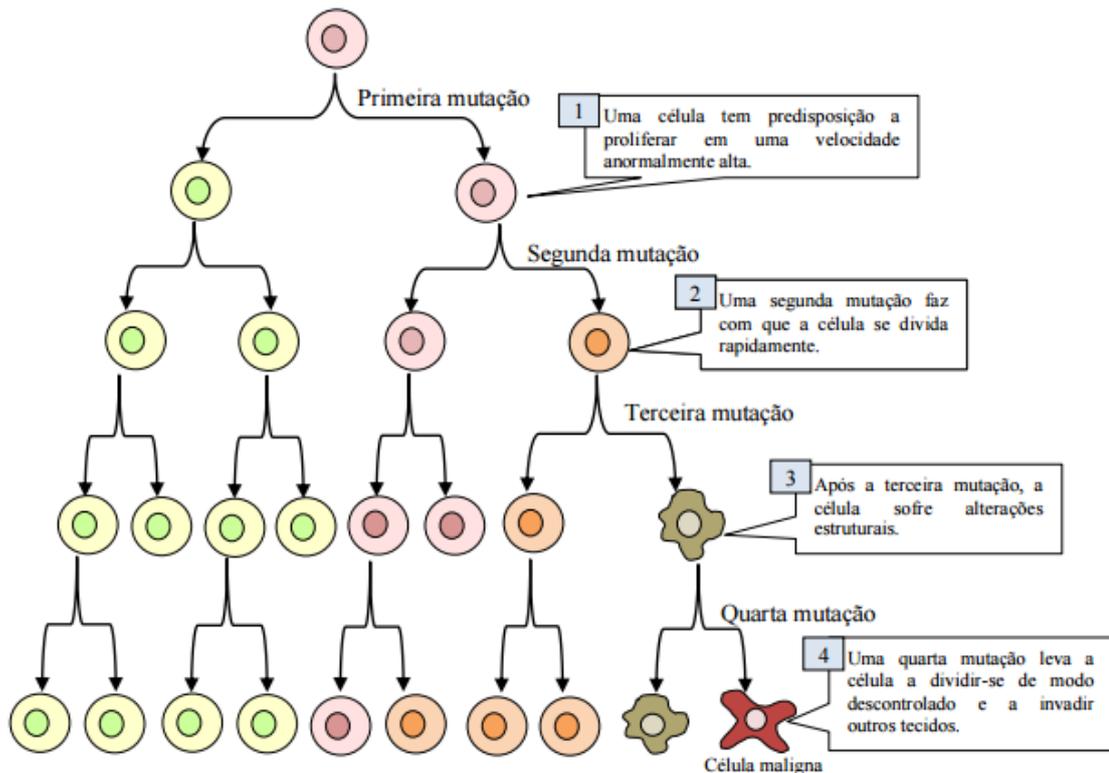


Figura 2: Diagrama da evolução mutagênica na reprodução de uma linhagem celular. O acúmulo de mutações leva a célula a se tornar maligna e agressiva. **Fonte:** SOUZA, 2014.

Os fatores internos também podem estar relacionados com mecanismos epigenéticos. Epigenética é a ciência que estuda as modificações do DNA e das histonas (proteínas responsáveis pela compactação do DNA) e que, por sua vez, não alteram a sequência de bases do DNA. Estas modificações podem, ainda, ser herdáveis (MENDITI & KANG, 2007; OLIVEIRA et al., 2010).

Em relação aos mecanismos epigenéticos, o DNA pode sofrer reação de metilação, que é adição de grupo metil [-CH₃] na citosina que, no geral, precede uma guanina (dinucleotídeo CpG, onde C representa a citosina, G representa a guanina e p representa o fosfato que liga as duas). Os dinucleotídeos CpG aparecem espalhados pelo genoma ou até agrupados em regiões denominadas ilhas CpG (regiões do DNA maiores com mais de 200 pares de bases onde existem aproximadamente 50% de bases C e G e aproximadamente 60% de nucleotídeos CpG). O dinucleotídeos CpG que estão esparsos pelo genoma geralmente estão metilados enquanto os dinucleotídeos CpG das ilhas CpG se encontram desmetilados. Essas ilhas geralmente se localizam em regiões promotoras

dos genes (regiões onde a síntese de RNA começa). As histonas são proteínas que atuam na compactação e descompactação das fitas de DNA, controlando assim a transcrição dos genes. Diferente do que acontece com o DNA, as histonas podem também sofrer metilação, fosforilação e acetilação (OLIVEIRA *et al.*, 2010). A metilação é uma alteração covalente onde um grupo metil (CH₃) é adicionado no carbono 5 de uma citosina do dinucleotídeo CpG (OLIVEIRA *et al.*, 2010), catalisada por enzimas DNA metiltransferases, gerando a 5-metilcitosina (5-MeC) (SOUZA, 2014).

A ingestão de folato, colina e vitamina B12, por meio da nossa dieta alimentar, levam à formação de doadores de radical metil no processo de digestão e estes resíduos metabólicos podem, por sua vez, interagir com o DNA. Além das enzimas que fazem a metilação, há também as enzimas que promovem a desmetilação do DNA (desmetilases). Estas enzimas, envolvidas na reação de desmetilação ativa, são necessárias para ativar genes específicos durante o desenvolvimento ou mesmo como resposta a perturbações ambientais. Existe também a desmetilação passiva, que ocorre quando as desmetilases estão inativas durante o ciclo celular. Além disso, a transcrição gênica pode ser fortemente inibida pela metilação, pois pode inibir a ligação dos fatores de transcrição às regiões metiladas. De modo inverso, a desmetilação leva ao aumento da transcrição gênica (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O nível e o padrão de 5-MeC são determinados por esses dois processos, por isso as enzimas envolvidas nesses processos devem estar sempre muito reguladas (OLIVEIRA *et al.*, 2002), pois a desregulação significa o surgimento de desequilíbrios epigenéticos chamados de hipometilação e hipermetilação. O primeiro se refere à remoção exagerada de grupos metil o que acarreta um aumento na expressão dos genes. Já a hipermetilação promove o silenciamento dos genes, como por exemplo, os supressores tumorais e, por isso, está relacionado com a carcinogênese. Então, uma aberração no padrão de metilação de algum gene pode fazer com que o mesmo perca sua função e isso pode ser muito mais recorrente que a mutação genética (OLIVEIRA *et al.*, 2010; WARD, 2002).

Estudos mostram que os fatores genéticos influem moderadamente no desenvolvimento de câncer ao passo que os fatores ambientais são mais determinantes para esta doença do que qualquer outro (WARD, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Em geral, de todos os casos de câncer, 80 a 90% estão associados à fatores ambientais. Alguns exemplos de câncer comumente desenvolvidos por fatores ambientais são o

câncer de pulmão (que pode ser provocado pelo tabaco), o câncer de pele (que pode ser provocado pela exposição excessiva com a luz solar) e a leucemia (que pode ser provocado por um vírus ou radiação). Existem, ainda, outros fatores relacionados com outros tipos de câncer como consumo excessivo de determinados alimentos e outros fatores cuja relação com o desenvolvimento do câncer é desconhecida (WARD, 2002; INCA, 2014).

Com relação aos fatores de risco comportamentais e ambientais, envolvidos no desenvolvimento de carcinoma, estão incluídos a ingestão excessiva de bebidas alcóolicas, sobrepeso, obesidade, tabagismo e exposição constante à radiação ionizante, como os raios x e radiação gama (INCA, 2014).

Já os fatores de risco genéticos e hereditários estão relacionados à presença de mutações gênicas. Mulheres com predisposição genética, ou seja, àquelas que possuem casos de câncer de mama ou de ovário em seu histórico familiar (principalmente em jovens) podem ter elevado grau de risco para o desenvolvimento desta doença (INCA, 2014).

1.2 O Câncer de mama e sua incidência

O carcinoma mamário (câncer de mama), modelo experimental deste trabalho, é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo considerado o segundo mais comum no mundo, tanto em países desenvolvidos como em subdesenvolvidos. O câncer de mama pode acometer também os homens, porém é bem menos comum, representando cerca de apenas 1% dos casos. No Brasil, 22% dos novos casos de câncer ocorrentes são de mama. Estatísticas comprovam que a incidência deste tipo de câncer cresce cada vez mais em toda a parte do mundo, necessitando, assim, de uma atenção especial e descoberta de novos tratamentos que sejam mais efetivos, pois a taxa de mortalidade é elevada e a sobrevivência dos pacientes portadores da doença é de 61% depois de cinco anos (INCA, 2014).

O desenvolvimento do carcinoma mamário não tem uma causa única. A idade, história reprodutiva, fatores endócrinos, comportamentais e ambientais, assim como fatores genéticos (defeitos que podem ser adquiridos pelos genes, por mutação) e hereditários (herdados dos ancestrais) podem ser determinantes para o aumento do risco do desenvolvimento da doença (INCA, 2014).

Em relação aos fatores endócrinos sabe-se que estes estão relacionados com o histórico reprodutivo já que se relacionam com o hormônio estrogênio. Entre esses, pode-se destacar a menarca precoce (primeira menstruação antes dos 12 anos de idade), menopausa tardia (após os 55 anos), não ter tido filhos e o uso de diversos hormônios (contraceptivo oral, reposição hormonal pós-menopausa) principalmente por tempo prolongado. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), os contraceptivos orais também representam risco para o desenvolvimento do câncer, embora existam estudos que discordem (INCA, 2014).

Nos Estados Unidos da América, a Sociedade Americana de Câncer estima para o ano de 2016, o aparecimento de 246.660 novos casos diagnosticados de carcinoma mamário invasivo em mulheres e 61.000 novos casos de carcinoma mamário *in situ* (não invasivo). A organização prevê ainda a morte de cerca de 40.450 mulheres vítimas dessa neoplasia para este mesmo ano (ASC, 2016).

Antes dos 35 anos de idade, a ocorrência do câncer de mama é relativamente rara, sendo que acima dessa faixa etária, sua incidência cresce rápida e progressivamente. Em 2010, a estimativa era de 49.240 novos casos no Brasil, enquanto que para 2014 a estimativa passou para 57.120 novos casos (INCA, 2014; CINTRA et al., 2012). Para 2016, a previsão é de aproximadamente 57.960 novos casos. Aproximadamente 5 a 10% da ocorrência deste tipo de câncer tem o fator genético como uma das principais causas. Em 2013, o número de mortes por causa da doença foi de 14.216 mulheres e 181 homens. (INCA, 2014).

O carcinoma mamário é classificado de acordo com o tipo de célula da qual se origina o tumor. Na **A figura3** é mostrada a anatomia normal da mama humana, que é formada pelo parênquima que é constituído por (1) lóbulos (glândulas produtoras do leite), (2) ductos (estruturas que consistem em pequenos canais que conduzem o leite produzido para o mamilo) e pelo estroma, que é a designação para os tecidos de suporte (tecido adiposo e muscular) que circundam os lóbulos, ductos e vasos sanguíneos e vasos linfáticos da mama. A maior parte das neoplasias mamárias tem sua origem nos ductos (cânceres ductais *in situ* ou CDIS). Algumas neoplasias começam nas próprias glândulas produtoras de leite e, por isso, esse tipo de câncer é chamado de câncer lobular *in situ* (CLIS). Existem ainda alguns cânceres que se originam de outros tecidos

da mama, porém são classificados como sarcomas ou linfomas e não se classificam especificamente como um câncer de mama (ASC, 2016).

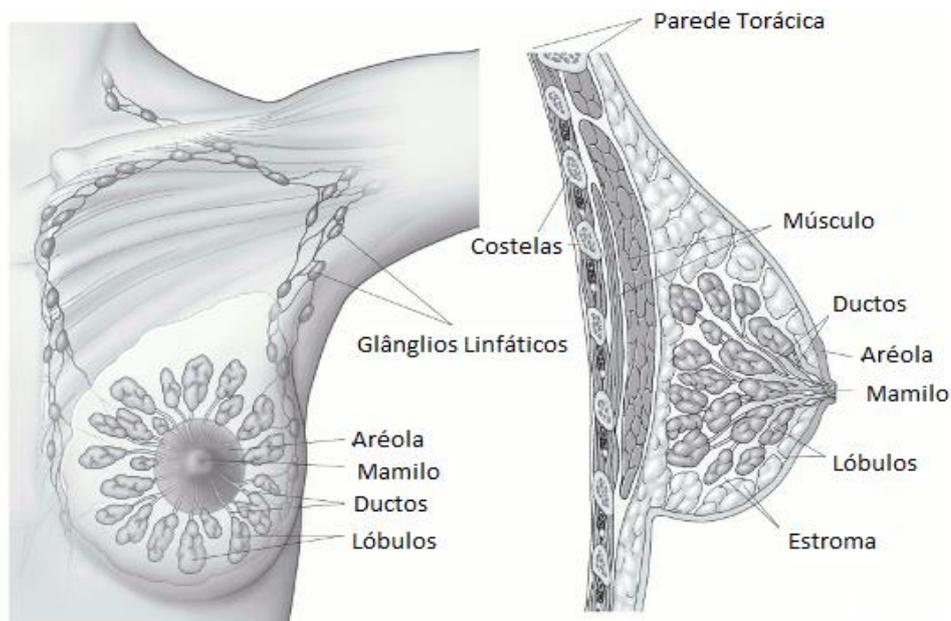


Figura 3: Anatomia normal da mama e região com seus componentes internos e estruturais (lóbulos, ductos, estroma, músculos, costelas e glânglios linfáticos) e **externos** (aréola e mamilos). **Fonte:** Adaptado de <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>

No decorrer da vida, a mulher pode sofrer várias alterações em suas células mamárias, assim sendo, suas glândulas podem apresentar modificações na fisiologia ou anatomia, pois as células podem aumentar em tamanho ou quantidade e, neste caso, estas modificações são denominadas de hiperplasia. Se a hiperplasia ocorrer nos lóbulos então ela é chamada de hiperplasia lobular; se ocorre nos ductos é chamada de hiperplasia ductal. Essas alterações são comuns e podem ser classificadas em típicas ou atípicas. Quando a hiperplasia é típica, significa que se trata de uma alteração benigna na mama, enquanto que a hiperplasia atípica se trata também de uma alteração benigna, mas que está se desenvolvendo de modo anormal podendo representar um risco de evoluir para um câncer (ASC, 2016).

Uma vez desenvolvido o tumor maligno, ele pode se espalhar pelo corpo e produzir metástases em locais distantes por intermédio do sistema linfático que promove a

circulação da linfa por todo o corpo e especificamente nas mamas, possui uma área abrangente como visto na figura anterior e mostrado mais claramente na **figura 4** (ASC, 2016). Na **figura 5** é mostrado o ducto mamário normal e anormal. O mesmo, referente aos lóbulos é mostrado na **figura 6**.

