

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL-MG

**BRUNA ALEXANDRE OLIVEIRA DA SILVA**

**CITOTOXICIDADE DE COMPLEXOS DE PALÁDIO(II) PARA AS LINHAGENS  
MCF-7 E MDA-MB-435 DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

Alfenas/MG  
2019

**BRUNA ALEXANDRE OLIVEIRA DA SILVA**

**CITOTOXICIDADE DE COMPLEXOS DE PALÁDIO(II) PARA AS LINHAGENS  
MCF-7 E MDA-MB-435 DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: fisiopatologia.  
Orientadora: Profa. Dra. Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa.

Alfenas/MG  
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfnas

S586c Silva, Bruna Alexandre Oliveira da.  
Citotoxicidade de complexos de Paládio(II) para as linhagens MCF-7 e  
MDA-MB-435 de adenocarcinoma mamário humano. / Bruna Alexandre  
Oliveira da Silva – Alfnas/MG, 2019.  
58 f.: il. --

Orientadora: Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa.  
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde)  
Universidade Federal de Alfnas, 2019.  
Bibliografia.

1. Neoplasias da Mama. 2. Complexos de Coordenação. 3. Células. I.  
Gouvêa, Cibele Marli Cação Paiva. II. Título.

CDD-616.49

**BRUNA ALEXANDRE OLIVEIRA DA SILVA**

**CITOTOXICIDADE DE COMPLEXOS DE PALÁDIO(II) PARA AS LINHAGENS  
MCF-7 E MDA-MB-435 DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

A Banca examinadora abaixo assinada aprova a  
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas  
à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de  
concentração: fisiopatologia.  
Orientadora: Profa. Dra. Cibele Marli Cação Paiva  
Gouvêa.

Aprovada em: 05/04/2019

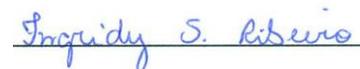
Profa. Dra. Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - MG

Assinatura:



Profa. Dra. Ingridy Simone Ribeiro  
Instituição: IFSULDEMINAS

Assinatura:



Profa. Dra. Patrícia Lunardelli Negreiros de Carvalho  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - MG

Assinatura:



Dedico a minha mãe e ao meu pai, por sempre estarem presentes em minha vida e que por diversas vezes abdicaram dos seus sonhos para que os meus pudessem ser vividos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me iluminado, me protegido e me concedido saúde até o final dessa caminhada.

Aos meus pais, Luci e Alexandre, por serem meu alicerce, pelo amor e confiança que depositaram em mim.

À minha irmã Bianca, pelas palavras de carinho e incentivo.

Ao meu namorado Rodrigo, por me acalmar nos momentos difíceis, por acreditar no meu potencial e pelo companheirismo nos momentos de alegria.

À minha querida amiga Lorena, por ser minha confidente e por me proporcionar momentos felizes ao longo do meu trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa por partilhar seu conhecimento comigo, por sua incansável dedicação e paciência. Agradeço ainda por ter acreditado em meu trabalho.

A equipe do laboratório de Cultura de Células pelo apoio, em especial a aluna de iniciação científica Isabela por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Alfenas por ser minha segunda casa e pela oportunidade oferecida. Agradeço o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos meus colegas de trabalho, amigos e a todos que de alguma forma contribuíram para que este sonho fosse alcançado.

## LISTA DE SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
BL1	Basal-símile 1
BL2	Basal-símile 2
Br	Bromo
<i>BRCA1</i>	Gene que codifica a proteína BRCA1
<i>BRCA2</i>	Gene que codifica a proteína BRCA2
BSA	Albumina de soro bovino
C1	Ligante
C2	Complexo de paládio 2
C3	Complexo de paládio 3
C4	Complexo de paládio 4
C5	Complexo de paládio 5
C6	Complexo de paládio 6
C7	Complexo de paládio 7
CEP17	Sonda centromérica para o cromossomo 17
Cl	Cloro
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ER	Receptor de estrógeno $\alpha$
<i>ERBB2</i>	Gene que codifica a proteína do fator de crescimento epidérmico humano 2
<i>ESR1</i>	Gene que codifica o receptor de estrógeno
HER1	Receptor para o fator de crescimento epidérmico humano 1
HER2	Receptor para o fator de crescimento epidérmico humano 2
I	Iodo
IM	Imunomodulatório
Ki-67	Proteína que indica o índice de proliferação celular
LAR	Luminal receptor de andrógeno
M	Mesenquimal
M0	Medida entre as bordas da ferida no tempo 0 h
M48	Medida entre as bordas da ferida no tempo 48 h

MCF-7	Célula modelo de carcinoma mamário humano estrógeno positivo
MDA-MB-435	Célula modelo de carcinoma mamário humano triplo-negativo
MEC	Matriz extracelular
MSL	Mesenquimal tronco-símile
N <sub>3</sub>	Azida
N7	Nitrogênio 7
NCO	Cianato
p53	Proteína p53
PARP	Enzima poli-ADP ribose-polimerase
PR	Receptor de progesterona
R <sub>1</sub>	Radical 1
R <sub>2</sub>	Radical 2
R <sub>3</sub>	Radical 3
RPMI	Meio de cultura “Roswell Park Memorial Institute”
SCN	Tiocianato
SRB	Sulforrodamina B
TBE	Tampão Tris, ácido bórico e EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Tampão Tris e EDTA
TP53	Gene que codifica a proteína p53
V	Volts

## RESUMO

O câncer de mama é o tipo prevalente entre as mulheres e compreende um grupo heterogêneo de tumores com diferentes prognósticos e respostas ao tratamento, incluindo os tumores receptor de estrógeno positivo (ER+), os que apresentam superexpressão do receptor para o fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2+) e os triplo-negativos. A cisplatina é um agente quimioterápico utilizado na prática clínica para o tratamento de vários tipos tumorais, entretanto, os efeitos tóxicos adversos desse medicamento, limitam seu uso. Assim, a prospecção de novos compostos com atividade antitumoral é importante para aumentar a eficiência do tratamento do câncer de mama. Este é o caso dos complexos de paládio(II). O presente trabalho avaliou a atividade citotóxica do ligante (C1) e de complexos de paládio(II), derivados deste (C2 – C7), frente as linhagens celulares MCF-7, de tumor de mama ER+ e MDA-MB-435, de tumor de mama triplo-negativo. As células foram cultivadas em meio RPMI, contendo 20% de soro fetal bovino e antibióticos, a 37° C, em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Foram realizados os ensaios: de sulforrodamina B para avaliação da viabilidade celular, clonogênico, de migração, de adesão, morfológico, morfométrico, de fragmentação do DNA genômico e de ligação ao DNA plasmidial. Os resultados demonstraram que houve redução da viabilidade celular após tratamento com os complexos de paládio(II) e estes inibiram completamente a sobrevivência celular, avaliada pelo ensaio clonogênico. O tratamento alterou a morfologia e induziu a morte celular. Assim, os complexos de paládio(II) podem ser considerados antitumorais. Além disso, os complexos inibiram a migração e adesão das células à matriz extracelular, o que indica atividade antimetastática. Também apresentaram capacidade de ligação ao DNA plasmidial induzindo a quebra tanto do DNA plasmidial como do DNA genômico das células, com formação de padrão escada do DNA, indicando apoptose. Assim, os complexos analisados apresentaram atividade antitumoral e antimetastática, podendo ser considerados supressores tumorais e seu mecanismo de ação inclui a indução de apoptose. Os resultados deste trabalho indicaram que os complexos C5 e C7 foram ativos, em todos os testes realizados, tanto para células MCF-7 como para MDA-MB-435, sendo bons candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer de mama.

Palavras-chave: Neoplasias da Mama. Complexos de Coordenação. Células.

## ABSTRACT

Breast cancer is the prevalent cancer type among women and comprises a heterogeneous group of tumors with different prognoses and responses to treatment, including estrogen receptor positive tumors (ER+), those with overexpression of the receptor to the human epidermal growth factor 2 (HER2+) and triple-negatives. Cisplatin is a chemotherapeutic agent used in clinical practice for the treatment of various tumor types, however, the adverse effects of this compound, limit its use. Thus, the search for new compounds with antitumor activity is important to increase the efficiency of breast cancer treatment. This is the case of palladium(II) complexes. The present study evaluated the cytotoxic activity of the ligand (C1) and palladium(II) complexes(C2-C7), derived from the ligand, to the cell lines MCF-7, breast tumor ER+ and MDA-MB-435, triple-negative breast tumor. The cells were cultured in RPMI medium containing 20% fetal bovine serum and antibiotics, and maintained at 37 °C in humidified atmosphere, with 5% CO<sub>2</sub>. The following tests were carried out: sulforhodamine (B) for the evaluation of cell viability, clonogenic, migration and adhesion assays, morphological and morphometric studies, genomic DNA fragmentation analysis and plasmidial DNA binding test. The results showed that there was a reduction of cell viability after treatment with palladium(II) complexes and these inhibited completely the cell survival in the clonogenic assay. The treatment induced cell morphological alterations and cell death. Thus the palladium(II) complexes can be considered antitumor compounds. In addition, the complexes inhibited migration and adhesion of the cells to the extracellular matrix, which indicates antimetastatic activity. The complexes showed plasmidial DNA binding capacity and induced break of both plasmidial and genomic DNA, with DNA ladder pattern formation, indicating apoptosis. Thus, the complexes analyzed showed antitumor and antimetastatic activities, can be considered tumor suppressors and their mechanism of action includes the induction of apoptosis. The results of this work indicated that the complexes C5 and C7 were active in all tests, both for MCF-7 and MDA-MB-435 being good candidates for the development of new drugs for the treatment of breast cancer.

Keywords: Breast Neoplasms. Coordination Complexes. Cells.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	11
<b>2.1</b>	<b>Câncer de mama: incidência e fatores de risco</b>	11
<b>2.2</b>	<b>Tumores mamários: tipos e tratamento</b>	12
<b>2.3</b>	<b>Complexos de platina e de paládio e câncer de mama</b>	18
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	22
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	22
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	22
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	23
<b>4.1</b>	<b>Cultura de células MCF-7 e MDA-MB-435</b>	23
<b>4.2</b>	<b>Complexos de paládio(II) e tratamento das células</b>	23
<b>4.3</b>	<b>Ensaio de sulforrodamina B (SRB)</b>	24
<b>4.4</b>	<b>Ensaio clonogênico</b>	24
<b>4.5</b>	<b>Ensaio de migração celular – “wound healing”</b>	25
<b>4.6</b>	<b>Ensaio de adesão celular</b>	25
<b>4.7</b>	<b>Estudo morfológico e morfométrico</b>	26
<b>4.8</b>	<b>Detecção de morte celular</b>	26
<b>4.9</b>	<b>Fragmentação do DNA</b>	27
<b>4.10</b>	<b>Ensaio de ligação ao DNA plasmidial</b>	27
<b>4.11</b>	<b>Análise estatística</b>	27
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	28
<b>5.1</b>	<b>Complexos de paládio(II) sintetizados</b>	28
<b>5.2</b>	<b>Viabilidade celular</b>	30
<b>5.3</b>	<b>Ensaio clonogênico</b>	31
<b>5.4</b>	<b>Ensaio de migração celular – método “wound healing”</b>	32
<b>5.5</b>	<b>Ensaio de adesão celular</b>	36
<b>5.6</b>	<b>Estudo morfológico e morfométrico</b>	38
<b>5.7</b>	<b>Morte celular</b>	43
<b>5.8</b>	<b>Fragmentação do DNA</b>	44
<b>5.9</b>	<b>Ligação ao DNA plasmidial</b>	46
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	50
	<b>REFERÊNCIAS</b>	51

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto desenvolvidos. Existem diversos tipos de tumores mamários, fenotipicamente distintos, devido à mutação em diferentes genes, que controlam a proliferação e a diferenciação do tecido mamário. Dentre estes, destacam-se os tumores que expressam o receptor de estrógeno (ER+), o receptor de progesterona (PR+), os que apresentam superexpressão do receptor para o fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2+) ou a amplificação do gene *ERBB2* e os triplo-negativos, que não expressam os receptores de estrógeno, progesterona e não apresentam a superexpressão de HER2, para os quais não há terapia alvo disponível. Apesar de ser uma patologia de bom prognóstico, se diagnosticada precocemente, ainda não há tratamento curativo para vários tipos de tumores mamários, especialmente, quando ocorrem metástases. Assim, é importante a busca por compostos mais eficazes para o tratamento desta patologia.

Os complexos de platina são utilizados como agentes quimioterápicos, sendo a cisplatina [cis-diaminodicloroplatina(II)], a mais utilizada clinicamente. Contudo, os efeitos adversos e o desenvolvimento de resistência pelas células tumorais limitam seu uso. Para contornar esses problemas, novos compostos têm sido sintetizados. Neste contexto inserem-se aqueles contendo paládio, um metal menos tóxico ao organismo quando comparado à platina. Vários complexos de paládio(II) apresentam atividade citotóxica para células tumorais. Em estudo anterior de nosso laboratório com dois complexos de paládio(II) evidenciou o efeito citotóxico e inibidor do crescimento de células de adenocarcinoma mamário MDA-MB-435.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar a atividade citotóxica de novos complexos imínicos de paládio(II), frente células MCF-7 (modelo de carcinoma mamário humano ER+) e para células MDA-MB-435 (modelo de carcinoma mamário humano triplo-negativo).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Câncer de mama: incidência e fatores de risco

As doenças e agravos não transmissíveis são os principais responsáveis mundiais pelo adoecimento e óbito, com destaque para o câncer. Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças multifatoriais, que têm em comum o crescimento desordenado ou maligno de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo se espalhar para outras regiões do corpo, formando metástases. Dividindo-se rapidamente, as células cancerosas formam as neoplasias ou tumores malignos. As alterações genéticas observadas no câncer ocorrem em células germinativas ou somáticas. As que ocorrem em células germinativas podem ser herdadas, enquanto as que ocorrem em células somáticas são adquiridas ao longo da vida por acúmulo de mutações no DNA, decorrentes de fatores endógenos e exógenos. Tanto as alterações germinativas como somáticas têm papel fundamental na predisposição individual ao câncer, influenciando tanto a iniciação como a progressão tumoral. Assim, as alterações genéticas servem como biomarcadores efetivos para a detecção precoce, monitoração e prognóstico do câncer (BRAY et al., 2018; INSTITUTO, 2017; LOW; ZEMBUTSU; NAKAMURA, 2018).

O câncer de mama é a neoplasia maligna de maior ocorrência na população feminina, compreendendo, aproximadamente, 25% de todos os cânceres em mulheres e a segunda maior causa de morte por câncer no mundo (BRAY et al., 2018). A estimativa no Brasil, para cada ano do biênio 2018-2019, aponta a ocorrência de cerca de 59.700 mil novos casos de câncer de mama e no estado de Minas Gerais, para o ano de 2018, a projeção foi de 5.360 novos casos. Este tipo de câncer é considerado relativamente de bom prognóstico, se diagnosticado precocemente, com taxas de cura que, em geral, chegam a 90%. Entretanto, no Brasil os índices de mortalidade continuam elevados, principalmente, devido ao diagnóstico tardio (INSTITUTO, 2017).

Este câncer é resultado da relação entre fatores ambientais e genéticos (multifatorial), envolvendo fatores biológico-endócrinos, vida reprodutiva, comportamento e estilo de vida. Os principais fatores de risco para a ocorrência do câncer de mama são: idade da primeira menstruação menor que 12 anos; menopausa após os 55 anos; nuliparidade; primeira gravidez após os 30 anos; uso de anticoncepcionais; terapia de reposição hormonal na menopausa, especialmente, por tempo prolongado; exposição à radiação ionizante; consumo de bebidas alcoólicas e tabaco; obesidade; sedentarismo e mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, que

favorecem a ocorrência do câncer de mama e de ovário (HIATT; BRODY, 2018; INSTITUTO, 2017).

## 2.2 Tumores mamários: tipos e tratamento

Apesar da mesma origem tecidual, os carcinomas de mama são heterogêneos. O câncer de mama apresenta etiologia complexa, com mutações gênicas, que resultam na perda de função supressora de tumor e sinalização cruzada das vias de transdução de sinais, o que determina a heterogeneidade molecular e morfológica desta neoplasia. A heterogeneidade tumoral determina as características clínicas da doença, o comportamento metastático e a resposta terapêutica. Assim, tumores com a mesma classificação histológica podem apresentar diferenças no perfil molecular, o que pode determinar diferenças no curso biológico da doença e na resposta ao tratamento (EZENWAJIKU; MA; ADEMUYIWA, 2018; GROSS et al., 2016).

Os tumores mamários são classificados em subtipos, com base na morfologia, organização estrutural, presença de marcadores imuno-histoquímicos e moleculares, que são utilizados no diagnóstico e são importantes para o planejamento terapêutico. Os marcadores imuno-histoquímicos mais utilizados são os receptores de estrógeno  $\alpha$  (ER), progesterona (PR), do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e mais recentemente o Ki-67 (índice de proliferação celular), proteína nuclear não-histônica, expressa em células em proliferação. Assim, em termos clínicos há quatro tipos de tumores mamários: luminal A (ER+, PR+, HER2-, Ki-67 < 14%); luminal B, que pode ser HER2- (ER+ e/ou PR+, HER2-, Ki-67  $\geq$  14%) ou HER2+ (ER+ e/ou PR+, HER2+, Ki-67 variável); HER2 superexpresso (ER-, PR-, HER2+) e triplo-negativo (ER-, PR-, HER2-). A expressão de ER, PR e Ki-67 é determinada por imuno-histoquímica, assim como a expressão de HER2, que pode também ser determinada por hibridização *in situ*. Ainda os tumores são caracterizados pelo grau histológico e expressão de Ki-67, para distinguir os tumores luminal A e B, fatores importantes para determinar o tipo de tratamento (CURIGLIANO et al., 2017).

Os tumores luminal A apresentam forte marcação para ER e PR; Ki-67 e grau histológico baixos. Os tumores luminal B apresentam marcação para ER menor e PR variável, Ki-67 alto e grau histológico maior que os luminal A. O tumor é classificado como positivo para ER ou PR quando ocorre imunomarcção  $\geq$  1% dos núcleos celulares e o Ki67 é

considerado alto quando ocorre imunomarcção  $\geq 14\%$  (CURIGLIANO et al., 2017; HAMMOND et al., 2010).

Para ser classificado como HER2+ toda a circunferência da membrana celular dever ser marcada intensamente por imuno-histoquímica em 10% ou mais células e no caso de diagnóstico ou confirmação diagnóstica por hibridização *in situ*, o uso de duas sondas moleculares, HER2/CEP17, é o mais indicado (CURIGLIANO et al., 2017; HAMMOND et al., 2010; WOLFF et al., 2018).

As características clínicas são fundamentais para determinação do tipo de tumor mamário e do tratamento, entretanto, a classificação baseada apenas em marcadores imuno-histoquímicos apresenta-se insuficiente para a caracterização de alguns tipos de tumores, inclusive para a escolha mais adequada do tratamento. Assim, esforços para a melhor compreensão sobre a heterogeneidade do câncer de mama, baseado em padrões de expressão gênica resultaram na primeira classificação molecular em 5 subtipos intrínsecos de tumores mamários: luminal A, luminal B, HER2 superexpresso, basal-símile (“basal-like”) e normal-símile (PEROU et al., 2000). Desde então, outros subtipos moleculares foram descritos (FARMER et al., 2005; PRAT et al., 2010; CURTIS et al., 2012).

O subtipo basal-símile apresenta perfil de expressão gênica semelhante ao das células mioepiteliais do tecido mamário normal (epitélio basal de outros tecidos normais) e quando de sua descrição acreditou-se englobar todos os tumores de mama triplo-negativos. Entretanto, estudos posteriores demonstraram que nem todos os tumores de mama basal-símile são triplo-negativos, bem como nem todos os tumores triplo-negativos são do tipo basal e os estudos moleculares têm demonstrado que os tumores de mama triplo-negativos são o grupo com maior heterogeneidade (BERTUCCI et al., 2008). Assim, a maioria dos carcinomas de mama basal-símile é triplo-negativo (ER-, PR-, HER2-) por reação imuno-histoquímica (BARROS; LEITE, 2015; SERRA et al., 2014; UNTCH et al., 2013).

A análise molecular dos tumores triplo-negativos demonstrou instabilidade genômica, alta frequência de mutação no gene *TP53* (68% dos casos), além de outras aberrações cromossômicas estruturais e numéricas (KHOSRAVI-SHAHI; CABEZÓN-GUTIÉRREZ; CUSTODIO-CABELLO, 2018; RIDA et al., 2018). Muitos apresentam mutação em *BRCA1* e *BRCA2*, além de outros genes envolvidos no reparo por recombinação homóloga e superexpressão do receptor para o fator de crescimento epidérmico humano 1, HER1 (KHOSRAVI-SHAHI; CABEZÓN-GUTIÉRREZ; CUSTODIO-CABELLO, 2018). Assim, os tumores triplo-negativos têm sido divididos em diversos subtipos moleculares. Lehmann et al. (2011) propuseram a primeira classificação molecular dos tumores triplo-negativos em:

basal-símile 1 (BL1), basal-símile 2 (BL2), imunomodulatório (IM), mesenquimal (M), mesenquimal tronco-símile (MSL) e luminal receptor de andrógeno (LAR). Várias tentativas de classificar os tumores triplo-negativos demonstram sua marcante heterogeneidade e não há ainda, sistema padrão de classificação molecular, uniformemente, aceito para este tipo tumoral (EZENWAJIAKU; MA; ADEMUYIWA, 2018; QUIST et al., 2018). Cada subtipo apresenta diferentes fatores de risco para incidência, resposta terapêutica, progressão da doença e órgãos preferenciais para metástases (QUIST et al., 2018; TONG et al., 2018).

Apesar dos avanços nos estudos moleculares dos diferentes cânceres de mama, a análise complexa da expressão gênica tumoral dificulta sua implementação na prática clínica. Assim a classificação análoga, aproximada por modelos imuno-histoquímicos, embora imprecisa, é, frequentemente, utilizada para a definição do tratamento e estabelecimento do prognóstico da doença. A classificação imuno-histoquímica prediz a molecular, porém, não a substitui e tem a limitação de deixar uma série de casos sem catalogação, devido à mistura de marcadores, especialmente, nos tumores triplo-negativos (BARROS; LEITE, 2015; JOSEPH et al., 2018; LI; OPREA-ILIES; KRISHNAMURTI, 2017).

O principal desafio para o tratamento do câncer de mama é a natureza heterogênea dos tumores mamários, a qual determina as opções terapêuticas. Uma vez diagnosticado, as opções de tratamento para o câncer de mama incluem: cirurgia, terapia endócrina, imunoterapia, quimioterapia citotóxica sistêmica (que pode ser neoadjuvante e adjuvante) e radioterapia. O avanço do conhecimento sobre a heterogeneidade biológica do câncer de mama permitiu o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais efetivas e individualizadas para o tratamento de tumores ER+, PR+ e HER2+. Embora o câncer de mama seja uma doença local, pode ocorrer metástase para linfonodos próximos e, posteriormente, para os órgãos distais. A metástase é uma grande complicação da doença, sendo responsável pelo mau prognóstico e alta taxa de mortalidade em pessoas com câncer (LEE et al., 2011; SAMI; EFFERTH, 2017).

A cirurgia é o tratamento padrão para todos os tumores mamários, que possam ser removidos e, em geral, é seguida de radioterapia. No caso de tumores maiores e comprometimento de linfonodo, a terapia neoadjuvante é recomendada. Esta terapia destina-se a promover o tratamento sistêmico da doença, para prevenindo a recorrência e a promovendo a diminuição do tumor para que a cirurgia seja o menos invasiva possível (CURIGLIANO et al., 2017).

Os tumores mamários ER+ são os mais frequentes e, apesar da boa resposta clínica inicial à terapia antiestrogênica, é muito frequente o surgimento de resistência tumoral ao

medicamento, tanto intrínseca como adquirida. Foi verificado que os tumores luminais A e B são heterogêneos em termos de expressão gênica, espectro de mutações, alterações de número de cópias cromossômicas e prognóstico, com a identificação de 7 subtipos de tumores ER+, o que explica a evolução favorável da maioria, mas não de todos os casos, quando se utiliza apenas a marcação imuno-histoquímica para direcionar o tratamento. Ainda a resistência ao medicamento pode ocorrer por mutação no gene que codifica o receptor de estrógeno (*ESR1*) ou em seus efetores, por resposta adaptativa ao medicamento ou mesmo por regulação epigenética (CURTIS et al., 2012; TANG et al., 2016).

Os tumores ER+ são sempre tratados com terapia hormonal ou antiestrogênica, que inclui moduladores seletivos para os receptores de estrógeno, como tamoxifeno, inibidores da aromatase (anastrozol e letrozol) e análogos do hormônio gonadotrofina, de forma adjuvante ou mesmo de forma paliativa em casos de metástase. Atualmente, recomenda-se apenas terapia hormonal por 5 anos para os tumores ER+, HER2- em estágio precoce, sendo a quimioterapia com antraciclina e taxanos indicada no caso de resistência, alta taxa de proliferação celular, com alto risco genômico ou clínico de recorrência (CURIGLIANO et al., 2017).

Os tumores mamários HER2+ compreendem cerca de 20% dos tumores mamários diagnosticados, são mais agressivos e apresentam sobrevida livre da doença e global com taxas inferiores aos que não superexpressam HER2, sendo tratados com docetaxel (taxano) e anticorpo monoclonal anti-HER2 por 12 meses. Esses tumores respondem ao anticorpo monoclonal trastuzumabe, que age sob a porção extracelular da proteína HER2, inibindo a progressão do tumor; entretanto, o carcinoma metastático é incurável. No caso de metástases a utilização conjunta do anticorpo monoclonal pertuzumabe (anti-HER2), aumenta a sobrevivência (BASELGA et al., 2017; CURIGLIANO et al., 2017; LOIBL; GIANNI, 2017; PERNAS; BARROSO-SOUSA; TOLANEY, 2018).

O anticorpo trastuzumabe foi introduzido na prática clínica em 2005, o que revolucionou o tratamento do câncer HER2+, aumentando, consideravelmente, o sucesso do tratamento e a sobrevida dos tratados, entretanto, algumas pessoas não respondem ao tratamento, devido à heterogeneidade tumoral e ao desenvolvimento de resistência ao tratamento. Embora o mecanismo de resistência não seja conhecido, os estudos da biologia do tumor HER2+ resultaram em novos agentes terapêuticos-alvo, como o pertuzumabe e em novas estratégias terapêuticas que têm auxiliado na melhora da resposta às terapias-alvo para o HER2 (WUERSTLEIN; HARBECK, 2017).

Os tumores de mama triplo-negativos compreendem cerca de 20% dos tumores mamários, apresentam alto grau histológico, características histopatológicas heterogêneas, alta taxa de proliferação, metástase e recorrência, com o pior prognóstico entre todos os tipos de câncer de mama (KHOSRAVI-SHAHI; CABEZÓN-GUTIÉRREZ; CUSTODIO-CABELLO, 2018; RIDA et al., 2018). Cerca de 80% dos tumores triplo-negativos apresenta mutação em *BRCA1*, o que piora o prognóstico devido à sua função no reparo de alterações no DNA, sendo fator preditivo de resposta à quimioterapia. Os tumores triplo-negativos podem ainda expressar a proteína p53 mutante e baixos níveis de claudina, proteínas responsáveis pela junção oclusiva em células epiteliais. Apesar das características histológicas semelhantes e de não expressarem ER, PR e HER2, esses tumores constituem um grupo heterogêneo em termos moleculares, patológico e clínico, sendo o subtipo BL1 o que apresenta melhor resposta terapêutica (KHOSRAVI-SHAHI; CABEZÓN-GUTIÉRREZ; CUSTODIO-CABELLO, 2018; OMARINI et al., 2018; QUIST et al., 2018).

Para os tumores triplo-negativos não há terapia-alvo disponível, sendo a quimioterapia citotóxica sistêmica a principal opção terapêutica, contudo, a heterogeneidade da doença, com diferentes subtipos moleculares, determina a resposta individual diferente ao mesmo tratamento. Este também é o caso de doença recorrente e avançada, com metástase. A taxa de recorrência média dos tumores triplo-negativos é de 3 anos e a probabilidade de morte por metástase em 5 anos é três vezes maior que no caso de tumores ER+ (KHOSRAVI-SHAHI; CABEZÓN-GUTIÉRREZ; CUSTODIO-CABELLO, 2018; RIDA et al., 2018).

Atualmente, não há consenso internacional determinando quais marcadores imuno-histoquímicos e alvos genômicos devem ser empregados para melhor identificar e tratar os tumores triplo-negativos. Além da ausência de marcador molecular específico nesses tumores, outro desafio para a escolha do tratamento é o reduzido número de amostras nos estudos clínicos e a natureza retrospectiva dos estudos. Cabe ainda ressaltar o paradoxo desses tumores, que apesar da boa resposta inicial à quimioterapia, com taxas de ausência de carcinoma invasivo residual superiores aos demais tipos de tumores mamários, com qualquer regime quimioterápico neoadjuvante, apresentam baixas taxas de sobrevida e altas taxas de recorrência no período de 3 anos (cerca de 63% dos casos), provavelmente, por apresentarem doença residual após a cirurgia, devido ao microambiente imunológico do tumor e à presença de células tumorais pouco diferenciadas quiescentes (JITARIU et al., 2017; OMARINI et al., 2018; RIDA et al., 2018; SARAIVA et al., 2017).

O tratamento do câncer de mama triplo-negativo é complexo, não há protocolo quimioterápico preferencial, mas este inclui antraciclina, taxanos e pode incluir

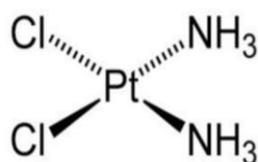
ciclofosfamida, tanto na quimioterapia neoadjuvante como adjuvante, sendo a primeira, considerada a principal abordagem terapêutica. A introdução da quimioterapia neoadjuvante, especialmente, nos casos de doença precoce, refletiu em melhora na resposta ao tratamento da doença, especialmente, nos casos com ausência de doença residual após este tratamento. A adição de sais de platina à terapia neoadjuvante parece melhorar a resposta ao tratamento e os estudos têm indicado aumento de sobrevida livre de doença nos tratados com cisplatina e carboplatina (BIANCHINI, 2016; CASTRELLON et al., 2017; CURIGLIANO et al., 2017; KHOSRAVI-SHAHI; CABEZÓN-GUTIÉRREZ; CUSTODIO-CABELLO, 2018; POGGIO et al., 2018; TONG et al., 2018). Além de quimioterápicos, novas terapias sistêmicas têm sido estudadas para o tratamento dos tumores triplo-negativos, entretanto, não há ainda terapia-alvo aprovada. Vários estudos clínicos estão em andamento para avaliação da efetividade de fármacos e compostos para o tratamento, tais como: agentes que produzem danos ao DNA; inibidores da poli-ADP ribose-polimerase (PARP), que atua no reparo de lesão de simples fita; inibidores dos receptores tirosina-quinase e da sinalização celular; inibidores do receptor de andrógeno; moduladores diretos da apoptose e imunomoduladores (CASTRELLON et al., 2017; COATES et al., 2015; JITARIU et al., 2017; LA BELLE et al., 2017; LI; OPREA-ILIES; KRISHNAMURTI, 2017; NOOR.; MASTER, 2018; OMARINI et al., 2018; PARK; AHN; KIM, 2018; SHARMA, 2018; ZEICHNER; TERAWAKI; GOGINENI, 2016).

Os tumores de mama ER+ e HER2+ possuem terapia-alvo antiestrogênica e com anticorpo monoclonal anti-HER2, respectivamente, entretanto, para os tumores triplo-negativos não há terapia-alvo disponível, são tratados por quimioterapia convencional e a taxa de morte e recorrência é maior que no caso de tumores ER+. O tumor triplo-negativo é o de pior prognóstico, mas mesmo no caso de tumores ER+ e HER2+ o tratamento pode não ser eficaz, principalmente, devido ao desenvolvimento de resistência tumoral, dada à heterogeneidade molecular dos tumores. Além da resistência tumoral, para os casos invasivos dos tumores mamários ER+, com comprometimento de várias partes do tecido mamário e de outros tecidos, o tratamento disponível atualmente é pouco eficaz. Somado a isto, os inúmeros efeitos adversos dos medicamentos disponíveis atualmente, podem impedir seu uso, o que justifica a busca de novos e mais eficazes medicamentos para o tratamento desta patologia (KHOSRAVI-SHAHI; CABEZÓN-GUTIÉRREZ; CUSTODIO-CABELLO, 2018; NOOR.; MASTER, 2018).

### 2.3 Complexos de platina e de paládio e câncer de mama

A cis-diaminodicloroplatina ou cisplatina ( $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ ) foi sintetizada pela primeira vez em 1844 por Michele Peyrone e teve sua estrutura química descrita apenas em 1893, por Alfred Werner (DASARI; TCHOUNWOU, 2014). Trata-se de composto metálico (platina) de coordenação, com geometria quadrado-planar (FIGURA 1). As pesquisas e observações feitas por Rosenberg, Vancamp e Krigas (1965) em *E. coli*, permitiram a descoberta do poder inibidor de divisão celular deste composto. Desde então, a cisplatina ganhou atenção e passou a ser utilizada, sozinha ou de forma combinada, no tratamento de diversos tipos de câncer, principalmente, nos cânceres decorrentes de mutações em células germinativas. Desde sua aprovação para o tratamento do câncer, em 1978, tem sido crescente a busca por novos complexos de platina(II), bem como de outros metais nobres com potencial antitumoral, entretanto, até o momento apenas a carboplatina e a oxaliplatina obtiveram aprovação mundial para o tratamento de vários tipos de tumores (APPS; CHOI; WHEATE, 2015; DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

Figura 1 - Cis-[(diaminodicloro)platina(II)] ou cisplatina.



Fonte: Dasari e Tchounwou (2014).

Apesar de bastante estudado, o mecanismo de ação da cisplatina não está completamente elucidado, mas sua ação citotóxica para células tumorais deve-se à sua interação com o DNA. Os átomos de Cl da cisplatina são hidrolisados por reação química com agentes nucleofílicos, como a água e grupamentos sulfidríla, formando um complexo de platina altamente reativo, que se liga ao DNA pelo N7 das purinas, preferencialmente, de resíduos de guanosina. A formação do aduto, por ligação cruzada no DNA, interfere na replicação, divisão celular e transcrição. Se os danos ao DNA não forem reparados, a célula entra em apoptose. Diferentes adutos podem se formar pela ligação da cisplatina ao DNA, sendo inicialmente monofuncionais e, posteriormente, formam ligações intra e interfitas, preferencialmente do DNA genômico, mas ligações com o DNA mitocondrial e proteínas também podem ocorrer (MEHMOOD, 2014).

A cisplatina é um dos fármacos anticancerígenos que possui metal mais utilizados para tratar tumores de mama metastáticos, com invasão dos tecidos mamários e linfonodos, sendo mais eficiente nos casos de tumores triplo-negativos e HER2+ do que nos casos de tumores ER+ (COATES et al., 2015; ZHOU et al., 2017). Apesar do sucesso terapêutico, o tratamento com cisplatina causa efeitos adversos tais como: ototoxicidade, neurotoxicidade, náusea, vômito, mielossupressão e nefrotoxicidade, além da resistência que pode ser intrínseca ou adquirida e de sua inativação por tióis, o que limitam seu uso e que têm estimulado a busca por novos complexos de platina, além de outros metais nobres (APPS; CHOI; WHEATE, 2015; CAIRES, 2007; DASARI; TCHOUNWOU, 2014; REDDY et al., 2015).