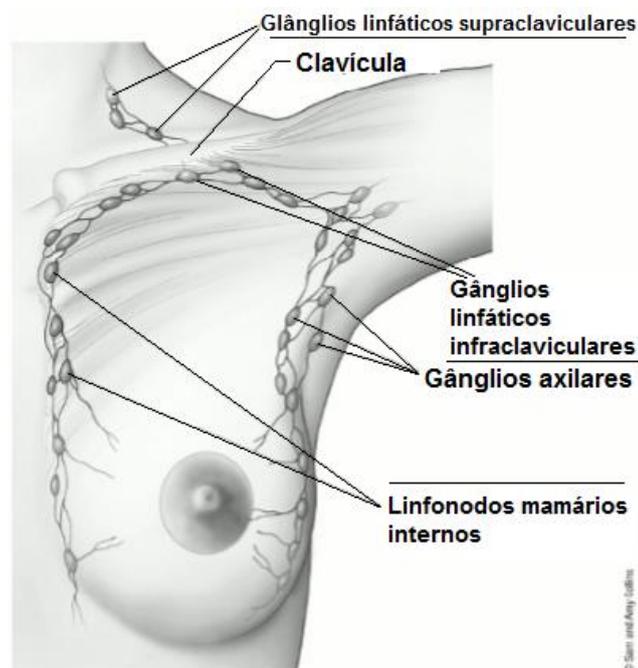


Figura 4: Linfonodos da mama e circundantes a mama. Uma vez atingindo os vasos linfáticos o tumor pode se espalhar pelo corpo através desse sistema. Além disso a ocorrência do tumor original em algum desses linfonodos, mesmo nos linfonodos mamários internos, não é considerado ser câncer de mama. **Fonte:** Adaptado de <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>

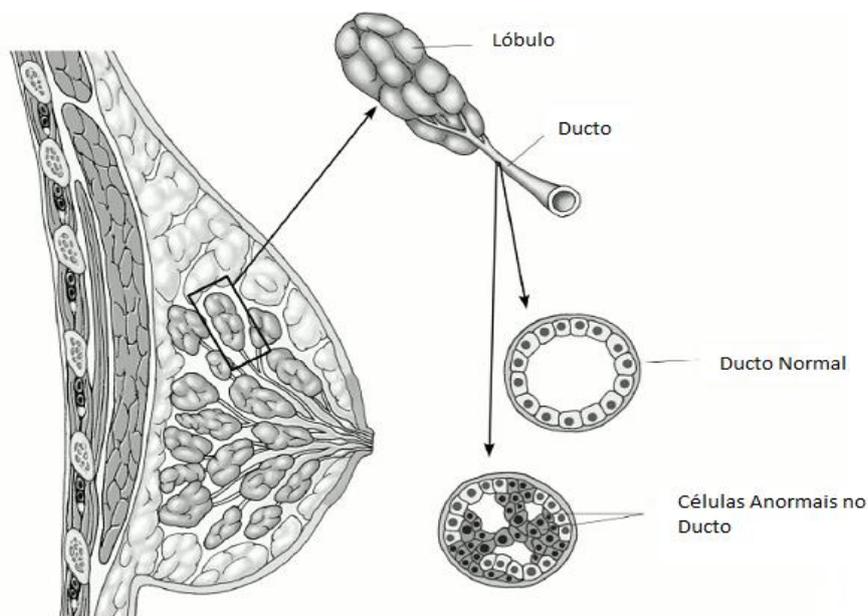


Figura 5: Representação dos Ductos mamários normais e anormais. Nos ductos anormais há uma multiplicação exagerada das células (escuras) ocupando o espaço interno do ducto que é destinada à passagem de leite. **Fonte:** Adaptado de <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>

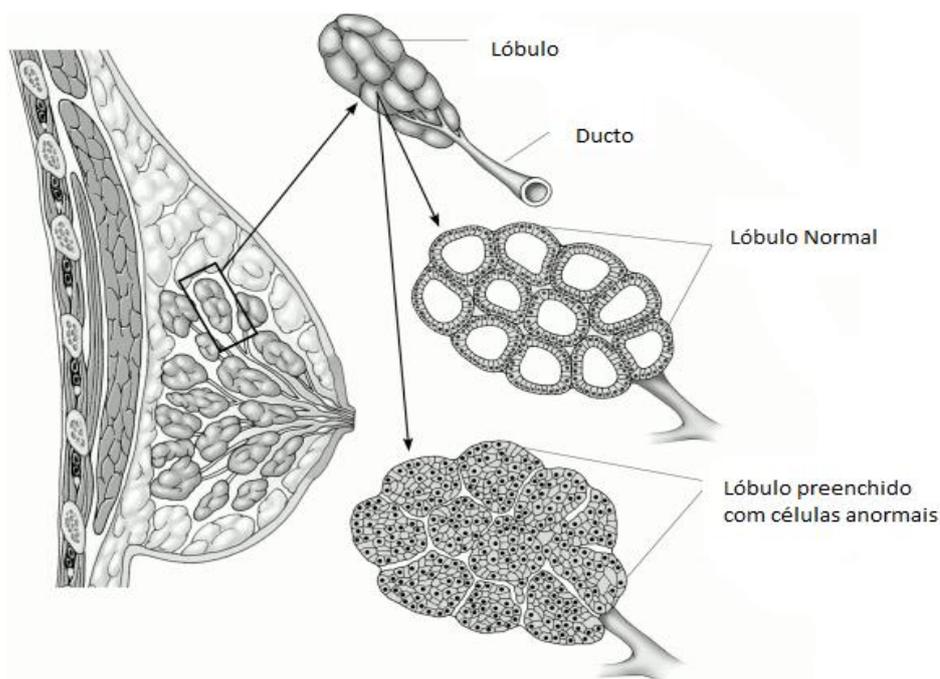


Figura 6: Representação esquemática de lóbulos mamários normais e anormais. No caso dos lóbulos anormais as células indesejadas também tendem a ocupar o espaço interno dos lóbulos, assim como ocorre com os ductos. **Fonte:** Adaptado de <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>

1.3 Ciclo e morte celular

O ciclo celular é formado sequencial e ordenadamente por algumas fases designadas como G₀, G₁, S, G₂ e M (**figura 7**). Em G₀ a célula está diferenciada e está quiescente (dormente em relação ao crescimento). Se ela estiver pronta para a divisão mitótica, entrará na fase G₁, e irá crescer e fabricar as proteínas necessárias para a produção do DNA. É nesta fase que a célula se encontra sensível às condições externas e do meio, podendo, portanto, sofrer alguma mutação por radiação, substâncias químicas. Se as condições não forem favoráveis nesta fase, a divisão celular cessa em G₁. Por isso, a fase G₁ tem o objetivo de decidir entre continuar a proliferação ou se retirar do ciclo e entrar numa fase de dormência (G₀).

Porém, se continuar e ultrapassar o primeiro ponto de controle, o ponto R, (restrição), a divisão celular acontecerá desconsiderando os fatores ambientais. Uma vez passado pelo ponto R, a célula se compromete a finalizar o ciclo mesmo sem estímulos adicionais (WARD, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005). Isto geralmente acontece quando a célula atinge o um valor crítico de proteínas produzidas e tamanho ideal - o dobro do normal geralmente -, fazendo com que o ciclo prossiga (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005). Ainda em G₁, ocorre outro mecanismo de controle responsável por interromper temporariamente o ciclo caso haja a detecção de danos no DNA para que os mecanismos de reparo operem antes da replicação. Nas células de mamíferos, este sinal de parada em G₁ é promovido por uma proteína chamada de p53. Em vários tipos de câncer humano podem ser constatadas mutações da proteína p53 fazendo com que ela perca sua função sinalizadora e, assim, esses danos são transmitidos às células-filhas (WARD, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

A próxima fase (S) é quando o DNA é replicado. Esta é uma fase que leva necessariamente à divisão celular. Em células eucarióticas, o DNA nuclear se apresenta na forma de fibras de cromatina e forma um complexo com proteínas histonas e por isso a cromatina deve sofrer duplicação no período S, exigindo para tanto, não só a duplicação do conteúdo de DNA, mas também a duplicação da quantidade de histonas. Portanto, histonas são as únicas proteínas cuja síntese está restrita à fase S, ocorrendo simultaneamente com a produção de DNA (WARD, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

No início da fase G2 existe outro ponto de controle que verifica a qualidade do DNA replicado. Se tudo estiver favorável, a célula entra na fase M (mitose) onde o DNA duplicado será dividido entre as duas novas células. Se for constatada alguma anormalidade na divisão dos cromossomos no ponto de controle, a mitose será impedida (WARD, 2002).

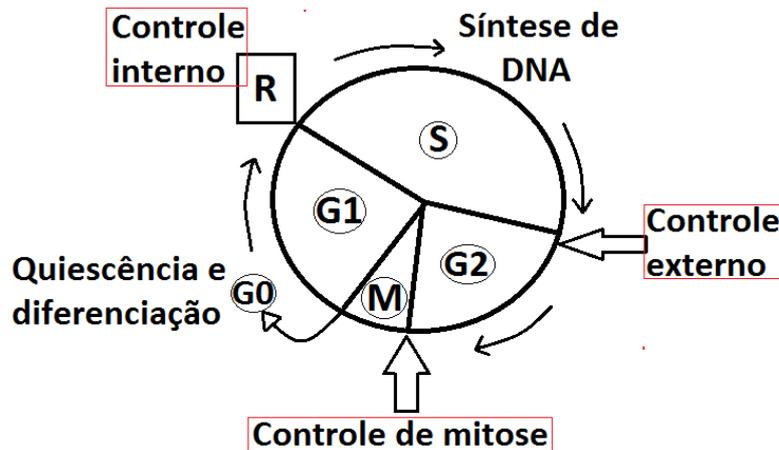


Figura 7: Pontos de controle do ciclo celular. No primeiro ponto de controle R, é verificado se a célula atingiu o tamanho adequado, a quantidade suficiente de nutrientes e a adesão ideal. No ponto de controle externo é verificado se a replicação do DNA está completa e se algum possível dano foi corrigido. No controle de mitose é conferido se os cromossomos estão unidos no fuso de maneira apropriada. **Fonte:** Adaptado de WARD, 2002.

A fase M, abreviação para mitose, é quando ocorre de fato a divisão celular tanto preparada durante a intérfase. Mesmo ela sendo a fase de menor duração, é subdividida em quatro estágios (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005). Resumidamente em cada estágio ocorre o seguinte: na prófase, as fibras de cromatina se condensam formando os cromossomos. O envoltório nuclear se rompe e os cromossomos são direcionados para a região equatorial da célula. Na metáfase é quando os cromossomos atingem a condensação máxima e se alinham ligadas aos polos opostos das células. Na anáfase ocorre a separação e a migração das cromátides para os polos da célula. Finalmente, na telófase, os cromossomos alcançam os pólos, os núcleos se reconstituem e todo o conteúdo citoplasmático se divide dando origem às células filhas. Finda esta fase, as células-filhas estarão todas organizadas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

Por outro lado, as células também podem sofrer morte celular e existem três mecanismos de morte celular, sendo que dois deles tem a importante função de controlar a quantidade e qualidade das células do organismo, se valendo de mecanismos de autodestruição de células muito lesadas ou com mutações em seu DNA. Tais mecanismos então ajudam a minimizar ainda mais as chances de uma célula mutante desenvolver o câncer (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005). Os três tipos de mortes celulares mais conhecidos são apoptose, necrose e autofagia (CARNEIRO, 2007).

A apoptose é a morte celular mais frequente e consiste em um mecanismo programado, rápido e controlado por expressões gênicas. Neste tipo de morte celular não ocorre inflamação e o material intracelular não é exteriorizado, ou seja, não entra em contato com o meio externo. Neste processo, a célula encolhe, perde a aderência com as células vizinhas e/ou com a matriz extracelular, se condensa e fragmenta o núcleo e seu conteúdo citoplasmático sem romper a membrana, formando assim várias pequenas vesículas apoptóticas que são reconhecidas por macrófagos e em seguida fagocitadas sem afetar nenhuma outra célula. Assim esse tipo de morte celular é chamado de “morte celular silenciosa” (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005; CARNEIRO, 2007).

A outra via de morte celular é chamada de autofagia e também consiste em uma morte programada que ocorre quando a célula passa por um estresse metabólico que finda por degradar seus componentes celulares. Ela é chamada de “suicídio celular” e, neste tipo de morte, ocorre uma reciclagem de seus componentes celulares (BERTOLLO, 2010). Porém é ainda mais comum o processo de autofagia ser utilizado pela própria célula não para se autodestruir, mas para reciclar porções de seu meio citoplasmático e organelas que alteradas ou que não são mais necessárias nas células. Este processo é realizado por vesículas denominadas vacúolos autofágicos ou autofagossomos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

A necrose é um tipo de morte celular que é mais agressivo, descontrolado e ocorre “acidentalmente” quando a célula sofre uma agressão intensa que pode ocorrer por fatores físicos, químicos, infecciosos, biológico, entre outros. Neste caso, ocorre a ruptura da membrana plasmática da célula e, por consequência, o espalhamento do conteúdo intracelular no meio que gera uma resposta inflamatória, afetando células

vizinhas e assim aumentando a lesão no tecido (GRIVICICH1 & REGNER & ROCHA, 2007).

1.4 Abordagens terapêuticas para o câncer

Atualmente, o tratamento do câncer é realizado, convencionalmente, por meio de radioterapia (tratamento que se utiliza de radiação para destruir um tumor ou impedir que suas células aumentem), quimioterapia, hormonioterapia e até mesmo cirurgia. Mais de um tipo de tratamento pode ser utilizado, dependendo do tipo de câncer e de seu estágio de desenvolvimento. Porém, estas formas de tratamento não são efetivas se o câncer já estiver em estágio avançado (INCA, 2014).

Na quimioterapia, medicamentos são administrados ao paciente e estes podem provocar um efeito sistêmico já que são conduzidos por meio da corrente sanguínea. Porém, o grande problema deste método é que os medicamentos não afetam apenas as células tumorais, mas também células saudáveis (efeito sistêmico) e, por isso, causam efeitos adversos ao paciente (BRANNON-PEPPAS e BLANCHETTE, 2004). Além disso, até mesmo os cânceres mais comuns dificilmente são curados se já estiverem em fase metastática. Dessa forma, esta abordagem terapêutica, às vezes, é utilizada como um tratamento paliativo, e não curativo, tendo o objetivo de melhorar a qualidade de vida do paciente (WARD, 2002).

Recentemente, novas abordagens preventivas estão sendo estudadas na tentativa de impedir o aparecimento e/ou desenvolvimento da doença. Este método chamado de quimioprevenção consiste em utilizar compostos naturais ou sintéticos com o objetivo de reverter, retardar ou prevenir a carcinogênese (EUN-YI KO & AREE MOON, 2015).

A quimioterapia é, provavelmente, o tipo de tratamento mais conhecido contra o câncer e consiste na aplicação de um ou mais medicamentos classificados como antineoplásicos. Essas drogas são citotóxicas e interferem nos mecanismos de sobrevivência, proliferação e migração das células. Os quimioterápicos, em sua maioria, agem no momento da divisão celular. Alguns atuam em determinadas fases do ciclo de duplicação e outros, como a cisplatina, atuam em todas as fases do ciclo celular (BITTENCOURT & BRUNSTEIN, 2006).

Os quimioterápicos não agem exclusivamente nas células tumorais do organismo. Eles também agem nas células normais agredindo-as, o que gera os vários efeitos

adversos comuns em pacientes submetidos a este tratamento. As células normais mais afetadas pela quimioterapia são as células da medula óssea, pelos e mucosas do tubo digestivo (RODRIGUES & PALIDORI, 2012; UNTURA & REZENDE, 2012). As células normais apresentam um tempo de recuperação previsível, diferente das células neoplásicas, e por isso, as sessões de quimioterapia são realizadas em ciclos periódicos, que visam à recuperação da mucosa do tubo digestivo e das células da medula óssea (BITTENCOURT & BRUNSTEIN, 2006). Além disso, estudos indicam que esses efeitos adversos podem resultar em perda cognitiva em alguns casos a longo prazo (UNTURA & REZENDE, 2012).

Com o decorrer do tempo, houve grande evolução com relação aos quimioterápicos utilizados, pois a cada dia, novas drogas são descobertas buscando um maior potencial para combater a doença e um meio para que o fármaco seja entregue apenas às células cancerosas para que haja menores efeitos adversos visando a melhora da qualidade de vida do paciente (INCA, 2014).

Em vista dos pontos tratados sobre esta doença no presente trabalho, o câncer de mama é uma doença que representa um importante problema de saúde pública mundial. Trata-se de uma patologia cada vez mais frequente, agressiva, temida, muitas vezes fatal e dispendiosa quanto ao seu tratamento. É preciso que haja alternativas terapêuticas eficientes para combatê-la. Neste sentido, alguns complexos metálicos têm sido bastante estudados com este propósito.

1.5 O uso de complexos metálicos na quimioterapia

Há séculos que complexos metálicos são utilizados na quimioterapia para o combate ao câncer. Um deles, talvez o mais popular e que é utilizado até hoje, é a cisplatina. Ela foi sintetizada pela primeira vez no ano de 1845 (ANTUNES & BIANCHI, 2004). Porém, sua descoberta como agente antitumoral ocorreu acidentalmente quando Rosenberg et al. (1965) estudavam os efeitos dos campos elétricos sobre o crescimento celular bacteriano de *Escherichia coli*. Para o experimento, utilizando eletrodos de platina (Pt) dentro de soluções de cloreto de alumínio, os autores observaram que as células bacterianas pararam de realizar a divisão

celular, descobrindo assim que os eletrodos se dissolviam na solução formando um complexo metálico de platina, causando a morte das células.