Embora, o uso da cisplatina não tenha protocolo estabelecido para o tratamento dos tumores de mama, esta tem sido utilizada no tratamento de tumores triplo-negativos e parece ser eficiente tanto como neoadjuvante quanto no cenário de resistência a antraciclina e taxanos, bem como no caso de mutação em *BRCA1* ou em tumores com perfil de expressão gênica similar à deficiência de *BRCA1*. Os genes BRCA desempenham importante papel no reparo de lesão de dupla fita no DNA, contribuindo para a manutenção da estabilidade do genoma. Grande parte dos tumores triplo-negativos apresentam perda ou inativação de genes BRCA, resultando no reparo deficiente do DNA, o que favorece o acúmulo de mutações e desenvolvimento da doença. A hipometilação da região promotora do *BRCA1* e do gene da anemia de Fanconi resulta em fenótipo semelhante à perda ou inativação de BRCA. Nestes casos os tumores respondem bem a agentes que interagem com o DNA produzindo quebra de dupla fita, como os contendo platina e antraciclina. Esses tumores também respondem a inibidores da enzima poli(ADP ribose) polimerase (PARP), que participa do reparo de quebra de simples fita do DNA e sua inibição produzirá quebras de simples fita que resultarão em quebras de dupla fita na forquilha de replicação, o que leva também a célula tumoral à morte. Assim, apenas o subtipo BL1 de tumor triplo-negativo se beneficia do tratamento com platina, já que este subtipo apresenta deficiência no sistema de reparo por recombinação (CASTRELLON et al., 2017; KHOSRAVI-SHAHI; CABEZÓN-GUTIÉRREZ; CUSTODIO-CABELLO, 2018; LA BELLE et al., 2017; LEBERT et al., 2018; MCANDREW; DEMICHELE, 2018; NOOR.; MASTER, 2018; OMARINI et al., 2018; PARK; AHN; KIM, 2018; POGGIO et al., 2018; SHARMA, 2018;).

A quimioterapia baseada em cisplatina e carboplatina tem sido analisada em vários estudos, mas o melhor agente de platina, a combinação ideal ou a melhor sequência de quimioterapia ainda permanecem desconhecidos. Entretanto, vários estudos apontam que a adição de complexos de platina à quimioterapia, especialmente, em combinação com taxanos,

sem o uso de antraciclina aumenta a resposta inicial à doença, mas não da longevidade. A cisplatina tem se mostrado mais eficiente e com menor toxicidade sistêmica que a carboplatina, porém, apresenta toxicidade sistêmica, o que tem limitado seu uso no tratamento do câncer de mama (CASTRELLON et al., 2017; KHOSRAVI-SHAHI; CABEZÓN-GUTIÉRREZ; CUSTODIO-CABELLO, 2018; LA BELLE et al., 2017; LEBERT et al., 2018; MCANDREW; DEMICHELE, 2018; NOOR.; MASTER, 2018; OMARINI et al., 2018; PARK; AHN; KIM, 2018; POGGIO et al., 2018; SHARMA, 2018).

Apesar do sucesso terapêutico, a cisplatina apresenta inúmeros efeitos adversos, além da resistência tumoral sendo, portanto, vital a prospecção de novos compostos com potencial para o tratamento do câncer de mama. Este é o caso dos complexos organometálicos de paládio(II), que apresentam analogia estrutural e termodinâmica à cisplatina, sobretudo exibindo menor toxicidade sistêmica, especialmente renal, devido à incapacidade da substituição dos quelantes dos complexos de paládio(II) por grupamentos sulfidríla de proteínas dos túbulos renais (CUTILLAS et al., 2013; GAO et al., 2009; JAHROMI et al., 2016; REDDY et al., 2015). Além disso, outras características químicas tais como a geometria quadrado-planar dos complexos de paládio(II) favorecem outras formas de interação com o DNA e proteínas, como a intercalação, o que não ocorre com a cisplatina. A lipofilicidade, bem como a natureza não iônica dos complexos pode favorecer a translocação passiva da molécula, pela bicamada lipídica das membranas celulares, favorecendo a citotoxicidade (JAHROMI et al., 2016).

Os primeiros complexos de paládio(II) sintetizados apresentaram pouca ou nenhuma aplicação como antitumorais, devido à sua rápida hidrólise em ambientes biológicos. No entanto, o uso de ligantes quelantes na sua síntese foi oportuno para melhorar a estabilidade, que foi adicionalmente aprimorada com a geração de compostos ciclopaladados (BINCOLETTO et al., 2005; CAIRES, 2007; SHARMA; AMETA; SINGH, 2016).

As bases de Schiff têm sido muito utilizadas como ligantes, na síntese de complexos de paládio(II). Pertencem ao grupo orgânico das iminas, sendo produto da condensação de um aldeído ou cetona com uma amina e sua obtenção ocorre tipicamente pelo método clássico proposto por Hugo Schiff. A fórmula geral de uma base de Schiff é  $R_1R_2C=NR_3$  onde  $R_1, R_2$  e  $R_3$  podem ser um grupo arila ou alquila. Suas propriedades têm despertado considerável interesse, pois possuem estabilidade estrutural e geralmente sua síntese requer procedimentos sintéticos simples. Como ligantes apresentam potencial de estabilizar diferentes estados de oxidação, sendo ótimos quelantes de metais, além de contribuir para aumentar a solubilidade de um composto (FAGHIH et al., 2018; MALIK et al., 2018).

A escolha do ligante apropriado é crucial para a atividade dos complexos de paládio(II) e desempenha importante papel na modificação da reatividade e lipofilicidade, na estabilização do estado de oxidação, além de aumentar a afinidade dos complexos pelo DNA, o principal sítio de interação dessas moléculas em um ambiente biológico. Ainda a atividade do complexo depende não só do ligante, mas também dos substituintes, os átomos doadores, sendo que a presença de enxofre e de halogênios parece aumentar a atividade antitumoral dos complexos de paládio(II) (CAIRES 2007; JAHROMI et al., 2016).

Vários complexos de paládio(II) com ligantes imínicos (contendo base de Schiff) apresentam atividade citotóxica para linhagens de tumor mamário (ARI et al., 2014; FIUZA et al., 2011; QUIRANTE et al., 2011; REDDY et al., 2015; ULUKAYA et al., 2011). Campanella et al. (2012) demonstraram que os complexos  $[Pd(ca_2-o-phen)Cl_2]$  e  $[Pd(dmba)(dppp)Cl]$  foram citotóxicos para células MDA-MB-435, uma linhagem celular de tumor de mama triplo-negativo. Albert et al. (2013) demonstraram atividade citotóxica de complexos ciclopaladados imínicos para células MDA-MB-231 (triplo-negativas) e MCF-7 (ER+). Kacar et al. (2014) observaram que um complexo de paládio(II) derivado de base de Schiff, contendo sacarinato diminuiu a viabilidade e induziu a morte de células MDA-MB-435, MDA-MB-231 e MCF-7, além de outras. Faghieh et al. (2018) também demonstraram que complexos de paládio(II) derivados de base de Schiff contendo orto-vanilina (composto natural) exibiu atividade antiproliferativa para três linhagens, incluindo MCF-7 e Şahina et al. (2018) demonstraram a citotoxicidade, também para células MCF-7, de novos complexos de paládio(II) imínicos heterocíclicos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de complexos de paládio(II) frente as linhagens celulares de adenocarcinoma mamário humano MCF-7, ER+ e MDA-MB-435, triplo-negativo.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Avaliar o efeito dos compostos sobre a viabilidade celular;
- b) analisar se os compostos apresentam efeito citostático;
- c) pesquisar se os compostos interferem na migração e adesão celular,
- d) verificar se o tratamento com os compostos produz alterações morfológicas e morfométricas nas células;
- e) determinar se os compostos induzem a morte das células;
- f) investigar se os compostos induzem a quebra de DNA genômico e interagem com o DNA plasmidial.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cultura de células MCF-7 e MDA-MB-435

As linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-435, ambas provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio RPMI 1640, contendo 20% (v/v) de soro fetal bovino inativado termicamente, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (10 µg/mL), em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. O meio foi substituído a cada 2 dias e as células foram subcultivadas a cada 3 dias, após tripsinização com solução de tripsina-EDTA a 0,25%.

### 4.2 Complexos de paládio(II) e tratamento das células

Antes do início dos experimentos as células foram tripsinizadas e a viabilidade celular foi determinada por coloração com “Trypan blue” (método de exclusão do corante). A seguir as células foram transferidas para os frascos de cultura, mantidas por 24 h para aderência e incubadas com os compostos para avaliação da citotoxicidade. As células não tratadas com os compostos constituíram o controle negativo (CN) e com cisplatina, o controle positivo (CP). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os compostos utilizados neste trabalho foram sintetizados no Laboratório de Química Inorgânica, do Instituto de Química, da Universidade Federal de Alfenas. Foram testados os seguintes compostos: a cisplatina (composto citotóxico), o ligante (C1) e os complexos de paládio(II) (C2 a C7) derivados do ligante e contendo diferentes substituintes (TABELA 1).

Tabela 1- Ligante (C1) e complexos de paládio(II) derivados do ligante (C2 a C7), sintetizados e inéditos

Sigla	Compostos	Massa molecular (g.mol <sup>-1</sup> )
C1	H <sub>2</sub> ani <sub>2</sub> <i>p</i> -fen	344,40
C2	[Pd <sub>2</sub> (Hani <sub>2</sub> <i>p</i> -fen) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	970,54
C3	[Pd <sub>4</sub> (ani <sub>2</sub> <i>p</i> -fen) <sub>2</sub> (N <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ]	1278,54
C4	[Pd(H <sub>2</sub> ani <sub>2</sub> <i>p</i> -fen) <sub>2</sub> (NCO) <sub>2</sub> ]	891,27
C5	[Pd <sub>4</sub> (ani <sub>2</sub> <i>p</i> -fen) <sub>2</sub> (SCN) <sub>4</sub> ]	1342,79
C6	[Pd <sub>4</sub> (ani <sub>2</sub> <i>p</i> -fen) <sub>2</sub> Br <sub>4</sub> ]	1430,07
C7	[Pd <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> ani <sub>2</sub> <i>p</i> -fen) <sub>2</sub> I <sub>4</sub> ]	1409,27

Fonte: Do autor

### 4.3 Ensaio de sulforrodamina B (SRB)

Foi utilizado o ensaio com sulforrodamina B para determinação do efeito de diferentes concentrações dos compostos sobre o teor de proteínas celulares, um indicador da viabilidade celular, de acordo com Vichai e Kirtikara (2006), com modificações segundo Carvalho, Ishikawa e Gouvêa (2012). As células ( $2 \times 10^4$  células viáveis/mL) foram cultivadas em placas “multiwell” de 96 poços e após aderência foram tratadas, por 24 h, com 0,05, 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  de cada composto. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram fixadas com 200  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v), a  $4^\circ\text{C}$ , por 1 h. A seguir o TCA foi removido e as células lavadas com água destilada. Após secagem por 24 h à temperatura ambiente, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de sulforrodamina B a 0,4% (p/v) em ácido acético a 1% (v/v), por 30 min. Decorrido o tempo o corante foi removido e os poços lavados por 4 vezes com ácido acético a 1% (v/v). Após secagem por 24 h à temperatura ambiente, o corante foi dissolvido pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de Tris 10  $\mu\text{M}$ , pH 10,5, por 30 min sob agitação e a absorbância determinada a 510 nm. O efeito dos compostos sobre a viabilidade celular foi obtida considerando-se o teor de proteína do CN como 100%.

### 4.4 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico foi realizado segundo descrito por Franken et al. (2006). As células viáveis foram cultivadas em placas “multiwell” de 24 poços, sendo 100 células por poço em volume final de 1 mL. Após a aderência, as células foram tratadas por 24 h com 0,05, 1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  de cada composto. Após o período de tratamento, o meio de cultivo foi removido, novo meio foi adicionado e as células foram cultivadas por mais 14 dias. Decorrido o tempo de cultivo, o meio foi removido, as células lavadas com solução salina a 0,85% (m/v), fixadas e coradas com 2 mL, por poço, de glutaraldeído a 6% (v/v), contendo cristal violeta a 0,5% (m/v), por 30 min, à temperatura ambiente. A seguir o corante foi removido, os poços lavados, cuidadosamente, com água corrente, as placas foram secas à temperatura ambiente e as colônias foram contadas com auxílio de estereomicroscópio. Foram consideradas colônias, aquelas contendo mais de 50 células e a sobrevivência celular, após o tratamento, foi estimada de acordo com a equação:

$$\text{Sobrevivência(\%)} = \frac{\text{número de colônias após tratamento}}{\text{número de colônias controle}} \times 100$$

#### 4.5 Ensaio de migração celular – “wound healing”

O ensaio foi conduzido segundo descrito por Justus et al. (2014) As células ( $1 \times 10^6$  células viáveis/mL) foram cultivadas em placa “multiwell” de 24 poços, por 24 h quando atingiram 100% de confluência. Com auxílio de uma ponteira estéril, para micropipeta de 1000  $\mu$ L, foi realizada a remoção de uma faixa central de células de cada poço (ferida). Os poços foram lavados com meio, para a remoção das células não aderidas; foi adicionado 1 mL de meio em cada poço e as células foram fotografadas (tempo 0 h) em microscópio invertido. A seguir as células foram tratadas com 0,05  $\mu$ g/mL de cada composto, por 48 h (tempo 48 h). Foram realizadas medidas do comprimento entre as bordas das feridas nos tempos 0 h e 48 h. A migração celular (%) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Migração celular (\%)} = \frac{M0 - M48}{M0} \times 100$$

Onde, M0 é a medida entre as bordas da ferida, imediatamente, após a sua realização (tempo 0 h) e M48 é a medida entre as bordas da ferida após 48 h de tratamento (tempo 48 h).

#### 4.6 Ensaio de adesão celular

Para esse ensaio foi utilizada a matriz extracelular (MEC), gel de sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm de camundongo (SIGMA-ALDRICH®). O preparo foi realizado conforme as especificações do fabricante e segundo descrito por Liu et al. (2017), com modificações. Foram adicionados 50  $\mu$ L de MEC por poço, em placa “multiwell” de 96 poços. A seguir foram adicionados 100  $\mu$ L de albumina de soro bovino (BSA) estéril a 1% (m/v), em cada poço, seguido de incubação por 1 h, a 37°C, para bloquear os sítios inespecíficos de ligação da MEC. Após a retirada da BSA, os poços foram lavados com 100  $\mu$ L de meio sem soro e sem antibióticos. A cada poço foram adicionados 100  $\mu$ L de suspensão celular na concentração de  $1 \times 10^5$  células viáveis/mL e 0,05  $\mu$ g/mL de cada composto, seguido de incubação por 1 h, a 37°C. Decorrido o tempo, cada poço foi lavado 2 vezes com solução salina a 0,85% (m/v), seguido de fixação e coloração com 100  $\mu$ L de glutaraldeído a 6% (v/v), contendo cristal violeta a 0,25% (m/v), por 30 min, à temperatura ambiente. A seguir o corante foi removido e os poços lavados, cuidadosamente, com água corrente. As placas

foram secas à temperatura ambiente e os poços foram fotografados em microscópio invertido, para a contagem de células aderidas à MEC. O efeito dos compostos sobre a adesão celular foi determinado em porcentagem em relação ao total de células aderidas no CN, que foi considerada 100%.

#### **4.7 Estudo morfológico e morfométrico**

As células ( $2 \times 10^4$  células viáveis/mL) foram cultivadas sobre lamínula, em placas de Petri, contendo 4 mL de meio. Depois de aderidas, as células foram tratadas com 0,05 µg/mL de cada composto, por 24 h. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram fixadas com acetona a 70% (v/v), coradas com hematoxilina-eosina, desidratadas e foram preparadas lâminas permanentes, para análise morfológica e morfométrica. As lâminas foram observadas ao microscópio Olympus BX52 e imagens digitais foram adquiridas utilizando-se o software Motic Plus 2.0, para captura e análise de imagem. Foram analisados 15 campos aleatórios, por tratamento e o diâmetro celular e das colônias foi determinado em 50 células e 50 colônias respectivamente (CAMPANELLA et al., 2012; CARVALHO; ISHIKAWA; GOUVÊA, 2012).

#### **4.8 Detecção de morte celular**

Para estimar a morte celular foi utilizado o método de coloração por “fast green”, descrito por Weisenthal et al. (1983) com modificações. As células ( $2 \times 10^4$  células viáveis/mL) foram cultivadas sobre lamínula, em placas de Petri, contendo 4 mL de meio. Depois de aderidas, as células foram tratadas com 0,05 µg/mL de cada composto, por 24 h. Após o tratamento, as células foram coradas com “fast green” a 2% (m/v), em NaCl 0,15 M, por 10 min, seguido de coloração por hematoxilina-floxina. As lâminas foram processadas e montadas com Enthellan, observadas ao microscópio Olympus BX52 e imagens digitais foram obtidas utilizando-se o software Motic Plus 2.0, para captura e análise de imagem. As células viáveis apresentam coloração rosa-avermelhada e as mortas coloração verde. Foram avaliadas 600 células, por tratamento, para determinar a porcentagem de células mortas (CARVALHO; ISHIKAWA; GOUVÊA, 2012).

#### **4.9 Fragmentação do DNA**

Foi realizada a avaliação da fragmentação do DNA genômico para verificação da formação do padrão escada do DNA (“DNA ladder”), que é um indicador de apoptose, segundo descrito por Rahbar Saadat et al. (2015). As células ( $1 \times 10^5$  células viáveis/mL) foram cultivadas em placa “multiwell” de 24 poços, em 1 mL de meio. Após a aderência, as células foram tratadas com 0,05  $\mu\text{g/mL}$  de cada composto, por 24 h. A seguir o DNA foi extraído utilizando-se kit Nucleo Spin Tissue, Macherey-Nagel e submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris 10 mM, ácido bórico 10 mM e EDTA 1mM), por 1 h, a 80 V. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e fotografado sob transluminação com ultravioleta.

#### **4.10 Ensaio de ligação ao DNA plasmidial**

Foi verificada a interação *in vitro* do ligante e dos complexos de paládio(II) com o DNA plasmidial. Foram utilizados 500 ng do plasmídeo pUC-19, que foram incubados a 37°C, por 30 min em tampão TE (Tris 10 mM, pH 8,0, contendo EDTA 1 mM) na ausência (CN) e na presença dos compostos sintetizados a 0,05  $\mu\text{g/mL}$ . A interação dos compostos com o DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% (CHEN; WU; LIN, 2007).

#### **4.11 Análise estatística**

Os dados obtidos para os experimentos realizados foram comparados por análise de variância pelo teste ANOVA, seguido do teste de Tukey, quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Complexos de paládio(II) sintetizados

A descoberta acidental da atividade antitumoral da cisplatina alavancou o desenvolvimento da química inorgânica medicinal, tanto para fins diagnósticos como terapêuticos. Neste sentido, os complexos de paládio(II) têm sido sintetizados e avaliados quanto à citotoxicidade, para o desenvolvimento de medicamentos alternativos aos complexos de platina(II), devido às similaridades estrutural e termodinâmica entre esses complexos (MALIK et al., 2018; REDDY et al., 2015). O ligante imínico (base de Schiff) utilizado neste trabalho foi sintetizado e, à partir dele, foram também sintetizados 6 diferentes complexos, por coordenação ao paládio(II), contendo diferentes substituintes, que resultou em complexos com diferentes fórmulas estruturais (FIGURA 2). O complexo C2 é ciclopaladado bidentado. Os complexos C3, C5 e C6 apresentam estruturas semelhantes, sendo ciclopaladados tetradentados. A diferença entre eles reside nos substituintes, N<sub>3</sub>, SCN e Br respectivamente. Já os complexos C4 e C7 não são ciclopaladados, sendo o primeiro monodentado e o segundo bidentado. É interessante ressaltar que de acordo com a classificação dos ácidos e bases de Pearson o paládio(II) é uma ácido macio, enquanto as bases presentes nos complexos foram: Cl, dura; N<sub>3</sub> e Br intermediárias e NCO, SCN e I, macias (PEARSON, 1963).

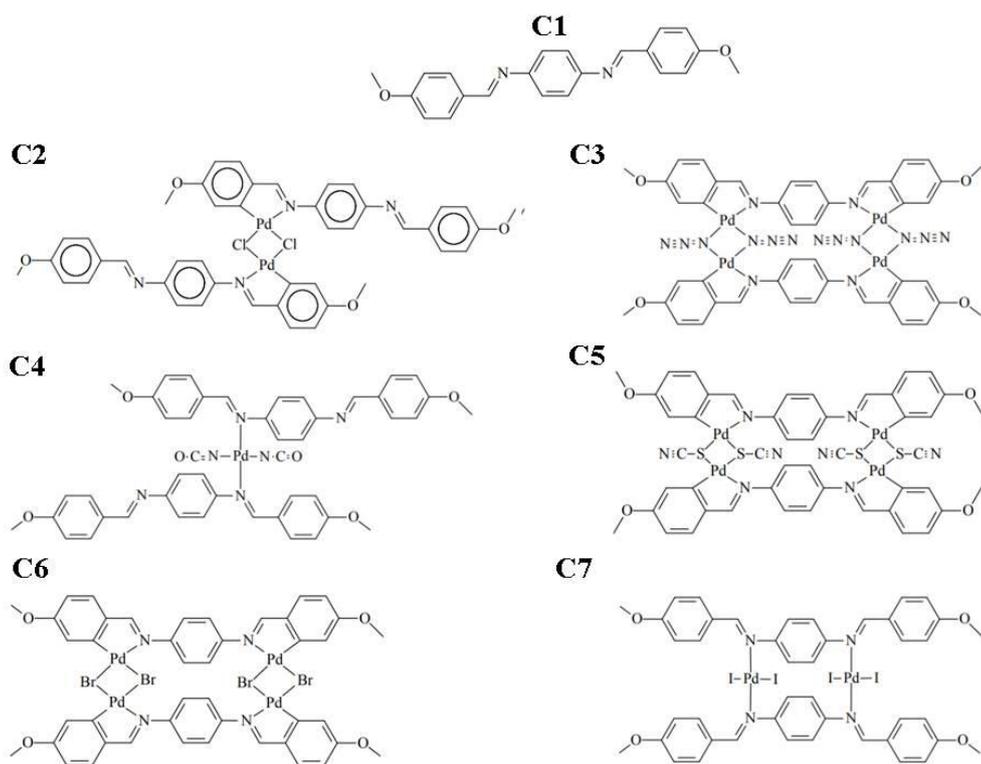
Este é o primeiro trabalho a testar a atividade citotóxica destes complexos de paládio(II) inéditos. A citotoxicidade pode ser utilizada como um indicativo da atividade antitumoral de um composto, pois os agentes quimioterápicos utilizados na prática clínica apresentam atividade citotóxica (LE TOURNEAU et al., 2010). A citotoxicidade é expressa como alteração bioquímica após a exposição a substâncias químicas e serve como indicador sensível da integridade celular e da inibição de crescimento, podendo ser estimada por testes que avaliam a liberação de enzimas, a viabilidade, a sobrevivência, a morte celular, além de outros. Os testes de viabilidade baseiam-se na exclusão ou incorporação de corante, medida da atividade enzimática e da determinação do conteúdo proteico celular (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016; SUMANTRAN, 2011).

Um composto citotóxico provoca perda da viabilidade celular desencadeando a morte ou a diminuição da sobrevivência celular, em curto prazo, enquanto, um composto citostático afeta a proliferação celular em longo prazo (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016; SUMANTRAN, 2011). Assim, no presente trabalho foi avaliado se o ligante e os complexos de paládio(II) sintetizados, apresentam efeito citotóxico, citostático e modulador da morte das

linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-435 de adenocarcinoma mamário humano e o efeito foi comparado ao da cisplatina, utilizada na prática clínica para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo de mama.

As células MCF-7 compreendem uma linhagem de adenocarcinoma mamário humano, que expressam o receptor de estrógeno e de progesterona, mas não super expressam o gene HER2 (ER+/PR+/HER2-). As células MDA-MB-435 são triplo-negativas (ER-/PR-/HER2-). O cariótipo dessa linhagem celular revelou número cromossômico variável (55-62) e a presença de inúmeras aneuploidias, tais como: nulissomia dos cromossomos 6, 11 e 22; monossomia dos cromossomos 7, 13, 18 e 21; trissomia do 2 e translocações. As células MDA-MB-435 apresentam formato alongado, não formam colônias e são altamente metastáticas (BAJO et al., 2002).

Figura 2 – Fórmula estrutural do ligante (C1) e dos complexos de paládio(II) (C2 a C7).



Fonte: Gois (2011).

Nota: **C1**, H<sub>2</sub>ani<sub>2</sub>p-fen; **C2**, [Pd<sub>2</sub>(Hani<sub>2</sub>p-fen)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]; **C3**, [Pd<sub>4</sub>(ani<sub>2</sub>p-fen)<sub>2</sub>(N<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]; **C4**, [Pd(H<sub>2</sub>ani<sub>2</sub>p-fen)<sub>2</sub>(NCO)<sub>2</sub>]; **C5**, [Pd<sub>4</sub>(ani<sub>2</sub>p-fen)<sub>2</sub>(SCN)<sub>4</sub>]; **C6**, [Pd<sub>4</sub>(ani<sub>2</sub>p-fen)<sub>2</sub>Br<sub>4</sub>]; **C7**, [Pd<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>ani<sub>2</sub>p-fen)<sub>2</sub>I<sub>4</sub>].

## 5.2 Viabilidade celular

Os complexos de paládio(II) testados afetaram a viabilidade celular, evidenciada pela diminuição do teor proteico das células tratadas, quando comparadas ao controle negativo (CN), pelo ensaio de SRB (FIGURA 3).

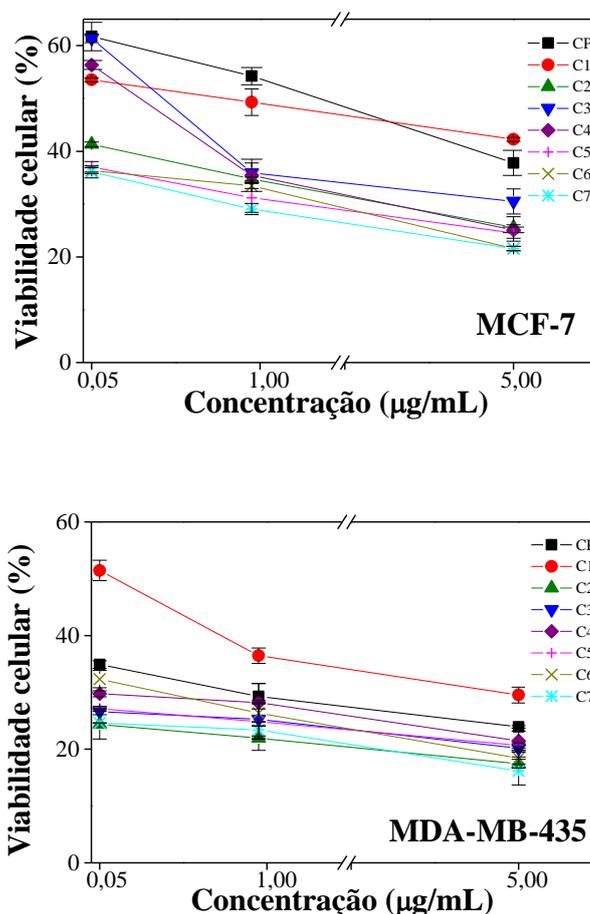
A SRB é um corante aminoxanteno de cor rosa, com dois grupos sulfônicos, que lhe conferem a capacidade de se unir eletrostaticamente aos aminoácidos básicos das proteínas. Sendo o teor de corante, diretamente, proporcional ao total de proteínas celulares; a diminuição da absorvância mostra interferência na proliferação celular ou na síntese proteica, o que indica citotoxicidade (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016; VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

Os complexos de paládio(II) mostraram-se mais citotóxicos para as células MDA-MB-435, as quais apresentaram menor viabilidade que as células MCF-7 após o tratamento. Resultado semelhante ocorreu no experimento de Kacar et al. (2014), no qual a viabilidade celular da linhagem MDA-MB-435 foi menor em relação a MCF-7, porém, o complexo de paládio(II) testado foi diferente dos utilizados no presente trabalho. Resultados semelhantes foram obtidos por Ulukaya et al. (2011), que também observaram maior redução da viabilidade de células MDA-MB-231 (triplo-negativas) do que de células MCF-7 tratadas com um complexo de paládio(II) imínico contendo sacarinato. Uma possível explicação para esse fato é a alta frequência de mutações em genes supressores tumorais como *TP53* em tumores do tipo triplo-negativos, que é o caso da linhagem MDA-MB-435 (KHOSRAVI-SHAHI; CABEZÓN-GUTIÉRREZ; CUSTODIO-CABELLO, 2018). Esse gene em questão está envolvido no reparo de lesões ao DNA, que é justamente o mecanismo mais aceito de ação dos complexos de Pd(II), os quais se ligam ao DNA, induzindo sua quebra (BIEGING; MELLO; ATTARDI, 2014; FAGHIH et al., 2018; JAHROMI et al., 2016).

Os complexos de paládio(II) mais citotóxicos para as células MCF-7 foram os C6 e C7, enquanto para a MDA-MB-435 foram os C2, C3, C5 e C7. Os complexos de paládio(II) foram, significativamente ( $p < 0,01$ ), mais citotóxicos do que o ligante C1 e estes apresentaram citotoxicidade em concentrações inferiores às obtidas por Hernández et al. (2013), Kavitha e Laxma Reddy (2016), Tabrizi e Chiniforoshan (2016), Faghieh et al. (2018) e Şahina et al. (2018) que verificaram atividade citotóxica de complexos de paládio(II) para células MCF-7 e à obtida por Campanella et al. (2012) para células MDA-MB-435. Entretanto, estes autores utilizaram complexos de paládio(II) derivados de ligantes diferentes dos testados no presente estudo, apesar de todos serem derivados de base de Schiff,

evidenciando que a estrutura química de um composto determina sua atividade biológica, como já observado anteriormente (MALIK et al., 2018).

Figura 3 - Viabilidade (%), estimada pelo teste de sulforrodamina B, das células MCF-7 e MDA-MB-435, controle (CN) e após o tratamento por 24 h, com diferentes concentrações de cisplatina (CP), do ligante (C1) e dos complexos de paládio(II) (C2 a C7).



Fonte: Do autor.

Nota: C1,  $H_2ani_2p-fen$ ; C2,  $[Pd_2(Hani_2p-fen)_2Cl_2]$ ; C3,  $[Pd_4(ani_2p-fen)_2(N_3)_4]$ ; C4,  $[Pd(H_2ani_2p-fen)_2(NCO)_2]$ ; C5,  $[Pd_4(ani_2p-fen)_2(SCN)_4]$ ; C6,  $[Pd_4(ani_2p-fen)_2Br_4]$ ; C7,  $[Pd_2(H_2ani_2p-fen)_2I_4]$ . Nota-se a diminuição da viabilidade celular após o tratamento.

### 5.3 Ensaio clonogênico

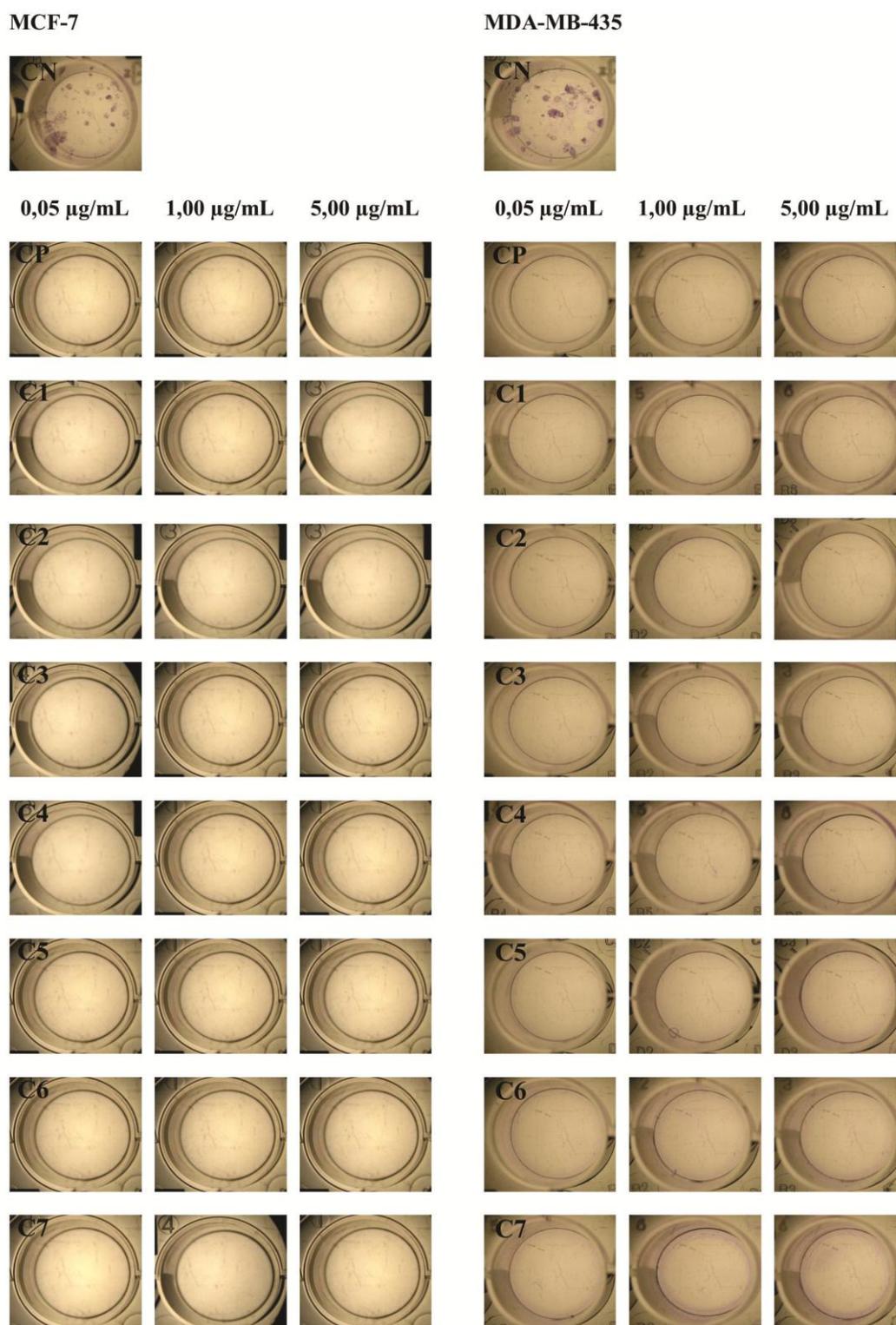
O ensaio clonogênico é um ensaio *in vitro* de sobrevivência de células, baseado na capacidade de uma única célula sobreviver, se proliferar e formar uma colônia, com no mínimo 50 células. Trata-se de ensaio padrão para determinar a morte reprodutiva das células, ou seja, o efeito citostático, após tratamento com radiação ionizante ou outros agentes citotóxicos (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016; FRANKEN et al., 2006). Este teste permitiu obter a taxa de sobrevivência celular após o tratamento e os resultados demonstraram que o

tratamento das células MCF-7 e MDA-MB-435, com todos os compostos, resultou em morte reprodutiva, pois não houve formação de colônias nos grupos tratados, mas apenas no CN (FIGURA 4). Al-Noaimia, Abu-Surrah e Tahtamouni (2016) também observam inibição da sobrevivência de células de tumor mamário humano após tratamento com complexos de paládio(II) imínicos, sendo o mais ativo o complexo contendo Br como substituinte. Já no presente trabalho os complexos de paládio(II) mais ativos foram os que apresentaram os substituintes SCN (C5) e I (C7). Assim, além da natureza do ligante, o volume, propriedades eletrônicas e interação do substituinte com o paládio(II) parecem influenciar a atividade biológica do complexo.

#### **5.4 Ensaio de migração celular – método “wound healing”**

O método de “wound healing” é muito utilizado para o estudo das características da migração celular, assim como para a validação de moléculas que possam interferir no processo migratório. Este método baseia-se na observação de que, após a criação de uma lacuna artificial (ferida) em uma monocamada celular confluyente, as células na borda do espaço recém criado se movem para a abertura a fim de fechar a ferida (LIANG; PARK; GUAN, 2007). As células utilizam o processo de migração no organismo tanto em condições fisiológicas, como em situações patológicas. No processo metastático a interação das células tumorais com o endotélio vascular permite a migração das células do tumor primário para o sistema circulatório e deste para um novo local. O processo de migração requer a adesão das células tumorais e endoteliais, sendo este um processo dinâmico e complexo, envolvendo a interação de múltiplos receptores, rearranjos do citoesqueleto e a regulação de vias de sinalização (CHOI; MOON, 2018; EMON et al., 2018; OUDIN; WEAVER, 2016). Para analisar o efeito dos compostos sobre a migração das células MCF-7 e MDA-MB-435 foi realizado o ensaio de “wound healing” e os resultados apresentados nas Figuras 5 a 7 demonstram que, após 24 h de tratamento, os complexos de paládio(II) inibiram a migração celular, tanto das células MCF-7 como das células MDA-MB-435, significativamente ( $p < 0,001$ ), quando comparada ao CN. Os complexos foram mais ativos sobre as células MCF-7 do que a cisplatina, pois a inibição da migração celular observada após o tratamento com os complexos foi, significativamente ( $p < 0,001$ ), menor do que a observada após o tratamento com CP (FIGURA 6).