A estrutura da cisplatina é formada por um átomo de platina no centro do composto, como é mostrado na **figura 8**. Para ser utilizada na quimioterapia, a cisplatina é administrada via intravenosa ou intraperitoneal e seu principal alvo celular é o DNA, mas também age em várias outras estruturas como o RNA, membranas e proteínas (ANTUNES & BIANCHI, 2004).

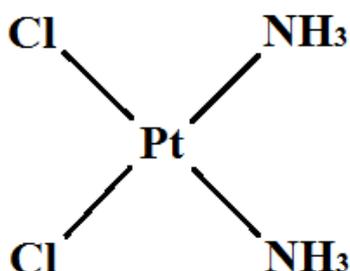


Figura 8: Fórmula estrutural da cisplatina. O átomo de platina se encontra no meio, circundado por 2 átomos de cloro e 2 moléculas de amônia na posição cis. Fonte: Adaptado de ANTUNES & BIANCHI, 2004

A cisplatina é um complexo metálico de coordenação com estrutura plana. É hidrossolúvel e sua ação é análoga a dos agentes alquilantes, que conseguem formar ligações covalentes com o DNA tendo como etapa principal a formação de um íon de carbono. A cisplatina, ao entrar na célula, perde o Cl⁻ gerando assim um complexo reativo que reage com a água e depois interage com o DNA, alterando sua estrutura e consequentemente induzindo a morte celular (RANG & DALE, 2007). Todos os compostos de platina que hoje são utilizados na clínica, em pacientes com câncer, possuem o mesmo mecanismo de ação que a cisplatina, ou seja, eles também formam ligações com o DNA das células (entre elas, também as saudáveis, que também são muito afetadas devido estarem em processo de divisão celular) de modo que o sistema de reparação de DNA dificilmente consiga reverter a situação, ativando os mecanismos de morte celular. Vários mecanismos foram propostos para explicar este efeito, o mais aceito especifica que as ligações com a cisplatina ocorrem dentro (intra), e por vezes, entre (inter) cadeia e, mais comumente, entre os resíduos de guanina de DNA, criando assim distorções na hélice de DNA e impedindo os processos de transcrição. Por isso, a célula é conduzida à morte por apoptose e necrose (BERGAMO & SAVA, 2015).

A cisplatina é uma droga antineoplásica potente e muito utilizada no combate ao câncer, sendo especialmente empregada em tumores do testículo, do ovário, melanomas malignos, tumores de cabeça e pescoço e carcinomas da bexiga e pulmão (HYPPOLITO et al., 2005; ANTUNES & BIANCHI, 2004). Porém, este quimioterápico tem uma desvantagem bastante limitadora: induz uma toxicidade elevada ao organismo e isto acarreta em vários efeitos adversos (LI et al., 2011) como náuseas, vômitos, supressão da medula óssea, ototoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade (HYPPOLITO et al., 2005; ANTUNES & BIANCHI, 2004).

Segundo estudos de Wheate et al. (2010), das principais drogas à base de platina que foram criadas com potencial antineoplásico, apenas cinco foram aprovadas enquanto 14 tiveram seu uso descontinuado devido a alta toxicidade e quatro se encontram em diversas fases de testes clínicos. As drogas aprovadas são: Carboplatina e Oxaliplatina (aprovadas em todo o mundo), Nedaplatina (aprovada no Japão), Lobaplatina (aprovada na China), Heptaplatina (aprovada na República da Coreia). As drogas que tiveram de ser descontinuadas foram JM11, NSC170898, Ormaplatina, Sebriplatina, Enloplatina, Zeniplatina, Spiroplatina, Cycloplatom, Iproplatina, Miboplatina, TRK-710, SPI-077, Aroplatina, BBR3464. Os medicamentos que atualmente estão em testes clínicos são Satraplatina, Picoplatina, ProLindac e Lipoplatina, sendo que os dois primeiros são ativos se tomados por via oral e estão próximos de serem aprovados e comercializados (WHEATE et al., 2010).

O uso da cisplatina juntamente com outras drogas é algo que também vem sendo explorado na tentativa de encontrar uma associação que não diminua o potencial antineoplásico da cisplatina e reduza o impacto de seus efeitos adversos. Em um trabalho de Fabrício *et al.* (2008), foi descrito um tratamento de baixo custo em pacientes com câncer de cabeça, pescoço e esôfago avançados, onde foram ministradas cisplatina, 5-fluorouracilo e leucovorina (CFL). Os resultados deste indicam que o tratamento ambulatorial de CFL parece ser relativamente favorável e possui uma toxicidade tolerável. Porém, para se comprovar a viabilidade deste tratamento, estudos mais aprofundados devem ser realizados.

Assim, pesquisas sobre quimioterápicos eficientes buscam a descoberta de novos complexos metálicos que possuem uma citotoxicidade similar à da cisplatina, porém, que sejam menos agressivos ao organismo. Vários outros complexos metálicos, como

complexos de ródio e rutênio, foram descobertos com a citotoxicidade comparável à da cisplatina, sua inclusão nos testes clínicos é cautelosa, devido aos altos índices de toxicidade de tais substâncias (ZHANG e LIPPARD, 2003).

Carboxilatos de Ródio (**figura 9**), (fórmula geral $[\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CR})_4]$), representam uma classe de complexos metálicos que apresentam considerável potencial antitumoral e atividade carcinostática em vários tipos de tumores. Porém, o mecanismo de ação destes complexos no organismo ainda não foi totalmente compreendido. Mas acredita-se que a atividade antitumoral destes complexos esteja relacionada a um mecanismo de inibição de síntese de DNA e proteínas, similar ao que ocorre com a cisplatina. Foi demonstrado que estes tipos de complexos de ródio (II) podem interromper a síntese e o processo de transcrição do DNA, pois podem fazer ligações diretas com nitrogênio, enxofre, oxigênio e fósforo, desestabilizando assim os nucleotídeos no DNA e, isto, demonstra o elevado potencial destes complexos para uso na quimioterapia para o câncer (KATSAROS e ANAGNOSTOPOULOU, 2002).

O citrato de ródio (II) ($\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$) (**figura 10**), cuja nomenclatura sugerida é tetrabis(μ -O,O-citrato) de dirródio (II), é um membro de carboxilatos de ródio e é um complexo de dois núcleos formado pela ligação em ponte de quatro íons citrato a uma unidade dimetalica Rh^{2+} - Rh^{2+} . Neste complexo há uma cadeia fechada composta por dois íons de ródio ligados à água em sua posição axial e por quatro grupos citrato. Os grupos citrato são formados por três carboxilas que podem estar na posição alfa ou beta (CARNEIRO *et al.*, 2011). Este tipo de carboxilato apresentou atividade citotóxica, citostática, e antitumoral em células de carcinoma mamário da linhagem Ehrlich e em células tumorais e normais da adrenocortical (AR-1(6)) (ZYNGIER, KIMURA e NAJJAR, 1989) e para células de carcinoma mamário das linhagens MCF-7 e 4T1 em estudos *in vitro* (CARNEIRO *et al.*, 2011) e *in vivo* (CARNEIRO *et al.*, 2013, PEIXOTO *et al.*, 2014).

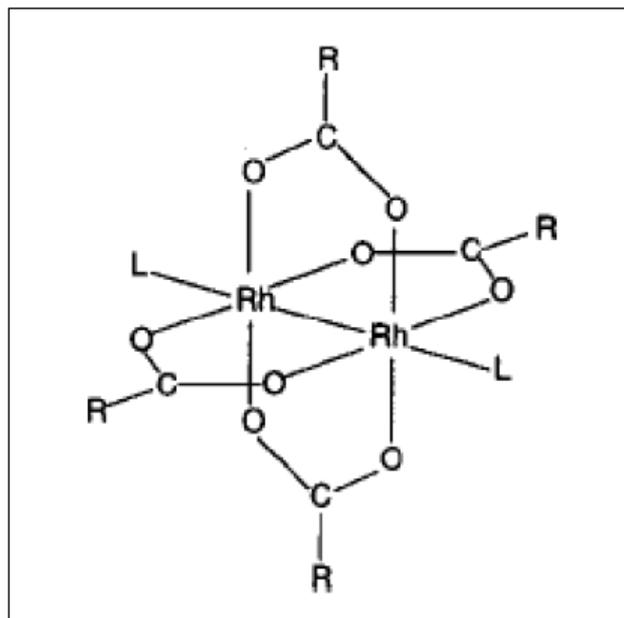


Figura 9: Estrutura química geral dos carboxilatos de ródio. Fonte: <http://qnint.s bq.org.br/novo/index.php?hash=tema.31>

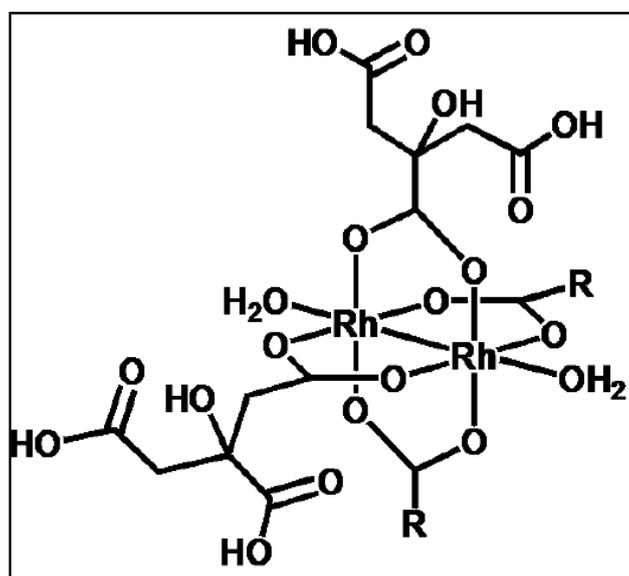


Figura 10: Estrutura química do citrato de ródio. Fonte: PEIXOTO et al., 2012

1.5.1 Complexos de Rutênio

Existem vários complexos contendo o metal rutênio que possuem potencial como drogas quimioterápicas e, por isso, atualmente, estão sendo estudados para a síntese de compostos. Esses complexos metálicos com rutênio estão sendo sintetizados a fim de se obter os mais diversos efeitos antitumorais, que a depender da estrutura e

propriedades do complexo, podem causar lesão no DNA (BERGAMO et al., 2003), desregulação da proliferação celular (ZORZET et al., 2000) e até desregulação das proteínas relacionadas com migração, invasão e metástase (BERGAMO et al., 2002). Isto se deve às propriedades das drogas com rutênio que sugerem uma possibilidade de obter drogas antitumorais inovadoras se comparadas às drogas a base de platina que possuem algumas desvantagens como a atividade terapêutica limitada e elevada toxicidade. Quimioterápicos com rutênio poderiam, assim, representar novas perspectivas quanto ao tratamento do câncer (BERGAMO & SAVA, 2011).

Os primeiros trabalhos utilizando complexos de rutênio foram realizados entre 1975 e 1985 e, graças a eles, importantes descobertas foram feitas, como por exemplo a hipótese dos complexos de rutênio agirem seletivamente através (1) do mecanismo de ativação pela redução (proposto por Michael Clarke), podendo, em meio fisiológico reduzir facilmente a estados de oxidação Ru (II, III e IV) (BERGAMO & SAVA, 2011; JAKUPEC et al., 2007); (2) do transporte de rutênio às células cancerosas por transferrina; (3) da ligação ao DNA diferente do que nas drogas de platina (BERGAMO & SAVA, 2011); (4) da geometria de coordenação octaédrica, diferente das drogas baseadas em platina que apresentam uma geometria quadrática planar, o que causa uma reatividade e modo de ação diferente da cisplatina; (5) da habilidade de ajustar as taxas de transferência de elétrons e potencial redox (JAKUPEC et al., 2007). Ainda, segundo Fisher et al. (2014) outras vantagens dos compostos com rutênio como geometria octaédrica que oferece possibilidades exclusivas ao ligar-se com ácidos nucleicos; (6) cinética de substituição de ligantes semelhante à cisplatina.

Estudos mostram que drogas de rutênio têm gerado um maior interesse nos últimos 20 anos, pois, comparados com as drogas à base de platina, aquelas baseadas em rutênio são menos tóxicas e ainda superam a resistência induzida pela platina às células neoplásicas (BERGAMO & SAVA, 2011). Os complexos de rutênio que têm se mostrado promissores na atualidade são principalmente o NAMI-A e o KP1019 (GLIGORIJEVIĆ, 2011).

Vários compostos de Ru(III) que apresentam o DMSO (dimetilsulfóxido) como ligante se destacaram na literatura graças às suas propriedades antitumorais, sobretudo o composto de nome NAMI, $NA\{trans-[RuCl_4Im(DMSO)]\}$, (NAMI quer dizer *New Antitumor Metastasis Inhibitor*, ou Novo Antitumoral Inibidor de Metástases) que é

ativo para tratamento de carcinoma de Lewis de pulmão, melanoma B16 e carcinoma mamário MCA e ainda possui propriedades anti-metastáticas que a cisplatina não possui. O NAMI-A surgiu depois, derivado do NAMI. O íon Na^+ é substituído pelo ImH^+ , deixando sua fórmula da seguinte forma: $[\text{ImH}^+]\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Im})(\text{DMSO})]\}$. O NAMI-A foi reportado por Mestroni *et al.* (1989) em Trieste na Itália e foi o primeiro complexo de rutênio a entrar em testes clínicos. Ambos compostos apresentam baixa toxicidade, citotoxicidade em células tumorais *in vitro*, mas não inibem o crescimento dos tumores primários. Entretanto, exibem efeito anti-metastático, pois afetam a mobilidade das células cancerosas; habilidade de imitar o ferro nas ligações com biomoléculas do soro humano como o que acontece para ser carregado pela transferrina até as células cancerosas (SOUZA, 2014; BERGAMO *et al.*, 2002).

Estudos da estrutura e da atividade do composto NAMI-A mostram que a atividade deste composto está relacionada à liberação progressiva de ligantes cloretos. Tais estudos apontam que o centro metálico de Ru(III) sofre redução pela ação de biomoléculas do plasma sanguíneo (como a albumina e a transferrina) como é proposto pela já citada hipótese de “ativação por redução”. Então, a ativação dos complexos de Ru(III) para que se tornem ativamente antitumorais (ou mais precisamente anti-metastático como no caso do NAMI-A), dependem das moléculas biológicas que funcionam como redutores biológicos. O que não se tem certeza até o momento é como esses compostos exercem sua ação através da interação direta com o DNA. Sabe-se apenas que alta toxicidade está relacionada com uma alta danificação do DNA (SOUZA, 2014), e quanto mais oxidantes os complexos de rutênio, mais citotóxico eles serão nas células (SOUZA, 2014; JAKUPEC, 2005).

O NAMI-A (trans-imidazoldimetilsulfoxidotetraclororutenato) (**figura 11C**) teve resultados surpreendentes na inibição metastática de câncer de pulmão e na inibição de câncer metastático em modelos animais (SAVA *et al.*, 1998, 1999). Em 2008 este complexo completou com sucesso a primeira fase de estudos clínicos no Instituto de câncer de Amsterdã, na Holanda (BENADIBA, 2008) e também a segunda fase (SOUZA, 2014). Este composto causa interferências da célula tumoral com a matriz extracelular, aumenta a adesão de células actino dependentes, inibe degradação da matriz pelas metaloproteinases de matriz, e reduz a capacidade de migração e invasão das células, o que dá origem a uma célula tumoral de fenótipo menos maligno (JAKUPEC *et al.*, 2007).

O composto de Ru(III), KP1019 ($[\text{IndH}]\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]\}$, em que ind = indazol) foi desenvolvido por Keppler et al. (1989), em Viena, Áustria. Seu desenvolvimento foi baseado em um composto antitumoral análogo chamado ICR, $[\text{Imd}]\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Im})_2]\}$, (**Figura 11A**) que não apresentou atividade em tumores induzidos em cólon de ratos. (SOUZA, 2014; HARTINGER *et al.*, 2006).