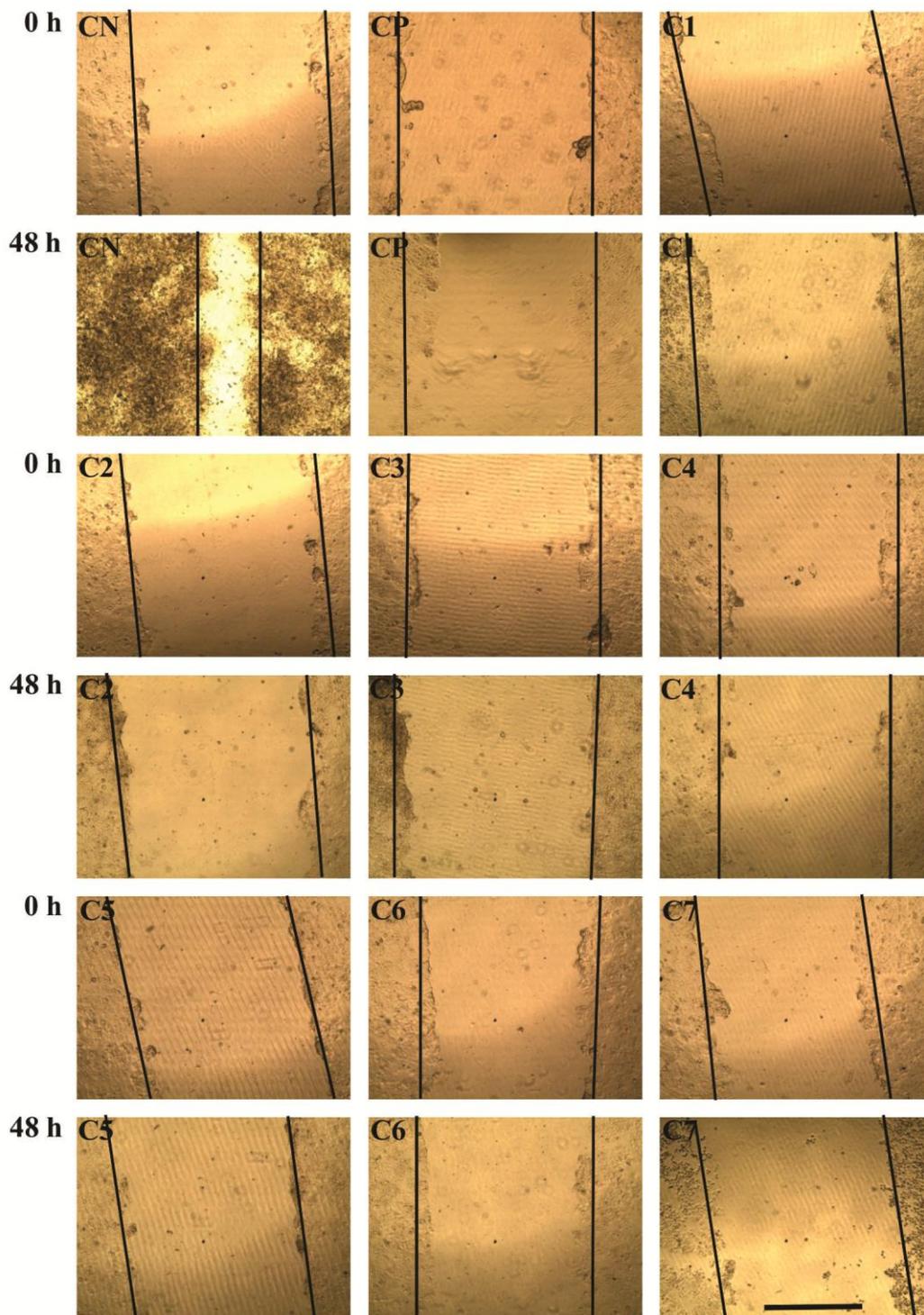
Figura 4 - Ensaio clonogênico das células MCF-7 e MDA-MB-435, controle (CN) e após tratamento com diferentes concentrações de cisplatina (CP), do ligante (C1) e dos complexos de paládio(II) (C2 a C7).



Fonte: Do autor.

Nota: C1,  $H_2ani_2p-fen$ ; C2,  $[Pd_2(Hani_2p-fen)_2Cl_2]$ ; C3,  $[Pd_4(ani_2p-fen)_2(N_3)_4]$ ; C4,  $[Pd(H_2ani_2p-fen)_2(NCO)_2]$ ; C5,  $[Pd_4(ani_2p-fen)_2(SCN)_4]$ ; C6,  $[Pd_4(ani_2p-fen)_2Br_4]$ ; C7,  $[Pd_2(H_2ani_2p-fen)_2I_4]$ . Nota-se que não houve sobrevivência celular após o tratamento.

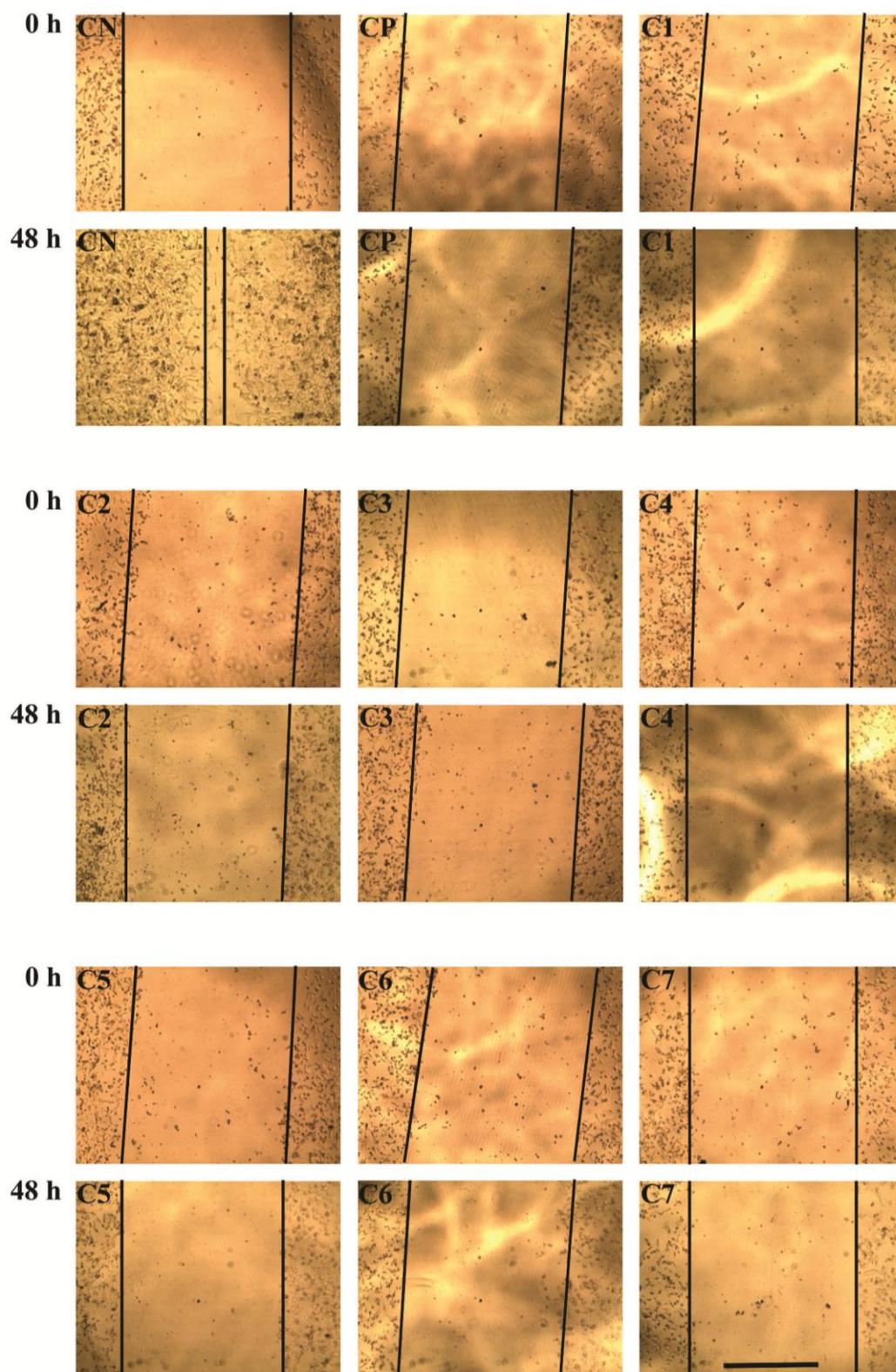
Figura 5 - Ensaio de migração celular, “wound healing”, das células MCF-7, controle (CN) e após tratamento por 48 h, com 0,05  $\mu\text{g/mL}$  de cisplatina (CP), do ligante (C1) e dos complexos de paládio(II) (C2 a C7).



Fonte: Do autor.

Nota: **C1**,  $\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen}$ ; **C2**,  $[\text{Pd}_2(\text{Hani}_2p\text{-fen})_2\text{Cl}_2]$ ; **C3**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{N}_3)_4]$ ; **C4**,  $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{NCO})_2]$ ; **C5**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{SCN})_4]$ ; **C6**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2\text{Br}_4]$ ; **C7**,  $[\text{Pd}_2(\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen})_2\text{I}_4]$ . Barra = 20  $\mu\text{m}$ . Nota-se que as células tratadas não migraram.

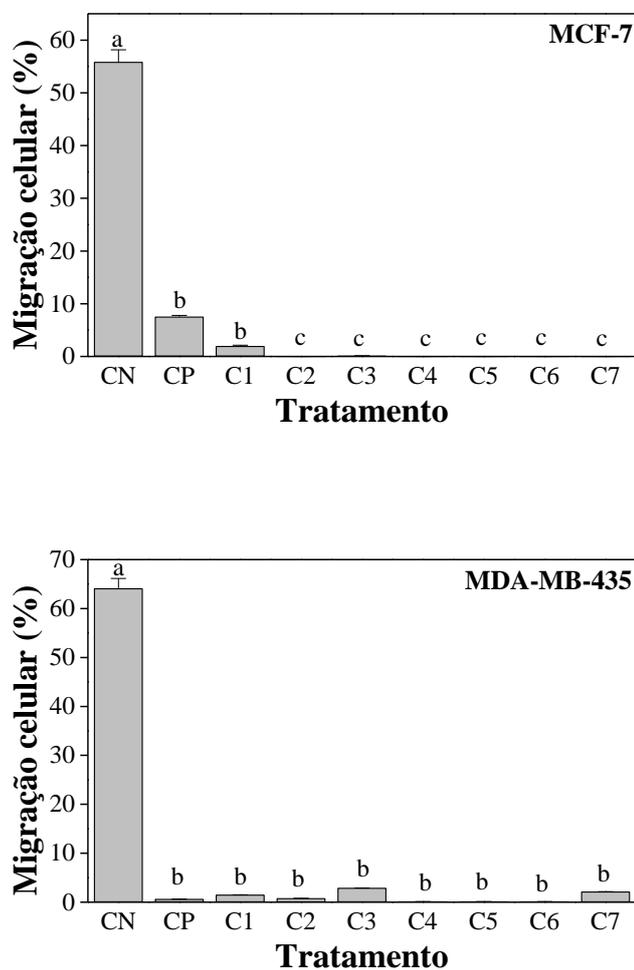
Figura 6 - Ensaio de migração celular, “wound healing”, das células MDA-MB-435, controle (CN) e após tratamento por 48h, com 0,05  $\mu\text{g/mL}$  de cisplatina (CP), do ligante (C1) e dos complexos de paládio(II) (C2 a C7).



Fonte: Do autor.

Nota: C1,  $\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen}$ ; C2,  $[\text{Pd}_2(\text{Hani}_2p\text{-fen})_2\text{Cl}_2]$ ; C3,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{N}_3)_4]$ ; C4,  $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{NCO})_2]$ ; C5,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{SCN})_4]$ ; C6,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2\text{Br}_4]$ ; C7,  $[\text{Pd}_2(\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen})_2\text{I}_4]$ . Barra = 20  $\mu\text{m}$ . Nota-se que o tratamento inibiu a migração celular.

Figura 7- Migração (%), em ensaio “wound healing”, das células MCF-7 e MDA-MB-435, controle (CN) e após tratamento por 48h, com 0,05 µg/mL de cisplatina (CP), do ligante (C1) e dos complexos de paládio(II) (C2 a C7).



Fonte: Do autor.

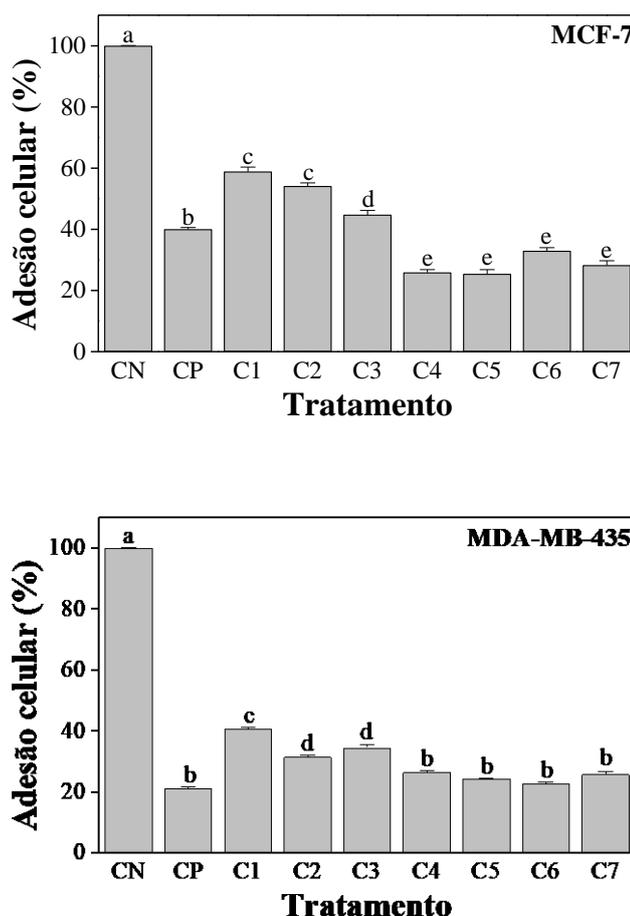
Nota: **C1**,  $H_2ani_2p\text{-fen}$ ; **C2**,  $[Pd_2(Hani_2p\text{-fen})_2Cl_2]$ ; **C3**,  $[Pd_4(ani_2p\text{-fen})_2(N_3)_4]$ ; **C4**,  $[Pd(H_2ani_2p\text{-fen})_2(NCO)_2]$ ; **C5**,  $[Pd_4(ani_2p\text{-fen})_2(SCN)_4]$ ; **C6**,  $[Pd_4(ani_2p\text{-fen})_2Br_4]$ ; **C7**,  $[Pd_2(H_2ani_2p\text{-fen})_2I_4]$ . Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ), pelo teste de Tukey. Nota-se que as células tratadas não migraram.

### 5.5 Ensaio de adesão celular

As células interagem com a matriz extracelular (MEC) tanto em condições não patológicas como em diversas etapas do processo metastático. O processo de metástase tumoral envolve a perda progressiva da arquitetura e dissolução das ligações entre o tecido epitelial e conjuntivo. A membrana basal, uma rede proteica, forma uma barreira física que restringe as lesões pré-invasivas, as quais permanecem restritas ao local da lesão (*in situ*).

Entretanto, a membrana basal não é estática e, sobretudo, no tecido mamário está em constante regeneração e remodelação (TANNER, 2012). Para penetrar na MEC as células tumorais devem se aderir aos componentes da matriz, tais como: laminina, colágeno tipo IV, proteoglicana de sulfato de heparam e entactina, principais componentes da membrana basal do tecido mamário e de outros tecidos epiteliais (CHANG; THAKAR; WEAVER, 2017; TANNER, 2012). Assim, a MEC utilizada neste ensaio apresentou essas proteínas em sua composição e os resultados obtidos demonstraram que o tratamento inibiu, significativamente ( $p < 0,001$ ), a adesão de células MCF-7 e MDA-MB-435 à MEC, quando comparada ao CN (FIGURA 8). Dessa forma, os compostos testados podem ser considerados antimetastáticos, tendo em vista que inibiram tanto a migração como a adesão celular.

Figura 8 - Adesão (%), à matriz extracelular, das células MCF-7 e MDA-MB-435, controle (CN) e após tratamento por 1 h, com 0,05  $\mu\text{g/mL}$  de cisplatina (CP), do ligante (C1) e dos complexos de paládio(II) (C2 a C7).



Fonte: Do autor.

Nota: **C1**,  $\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen}$ ; **C2**,  $[\text{Pd}_2(\text{Hani}_2p\text{-fen})_2\text{Cl}_2]$ ; **C3**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{N}_3)_4]$ ; **C4**,  $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{NCO})_2]$ ; **C5**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{SCN})_4]$ ; **C6**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2\text{Br}_4]$ ; **C7**,  $[\text{Pd}_2(\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen})_2\text{I}_4]$ . Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Letras diferentes indicam

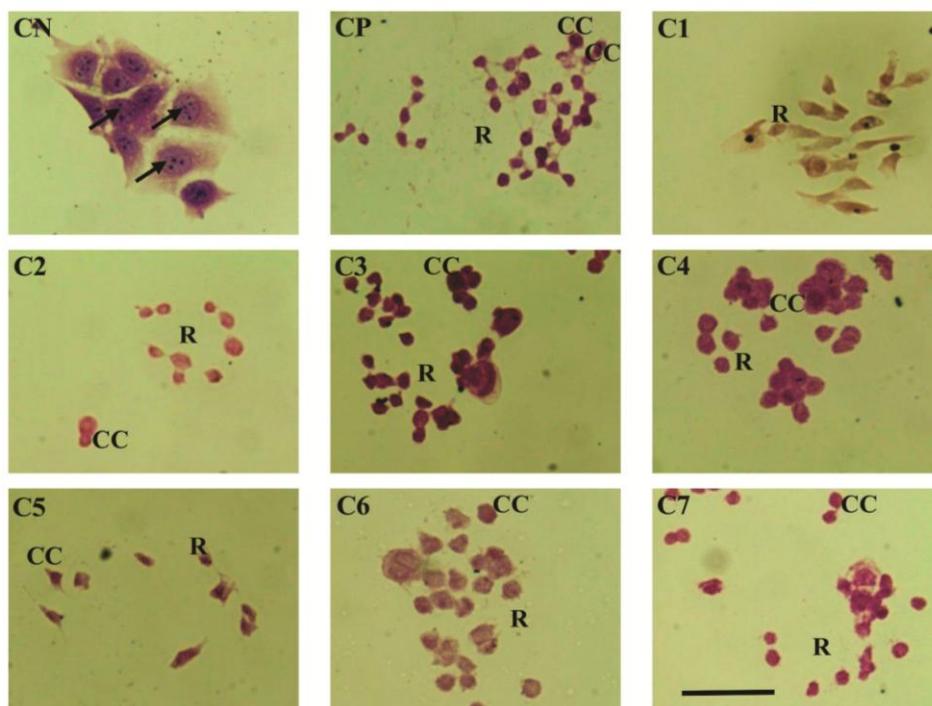
diferença significativa ( $p < 0,001$ ), pelo teste de Tukey. Nota-se a diminuição da adesão celular com o tratamento.

## 5.6 Estudo morfológico e morfométrico

A demonstração mais confiável do efeito citotóxico de um agente toxicante é a alteração morfológica de células em cultura, com crescimento em monocamada (EKWALL et al., 1990). A análise morfológica demonstrou o efeito citotóxico de todos os compostos para as duas linhagens celulares estudadas. As células MCF-7 (CN) crescem em colônias, apresentam formato poliédrico irregular, citoplasma menos corado que o núcleo e nucléolos evidentes. O tratamento das células com a CP e os compostos resultou em alterações morfológicas evidentes, tais como perda da morfologia celular típica, condensação da cromatina, arredondamento e diminuição da célula, o que indica alteração do citoesqueleto (FIGURA 9). Além disso, as células tratadas com os compostos cresceram de forma isolada e ocorreu alteração na morfologia das colônias (FIGURA 10).

As células MDA-MB-435 (CN) apresentaram-se isoladas, com formato irregular e fusiforme, citoplasma menos corado que o núcleo e nucléolos evidentes. Após o tratamento foram observadas alterações morfológicas evidentes, tais como a perda da morfologia celular típica e dos prolongamentos celulares responsáveis pela adesão ao substrato; a condensação da cromatina; arredondamento e diminuição da célula, indicando alteração do citoesqueleto, como observado nas células MCF-7 (FIGURA 11). Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Campanella et al. (2012), que também observaram alterações da morfologia das células MDA-MB-435, após o tratamento das células MDA-MB-435 com dois complexos de paládio(II), porém, em concentração maior que a utilizada no presente trabalho. Kacar et al. (2014) observaram que o tratamento com um complexo de paládio(II) derivado de base de Schiff contendo sacarinato também alterou a morfologia das células MDA-MB-435, as quais exibiram condensação da cromatina, fragmentação nuclear, diminuição dos prolongamentos de adesão celular e destacamento, além da diminuição das células, características semelhantes às observadas no presente estudo e compatíveis com alterações indicativas de morte celular. Assim, os resultados da análise morfológica corroboram os resultados obtidos nos ensaios já descritos, evidenciando que todos os compostos testados apresentaram citotoxicidade para as células MCF-7 e MDA-MB-435.

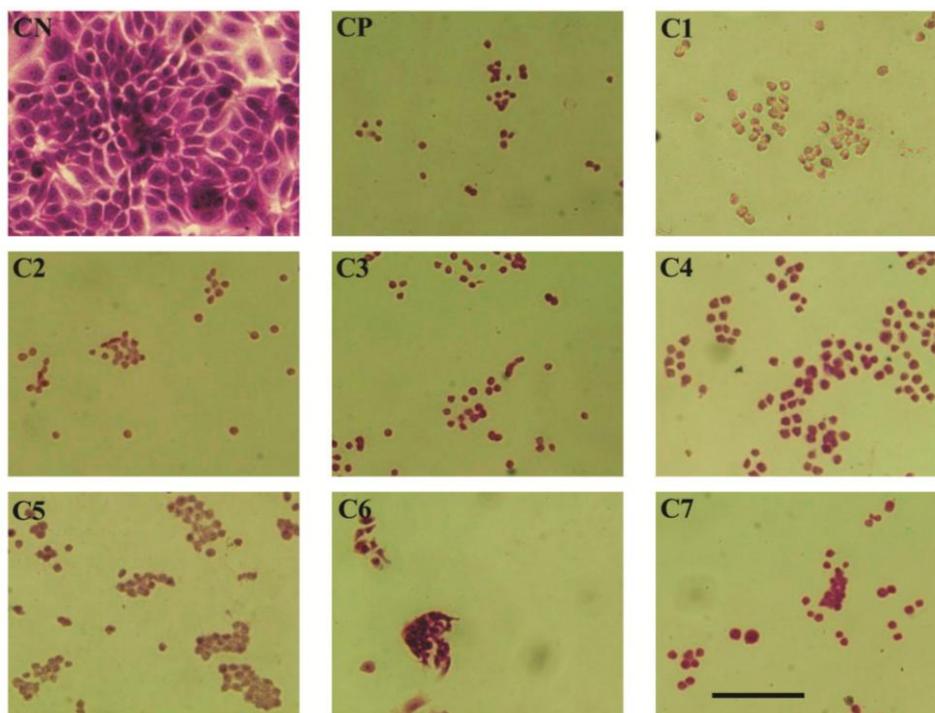
Figura 9 - Morfologia das células MCF-7, coradas com hematoxilina-eosina, controle (CN) e tratadas por 24 h, com 0,05  $\mu\text{g/mL}$  de cisplatina (CP), do ligante (C1) e dos complexos de paládio(II) (C2 a C7).



Fonte: Do autor.

Nota: **C1**,  $\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen}$ ; **C2**,  $[\text{Pd}_2(\text{Hani}_2p\text{-fen})_2\text{Cl}_2]$ ; **C3**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{N}_3)_4]$ ; **C4**,  $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{NCO})_2]$ ; **C5**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{SCN})_4]$ ; **C6**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2\text{Br}_4]$ ; **C7**,  $[\text{Pd}_2(\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen})_2\text{I}_4]$ . Barra = 5  $\mu\text{m}$ . Observa-se que as células CN crescem em colônias, apresentam formato poliédrico irregular, citoplasma menos corado que o núcleo e nucléolos evidentes (seta), enquanto as células tratadas são arredondadas (R), menores e apresentam condensação da cromatina (CC).

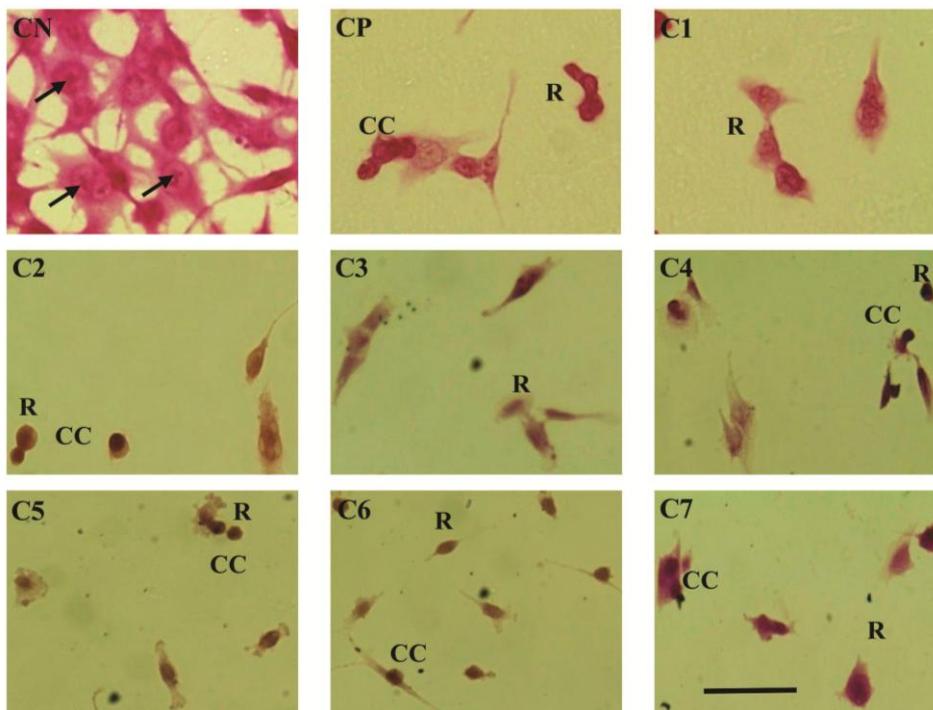
Figura 10 - Morfologia das colônias de células MCF-7, coradas com hematoxilina-eosina, controle (CN) e tratadas por 24 h, com 0,05 µg/mL de cisplatina (CP), do ligante (C1) e dos complexos de paládio(II) (C2 a C7).



Fonte: Do autor.

Nota: **C1**,  $H_2ani_2p\text{-fen}$ ; **C2**,  $[Pd_2(Hani_2p\text{-fen})_2Cl_2]$ ; **C3**,  $[Pd_4(ani_2p\text{-fen})_2(N_3)_4]$ ; **C4**,  $[Pd(H_2ani_2p\text{-fen})_2(NCO)_2]$ ; **C5**,  $[Pd_4(ani_2p\text{-fen})_2(SCN)_4]$ ; **C6**,  $[Pd_4(ani_2p\text{-fen})_2Br_4]$ ; **C7**,  $[Pd_2(H_2ani_2p\text{-fen})_2I_4]$ . Barra = 10 µm. Observe células isoladas e colônias menores que o CN, após o tratamento.

Figura 11 - Morfologia das células MDA-MB-435, coradas com hematoxilina-eosina, controle (CN) e tratadas por 24 h, com 0,05  $\mu\text{g/mL}$  de cisplatina (CP), do ligante (C1) e dos complexos de paládio(II) (C2 a C7).

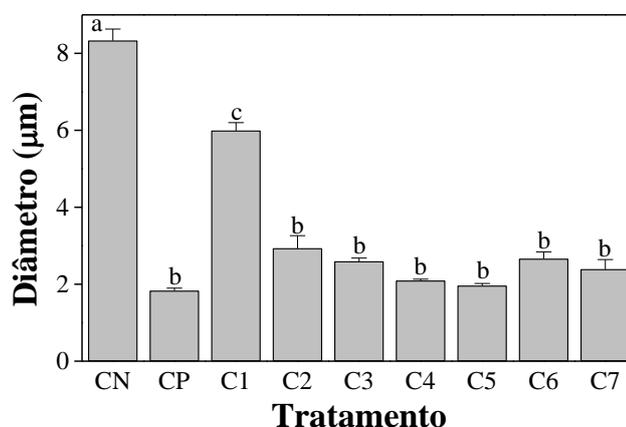


Fonte: Do autor.

Nota: **C1**,  $\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen}$ ; **C2**,  $[\text{Pd}_2(\text{Hani}_2p\text{-fen})_2\text{Cl}_2]$ ; **C3**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{N}_3)_4]$ ; **C4**,  $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{NCO})_2]$ ; **C5**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{SCN})_4]$ ; **C6**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2\text{Br}_4]$ ; **C7**,  $[\text{Pd}_2(\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen})_2\text{I}_4]$ . Barra = 5  $\mu\text{m}$ . Observa-se que as células CN crescem de forma isolada, apresentam formato irregular e fusiforme, citoplasma menos corado que o núcleo e nucléolos evidentes (seta), enquanto as células tratadas são arredondadas (R), menores, apresentam condensação da cromatina (CC) e perda dos prolongamentos de adesão ao substrato.

A diminuição das células, após tratamento com todos os compostos, foi demonstrada pela redução significativa ( $p < 0,001$ ) do diâmetro das células MCF-7 e colônias e do comprimento das células MDA-MB-435, em comparação ao CN. Todos os complexos de paládio(II) apresentaram efeito similar ao da CP ( $p > 0,05$ ) (FIGURAS 12 a 14).

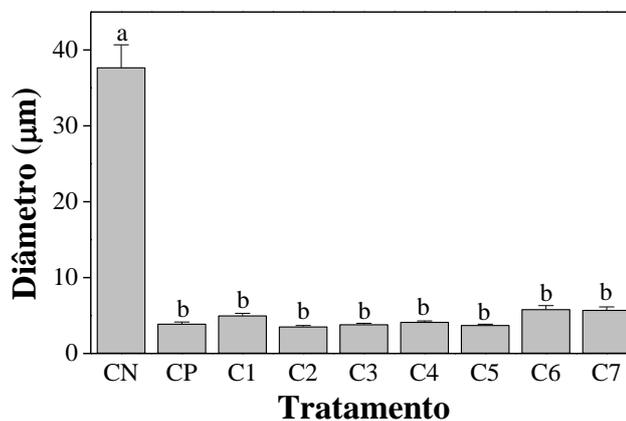
Figura 12 - Diâmetro das células MCF-7, controle (CN) e tratadas por 24 h, com 0,05  $\mu\text{g/mL}$  de cisplatina (CP), do ligante (C1) e dos complexos de paládio(II) (C2 a C7).



Fonte: Do autor.

Nota: **C1**,  $\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen}$ ; **C2**,  $[\text{Pd}_2(\text{Hani}_2p\text{-fen})_2\text{Cl}_2]$ ; **C3**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{N}_3)_4]$ ; **C4**,  $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{NCO})_2]$ ; **C5**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{SCN})_4]$ ; **C6**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2\text{Br}_4]$ ; **C7**,  $[\text{Pd}_2(\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen})_2\text{I}_4]$ . Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ), pelo teste de Tukey. Observa-se a diminuição do diâmetro celular após o tratamento com a CP e os complexos de paládio(II).

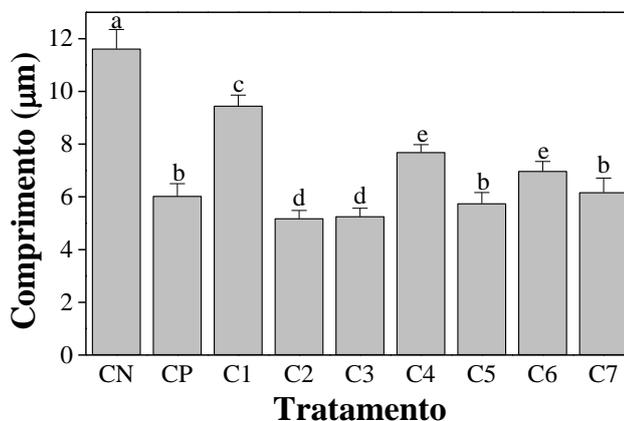
Figura 13 - Diâmetro das colônias de células MCF-7, controle (CN) e tratadas por 24 h, com 0,05  $\mu\text{g/mL}$  de cisplatina (CP) e dos complexos de paládio(II) (C2 a C7).



Fonte: Do autor.

Nota: **C1**,  $\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen}$ ; **C2**,  $[\text{Pd}_2(\text{Hani}_2p\text{-fen})_2\text{Cl}_2]$ ; **C3**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{N}_3)_4]$ ; **C4**,  $[\text{Pd}(\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{NCO})_2]$ ; **C5**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2(\text{SCN})_4]$ ; **C6**,  $[\text{Pd}_4(\text{ani}_2p\text{-fen})_2\text{Br}_4]$ ; **C7**,  $[\text{Pd}_2(\text{H}_2\text{ani}_2p\text{-fen})_2\text{I}_4]$ . Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ), pelo teste de Tukey. Observa-se a diminuição do diâmetro das colônias celulares após o tratamento com a CP e os complexos de paládio(II).

Figura 14 - Comprimento das células MDA-MB-435 controle (CN) e tratadas por 24 h, com 0,05 µg/mL de cisplatina (CP), do ligante (C1) e dos complexos de paládio(II) (C2 a C7).



Fonte: Do autor.

Nota: **C1**,  $H_2ani_2p\text{-fen}$ ; **C2**,  $[Pd_2(Hani_2p\text{-fen})_2Cl_2]$ ; **C3**,  $[Pd_4(ani_2p\text{-fen})_2(N_3)_4]$ ; **C4**,  $[Pd(H_2ani_2p\text{-fen})_2(NCO)_2]$ ; **C5**,  $[Pd_4(ani_2p\text{-fen})_2(SCN)_4]$ ; **C6**,  $[Pd_4(ani_2p\text{-fen})_2Br_4]$ ; **C7**,  $[Pd_2(H_2ani_2p\text{-fen})_2I_4]$ . Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 3 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ), pelo teste de Tukey. Observa-se a diminuição do comprimento celular após o tratamento com a CP e os complexos de paládio(II).

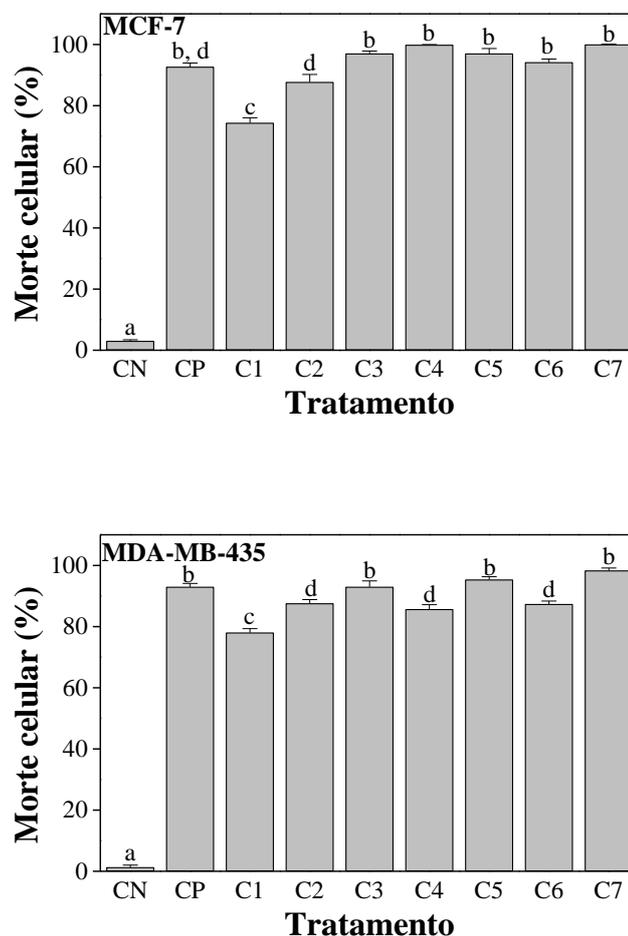
## 5.7 Morte celular

O teste utilizando “fast green” para detecção de morte celular é um método de coloração diferencial que determina a morte celular por perda de viabilidade. Este ensaio está fundamentado na capacidade das células viáveis excluírem o corante, enquanto as células mortas não o fazem. Assim, alterações celulares que incluam perda da integridade da membrana plasmática, de atividade enzimática, de ATP ou de atividade de esterase da membrana plasmática podem ser detectadas pela coloração com “fast green”. Este método pode ser utilizado para células em cultura e é, particularmente, útil para a avaliação da morte celular em tumores sólidos (espécimes clínicos) e quando há população mista de células (WEISENTHAL, 2011).