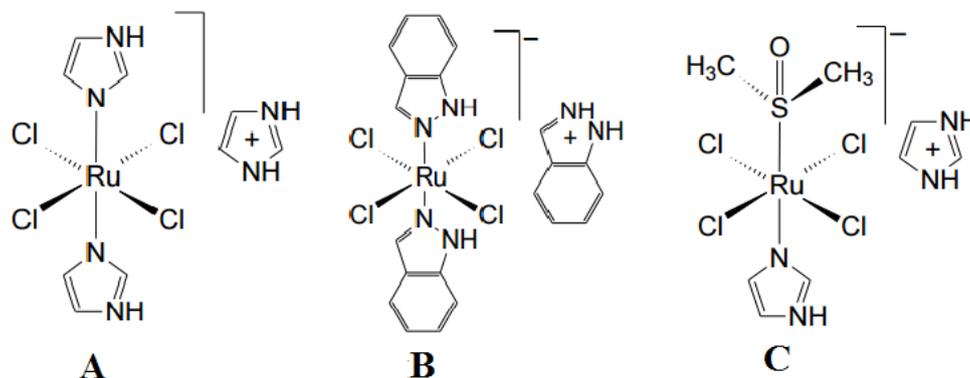


Figura11: Fórmulas estruturais dos complexos de Rutênio (III). (A)- $[\text{Imd}]\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Im})_2]\}$ (ICR); (B)- $[\text{IndH}]\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]\}$ (KP1019); (C)- $[\text{ImH}^+]\{\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Im})(\text{DMSO})]\}$ (NAMI-A).

Segundo Trávníček *et al.*(2011) embora o NAMI-A e o KP-1019 tenham similaridades químicas e estruturais, os dois complexos apresentam comportamentos citotóxicos diferenciados. O NAMI-A apresentou efeitos inibitórios contra metástases de diversos tipos em testes com animais, mas parece carecer de efeitos citotóxicos diretos, enquanto que o KP1019 apresentou uma atividade tumoral direta em vários tipos de tumores primários humanos que levam à indução de apoptose. Essas diferenças são devido aos diversos modos de ação desses dois complexos.

1.5.2 O complexo metálico KP1019

O KP1019 (**figura 11B**) é uma nova droga inibidora de tumores, cujo mecanismo envolve seu acúmulo em receptores de transferrina das células tumorais e também a redução das espécies Ru (III) no ambiente tumoral redutivo, ou seja, ele é ativado por redução (TRÁVNÍČEK *et al.*, 2011). Sua fórmula molecular é $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{Cl}_4\text{N}_6\text{Ru}$ e sua massa molar é 598,3 g/mol. A atividade citotóxica deste complexo sobre células murinas de carcinoma mamário será investigada neste estudo.

Este composto se mostrou bastante promissor no combate a tumores primários de vários tipos, mas o que apresentou maior sensibilidade ao fármaco foi o câncer de cólon (HEFFETER *et al.*, 2010).

O complexo KP1019 foi sintetizado com a finalidade de se obter um fármaco que interagisse com o DNA de forma que esta interação causasse o rompimento da cromatina e, conseqüentemente, a morte da célula de uma maneira diferente da cisplatina, que seria conseguido graças à sua geometria octaédrica que pode promover atividades diferentes (BERGAMO & SAVA, 2011).

O KP1019 é considerado um fármaco ativado por interações com diferentes componentes celulares e não só o DNA. Ele ativa mecanismos de morte celular devido a provável interação com moléculas responsáveis pela sobrevivência da célula. Sabe-se que ele promove a apoptose através da via mitocondrial, mas o mecanismo exato que explicaria este caminho até o resultado da morte celular ainda não foi totalmente elucidado (BERGAMO & SAVA, 2011).

Estudos sobre a interação do KP1019 com o DNA mostraram que seu modo de ação é similar à cisplatina; entretanto, com intensidade de aproximadamente 15 vezes menor no que se referem às ligações cruzadas DNA-DNA e DNA-proteína (BERGAMO *et al.*, 2012). Em estudos prévios mostrou-se que o antitumoral KP1019 mata células de câncer de colo retal através de apoptose (KAPITZA *et al.*, 2005; STEVENS *et al.*, 2012). Porém seu mecanismo exato ainda não foi completamente elucidado. A **figura 14** mostra o mecanismo proposto para KP1019 por Jakupec *et al.* (2007).

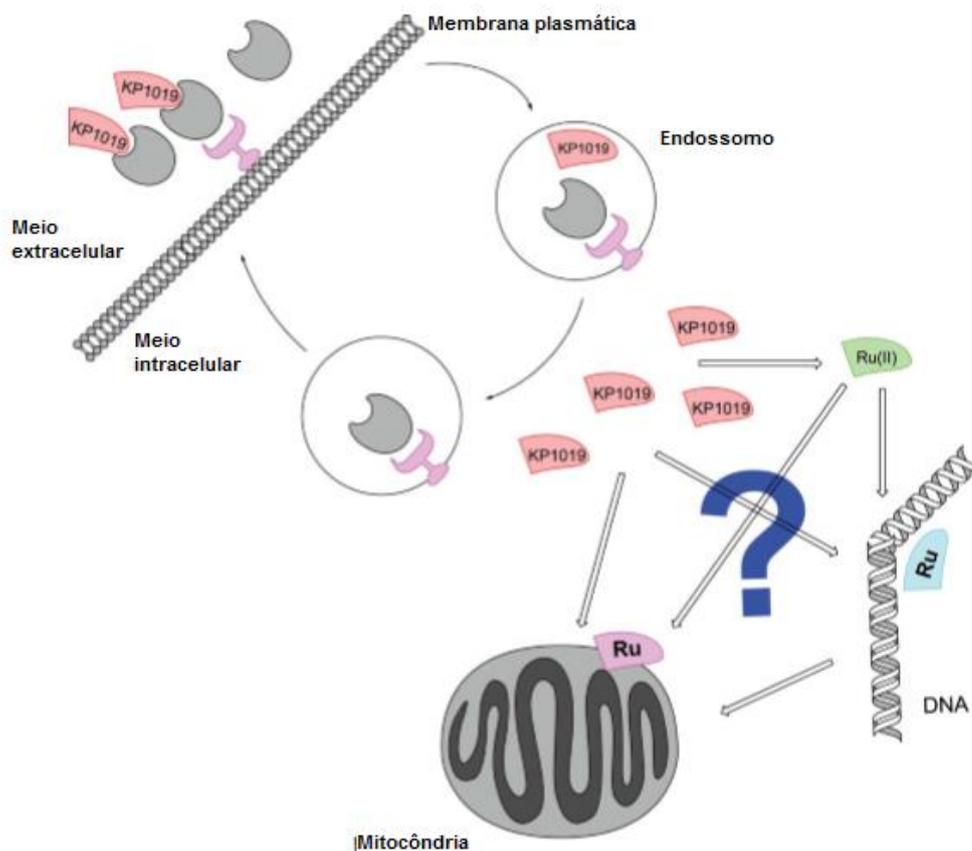


Figura 12: Esquema representando o mecanismo proposto para a ação do KP1019 dentro das células tumorais. Ele é internalizado através dos receptores de transferrina, sofre redução para Ru (II) e provavelmente ataca o DNA por via mitocondrial. **Fonte:** JAKUPEC *et al.*, 2007.

KP1019 é ministrado por via intravenosa e, por isso, tem as proteínas como sendo as primeiras moléculas de ligação na corrente sanguínea. Este é um passo importante no seu modo de ação. Considerando que nas células tumorais há o aumento de permeabilidade e efeito de retenção, assim como maior número de receptores de transferrina, graças à sua maior necessidade de ferro que células normais têm, a ligação do KP1019 às proteínas séricas torna-se a promissora ferramenta de direcionamento às células tumorais (JAKUPEC *et al.*, 2007).

Ademais, segundo experimentos com leveduras realizados por Stevens *et al.* (2012), KP1019 induziu à morte as células de *S. cerevisiae* com maior eficiência de acordo com a dose, ou seja, ele tem efeito citotóxico dose dependente. Além disso, KP1019 é internalizado pela célula a partir dos receptores de transferrina, mas como as leveduras não utilizam esta via para absorção de ferro, o KP1019 ficou associado às células que tiveram contato com o complexo por um tempo de duas horas.

Segundo Fischer *et al.* (2013), o estado de oxidação +3 do KP1019 faz com que ele tenha uma baixa reatividade geral, resultando em baixa solubilidade, principalmente a pH fisiológico (CHANG *et al.*, 2016). Assim, na fase II dos ensaios clínicos, KP1019 não obteve progresso em razão de sua baixa solubilidade (AITKEN *et al.*, 2012; FISCHER *et al.*, 2013). Por isso, pesquisas estão sendo realizadas na tentativa de criar novas formulações mais solúveis para o KP1019 ou o desenvolvimento de nanopartículas que se associem à molécula, deixando-a mais solúvel como, por exemplo, micelas lipídicas. Fischer *et al.* (2013) associaram o KP1019 à *tween* 80, dando origem a um rutênio mais estável.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é uma das doenças mais incidentes nas mulheres e é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo e de alta mortalidade. Os problemas e consequências dessa doença não se resumem apenas nisso; o tratamento é dispendioso, as cirurgias geralmente fazem a retirada da(s) mama(s) da mulher, o que reflete negativamente em sua autoestima e confiança e, ainda, o câncer de mama é um tumor com alta probabilidade metastática se não for diagnosticado cedo refletindo em prognóstico desfavorável. Frente a isso, é necessária a busca por tratamentos mais eficazes que combatam mais efetivamente a doença e que permitam melhor qualidade de vida (menos efeitos adversos) aos pacientes.

O complexo metálico KP1019 tem sido um importante alvo de pesquisas no campo oncológico e tem se mostrado um eficiente agente antitumoral e, por isso, sua atuação em células deve ser esclarecida através de experimentos que demonstrem sua eficiência, toxicidade e potencial anti-metastático em vários modelos experimentais tanto *in vitro* como *in vivo*.

O KP1019 tem propriedades antitumorais já conhecidas há alguns anos, porém, este pode não agir da mesma forma ou ter a mesma citotoxicidade em distintas linhagens celulares. Nosso grupo tem se dedicado a estudar o efeito citotóxico e antitumoral de vários complexos metálicos em várias linhagens de células de carcinoma mamário. Assim, neste estudo, em específico, foi avaliado o efeito do KP1019 na linhagem de carcinoma mamário 4T1, visto que não se encontrou referência na literatura em relação ao efeito deste complexo nesta linhagem.

Como hipótese, espera-se que o KP1019 seja mais citotóxico para as células tumorais 4T1 do que para as células normais NIH-3T3.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Realizar a síntese, caracterização e investigar a atividade citotóxica do complexo KP1019 em cultura de células de carcinoma mamário da linhagem 4T1 e células de fibroblastos da linhagem NIH-3T3, ambas de origem murina.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar o complexo Indazolium trans [tetrachlorobis (1H-indazole) ruthenate (III)] (KP1019);
- Caracterizar KP1019, por meio de ressonância magnética nuclear (RMN).
- Avaliar sua citotoxicidade em células das linhagens 4T1 e NIH-3T3, por meio do método colorimétrico do MTT;
- Avaliar as alterações morfológicas e estruturais induzidas por KP1019 em células da linhagem 4T1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese do KP1019

A síntese do complexo KP1019 foi orientada pelo professor Dr. Aparecido Ribeiro de Souza no Departamento de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG) em Goiânia. Para esta síntese foi utilizado o protocolo de acordo com Lipponer *et al.*, (1996). A síntese do KP1019 foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa adotou-se os seguintes procedimentos: em um balão de fundo redondo de 50 mL, dissolveu-se 100 mg do sólido $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em 0,6 mL de HCl concentrado a 37% e 0,6 mL de etanol, e colocou-se em banho-maria de silicone e sob refluxo e agitação por uma hora para garantir o estado de oxidação do rutênio para Ru (III). Após, a solução passou por rotoevaporação e foi reduzida à 1/3 do volume inicial. Transferiu-se, então, a solução para um balão de 10 mL e completa-se o volume com HCl concentrado.

Na segunda etapa de síntese dissolveu-se 100 mg de Indazol em 1,3 mL de HCl concentrado em um balão de fundo redondo de 50 mL aqueceu-se a solução até 70°C. Em seguida, adicionou-se 1,3 mL da solução de Ru previamente preparada, manteve-se sob agitação e refluxo por 15 min com temperatura entre 80-90°C. Um precipitado escuro foi formado imediatamente, o aquecimento foi cessado e mantido sobre agitação até atingir a temperatura ambiente. O sólido foi separado por filtração. O HCl foi utilizado para remover o resíduo do balão. O sólido coletado foi transferido para um Béquer contendo cerca de 75 mL de água destilada. Agitou-se por cerca de duas horas para a remoção do excesso de ácido. Logo, o sólido foi filtrado a vácuo e lavado com 5mL de etanol e 5 mL de éter etílico.

4.2 RMN: Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, ou abreviadamente, RMN, é uma técnica analítica utilizada para identificar moléculas descobrindo sua fórmula molecular, fórmula estrutural e espacial. Essa técnica se baseia na absorção de radiação eletromagnética de frequência específica por um núcleo na presença de um campo magnético. Alguns núcleos também apresentam spin (momento angular) assim como os elétrons e por isso apresentam propriedades magnéticas. Quando uma substância é submetida a um forte campo magnético e à irradiação de energia eletromagnética, os

núcleos atômicos podem absorver a energia que será então quantizada, gerando um espectro característico para aquele composto (SOLOMONS & FRYHLE, 2001; BROWN *et al.*, 2005).

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Varian Gemini 2000BB e espectrômetro Bruker, Avance III 500. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como padrão de referência interna o TMS, tetrametilcilano, ($\delta = 0,0$ ppm).

4.3 Cultivo e tratamento das células

As células escolhidas para este estudo foram fibroblastos da linhagem NIH-3T3 e carcinoma mamário da linhagem 4T1, ambas de origem murina. Estas linhagens foram fornecidas pelo Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Ambas as linhagens de células foram estocadas em nitrogênio líquido e quando necessário, eram descongeladas e transferidas para frascos de 25 cm² (TPP, EUA). Tais células foram cultivadas com 90% de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium, Sigma), 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma), 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina - Sigma) em frascos de poliestireno (25 a 75 cm²) para cultivo celular e mantidas em incubadora úmida contendo 5% de CO₂ a uma temperatura constante de 37°C.

Ao atingir uma quantidade ideal de confluências para os experimentos (cerca de 1×10^6), as células eram removidas dos frascos e semeadas em placas de cultura. Para isto, inicialmente, o meio de cultura DMEM foi retirado e as células foram lavadas com solução tampão fosfato-salina (PBS: Phosphate Buffered saline). Depois foi acrescentado ao recipiente com células, tripsina-EDTA (Gibco, USA) deixando-a agir por aproximadamente quatro minutos em incubadora a 37°C para que esta enzima promovesse a desagregação das células ao substrato. Passado este tempo, neutralizou-se a ação da tripsina acrescentando-se DMEM suplementado no mesmo volume acrescentada anteriormente de tripsina. A solução contendo as células foi transferida para um tubo de ensaio com tampa para a centrifugação por três minutos a 300 g. Depois da centrifugação as células formam um *pellet*, a solução é descartada e as células são ressuspensas e depois contadas por meio de contagem direta com câmara

de Neubauer. O método utilizado foi o de exclusão por azul de Tripán (Sigma), que distingue as células viáveis de não viáveis.

A quantidade inicial de células semeadas em cada poço das placas de poliestireno de 96 poços foi de 1×10^3 e estas foram mantidas com DMEM em incubadora com 5% de CO_2 a 37°C . Após 24 h, as células foram tratadas com o KP1019 e cisplatina nas doses de 200, 100, 50, 25, 12,5, 2,5 e 1,25 μM pelos períodos de 24, 48 e 72 horas (cada tempo para uma placa). Transcorridos tais períodos, as células foram analisadas pelo método MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio) para avaliação da citotoxicidade dos compostos conforme descrito a seguir. A cisplatina (accord) foi usada como controle positivo, visto que é um quimioterápico largamente empregado na clínica.