Os compostos induziram a morte, significativamente ( $p < 0,05$ ), tanto das células MCF-7 como das células MDA-MB-435 (FIGURA 15). Os complexos de paládio(II) foram mais ativos que o ligante para ambos tipos celulares, sendo os complexos C3 a C7 os mais ativos para as células MCF-7 e os complexos C3, C5 e C7 os mais ativos para as células MDA-MB-435. Kacar et al. (2014) demonstraram que o complexo de paládio(II) derivado de base de Schiff contendo sacarinato também induziu a morte de células MDA-MB-435, por apoptose e o efeito deste complexo foi independente dos níveis de p53, Bax, ou caspase 3.

Esses autores demonstraram que a indução de apoptose decorreu da quebra de dupla fita do DNA induzida pelo complexo, o que pode ter ocorrido também no presente trabalho.

Figura 15 - Morte de células (%) MCF-7 e MDA-MB-435, controle (CN) e tratadas por 24 h, com 0,05 µg/mL de cisplatina (CP), do ligante (C1) e dos complexos de paládio(II) (C2 a C7).



Fonte: Do autor.

Nota: **C1**,  $H_2ani_2p\text{-fen}$ ; **C2**,  $[Pd_2(Hani_2p\text{-fen})_2Cl_2]$ ; **C3**,  $[Pd_4(ani_2p\text{-fen})_2(N_3)_4]$ ; **C4**,  $[Pd(H_2ani_2p\text{-fen})_2(NCO)_2]$ ; **C5**,  $[Pd_4(ani_2p\text{-fen})_2(SCN)_4]$ ; **C6**,  $[Pd_4(ani_2p\text{-fen})_2Br_4]$ ; **C7**,  $[Pd_2(H_2ani_2p\text{-fen})_2I_4]$ . Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey. Observa-se a indução da morte das células após tratamento com CP e com os demais compostos.

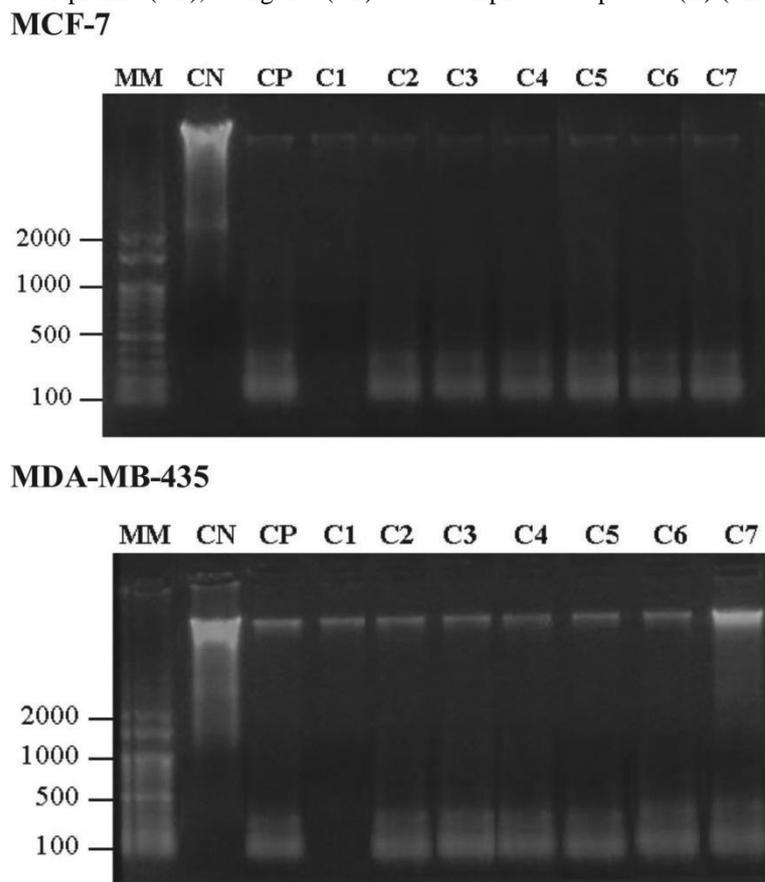
## 5.8 Fragmentação do DNA

A análise da fragmentação do DNA demonstrou clivagem internucleossômica, induzida pela CP e pelos complexos de paládio(II) (FIGURA 16). Este teste mostra a formação do padrão de fragmentação do DNA em escada, um sinal clássico de apoptose, embora esta possa ocorrer na ausência de formação de DNA escada (GALLUZZI et al., 2018), como observado por Kacar et al. (2014) para células MDA-MB-435 tratadas com um complexo de paládio(II)

imínico contendo sacarinato. Entretanto, Ulukaya et al. (2011) observaram a fragmentação do DNA, em padrão escada, das células MCF-7 tratadas com complexo de paládio(II) imínico, contendo sacarinato. No presente trabalho todos os complexos de paládio(II) testados induziram a clivagem internucleossômica do DNA genômico das células MCF-7 e MDA-MB-435, indicando a indução de apoptose.

Muitos agentes quimioterápicos, especialmente, os metalofármacos têm como alvo a replicação do DNA, um evento crucial para a divisão celular, que está superativada nas células tumorais. A interação com o DNA pode induzir diferentes tipos de clivagem e de ligações cruzadas, que alteram a sua estrutura, impedindo a replicação, o que leva à morte celular (FAGHIH et al., 2018). Este parece ser o caso dos complexos de paládio(II) testados no presente trabalho.

Figura 16 - Eletroforese do DNA genômico das células MCF-7e MDA-MB-435, controle (CN) e tratadas por 24 h, com 0,05 µg/mL de cisplatina (CP), do ligante (C1) e dos complexos de paládio(II) (C2 a C7).



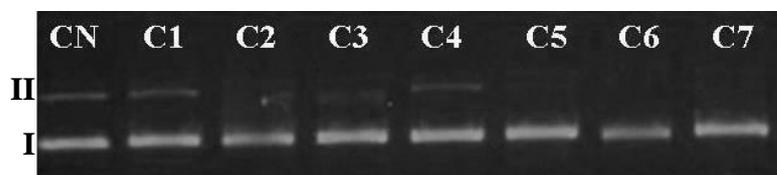
Fonte: Do autor.

Nota: **MM**, marcador de massa molecular de 100 pb; **C1**,  $H_2ani_2p-fen$ ; **C2**,  $[Pd_2(Hani_2p-fen)_2Cl_2]$ ; **C3**,  $[Pd_4(ani_2p-fen)_2(N_3)_4]$ ; **C4**,  $[Pd(H_2ani_2p-fen)_2(NCO)_2]$ ; **C5**,  $[Pd_4(ani_2p-fen)_2(SCN)_4]$ ; **C6**,  $[Pd_4(ani_2p-fen)_2Br_4]$ ; **C7**,  $[Pd_2(H_2ani_2p-fen)_2I_4]$ .

## 5.9 Ligação ao DNA plasmidial

Tem sido proposto que o efeito citotóxico de complexos de paládio(II) para células tumorais decorre de sua interação com o DNA, por meio da formação de ligações cruzadas coordenadas entre o paládio(II) e resíduos de guanosina do DNA (CAIRES, 2007; GAO et al., 2009; SAEIDIFAR et al., 2013). Assim, analisou-se neste trabalho o efeito dos complexos de paládio(II) sobre o DNA plasmidial. A conversão do DNA plasmidial dupla fita, circular, superenrolado para a forma relaxada é um indicador de quebras no DNA e, por outro lado, a ligação cruzada forma uma estrutura altamente compacta, que leva à migração mais rápida do DNA (CHEN;WU; LIN, 2007; ICSEL et al., 2013). Tem sido proposto que os complexos de paládio(II) têm propriedades semelhantes à cisplatina, em relação à interação com o DNA. A Figura 17 mostra que o DNA plasmidial, CN, apresenta 2 bandas, sendo a forma II correspondente ao DNA com clivagem de simples fita (relaxado) e a forma I corresponde ao DNA superenrolado. O tratamento com o ligante C1 não mostrou alteração do padrão de migração do DNA plasmidial, indicando que o ligante não induz clivagem do DNA, como o observado para o DNA genômico das células MCF-7 e MDA-MB-435 CN. Contudo, o tratamento com os complexos de paládio(II) produziu alterações no padrão de migração do DNA plasmidial. O tratamento com os complexos C2, C5, C6 e C7 induziu o desaparecimento da forma II, alteração do padrão de migração da forma I bem como diminuição da banda correspondente à essa forma, provavelmente, porque esses complexos induziram a clivagem hidrolítica do DNA em fragmentos pequenos. Tais alterações são mais evidentes no tratamento com os complexos C2 e C6. Esse efeito de complexos de paládio(II) foi também observado por Kacar et al. (2014) e por Kavitha e Laxma Reddy (2016). O tratamento com o complexo C2 induziu ainda, o aparecimento de uma banda intermediária entre as formas II e I, assim como o complexo C3, o que indica quebra de dupla fita do DNA. O tratamento com o complexo C4 induziu alteração do padrão de migração, indicando interação com o DNA, provavelmente, formando uma geometria complexa que retarda a migração da forma I, como observado por Repich et al. (2017) e Faghieh et al. (2018).

Figura 17 - Ensaio de ligação do DNA plasmidial (CN) ao ligante (C1) e aos complexos de paládio(II) (C2 a C7).



Fonte: Do autor.

Nota: **C1**,  $H_2ani_2p\text{-fen}$ ; **C2**,  $[Pd_2(Hani_2p\text{-fen})_2Cl_2]$ ; **C3**,  $[Pd_4(ani_2p\text{-fen})_2(N_3)_4]$ ; **C4**,  $[Pd(H_2ani_2p\text{-fen})_2(NCO)_2]$ ; **C5**,  $[Pd_4(ani_2p\text{-fen})_2(SCN)_4]$ ; **C6**,  $[Pd_4(ani_2p\text{-fen})_2Br_4]$ ; **C7**,  $[Pd_2(H_2ani_2p\text{-fen})_2I_4]$ . **II**, banda correspondente ao DNA relaxado (com quebra de simples fita); **I**, banda correspondente ao DNA superenrolado.

Um composto citotóxico pode induzir a diminuição da viabilidade por alteração bioquímica ou indução da morte (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016; SUMANTRAN, 2011). Assim, os resultados obtidos no presente trabalho, tais como: diminuição do teor de proteínas, alterações morfológicas e morfométricas, diminuição da sobrevivência, migração e adesão e indução da morte celular indicam efeito citotóxico dos complexos de paládio(II) para as células MCF-7 e MDA-MB-435, os quais podem ser considerados potencialmente antitumorais e antimetastáticos.

Tem sido proposto que o efeito citotóxico de complexos de paládio(II) para células tumorais decorre da interação do complexo com o DNA, por meio da formação de ligações cruzadas coordenadas entre o paládio(II) e a guanosina do DNA (ALBERT et al., 2013; CAIRES, 2007; GAO et al., 2009; SAEIDIFAR et al., 2013), o que pode também ter ocorrido no presente trabalho. Os complexos de paládio(II) estudados, possuem ligantes imínicos, formando ligação estável com o metal e apresentam substituintes hidrolisáveis, o que disponibiliza o paládio(II) para se ligar às bases doadoras de elétrons, como os resíduos de guanosina e adenosina (especialmente o N7). Todos os complexos de paládio(II) estudados no presente trabalho mostraram interação com o DNA, mas o ligante não.

É interessante ressaltar que a estrutura molecular dos complexos de paládio(II), testados neste trabalho, apresentam geometria quadrado-planar com ligante desprotonado coordenado ao íon paládio(II), por meio de átomos de carbono e nitrogênio imínico e os resultados do presente trabalho demonstram o aumento da atividade citotóxica do ligante, após coordenação ao paládio(II). Além disso, o paládio(II) apresenta-se ligado a substituintes haletos, não haletos e pseudoaletos. Isto é importante, pois em condições fisiológicas o substituinte deve ser perdido para que o paládio(II) possa se ligar a compostos celulares. Neste sentido, observa-se que apesar de todos os complexos de paládio(II) apresentarem atividade citotóxica

os mais potentes podem ser considerados o C5 e C7, uma vez que estes apresentaram atividade citotóxica para as duas linhagens celulares em todos os testes realizados. A atividade destes complexos pode ser atribuída a estrutura e propriedades químicas, evidenciando a importância do substituinte, além do ligante, para a atividade do complexo. Esses complexos são formados por ácido macio (paládio) e bases macias (SCN e I), o que provavelmente, favoreceu a interação e estabilidade dos complexos, permitindo alcançar o alvo biológico antes de sua hidrólise.

Os agentes quimioterápicos são divididos em duas classes: os bloqueadores, que evitam o processo de iniciação da carcinogênese e os supressores tumorais, que previnem a posterior promoção e progressão das lesões de DNA já estabelecidas (FRESCO et al., 2010). Tendo em vista que foram utilizadas células com lesões no DNA já estabelecidas e o tratamento com os compostos foi citotóxico para as células analisadas, estes apresentam efeito supressor tumoral.

Além de supressor tumoral (antitumoral), os complexos de paládio(II) testados podem ser considerados com potencial antimetastático, pois inibiram a adesão e migração celular, eventos necessários ao processo metastático (CHOI; MOON, 2018; EMON et al., 2018; OUDIN; WEAVER, 2016). Esse processo é descrito como uma cascata de eventos em que as células normais são transformadas em células tumorais devido a mutações em genes que regulam vias importantes, como a via de sinalização Wnt/RhoA/ROCK, produzindo desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular (KOBUNE et al., 2007; WONG et al., 2015). Interações das células tumorais com o microambiente estromal e proteínas da matriz extracelular contribuem para a formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos. Essas interações facilitam a migração e invasão das células tumorais para os tecidos circundantes, intravasamento pelos vasos recém-formados e disseminação para outros tecidos, para formar os tumores secundários (CHOI; MOON, 2018; EMON et al., 2018; OUDIN; WEAVER, 2016). A organização da matriz extracelular também regula a função celular, assim, alterações na síntese, remodelação e degradação proteolítica contribuem para a perda da integridade estrutural, permitindo a migração e invasão celular no processo metastático (CHOI; MOON, 2018; EMON et al., 2018; OUDIN; WEAVER, 2016).

O citoesqueleto é uma estrutura celular, com várias funções, como organização de organelas citoplasmáticas e compartimentos intracelulares, segregação dos cromossomos nos eventos de mitose e também é responsável pela determinação da forma da célula e promoção da adesão célula-célula ou célula-matriz, por meio de suas interações com caderina e integrinas, respectivamente (FIFE; MCCARROLL; KAVALLARIS, 2014). Os resultados deste estudo indicaram a possível ação dos complexos de paládio(II) sobre o citoesqueleto das

células MCF-7 e MDA-MB-435, evidenciada pelas notáveis alterações morfológicas celulares. Esse resultado sugere, portanto, que a inibição da migração e adesão, podem estar relacionadas também com a capacidade dos complexos de paládio(II) em modificar a estrutura do citoesqueleto.

As células MCF-7 representam o modelo do tumor mamário de maior importância clínica, em termos de prevalência, os tumores luminal A (ER+), que respondem à terapia hormonal (CURIGLIANO et al., 2017). Entretanto, apesar da boa resposta inicial ao tratamento, muitos tumores desenvolvem resistência ao medicamento, além disso, os tumores ER+ não apresentam boa resposta à quimioterapia neoadjuvante e ainda, nos casos avançados da doença, a resposta ao tratamento quimioterápico convencional também não é boa (CURIGLIANO et al., 2017; CURTIS et al., 2012; TANG et al., 2016). As células MDA-MB-435 representam um modelo de tumor mamário triplo-negativo, para o qual não há tratamento clínico curativo. Assim, os resultados desse trabalho indicam que os complexos de paládio(II) testados apresentam potencial, como candidatos para o desenvolvimento de medicamento para tratamento do câncer de mama.

## 6 CONCLUSÃO

O presente trabalho evidenciou potencial antitumoral e antimetastático dos complexos de paládio(II) inéditos. Os complexos foram citotóxicos para as linhagens celulares de tumor mamário humano MCF-7 e MDA-MB-435, pois levaram à diminuição da viabilidade das células, além de alterações morfológicas, morfométricas e induziram a morte celular, podendo ser considerados agentes supressores tumorais. Além disso, os complexos inibiram a migração e adesão celular, apresentando atividade antimetastática. Os complexos apresentaram ainda, capacidade de ligação ao DNA genômico e plasmidial, produzindo a fragmentação destes, indicando que o mecanismo de ação dos complexos inclui a indução de apoptose. Todos os complexos de paládio(II) apresentaram atividade superior ao ligante e apesar de todos serem citotóxicos para ambas as linhagens celulares, os complexos C5 e C7 foram ativos para as células MCF-7 e MDA-MB-435 em todos os testes realizados, podendo, assim, ser considerados os mais ativos. O desenvolvimento de compostos que atuem de forma efetiva, seletiva e com baixa toxicidade ainda é um desafio para o tratamento da maioria dos tipos de tumor. O presente trabalho demonstrou pela primeira vez o efeito citotóxico dos compostos sintetizados para a linhagem MCF-7, de adenocarcinoma mamário humano ER+ e MDA-MB-435, triplo-negativo. Este resultado indica que os complexos apresentam potencial para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer de mama, especialmente, os complexos C5 e C7.