4.4 Análise da viabilidade celular

O método colorimétrico de MTT foi desenvolvido por Tim Mossman em 1983 e é utilizado para avaliar a ação de compostos químicos sobre a viabilidade celular. É um método que consiste na conversão do sal tetrazólio em um corante púrpura chamado de formazan. O sal de tetrazólio (que possui cor amarela e é solúvel em água e reativo à luz) sofre uma reação de redução promovida pela enzima succinato-desidrogenase, presente no interior das mitocôndrias, transformando o sal em questão em formazan, que possui cor púrpura/azul escuro e é insolúvel em água, se acumulando no citoplasma das células viáveis.

Após retirar o meio de cultura com o tratamento e adicionar uma solução de meio com 0,5 mg/mL de MTT (5mg/mL em 0,15 M de PBS), as células foram mantidas na incubadora por duas horas e meia. Como esta reação ocorre apenas em células vivas, quanto mais cristais são produzidos mais a solução apresenta a cor púrpura e, portanto, isto indica maior número de células viáveis. Porém, para quantificar com mais exatidão o percentual de células viáveis, os cristais são dissolvidos em um solvente específico, o DMSO (dimetilsulfóxido). Para tanto, primeiro foi retirado o meio com o MTT e acrescentado 200 μL de DMSO.

Após a homogeneização para a dissolução dos cristais, as absorbâncias foram avaliadas por meio de um espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices). O

comprimento de onda utilizado foi 595 nm. Maiores valores de absorvância implicam em mais cristais produzidos e maior viabilidade celular. Os resultados obtidos foram analisados e normalizados com o branco, que são poços da placa sem células e com DMSO (solvente) para a certificação de que não houve interferência do DMSO na análise. Em todos os experimentos, os grupos experimentais foram realizados em triplicatas e realizou-se três repetições independentes.

4.5 Alterações estruturais e morfológicas em células de carcinoma mamário 4T1 tratadas com KP1019

Após 24 horas de tratamento com 20 μM de KP1019 e 20 μM de cisplatina em placas de seis poços, as células da linhagem 4T1 foram visualizadas e fotografadas em microscópio Axiovert 100 (Zeiss), operado em contraste de fase, para observação das alterações morfológicas induzidas pelo tratamento.

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *Software Graph Pad Prism*. Os resultados foram expressos como Média \pm erro padrão da média (SEM). O Nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$. As comparações de tratamentos em relação ao controle, os efeitos do tempo de exposição e da concentração dos compostos testados foram feitos por análise de variância *two-way* (ANOVA) seguido por pós-teste de Bonferroni.

Os valores da concentração inibitória (IC_{50}) e seus intervalos de confiança de 95% derivam de um modelo de regressão linear, baseado em uma curva dose resposta e os cálculos foram realizados utilizando o *Software Graph Pad Prism*.

5 RESULTADOS

5.1 Síntese do KP1019

Para sintetizar o KP1019, iniciou-se com o sólido $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ que foi submetido sob refluxo em HCl a 37% e etanol para garantir o estado de oxidação dos átomos de Rutênio sejam Ru(III), necessário para a síntese do KP1019. Após este processo, o etanol passou por uma evaporação rotativa a partir da solução, obtendo-se, assim, a solução de Ru(III), aproximadamente 0,25g de Rutênio em uma solução de 10 mL de Ru(III) e HCl. O rendimento percentual foi calculado (82,3%) obtendo-se 126,5 mg de KP1019, que em seguida, foi armazenado em um frasco apropriado (falcon).

5.2 Caracterização do composto KP1019 por espectrometria de RMN

Os espectros de RMN foram analisados por ^1H ($^1\text{HRMN}$) e os sinais foram identificados. Os sinais característicos do indazol ($\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2$) foram identificados por meio desta análise, demonstrando que a síntese do composto foi bem-sucedida. Foram observados os seguintes sinais em δ : 8,54 ppm para singleto, H1; δ : 8,16 ppm para singleto, H6; δ : 7,81 ppm para duplete, H2; δ : 7,56 ppm para duplete, H5; δ : 7,44 ppm para tripleto, H3; δ : 7,19 ppm para tripleto, H4 (**Figura 15**). O sinal em δ : 0,00 se refere à substância referência, tetrametilcilano; o sinal em δ : 4,90 ppm se refere a água; o sinal δ : 3,32 ppm se refere ao solvente, metanol deuterado, e os sinais menores espalhados entre δ : 1,0 e 4,4 ppm se referem às impurezas e foram marcadas com “x” na **figura 15** para indicar que não foram levadas em consideração para a caracterização.

a-kp1019-2.001.esp

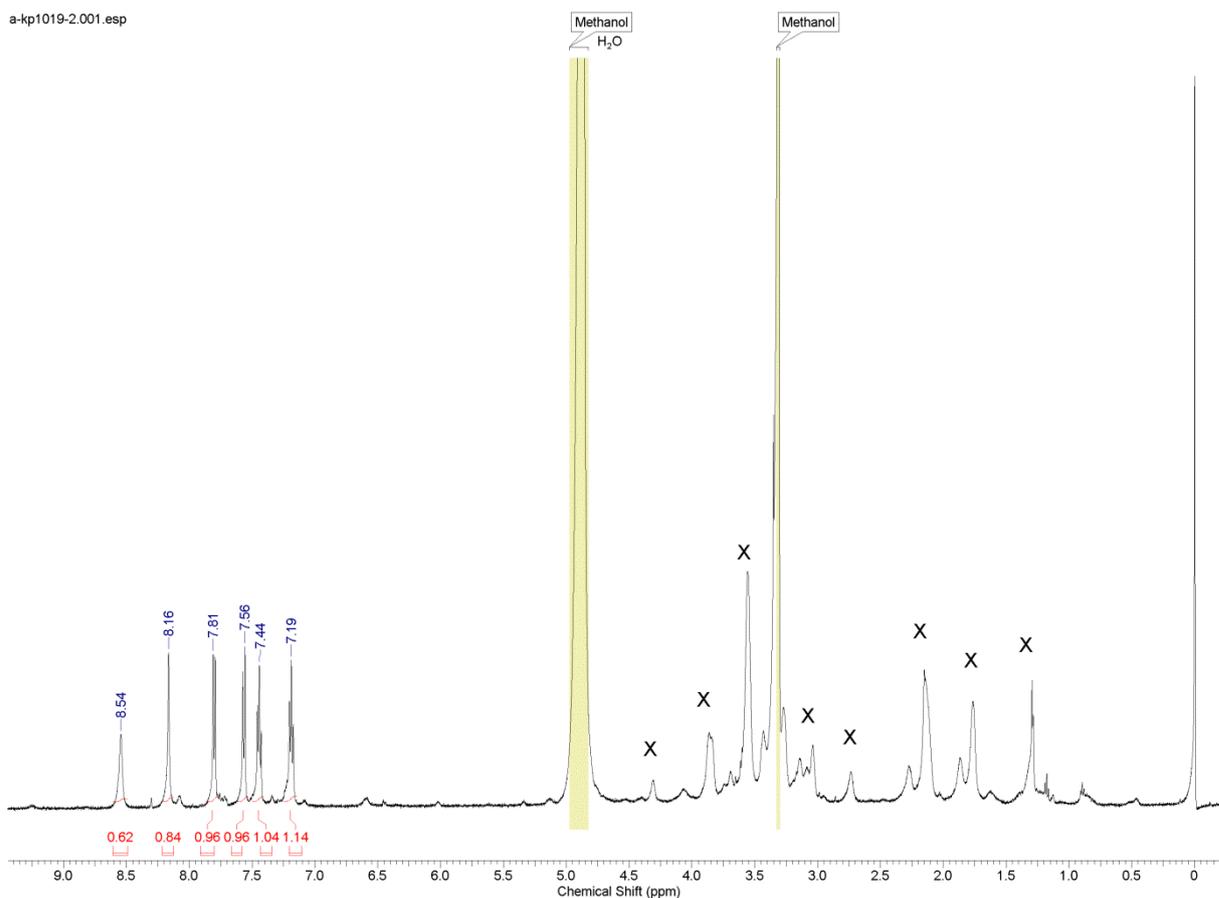


Figura 13: Espectro de $^1\text{HRMN}$ do KP1019 (Feito em CD_3OD). Foram identificados os principais sinais que definem o composto sendo eles: 8,54 ppm para H-1; 8,16 ppm para H-6; 7,81 ppm para H-2; 7,52 para H-5; 7,44 para H-3; 7,19 para H-4. Os dois picos maiores e os menores antes de 4,00 ppm (marcados com “x”) se referem ao solvente, água e às impurezas respectivamente, portanto não são levadas em consideração nesta análise de sinais.

5.3 Citotoxicidade de KP1019 em cultura de células de carcinoma mamário e fibroblastos

5.3.1 Análise de MTT

A citotoxicidade do KP1019 que foi avaliada em linhagens de células de carcinoma mamário (4T1) e em fibroblastos (NIH-3T3) nos períodos de 24, 48 e 72 h. As doses escolhidas para conduzir esta análise foram de 1,25; 2,5; 12,5; 25; 50; 100 e 200 μM e foram selecionadas após pesquisa detalhada de outros trabalhos similares de escritos na literatura (DEPENBROCK *et al.*, 1997; BIERLE *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2014; STEVENS *et al.*, 2012; PONGRATZ, 2003; HEFFETER *et al.*, 2010).

De acordo com esta pesquisa, a maioria desses autores utilizou, em seus experimentos, doses de até 100 μM de KP1019, exceto Pongratz (2003) e Heffeter *et al.*

(2010) que utilizaram doses de até 200 μM . As linhagens celulares utilizadas para estas pesquisas foram: *Saccharomyces cerevisiae* (levedura) para os experimentos de Bierle *et al.* (2015), Singh *et al.* (2014) e Stevens *et al.* (2012); Células humanas de linhagens tumorais como de mama, renais, esôfago, ovário, estômago, sarcomas, coloretais, testículos, mesoteliomas, útero, vesícula biliar, pâncreas, linfoma não-hodgkin's, células de pulmão não pequenas e células tumorais de local primário desconhecido para o trabalho de Depenbrock *et al.* (1997); KB-3-1, HCC1.1, HCC1.2, P31, P31cis, HCT116, VMC, HEP3B e SW480 para o trabalho de Heffeter *et al.* (2010). Como a cisplatina é um quimioterápico largamente empregado na clínica e é um complexo metálico, ela foi utilizada como controle positivo para validar nossos modelos experimentais e, para isso, adotou-se as mesmas doses utilizadas para o KP1019.

De maneira geral, observou-se que o KP1019 e a cisplatina induziram citotoxicidade de maneira dependente da dose, do tempo e das linhagens celulares analisadas (**Figuras 16, 17 e 18**). Foi feita a análise estatística para comparações entre os grupos de tratamento e controle assim como comparações dos dados entre as linhagens e entre os fármacos.

De maneira geral, após 24 h de tratamento percebeu-se que o KP1019 e a cisplatina foram citotóxicos para ambas as linhagens celulares analisadas: carcinoma mamário (linhagem 4T1) e fibroblastos (linhagem NIH-3T3), nas doses acima de 12,5 μM (**Figura 16**). Por exemplo, na linhagem tumoral (4T1) percebeu-se que KP1019 reduziu a viabilidade celular para menos de 50% nos tratamentos a partir de 12,5 μM ($33,4\% \pm 1,6$). Interessantemente, este composto também apresentou efeito citotóxico mais acentuado do que o composto usado como controle positivo (cisplatina) nas doses de 50 μM ($34,5\% \pm 11$ versus $16,5\% \pm 1,8$ para KP1019) e de 100 μM ($34,8\% \pm 11$ versus $16,9\% \pm 1,5$ para KP1019).

Com relação a linhagem de fibroblastos (NIH-3T3) os efeitos citotóxicos de KP1019 foram similares aos da cisplatina, exceto na dose de 25 μM em que se observou $42,9\% \pm 14,9$ de células viáveis no tratamento de KP1019 e $83,24\% \pm 10,1$ para cisplatina. Já nos tratamentos com 200 μM de ambos os compostos se observou valores médios similares na viabilidade celular, porém significativamente diferentes ($26,5\% \pm 1,2$ para KP1019 versus $30,4\% \pm 1,2$ para cisplatina).

Para futuras comparações e análises posteriores ao MTT, calculou-se também a IC_{50} (concentração inibitória de 50%) em células 4T1 e o valor encontrado foi de 26,4 μ M ($\pm 0,27$) no período de 24 h de tratamento com KP1019. Este valor de IC_{50} foi similar ao encontrado para cisplatina que foi de 20 μ M.

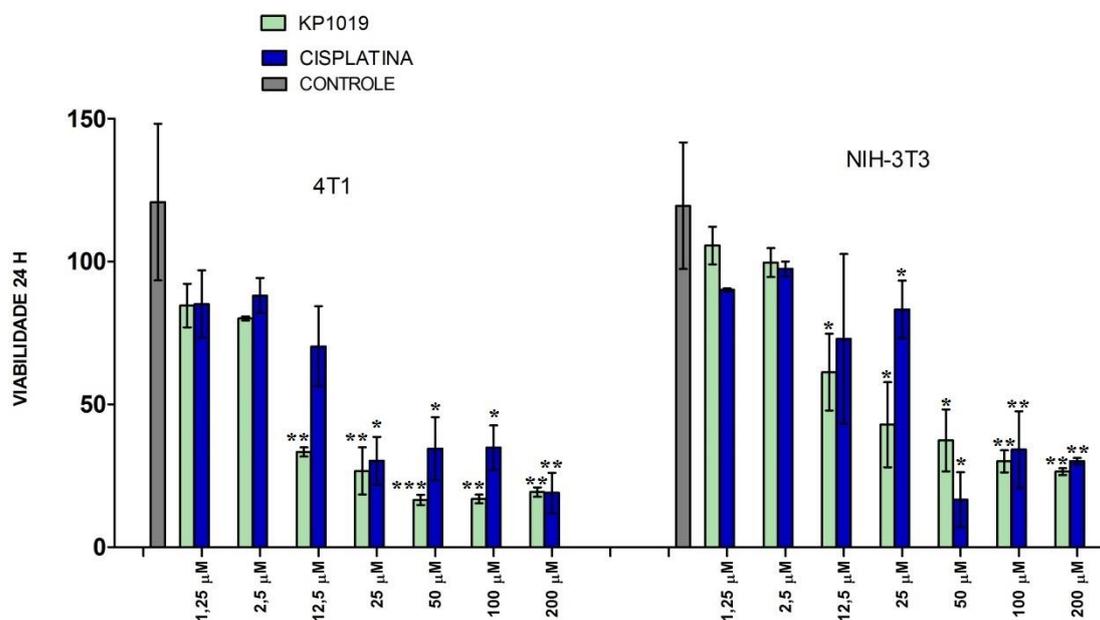


Figura 14: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de KP1019 e cisplatina (controle positivo) nas linhagens celulares avaliadas 4T1 (carcinoma mamário) e NIH-3T3 (fibroblastos) após 24h de tratamento. Os resultados foram normalizados com o controle negativo (células sem tratamento) e expressos como média \pm erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. Observou-se que tanto o KP1019 quanto a cisplatina foram citotóxicos para ambas as linhagens celulares, porém o KP1019 se destacou por apresentar maior citotoxicidade do que a cisplatina para as células tumorais. Asteriscos representam diferenças estatísticas entre o grupo controle e tratamentos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Por outro lado, no período de 48 h de tratamento verificou-se que apenas a cisplatina foi citotóxica para as células tumorais da linhagem 4T1 ao passo que KP1019 não alterou a viabilidade destas células. Por exemplo, nesta linhagem, notou-se apenas 24,3% ($\pm 6,4$) de células viáveis após tratamento com 25 μ M de cisplatina e no tratamento com KP1019, na mesma dose, não houve redução da viabilidade celular (113% ± 2). Ainda, comparando-se os efeitos citotóxicos entre KP1019 e cisplatina notou-se acentuada variação na viabilidade de células da linhagem 4T1 tratadas com 100 e 200 μ M entre KP1019 (98,2% $\pm 1,2$ e 73,8% $\pm 8,7$) e cisplatina (6,5% ± 2 e 8,5% $\pm 3,7$), respectivamente. Dessa forma, ficou evidente que a cisplatina foi muito mais

citotóxica na linhagem de células tumorais 4T1 no período de 48 h do que em NIH-3T3 (Figura 17).