## REFERÊNCIAS

- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016.
- ALBERT, J. et al. Cyclopalladated benzophenone imines: Synthesis, cytotoxicity against human breast adenocarcinoma cell lines and DNA interaction. **J. Organometal. Chem.**, v. 724, p. 289-296, 2013.
- AL-NOAIMI, M.; ABU-SURRAH, A. S.; TAHTAMOUNI, L. Palladium(II) complexes incorporating phenylazo arylmethine ancillary ligands: Synthesis, spectral and antitumor activity. **Arab. J. Chem.**, v. 9, sup. 2, p. S1503-S1509, 2016.
- APPS, M. G.; CHOI, E. H.; WHEATE, N. J. The state-of-play and future of platinum drugs. **Endocr. Relat. Cancer.**, v. 22, n. 4, p. R219-R233, 2015.
- ARI, F. et al. Apoptosis-inducing effect of a palladium(II) saccharinate complex of terpyridine on human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 22, n. 17, p. 4948-4954, 2014.
- BAJO, A.M. et al. Bombesin antagonists inhibit growth of MDA-MB-435 estrogen-independent breast cancers and decrease the expression of the ErbB-2/HER-2 oncoprotein and c-jun and c-fos oncogenes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 3836-3841, 2002.
- BARROS, A. C. S. D.; LEITE, K. R. M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. **Rev. Bras. Mastologia**, v. 25, n. 4, p. 146-155, 2015.
- BASELGA, J. et al. Advances in the management of HER2-positive early breast cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 119, p. 113-122, 2017.
- BERTUCCI, F. et al. How basal are triple-negative breast cancers? **Int. J. Cancer**, v. 123, n. 1, p. 236-240, 2008.
- BIANCHINI, G. et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, v. 13, n. 11, p. 674-690, 2016.
- BIEGING, K. T.; MELLO, S. S.; ATTARDI, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nat. Ver. Cancer**, v. 14, p. 359-370, 2014.
- BINCOLETTO, C. et al. Chiral cyclopalladated complexes derived from *N,N*-dimethyl-1-phenethylamine with bridging bis(diphenylphosphine)ferrocene ligand as inhibitors of the cathepsin B activity and as antitumoral agents. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 13, p. 3047-3055, 2005.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J. Clin.**, v. 0, n. 0, p.1-31, 2018.
- CAIRES, A. C. F. Recent advances involving palladium(II) complexes for the cancer therapy. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 7, n. 5, p. 484-491, 2007.

CAMPANELLA, N. C. et al. The cytotoxic and growth inhibitory effects of palladium(II) complexes on MDA-MB-435 cells. **Gen. Mol. Biol.**, v. 35, n. 1, p. 159-163, 2012.

CARVALHO, A. J. S.; ISHIKAWA, T.; GOUVÊA, C. M. C. P. Aqueous extract *Pliniaedulis* leaves: Antioxidant activity and cytotoxicity to human breast cancer MCF-7 cell line. **South Afric. J. Bot.**, v. 81, p. 1-7, 2012.

CASTRELLON, A. B. et al. The role of carboplatin in the neoadjuvant chemotherapy treatment of triple negative breast cancer. **Oncol.Rev.**, v. 11, n. 1, p. 324, 2017.

CHANG, T. T.; THAKAR, D.; WEAVER, V. M. Force-dependent breaching of the basement membrane. **Matrix Biol.**, v. 57-58, p.178-189, 2017.

CHEN, C. N.; WU, C. L.; LIN, J. K. Apoptosis of human melanoma cells induced by the novel compounds propolin A and propolin B from Taiwanese propolis. **Cancer Lett.**, v. 245, n. 1-2, p. 218-231, 2007.

CHOI H.; MOON A. Crosstalk between cancer cells and endothelial cells: implications for tumor progression and intervention. **Arch. Pharm. Res.**, v. 41, n. 7, p. 711-724, 2018.

COATES, A.S. et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. **Ann. Oncol.**, v. 26, n. 8, p. 1533-1546, 2015.

CURIGLIANO, G. et al. De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. **Ann. Oncol.**, v. 28, n. 8, p. 1700-1712, 2017.

CURTIS, C. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 346-352, 2012.

CUTILLAS, N. et al. Anticancer cyclometalated complexes of platinum group metals and gold. **Coord. Chem. Rev.** v. 257, p. 2784-2797, 2013.

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

EKWALL, B. et al. Toxicity tests with mammalian cell cultures. In: BOURDEAU, P. et al. (Ed.), **Short-term toxicity tests for non-genotoxic effects**. Nova Iorque: John Wiley and Sons, 1990. p. 75-97.

EMON, B. et al. Biophysics of tumor microenvironment and cancer metastasis - a mini review. **Comput. Struct. Biotechnol. J.**, v. 16, p. 279-287, 2018.

EZENWAJIAKU, N.; MA, C. X.; ADEMUYIWA, F. O. Updates on molecular classification of triple negative breast cancer. **Curr. Breast Cancer Rep.**, v. 10, p. 289-295, 2018.

- FAGHIIH, Z. et al. Palladium(II) complexes based on Schiff base ligands derived from *ortho*-vanillin; synthesis, characterization and cytotoxic studies. **Inorg. Chim. Acta**, v. 471, p.404-412, 2018.
- FARMER, P. et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. **Oncogene**, v. 24, n. 29, p. 4660-4671, 2005.
- FIUZA, S.M. et al. Biologic activity of a dinuclear Pd(II)-spermine complex toward human breast cancer. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 77, n. 6, p. 477-488, 2011.
- FIFE, C. M.; MCCARROLL, J. A.; KAVALLARIS, M. Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 171, n. 24, p. 5507-5523, 2014.
- FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells *in vitro*. **Nat. Protoc.**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.
- FRESCO, P. et al. The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. **Cur. Pharmac. Design**, v. 16, p. 114-134, 2010.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ.**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.
- GAO, E. et al. Current development of Pd(II) complexes as potential antitumor agents. **Anti-Cancer Agents Med. Chem.**, v. 9, p. 356-368, 2009.
- GOIS, E. P. Aspectos estruturais e potencialidade leishmanicida de compostos de paládio(II) ciclometalados ou não, com o ligante imínico H<sub>3</sub>C-O-p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>- (E)HC=N-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-p-N=CH(E)-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-p-O-CH<sub>3</sub>. 2011. 155 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2011.
- GROSS, K. et al. Cell fate decisions during breast cancer development. **J. Dev. Biol.**, v. 4, n. 1, p. 4, 2016.
- HAMMOND, M. E. H. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 134, p. 907-922, 2010.
- HERNÁNDEZ, W. et al. Synthesis and characterization of new palladium(II) thiosemicarbazone complexes and their cytotoxic activity against various human tumor cell lines. **Bioinorg. Chem. Appl.**, v. 2013, p. 524701, 2013.
- HIATT, R. A.; BRODY, J. G. Environmental determinants of breast cancer. **Annu. Rev. Public Health**, v. 39, p. 113-133, 2018.
- ICSEL, C. et al. *trans*-Dichloridopalladium(II) and platinum(II) complexes with 2-(hydroxymethyl)pyridine and 2-(2-hydroxyethyl)pyridine: Synthesis, structural characterization, DNA binding and *in vitro* cytotoxicity studies. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 60, p. 386-394, 2013.

INSTITUTO Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2017. 128 p.

JAHROMI, E. Z. et al. Palladium complexes: new candidates for anti-cancer drugs. **J. Iran. Chem. Soc.**, v. 13, n. 5, p. 967-989, 2016.

JITARIU, A. A. et al. Triple negative breast cancer: the kiss of death. **Oncotarget**, v. 8, n.28, p. 46652-46662, 2017.

JOSEPH et al. Breast cancer intra-tumour heterogeneity: current status and clinical implications. **Histopathology**, v. 73, p. 717-731, 2018.

JUSTUS, C. R. et al. *In vitro* cell migration and invasion assays. **J. Vis. Exp.**, v. 88, p. 1-8, 2014.

KACAR, O. et al. Evaluation of the molecular mechanisms of a palladium(II) saccharinate complex with terpyridine as an anticancer agent. **Anti-Cancer Drugs**, v. 25, n. 1, p. 17-29, 2014.

KAVITHA P.; LAXMA REDDY, K. Pd(II) complexes bearing chromone based Schiff bases: Synthesis, characterisation and biological activity studies. **Arab. J. Chem.**, v. 9, n. 5, p. 640-648, 2016.

KHOSRAVI-SHAHI, P.; CABEZÓN-GUTIÉRREZ, L.; CUSTODIO-CABELLO, S. Metastatic triple negative breast cancer: Optimizing treatment options, new and emerging targeted therapies. **Asia Pac. J. Clin.Oncol.**, v. 14, n. 1, p. 32-39, 2018.

KOBUNE, M. et al. Wnt3/RhoA/ROCK signaling pathway is involved in adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma in an autocrine mechanism. **Mol. Cancer Ther.**,v. 6, p. 1774-1784, 2007.

LA BELLE, A. et al. Role of platinum in early-stage triple-negative breast cancer. **Curr. Treat. Options Oncol.**, v. 18, n. 11, p. 68, 2017.

LEBERT, J. M. et al. Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer. **Curr.Oncol.**, v. 25, n. Suppl 1, p. S142-S150, 2018.

LEE, S. H. et al. Antimetastatic effects of *Phyllanthus* on human lung (A549) and breast (MCF-7) cancer cell lines. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p.e20994, 2011.

LE TOURNEAU, C. et al. Current challenges for the early clinical development of anticancer drugs in the era of molecularly targeted agents. **Target Oncol.**, v. 5, p. 65-72, 2010.

LEHMANN, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **J. Clin. Invest.**, v. 121, n. 7, p. 2750-2767, 2011.

- LI, X.; OPREA-ILIES, G. M.; KRISHNAMURTI, U. New developments in breast cancer and their impact on daily practice in pathology. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 141, n. 4, p. 490-498, 2017.
- LIANG, C.-C.; PARK, A.Y; GUAN, J.-L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nat. Protoc.**, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.
- LIU, X. et al. Puerarin suppresses LPS-induced breast cancer cell migration, invasion and adhesion by blockage NF- $\kappa$ B and Erk pathway. **Biomed. Pharmacother.**, v. 92, p. 429-436, 2017.
- LOIBL, S.; GIANNI, L. HER2-positive breast cancer. **Lancet**, v. 389, n. 10087, p. 2415-2429, 2017.
- LOW, S.-K.; ZEMBUTSU, H.; NAKAMURA, Y. Breast cancer: The translation of big genomic data to cancer precision medicine. **Cancer Sci.**, v. 109, n. 3, p. 497-506, 2018.
- MCANDREW, N.; DEMICHELE, A. Neoadjuvant chemotherapy considerations in triple-negative breast cancer. **J. Target Ther. Cancer**, v. 7, n. 1, p. 52-69, 2018.
- MALIK, M. A. et al. Heterocyclic Schiff base transition metal complexes in antimicrobial and anticancer chemotherapy. **Med. Chem. Comm.**, v. 9, n. 3, p. 409-436, 2018.
- MEHMOOD, R. K. Review of cisplatin and oxaliplatin in current immunogenic and monoclonal antibody treatments. **Oncol. Rev.**, v. 8, n. 2, p. 256, 2014.
- NOOR, Z. S.; MASTER, A. Updates on targeted therapy for triple-negative breast cancer (TNBC). **Curr. Breast Cancer Rep.** v. 10, p. 282-288, 2018.
- OMARINI, C. et al. Neoadjuvant treatments in triple-negative breast cancer patients: where we are now and where we are going. **Cancer Manag. Res.**, v. 10, p. 91-103, 2018.
- LOUDIN, M. J.; WEAVER, V. M. Physical and chemical gradients in the tumor microenvironment regulate tumor cell invasion, migration, and metastasis. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v. 81, p. 189-205, 2016.
- PARK, J. H.; AHN, J.-H.; KIM, S.-B. How shall we treat early triple-negative breast cancer (TNBC): from the current standard to upcoming immuno-molecular strategies. **ESMO Open**, v. 3, p. e000357, 2018.
- PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, n. 22, p. 3533-3539, 1963.
- PERNAS, S.; BARROSO-SOUSA, R.; TOLANEY, S.M. Optimal treatment of early stage HER2-positive breast cancer. **Cancer**, v. 124, p. 4455-4466, 2018.
- PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000.

POGGIO, F. Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Ann. Oncol.**, v. 29, n. 7, p. 1497-1508, 2018.

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 12, p. R68, 2010.

QUIRANTE, J. et al. Platinum(II) and palladium(II) complexes with (N,N') and (C,N,N')-ligands derived from pyrazole as anticancer and antimalarial agents: Synthesis, characterization and *in vitro* activities. **J. Inorg. Biochem.**, v. 105, n. 2, p. 1720-1728, 2011.

QUIST, J. et al. A four-gene decision tree signature classification of triple-negative breast cancer: Implications for targeted therapeutics. **Mol Cancer Ther.**, 2018. Disponível em: < <http://mct.aacrjournals.org/content/18/1/204> >. Acesso em 10 abr. 2019.

RAHBAR SAADAT, Y. et al. An update to DNA ladder assay for apoptosis detection. **BioImpacts**, v. 5, n. 1, p. 25-28, 2015.

REDDY, E. R. et al. Sugar-boronate ester scaffold tethered pyridyl-imine palladium(II) complexes: synthesis and their *in vitro* anticancer evaluation. **Dalton Trans.**, v. 44, n. 40, p. 17600-17616, 2015.

REPICH, H. H. et al. Synthesis, spectral characterization of novel Pd(II), Pt(II)  $\pi$ -coordination compounds based on N-allylthioureas. Cytotoxic properties and DNA binding ability. **J. Inorg. Biochem.**, v. 168, p. 98-106, 2017.

RIDA, P. et al. First international TNBC conference meeting report. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 169, n. 3, p. 407-412, 2018.

SAEIDIFAR, M, et al. Synthesis, characterization, and cytotoxicity studies of a novel palladium(II) complex and evaluation of DNA-binding aspects. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v. 32, n. 7, p. 366-388, 2013.

ŞAHINA, Ö. et al. New platinum (II) and palladium (II) complexes of coumarin-thiazole Schiff base with a fluorescent chemosensor properties: Synthesis, spectroscopic characterization, X-ray structure determination, *in vitro* anticancer activity on various human carcinoma cell lines and computational studies. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 178, p. 428-439, 2018.

SAMI, H.; EFFERTH, T. Ginkgolic acids inhibit migration in breast cancer cells by inhibition of NEMO sumoylation and NF- $\kappa$ B activity. **Oncotarget**. v.8, p. 35103-35115, 2017.

SARAIVA, D. P. et al. How many diseases is triple negative breast cancer: the protagonism of the immune microenvironment. **ESMO Open**, v. 2, n 4, p. e000208, 2017.

SERRA, K. P. et al. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 36, n. 12, p. 575-580, 2014.

SHARMA, N. K.; AMETA, R. K.; SINGH, M. Biological impact of Pd (II) complexes: Synthesis, spectral characterization, *in vitro* anticancer, CT-DNA binding, and antioxidant activities. **Int. J. Med. Chem.**, v. 2016, p. 9245619, 2016.

SHARMA, P. Update on the treatment of early-stage triple-negative breast cancer. **Curr. Treat. Options Oncol.**, v. 19, n. 5., p. 22, 2018.

SOULE, H.D. et al. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 5, p. 1409-1416, 1973.

SUMANTRAN, V.N. Cellular chemosensitivity assays: an overview. In: CREE, I.A. (Ed.), **Cancer cell culture: methods and protocols** (Methods in Molecular Biology 731 Springer Protocols). 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2011. p. 219-236.

TABRIZI, L.; CHINIFOROSHAN, H. New water-soluble palladium(II) complexes of lidocaine and phenylcyanamide derivative ligands: cytotoxicity and cellular response mechanisms. **Invest. New Drugs**, v. 34, n. 6, p. 723-732, 2016.

TANG, Y. et al. Classification, treatment strategy, and associated drug resistance in breast cancer. **Clin. Breast Cancer**, v. 16, n. 5, p. 335-343, 2016.

TANNER, K. Regulation of the basement membrane by epithelia generated forces. **Phys. Biol.**, v. 9, n. 6, p. 065003, 2012.

TONG, C. W. S. et al. Recent advances in the treatment of breast cancer. **Front. Oncol.**, v. 8, p. 227, 2018.

ULUKAYA, E. et al. Anti-cancer activity of a novel palladium(II) complex on human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 46, n. 10, p. 4957-4963, 2011.

UNTCH, M. et al. 13th St.Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - opinion of a German team of experts (Zurich 2013). **Breast Care**, v. 8, n. 3, p. 221-229, 2013.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nat.Potoc.**, v. 1, n. 3, p. 1112-1116, 2006.

WEISENTHAL, L. M. Differential staining cytotoxicity assay: a review. In: CREE, I.A. (Ed.), **Cancer cell culture: methods and protocols** (Methods in Molecular Biology 731 Springer Protocols), 2. ed. New York: Springer-Verlag, p. 259-283, 2011.

WEISENTHAL, L. M. et al. A novel dye exclusion method for testing *in vitro* chemosensitivity of human tumors. **Cancer Res.**, v. 43, n. 2, p. 749-757, 1983.

WOLFF et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Arch. Pathol. Lab. Med.** v.142, p. 1364-1382, 2018.

WONG et al. MiR-200b/200c/429 subfamily negatively regulates Rho/ROCK signaling pathway to suppress hepatocellular carcinoma metastasis. **Oncotarget**, v. 6, n. 15, p. 13658-13670, 2015.

WUERSTLEIN, R.; HARBECK, N. Neoadjuvant therapy for HER2-positive breast cancer. **Rev. Recent. Clin. Trials**, v. 12, n. 2, p. 81-92, 2017.

ZEICHNER, S. B.; TERAWAKI, H.; GOGINENI, K. A review of systemic treatment in metastatic triple-negative breast cancer. **Breast Cancer: Basic Clin. Res.**, v. 10, p. 25-36, 2016.

ZHOU L. et al. Weekly paclitaxel and cisplatin as neoadjuvant chemotherapy with locally advanced breast cancer: A prospective, single arm, phase II study. **Oncotarget**, v. 8, n. 45, p. 79305-79314, 2017.