Em contrapartida, na linhagem NIH-3T3, o tratamento com KP1019 induziu queda na viabilidade celular semelhante ao da cisplatina, exceto na dose de 25 μM em que se verificou apenas 8% ($\pm 0,35$) de células viáveis no tratamento com KP1019 contra 21,1% ($\pm 6,52$) com cisplatina. Sem pormenorizar, nesta linhagem, observou-se uma queda da viabilidade de cerca de 70% em todas as doses acima de 25 μM após os tratamentos com ambos compostos, cisplatina e KP1019. Ademais, os valores médios de células viáveis nas doses de 100 e 200 μM foram respectivamente 5,8% ($\pm 1,2$) e 6,2% ($\pm 1,3$) no tratamento com KP1019 versus 9,8% ($\pm 3,2$) e 7,9% ($\pm 3,6$) no tratamento com cisplatina (Figura 17).

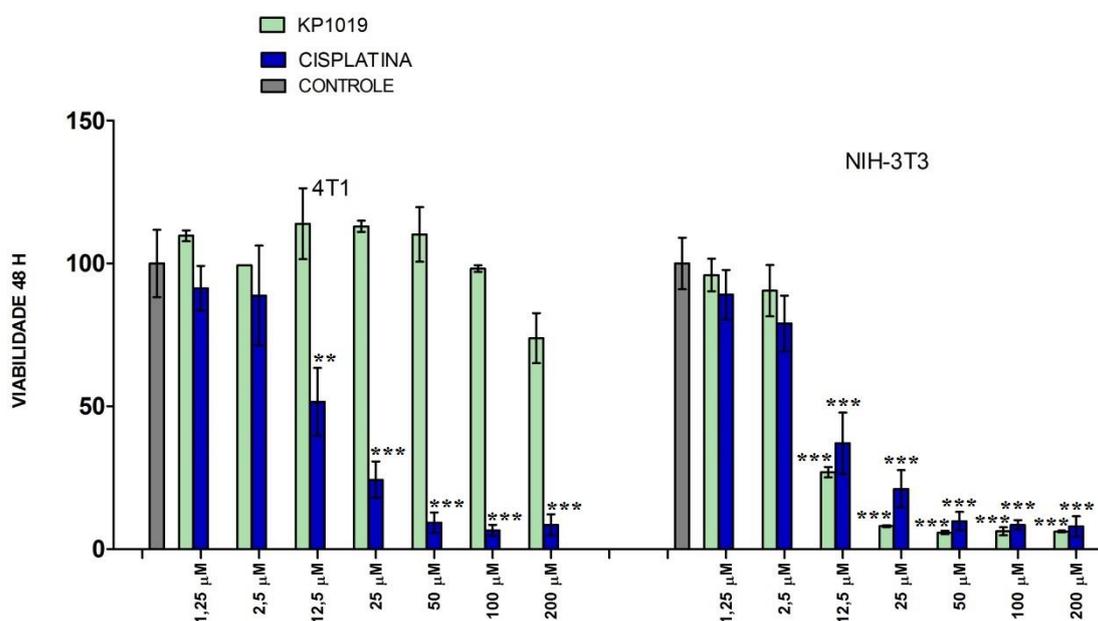


Figura 15: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de KP1019 e cisplatina (controle positivo) nas linhagens celulares avaliadas 4T1 (carcinoma mamário) e NIH-3T3 (fibroblastos) após 48 h de tratamento. Os resultados foram normalizados com o controle negativo (células sem tratamento) e expressos como média \pm erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. Observou-se que apenas o tratamento com cisplatina foi citotóxico para a linhagem 4T1. Já na linhagem NIH-3T3 este composto apresentou citotoxicidade semelhante à da cisplatina. Asteriscos representam diferenças estatísticas entre o grupo controle e tratamentos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Após 72 horas de tratamento o KP1019 e a cisplatina foram citotóxicos para ambas as linhagens celulares de forma dose dependente, ou seja, a citotoxicidade foi maior a partir da dose de 12,5 μM de ambos os compostos. Adicionalmente, observou-se um padrão semelhante na queda de viabilidade nas duas linhagens. Também se percebeu que, a partir da dose de 12,5 μM , de ambos os compostos, a viabilidade celular manteve-se abaixo de 50% nas duas linhagens celulares investigadas: 4T1 e NIH-3T3 (**Figura 18**).

Com relação ao tratamento com KP1019, na linhagem 4T1, notou-se diferente efeito citotóxico nas doses de 1,25 e 2,5 μM . Contudo, este efeito foi similar ao se comparar a linhagem NIH-3T3. Sobretudo, quando comparadas as duas linhagens celulares, percebeu-se que os tratamentos com cisplatina e também com KP1019 induziram citotoxicidade similar (**Figura 18**). Por exemplo, na linhagem NIH-3T3, os valores de viabilidade celular encontrados para o KP1019 foram de 24,1% ($\pm 6,5$) na dose de 100 μM e 23,8% ($\pm 6,6$) na dose de 50 μM . Já nos tratamentos com a cisplatina os valores de viabilidade celular foram de 22,1% ($\pm 8,5$) na dose de 50 μM e 21,7% ($\pm 8,9$) na dose de 200 μM .

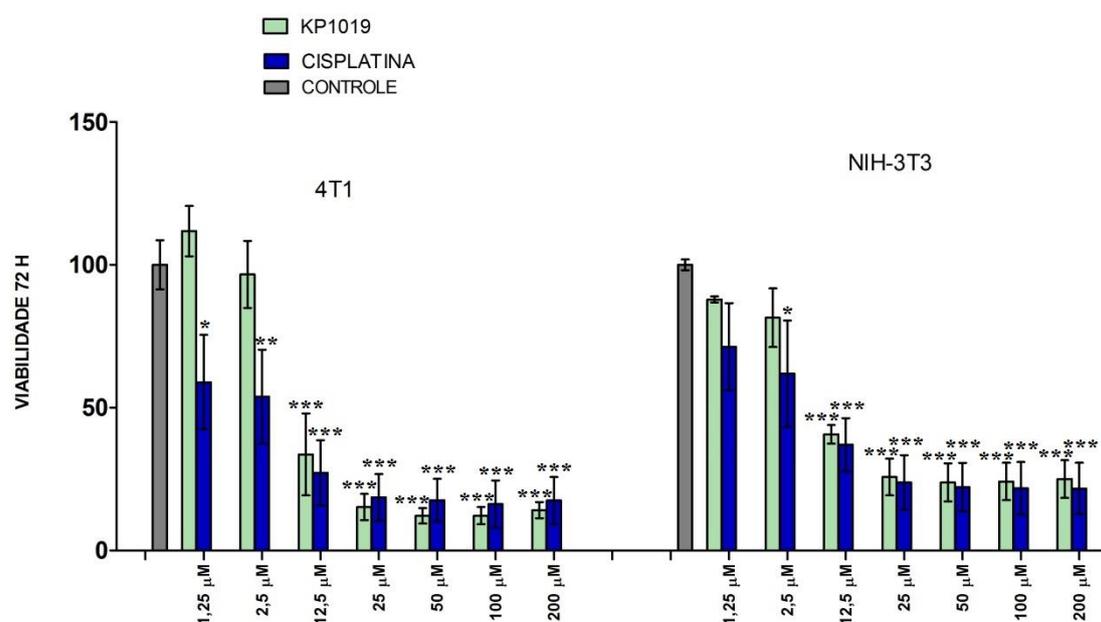


Figura 16: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de KP1019 e cisplatina (controle positivo) nas linhagens celulares avaliadas 4T1 (carcinoma mamário) e NIH-3T3 (fibroblastos) após 72 h de tratamento. Os resultados foram normalizados com o controle negativo (células sem tratamento) e expressos como média \pm erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. Observou-se

que o KP1019 e a cisplatina apresentaram efeito citotóxico similar para ambas as linhagens celulares investigadas. Asteriscos representam diferenças estatísticas entre o grupo controle e tratamentos com cisplatina e KP1019 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$).

5.3.2 Alterações morfológicas e estruturais induzidas por KP1019 em células tumorais da linhagem 4T1

A análise de alterações morfológicas em células após tratamentos com quimioterápicos é uma importante ferramenta preditiva para identificação de toxicidade (CARNEIRO et al., 2011). Assim, para confirmar a citotoxicidade de KP1019 em células 4T1 escolhemos o período experimental de 24 h e a dose de 20 μM , valor encontrado para o IC_{50} do tratamento com cisplatina. Assim, as células da linhagem 4T1 foram tratadas com 20 μM de cisplatina (controle positivo) ou KP1019. Células sem tratamento foram consideradas como controle negativo experimental. Após 24h de tratamento, as células da linhagem 4T1, que estavam em placas de poliestireno de seis poços, foram visualizadas e fotografadas em microscópio invertido de contraste de fase, sem nenhuma preparação de fixação ou coloração. Antes de se proceder ao registro fotográfico das células, toda a área da placa, onde as células se encontravam, foi cuidadosamente examinada e as figuras são representativas do que foi observado com frequência.

Analisando as imagens obtidas (**Figura 19 A**) percebeu-se que as células que não receberam tratamento (controle) exibiram morfologia dentro dos padrões peculiares observados para a linhagem 4T1 tais como formato fusiforme e presença de várias projeções da membrana citoplasmática que mostra a interação entre células por meio de pontos de adesão. Estas características geralmente estão associadas à integridade do citoesqueleto.

Nas células tratadas com 20 μM de cisplatina (**Figura 19 B**), grupo experimental que representam controle positivo, foi possível observar duas características morfológicas relacionadas à injúria e morte celular sendo elas: 1º) a diminuição na quantidade de células indicativa de que o tratamento foi citotóxico e induziu morte celular e 2º) a mudança do formato das células de fusiforme para formato arredondado, que pode ser um indício de alterações no citoesqueleto. Também se notou aspecto

granuloso bastante perceptível na maioria das células, que pode estar relacionado com o aumento da quantidade de vesículas intracelulares. Todas estas características são típicas de processo de morte celular.

Em relação ao tratamento das células com 20 μ M de KP1019 (**Figura 19C**) notou-se alterações morfológicas similares àquelas observadas com o controle positivo. Porém, as alterações morfológicas induzidas por KP1019 foram ainda mais expressivas. Verificou-se que o tratamento induziu acentuada citotoxicidade visto que em todas áreas examinadas havia confluência celular bem menor em relação ao controle. Adicionalmente, notou-se que nenhuma célula apresentava projeções citoplasmáticas características, o que indica que todas as células estavam totalmente suspensas no meio de cultura (“desgrudadas” da placa). Finalmente, mas não menos importante, verificou-se que a maioria das células apresentaram maior granulosidade do que observado no grupo do controle positivo. Como comentando anteriormente, provavelmente, este aspecto está associado com um maior número de vesículas no interior das células, confirmando, assim, a citotoxicidade do KP1019 nesta linhagem celular.

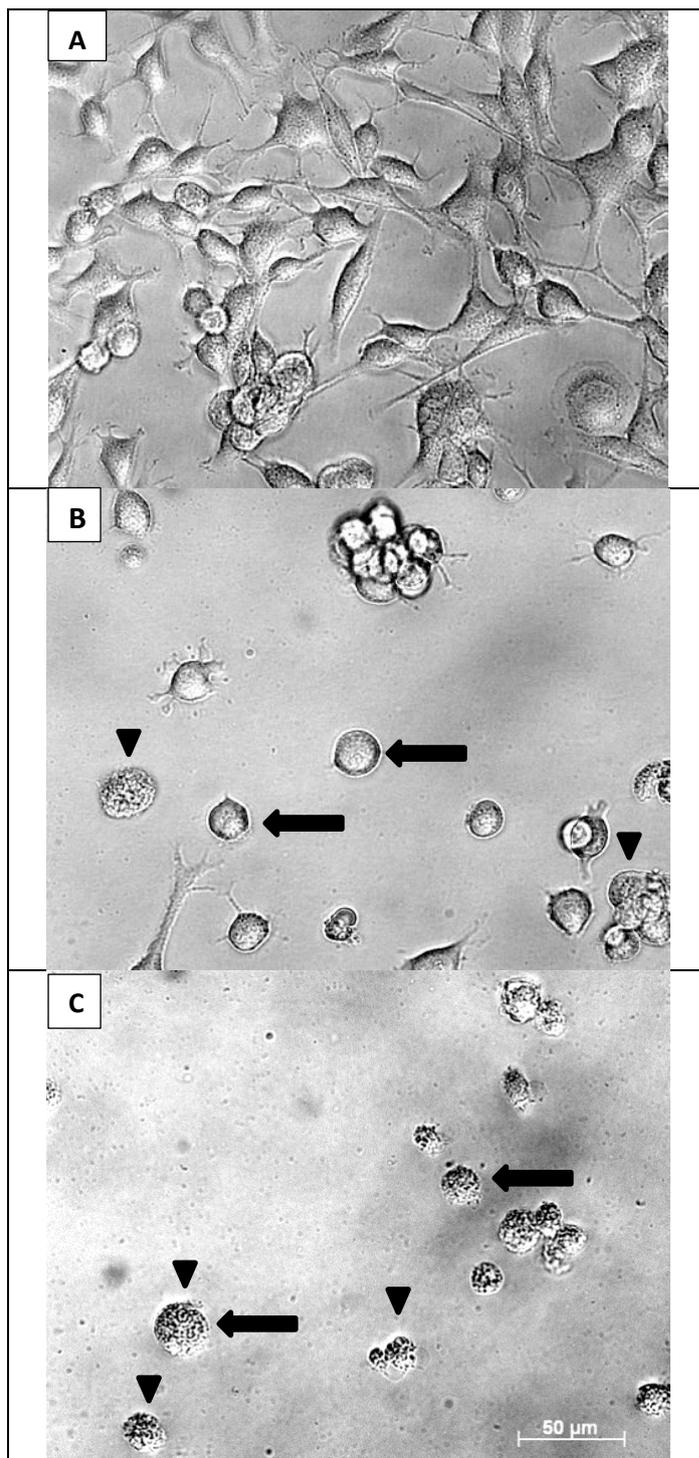


Figura 17: Alterações estruturais e morfológicas induzidas por KP1019 em células de carcinoma mamário (4T1) após 24h de tratamento. As células (5×10^5) foram incubadas com $20 \mu\text{M}$ de KP1019 ou $20 \mu\text{M}$ de cisplatina e, após 24 h, examinadas por microscopia de contraste de fase e fotografadas com o aumento de 200 X. (A) Células sem tratamento (controle negativo). (B) Células incubadas com $20 \mu\text{M}$ de cisplatina. (C) Células incubadas com $20 \mu\text{M}$ de KP1019. Nas micrografias (B) e (C) observa-se formato arredondado (seta preta) e maior granulosidade nas células (cabeça de seta), o que evidencia a ocorrência de um processo de morte celular induzido por KP1019 e cisplatina nestas condições experimentais.

6 DISCUSSÃO

6.1 Considerações sobre a síntese e caracterização do complexo KP1019 pelo método Espectroscopia de RMN (Ressonância Magnética Nuclear)

O objetivo deste trabalho teve como um dos focos a síntese do complexo metálico KP1019 e sua caracterização para confirmar se a síntese foi bem-sucedida. A análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear possibilitou a determinação da estrutura química do KP1019.

O KP1019 foi sintetizado de acordo com o protocolo de Lipponer *et al.* (1996) e caracterizado por análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{HRMN}$) e, nesta análise, foram encontrados deslocamentos químicos específicos comparáveis aos resultados dos trabalhos de Bartel *et al.* (2011) e Schluga *et al.* (2006). Estes trabalhos não relataram especificamente a caracterização do KP1019, mas usaram o método de RMN para identificar a interação de KP1019 com ácido ascórbico (Bartel *et al.* 2011) e GMP (Guanosina-5'-monofosfato) (Schluga *et al.* 2006).

6.2 Considerações sobre a citotoxicidade de KP1019 em linhagens celulares de carcinoma mamário 4T1 e fibroblasto NIH-3T3

No presente trabalho foi realizada a síntese do composto KP1019 e avaliada sua citotoxicidade em linhagens celulares de carcinoma mamário (4T1) e fibroblastos (NHI-3T3). Em nosso estudo, foi demonstrado que o complexo de rutênio KP1019 induziu acentuada citotoxicidade nas linhagens 4T1 e NIH-3T3 e este efeito citotóxico variou conforme o tempo analisado e, principalmente, com a dose assim como, em menor grau, com o tipo de célula analisado. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados por Heffeter (2010), o qual realizou experimentos com diversas linhagens celulares humanas (KB-1-3, HCC1.1, HCC1.2, P31, P31cis, HCT116, VMC, HEP3B e SW480) para determinar a citotoxicidade dos compostos KP1019 e seu análogo KP1339 (*Sodiumtrans*-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)]. Este análogo apresenta no lugar do indazol um cátion de Na^+ . As doses utilizadas variaram de acordo com o

experimento realizado, mas, de maneira geral, foram utilizadas as doses de 50, 75, 100, 150 e 200 μM por períodos de tratamento que variaram entre 1 a 72 h.

Depenbrock *et al.* (1997) utilizaram doses iguais a 1,67; 16,7 e 167 μM e testaram tais concentrações do complexo em células humanas de linhagens tumorais como de mama, renais, esôfago, ovário, estômago, sarcomas, coloretais, testículos, mesoteliomas, útero, vesícula biliar, pâncreas, linfoma não-hodgkin's, células de pulmão não pequenas e células tumorais de local primário desconhecido. Estes autores mostraram que o efeito de KP1019 foi dose dependente em todas as linhagens testadas e períodos de incubação. Neste estudo, os autores demonstraram que, na exposição das células ao KP1019, longo prazo (21-28 dias), a citotoxicidade foi maior na dose de 167 μM (inibição média de 80%). Já nos testes de exposição a curto prazo (1h) houve redução de 41% na dose de 167 μM .

Assim, traçando um parâmetro comparativo, os trabalhos de Bierle *et al.* (2015), Singh *et al.*, (2014), Stevens *et al.*, (2012) e Depenbrock *et al.* (1997) confirmaram achados dos experimentos realizados no presente trabalho que evidenciam o KP1019 como sendo um fármaco dose dependente, que possui efeitos citotóxicos mais efetivos quanto mais elevada for a dosagem utilizada. A comparação entre o tempo de exposição utilizado por este trabalho e dos autores relacionados acima, não pode ser muito conclusiva devido a grande diferença dos períodos de exposição, como nos trabalhos de Bierle *et al.* (2015), Singh *et al.* (2014) e Stevens *et al.* (2012) que avaliaram períodos de 1 a 3 h e Depenbrock *et al.* (1997) que avaliou uma longa exposição de tempo (21 a 28 dias). Destes quatro trabalhos em questão, apenas o estudo conduzido por Bierle *et al.* (2015) pode ser melhor comparável por utilizar também um ensaio com período de exposição do KP1019 de 24h, porém ele não utiliza nenhum método de avaliação da viabilidade celular para que uma comparação mais exata seja feita com o presente trabalho.

Stevens *et al.* (2012) demonstraram, em seus experimentos, que o tempo de exposição é bastante relevante para a utilização do KP1019, já que se notou um aumento considerável da morte celular quando se avaliou a dose de 20 μM entre 0 e 2 horas. Nós também observamos em nossos ensaios, pois ao aumentar o tempo de exposição das células ao KP1019, de modo geral, a morte celular também foi maior. Por exemplo, em nosso estudo, observou-se que maior citotoxicidade nos períodos de

exposição mais longos como o de 48 e 72 h (exceção do período de 48h na linhagem 4T1 tratada com KP1019) e, sobretudo, nas doses mais elevadas (acima de pelo menos 12,5 μM).

Por meio da análise de resultados de MTT, obtidos em nosso estudo, pôde-se, ainda, observar que o KP1019 tem uma eficiência citotóxica comparável à da cisplatina no período de 24 h. Contudo, na dose de 50 μM , KP1019 induziu valores de viabilidade diferentes entre células tumorais 4T1 (16,5% \pm 1,8) e células normais (37,4% \pm 10,8).

Bergamo *et al.* (2009) também realizaram análises de viabilidade celular utilizando o teste de MTT, porém para tais experimentos, o tempo de exposição ao KP1019 e também ao KP418 (outro análogo do KP1019 com o grupo indazol substituído pelo imidazol utilizado como composto de comparação da citotoxicidade entre eles) foi de apenas 1h com análise após 24 h da retirada dos fármacos. As células utilizadas nos experimentos foram as linhagens celulares humanas MDA-MB-231 (câncer de mama altamente invasivo), MCF-7 (câncer de mama) e HBL-100 (célula epitelial não-tumorigênica). Neste estudo, o KP1019 foi muito mais citotóxico que o seu análogo (KP418). Os valores da viabilidade celular com 1 μM de KP418, por exemplo, foram de 79,9; 105 e 97% para as células MDA-MB-231, MCF-7 e HBL-100, respectivamente. Nos tratamentos com KP1019 os valores foram de 91,8; 88,3 e 90,2% (10 μM) e de 57,2; 73,2% e 32,9% (100 μM) para as respectivas linhagens celulares MDA-MB-231, MCF-7 e HBL-100.

Por meio destes resultados, constatou-se que o KP1019 apresentou maior citotoxicidade conforme o aumento da dose. Ainda, nos ensaios do nosso trabalho, realizados com esta mesma concentração de 100 μM , as duas linhagens celulares (4T1 e NIH-3T3) apresentaram valores de viabilidade bem menores em ambas linhagens testadas. Contudo, não significa que foi um melhor resultado, mas sim algo equivalente, pois a diferença entre nosso trabalho e o destes autores supracitados se deve ao período de tratamento que foi maior em nossos ensaios e também ao tipo de linhagem celular que escolhemos que pode ser mais sensível tanto ao KP1019 quanto à cisplatina.

Em nosso estudo, no período de tratamento de 48 horas o KP1019 não apresentou efeito citotóxico em células tumorais da linhagem 4T1. Contudo, este complexo apresentou citotoxicidade em células NIH-3T3. Por outro lado, esta linhagem de fibroblastos tratadas com KP1019 por 72 horas apresentaram uma viabilidade

razoavelmente maior em todas as concentrações quando comparada ao período de 48 horas, na maioria dos casos. Por exemplo, neste período, verificou-se que o valor de viabilidade mais baixo foi de apenas 5,8% ($\pm 0,8$) na dose de 50 μM , enquanto que após 72 horas de tratamento o valor de viabilidade correspondente a mesma dose para esta linhagem foi de 23,8% ($\pm 6,6$).

Heffeter et al. (2010) relataram que o KP1019 é uma droga bastante reativa (a nível da cisplatina) e que um curto período de tempo de exposição às células é o suficiente para que ele exerça suas propriedades citotóxicas. Ainda, estes autores ressaltaram que o contato de KP1019 com as células por um período de 3 horas é o suficiente para desencadear 95% da sua atividade citotóxica.

Ademais, em outro estudo conduzido por Bierle *et al.* (2015), em que se utilizou linhagem de leveduras da espécie *S. cerevisiae*, foi demonstrado que o KP1019 (doses de 40 μM e 80 μM) interrompeu a progressão das células no ciclo celular. Por outro lado, Singh et al. (2014), trataram células de levedura da espécie *S. cerevisiae* com doses de 10 a 200 μM de KP1019 e concluíram que este composto induziu citotoxicidade de forma dose dependente, causando interrupção do ciclo celular. Por exemplo, quando as células foram expostas por 3 h com uma dose mais baixa de KP1019 (25 μM) houve acúmulo das mesmas na fase G2/M, enquanto que, em doses mais elevadas (50-100 μM), percebeu-se acúmulo na fase S.

A determinação do IC_{50} (concentração inibitória de 50%) é um dado importante para se comparar eficácia terapêutica de quimioterápico e avaliar seu potencial. Assim, nós avaliamos a IC_{50} de KP1019 no período de 24 h na linhagem tumoral (4T1). O valor de IC_{50} encontrado para KP1019 foi de 26,4($\pm 0,27$) μM , próximo ao encontrado para cisplatina que foi de 20 μM . Este resultado está de acordo com a literatura que traz valores similares, como por exemplo, no trabalho de Kapitza et al. (2005) foram utilizadas células da linhagem SW480 tratadas com KP1019 por um período de 24 horas e o IC_{50} foi de aproximadamente 30 μM . Para a linhagem de LT97 o IC_{50} correspondeu a aproximadamente 50 μM . Por outro lado, Heffeter et al. (2010), utilizaram células da linhagem HCT116 e o IC_{50} foi determinado 82,6 μM no período de 72 horas. Isto significa que proporcionalmente, o valor de 20 μM , utilizado neste trabalho está compatível com o que é encontrado na literatura, sendo que diferenças entre estes

valores podem ser atribuídas também a linhagem utilizada em nosso experimento, nunca antes testada com este fármaco.

Segundo Heffeter *et al.* (2010), o destino intracelular do KP1019 é amplamente desconhecido, porém, sabe-se que a maior parte deste complexo, que entra nas células, se concentra principalmente no citosol e a menor parte no núcleo. Para observar tais resultados, o KP1019 foi deixado em contato com as células por curtos períodos como 1 hora, 3 horas e ainda um tempo adicional de 6 horas. Curiosamente, a diferença da concentração de KP1019 no citosol foi mínima entre os períodos de 3 e 6 horas. Além disso, essa aglomeração no citosol não indicou se o KP1019 tem o DNA como alvo principal. Na verdade, muitos autores como Bergamo & Sava (2011), Heffeter *et al.* (2010), Viktor Brabec (2002) e Jakupec *et al.* (2007) defendem a hipótese mais provável de que o KP1019 leva à morte celular pelo mecanismo de apoptose por causar um estresse oxidativo pela via mitocondrial, mas não descartam a possibilidade de seu mecanismo de ação também agir diretamente no DNA formando adutos.

De acordo com Bergamo & Sava (2011), as dificuldades em desvendar o mecanismo de ação do KP1019 estão relacionadas com sua origem como uma droga criada para imitar o efeito citotóxico da cisplatina, não sendo uma droga racionalmente concebida de modo que se pudesse escolher o alvo e a mecanismo antes da determinação de sua forma e síntese química. Sendo assim, a descoberta de seu exato modo de ação é um grande desafio. Em nossos ensaios experimentais podemos constatar de que o KP1019 promoveu injúria e alterações morfológicas características típicas de um processo de morte celular, como por exemplo, as numerosas vesículas citoplasmáticas.

Para comprovar os efeitos citotóxicos de KP1019 na linhagem 4T1, a morfologia das células foi avaliada na dose de 20 μM após 24 h. Esta dose foi baseada no valor correspondente ao IC_{50} de cisplatina (**Figuras 19 A, B e C**). Para isso, delineamos três grupos experimentais: (1) Controle negativo (sem tratamento), (2) controle positivo (20 μM cisplatina) e (3) KP1019.

A morfologia normal de uma célula tumoral da linhagem 4T1 (**figura 19 A**) inclui o formato fusiforme com projeções da membrana citoplasmática que mostra a adesão celular entre as células e ao substrato por meio de pontos de adesão. Geralmente essas características estão associadas a integridade do citoesqueleto, o que evidencia que

a célula está dentro dos padrões da normalidade. Já no controle positivo onde foi utilizado 20 μM de cisplatina, notou-se características morfológicas que são relacionadas à injúria e à morte celular que são: 1- Diminuição no número de células, o que indica que o tratamento foi citotóxico e induziu morte celular. 2- Mudança de formato das células que eram fusiformes e passaram a ter o formato arredondado, o que é um indício de que seu citoesqueleto sofreu alterações e 3- aspecto granuloso na maioria das células, que pode estar relacionado com o aumento da quantidade de vesículas intracelulares. Essas características podem ser observadas no controle positivo e nos tratamentos com KP1019 (**figura 19 B e 19 C**) e são típicas de processos de morte celular. Destaca-se, ainda que foram observadas alterações morfológicas mais pronunciadas (maior granulosidade) em células tratadas com o KP1019, o que confirma a citotoxicidade do complexo KP1019 na linhagem tumoral 4T1.

Dessa forma, a citotoxicidade do KP1019 foi confirmada tanto com a linhagem 4T1 quanto na NIH-3T3 e este efeito foi dose e tempo dependente. Além disso, na concentração de 50 μM em 24h de tratamento, observou-se uma maior citotoxicidade nas células tumorais do que nas células normais, o que pode significar que nestas condições o KP1019 apresentou certo grau de seletividade celular, que deve ser melhor investigado em experimentos posteriores.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho, a síntese de KP1019 foi bem-sucedida, conforme verificado na análise de RMN. Concluiu-se que este complexo foi citotóxico para as linhagens celulares 4T1 e NIH-3T3 a partir da dose de 25 μM , exceto no período de 48 h para a linhagem 4T1. Este composto também induziu alterações morfológicas e estruturais às células 4T1, indicando que estas sofreram injúrias características do processo de morte celular, confirmando assim, sua potencial citotoxicidade.

O KP1019 se mostrou um composto bastante citotóxico, mas ainda possui muitos aspectos que permanecem desconhecidos. Seu mecanismo de ação foi pouco elucidado, possuindo apenas algumas evidências sobre o modo de funcionamento e mais de uma hipótese sobre seu comportamento dentro das células. Por esse motivo e por se acreditar que ele seja um complexo metálico com um potencial antitumoral eficiente, é necessário que mais pesquisas sejam desenvolvidas para se compreender esta substância, entender até onde vão suas vantagens e também buscar alternativas que driblem suas limitações. Por se mostrar um composto pouco solúvel em água, a síntese de uma nanoestrutura como uma micela lipídica pode ser uma alternativa que o torne mais eficiente e eficaz. Ensaio utilizando concentrações próximas dos valores com resultados mais promissores assim como ensaios *in vivo* também são necessários para se obter uma melhor perspectiva do futuro deste composto na medicina do câncer.

REFERÊNCIAS

1. AITKEN, J. B., ANTONY, S., WEEKLEY, C. M., LAI, B., SPICCIA, L., HARRIS, H. H. Distinct cellular fates for KP1019 and NAMI-A determined by X-ray fluorescence imaging of single cells. **Metallomics**, v. 4, n. 10, p. 1051-1056, 2012.
2. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 2010. 1463 p.
3. ALBERTS, S. R; SARGENT, D. J.; SURESH, N.; MAHONEY, M. R.; MOONEY, M.; THIBODEAU, S. N; SMYRK, T. C.; SINICROPE, F. A.; CHAN, E.; GILL, S.; KAHLENBERG, M. S.; SHIELDS, A. F.; QUESENBERRY J. T.; WEBB, T. A. JUNIOR, G. H. F.; POCKAJ, B. A. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. **Jama**, v. 307, n. 13, p. 1383-1393, 2012.
4. AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). Breast Cancer. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>. Acesso em 17 de fevereiro de 2016.
5. ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. **Revista de nutrição**, v. 17, n. 1, p. 89-96, 2004.
6. BARTEL, C.; EGGER, A. E.; JAKUPEC, M. A.; HEFFETER, P.; GALANSKI, M.; BERGER, W.; KEPLER, B. K. Influence of ascorbic acid on the activity of the investigational anticancer drug KP1019. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 16, n. 8, p. 1205-1215, 2011.
7. BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H., **Bioquímica médica**. 2 ed. São Paulo: Elsevier, 2007.
8. BENADIBA, M. **Análise da expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, apoptose, angiogênese, invasão e migração de células C6 in vitro e in vivo, após tratamento com o ácido γ -linolênico (GLA) e com um novo complexo dirutênico contendo ibuprofeno (Ru-Ibp)**. 2008. 166 f. Tese

- (doutorado em biologia celular e tecidual) – Instituto de ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
9. BERGAMO, A.; SAVA, G. linking the future of anticâncer metal-complexes to the therapy of tumour metastases. **Royal Society of Chemistry**, University of Sussex, 19,50:07, 26/03/2015.
 10. BERGAMO, A.; SAVA, G. Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 31, p. 7817-7823, 2011.
 11. BERGAMO, A.; GAIDDON, C., SCHELLENS, J. H. M., BEIJNEN, J. H., & SAVA, G. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 90-99, 2012.
 12. BERGAMO, A.; MAIS, A.; JAKUPEC, M. A.; KEPPLER, B. K.; Inhibitory effects of the ruthenium complex KP1019 in models of mammary cancer cell migration and invasion. **Metal-based drugs**, v. 2009, 2009.
 13. BERGAMO, A. MESSORI, L.; PICCIOLI, F.; COCCHIETTO, M.; SAVA, G. biological role of adduct formation of the ruthenium (III) complex NAMI-A with sérum albumin and sérum transferrin. *Invest New Drugs*. 2003; 21: 401-411.
 14. BERGAMO, A.; GAVA, B.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; SERLI, B.; COCCHIETTO, M.; ZORZET, S.; SAVA, G. Ruthenium-based NAMI-A type complexes with in vivo selective metastasis reduction and in vitro invasion inhibition unrelated to cell cytotoxicity. **Int J Oncol**. 2002; 21: 1331-1338.
 15. BERTOLLO, C. M. **Mecanismos de morte celular induzida pela radiação Y e expressão de proteínas nas novas linhagens de câncer de mama humano MACL-1 e MGSO-3**. 2010. Tese de doutorado – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
 16. BIERLE, L. A.; REICH, K. L.; TAYLOR, B. E.; MIDDLETON, S. M.; BURKE, S. D.; STULTZ, L. K.; HANSON, P. K.; PARTRIDGE, J. F.; MILLER, M. E. DNA Damage Response Checkpoint Activation Drives KP1019 Dependent Pre-Anaphase Cell Cycle Delay in *S. cerevisiae*. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. 01-24, 2015.
 17. BITTENCOURT, H. N. S.; BRUNSTEIN, C. G. Fármacos Antineoplásicos. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 502-531.

18. BRABEC, V. DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair. **Progress in nucleic acid research and molecular biology**, v. 71, p. 1-68, 2002.
19. BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 11, p. 1649-1659, 2004.
20. BROWN, T. L.; LEMAY, H. E.; BURSTEN, B. E.; BURDGE, J. R. **Química a ciência central**. 9.ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2005.
21. **Carcinoma in situ do colo uterino**, disponível em:<http://anatpat.unicamp.br/lamgin3.html> Acesso em: 05/02/2015 às 00:40.
22. CARNEIRO, M. L. B.; PEIXOTO, R. C. A.; JOANITTI, G. A.; OLIVEIRA, R. G. S.; TELLES, L. A.M.; MIRANDA-VILELA, A. L.; BOCCA, A. L.; VIANNA, L. M. S.; DA SILVA, I. C. R.; DE SOUZA, A. R.; LACAVA, Z. G.M; BÁO, S. N. Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 11, n. 4, 2013.
23. CARNEIRO, M. L. B. **Efeitos biológicos de citrato de ródio II livre e de sua associação a nanopartículas magnéticas e a magnetolipossomas em células de carcinoma mamário: estudos in vitro e in vivo**. 2011. 130 f. Tese de doutorado – Universidade de Brasília, Brasília.
24. CARNEIRO, M. L. B. **Alterações morfológicas e estruturais induzidas por um componente do açafrão (Curcuma longa L.) em células de melanoma humano em cultura**. 2007. 76f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
25. CINTRA, J. R. D.; TEIXEIRA, M. T. B.; DINIZ, R. W.; JUNIOR, H. G.; FLORENTINO, T. M.; FREITAS, G. F.; OLIVEIRA, L. R. M.; NEVES, M. T. R.; PEREIRA, T.; GUERRA, M. R. Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 2, p. 178-187, 2012.
26. DHANKHAR, R.; VYAS, S. P.; JAIN, A. K.; ARORA, S.; RATH, G.; GOYAL, A. K. Advances in novel drug delivery strategies for breast cancer therapy. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 230-249, 2010.

27. DEMUTH, T.; BERENS, M. E. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. **J Neurooncol.** 2004; 70: 217-228.
28. DEPENBROCK, H.; SCHMELCHER, S.; PETER, R.; KEPPLER, B. K., WEIRICH, G.; BLOCK, T.; RASTETTER, J.; HANAUSKE, A. R. Preclinical activity of trans-indazolium [tetrachlorobisindazolruthenate (III)](NSC 666158; IndCR; KP 1019) against tumour colony-forming units and haematopoietic progenitor cells. **European Journal of Cancer**, v. 33, n. 14, p. 2404-2410, 1997.
29. FABRÍCIO, V. C.; AMADO, F.; GIGLIO, A. D. Low-cost outpatient chemotherapy regimen of cisplatin, 5-fluorouracil and leucovorin for advanced head and neck and esophageal carcinomas. **São Paulo Med J.**,v.126 , n. 1, p. 63-66, 2008.
30. FISCHER, B.; HEFFETER, P.; KRYEZIU, K.; GILLE, L.; MEIER, S. M.; BERGER, W.; KOWOL, C. R.; KEPPLER, B. K. Poly (lactic acid) nanoparticles of the lead anticancer ruthenium compound KP1019 and its surfactant-mediated activation. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 3, p. 1096-1104, 2014.
31. GLIGORIJEVIĆ, N.; ARANĐELOVIĆ, S.; FILIPOVIĆ, L.; JAKOVLJEVIĆ, K.; JANKOVIĆ, R.; GRGURIĆ-ŠIPKA, S.; IVANOVIĆ, I.; RADULOVIĆ, S.; TEŠIĆ, Z. L. Picolinate ruthenium (II)–arene complex with in vitro antiproliferative and antimetastatic properties: Comparison to a series of ruthenium (II)–arene complexes with similar structure. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 108, p. 53-61, 2012.
32. GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.
33. HARTINGER, C. G.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; JAKUPEC, M. A.; KYNAST, B.; ZORBAS, H.; KEPPLER, B. K. From bench to bedside—preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis (1H-indazole) ruthenate (III)] (KP1019 or FFC14A). **Journal of inorganic biochemistry**, v. 100, n. 5, p. 891-904, 2006.
34. HEFFETER, P.; BÖCK, K.; ATIL, B.; HODA, M. A. R.; KÖRNER, W.; BARTEL, C.; JUNGWIRTH, U.; KEPPLER, B. C.; MICKSCHE, M.; BERGER, W.; KOELLENSPERGER, G. Intracellular protein binding patterns of the anticancer ruthenium drugs KP1019 and KP1339. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 737-748, 2010.

35. HYPOLITO, M. A.; OLIVEIRA, A. A.; LESSA, R. M.; ROSSATO, M. Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina: estudo em cobaias albinas por emissões otoacústicas produtos de distorção e microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de otorrinolaringologia**, v. 71, n. 3, p. 268-273, 2005.
36. INCA. Instituto Nacional de Câncer Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=336 >. Acesso em 13/01/2015.
37. INCA. Instituto Nacional de Câncer Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/fatores_de_risco_1 >. Acesso em: 08/05/2016.
38. JAKUPEC, M. A.; GALANSKI, M., ARION, V. B.; HARTINGER, C. G.; KEPPLER, B. K. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. **Dalton transactions**, n. 2, p. 183-194, 2007.
39. JAKUPEC, M. A.; Reisner, E.; Eichinger, A.; Pongratz, M.; Arion, V. B.; Galanski, M.; HARTINGER, C. G.; Keppler, B. K. Redox-active antineoplastic ruthenium complexes with indazole: correlation of in vitro potency and reduction potential. **Journal of medicinal chemistry**, v. 48, n. 8, p. 2831-2837, 2005.
40. JUNQUEIRA, L. C. CARNEIRO, J. **Biologia celular de molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2005
41. KAPITZA, S., JAKUPEC, M. A.; UHL, M.; KEPPLER, B. K.; MARIAN, B. the heterocyclic ruthenium (III) complex KP1019 (FFC14A) causes DNA damage and oxidative stress in colorectal tumor cells. **Cancer Letters**. v.226. p. 115-121. 2005.
42. KATSAROS, N.; ANAGNOSTOPOULOU, A. Rhodium and its compounds as potential agents in cancer treatment. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 42, n. 3, p. 297-308, 2002.
43. KO, E.; MOON, A. Natural products for chemoprevention of breast cancer. **Journal of Cancer Prevention**, Seoul Korea, v. 20, n. 04, 223-231, 2015.
44. KOOLMAN, J.; ROHM, K. H. **Bioquímica**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
45. ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran-Patologia**. Elsevier Brasil, 2005.
46. LI, F.; MULYANA, Y.; FETERL, M.; WARNER, J. M.; KEENE, F. R. LI, Fangfei et al. The antimicrobial activity of inert oligonuclear

- polypyridylruthenium (ii) complexes against pathogenic bacteria, including MRSA. *Dalton Transactions*, v. 40, n. 18, p. 5032-5038, 2011.
47. LIMA, A. P. **Estudo do potencial citotóxico e do mecanismo de morte celular de novos protótipos à base de rutênio frente a diferentes células tumorais.** 2014. 113 f. Tese de doutorado – Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2014.
 48. LIPPONER, K. G.; VOGEL, E.; KEPLER, B. K. Synthesis, characterization and solution chemistry of trans-indazoliumtetrachlorobis (indazole) ruthenate (III), a new anticancer ruthenium complex. IR, UV, NMR, HPLC investigations and antitumor activity. Crystal structures of trans-1-methyl-indazoliumtetrachlorobis-(1-methylindazole) ruthenate (III) and its hydrolysis product trans-monoaquatrachlorobis-(1-methylindazole)-ruthenate (III). *Metal-Based Drugs*, v. 3, n. 5, p. 243, 1996.
 49. MENDITI, K. B.C.; KANG, H. C. O papel das proteínas histonas nas neoplasias hematológicas. *Rev. bras. cancerol*, v. 53, n. 4, p. 453-460, 2007.
 50. MIRACCO, C; SANTOPIETRO, R.; BIAGIOLI, M.; LAZZI, S.; NYONGO, A.; VATTI, R.; LUZI, P. Different patterns of cell proliferation and death and oncogene expression in cutaneous malignant melanoma. *Journal of cutaneous pathology*, v. 25, n. 5, p. 244-251, 1998.
 51. OHNISHI, T.; ARITA, N.; HIRAGA, S.; TAKI, T.; IZUMOTO, S.; FUKUSHIMA, Y.; HAYAKAWA, T. Fibronectinmediated cell migration promotes glioma cell invasion through chemokinetic activity. *Clin Exp Metastasis*. 1997; 15: 538-46.
 52. OLIVEIRA, N. F. P.; PLANELLO, A. C.; ANDIA, D. C.; PARDO, A. S. Metilação de DNA e Câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 56, n. 4, p. 493-499, 2010.
 53. OTAKE, Y.; SENGUPTA, T. K.; BANDYOPADHYAY, S.; SPICER, E. K.; FERNANDES, D. J. Retinoid-induced apoptosis in HL-60 cells is associated with nucleolin down-regulation and destabilization of Bcl-2 mRNA. *Molecular pharmacology*, v. 67, n. 1, p. 319-326, 2005.
 54. PARMIGIANI, R. B.; CAMARGO, A. A. O genoma humano e o câncer. **Ferreira CG; Casali JC. Oncologia Molecular. São Paulo: Atheneu**, p. 3-11, 2004.

55. PEIXOTO, R. C. A.; MIRANDA-VILELA, A. L.; FILHO, J. S.; CARNEIRO, M. L. B.; OLIVEIRA, R. G. S.; DA SILVA, M. O. DE SOUZA, A. R.; BÁO, S. N. Antitumor effect of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles on mice bearing breast cancer: a systemic toxicity assay. **Tumor Biology**, v. 14, p. 2966, 2014.
56. PEIXOTO, R. C. A. **Avaliação toxicológica e antitumoral do tratamento sistêmico com citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas de maghemita em modelo experimental de câncer de mama**. 2012. 106f. Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília, Brasília.
57. PIERCE, B. A. **Genética Essencial: conceitos e conexões**. 1ª Edição. Ed. Guanabara Koogan S. A., 2012, 532p.
58. PINTO, L. F. R.; FELZENSWALB, I. Genética do Câncer. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. 1ed. Canoas: Umbra. 2003. p. 247-279.
59. PONGRATZ, M.; SCHLUGA, P.; JAKUPEC, M. A.; ARION, V. B.; HARTINGER, C. G.; ALLMAIER, G.; KEPPLER, B. K. Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 19, n. 1, p. 46-51, 2004.
60. RANG, H. P.; DALE M. M.; RITTTER, J. M. Farmacologia, 6a Edição. **Rio de Janeiro: Editora Elsevier. Cap**, v. 48, p. 692-697, 2007.
61. RODRIGUES, F. S. S.; POLIDORI, M. M. **Revista Brasileira de Cancerologia**. Enfrentamento e Resiliência de Pacientes em Tratamento Quimioterápico e seus Familiares, v. 58, n. 4, p. 619-627, 2012.
62. SANTOS, T.C. **Interação de Novos Compostos de Rutênio Antitumorais com Bicamadas Lipídicas: Mecanismos de Ação Alternativos em Metalofármacos**. 2013. 136 f. Dissertação (Mestrado em bioquímica) – Faculdade de ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa. 2013.
63. SAVA, G.; ALESSIO, E.; BERGAMO, A.; MESTRONI, G. Sulfoxide ruthenium complexes: non-toxic tools for the selective treatment of solid tumour metastases. In: **Metallopharmaceuticals I**. Springer Berlin Heidelberg, 1999. p. 143-169.
64. SAVA, G.; CAPOZZI, I.; CLERICI, K.; GAGLIARD, G.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G. Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a

- novel ruthenium complex. **Clinical & experimental metastasis**, v. 16, n. 4, p. 371-379, 1998.
65. SCHLUGA, P.; HARTINGER, C. G.; EGGER, A.; REISNER, E.; GALANSKI, M.; JAKUPEC, M. A.; KEPPLER, B. K. Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium (III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP. **Dalton transactions**, n. 14, p. 1796-1802, 2006.
66. SINGH, V.; AZAD, G., K.; MANDAL, P.; REDDY, M., A.; TOMAR, R., S. Anti-cancer drug KP1019 modulates epigenetics and induces DNA damage response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Febs Letters**, Índia, v.588, p. 1044-1052, 2014.
67. SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, vol. 1, 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.
68. SOUZA, A. P. C.; **Complexos de rutênio (ii) de interesse biológico: avaliação in vitro e in vivo do potencial antitumoral e genotóxico**. 2014. tese de doutorado. universidade federal de são carlos.
69. STEVENS, S. K.; STREHLE, A. P.; MILLER, R. L.; GAMMONS, S. H.; HOFFMAN, K. J.; MCCARTY, J. T.; MILLER, M. E.; STULTZ, L., K.; HANSON, P., K. The anticancer ruthenium complex KP1019 induces DNA damage, leading to cell cycle delay and cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular pharmacology**, v. 83, n. 1, p. 225-234, 2013.
70. TAVASSOÉLI, F. A.; DEVILEE, P. World health organization classification of tumors. In: (Ed.). **Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs**, v.4, 2003.
71. TRÁVNÍČEK, Z.; MAĽAROVÁ, M. M.; NOVOTNÁ, R.;VANČO, J. ŠTĚPÁNKOVÁ, K.; SUCHÝ, P. In vitro and in vivo biological activity screening of Ru (III) complexes involving 6-benzylaminopurine derivatives with higher pro-apoptotic activity than NAMI-A. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 105, n. 7, p. 937-948, 2011.
72. UNTURA, L. P.; REZENDE L. F. A Função Cognitiva em Pacientes Submetidos à Quimioterapia: uma Revisão Integrativa. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 2, p. 257-265, 2012.
73. WARD, L. S. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arq Bras Endocrinol Metab**, vol 46, n. 4, p.351-360, 2002.

74. WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E.; OUN, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton transactions**, v. 39, n. 35, p. 8113-8127, 2010.
75. ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. **Curr Opin Chem Biol**, v. 7, n. 4, p. 481-9, 2003.
76. ZHOU, J.; LEUSCHNER, C.; KUMAR, C.; HORMES, J. F.; SOBOYEJO, W. O. Sub-cellular accumulation of magnetic nanoparticles in breast tumors and metastases. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2001-8, 2006.
77. ZORZET, S.; BERGAMO, A.; COCCHIETTO, M.; SORC, A.; GAVA, B.; ALESSIO, A.; IENGO, A.; SAVA, G. Lack of in vitro cytotoxicity, associated to increased G2-M cell fraction and inhibition of matrigel invasion, may predict in vivo-selective antimetastasis activity of ruthenium complexes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, n. 3, p. 927-933, 2000.