



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Alfenas Unifal-MG

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG - CEP 37130-000

Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



AMANDA ALVIM NEGRETI RODRIGUES

**Efeitos de complexos de rutênio(II) contendo derivados do ácido
cinâmico sobre células derivadas de melanoma humano**

Alfenas/MG

Abril/2021

AMANDA ALVIM NEGRETI RODRIGUES

**Efeitos de complexos de rutênio(II) contendo derivados do ácido
cinâmico sobre células derivadas de melanoma humano**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Aplicada à Saúde como requisito para
obtenção do título de Doutorado em Biotecnologia
Aplicada à Saúde pela Universidade Federal de
Alfenas.

Orientador: Profa. Dra. Marisa Ionta.

Co-orientador: Prof. Dr. Angel Maurício Castro
Gamero

Alfenas/MG

Abril/2021

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

R696e Rodrigues, Amanda Alvim Negreti.
Efeitos de complexos de rutênio(II) contendo derivados do ácido cinâmico sobre células derivadas de melanoma humano. / Amanda Alvim Negreti Rodrigues. – Alfenas/MG, 2021.
84f.: il. --

Orientadora: Marisa Ionta.
Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Melanoma. 2. Compostos de Rutênio. 3. Anticarcinógenos. 4. Apoptose. I. Ionta, Marisa. II. Título.

CDD-616.994

Amanda Alvim Negreti Rodrigues

Efeitos de complexos de rutênio(II) contendo derivados do ácido cinâmico sobre células derivadas de melanoma humano

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiopatologia.

Aprovada em: 29 de abril de 2021

Profa. Dra. Marisa Ionta
Instituição: Universidade Federal de Alfenas -
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Pollyana Francielli de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Luciana Azevedo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Jaqueline Carvalho de Oliveira
Instituição: Universidade Federal do Paraná
UFPR

Prof. Dr. Jônatas Bussador Amaral
Instituição: Universidade Federal de São Paulo
USP



Documento assinado eletronicamente por **Pollyanna Francielli de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 29/04/2021, às 13:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 29/04/2021, às 13:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marisa Ionta, Professor do Magistério Superior**, em 29/04/2021, às 13:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **JONATAS BUSSADOR DO AMARAL, Usuário Externo**, em 29/04/2021, às 13:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jaqueline Carvalho de Oliveira, Usuário**



Externo, em 29/04/2021, às 13:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0497994** e o código CRC **DAA42871**.

*Dedico este trabalho a Deus, pois por Ele tudo
foi possível, e a toda minha família,
em especial, ao meu marido e à minha filha Sophia.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pelo Seu amor, por ser o meu refúgio e forta por tudo o que é e sempre será. Sem Sua presença em minha vida, nada disso seria possível.

Agradeço a minha orientadora, professora dra. Marisa Lonta, pela confiança, dedicação, profissionalismo, competência, ensinamentos, sábios conselhos e pelo ser humano que é. Sempre será um exemplo e uma inspiração para mim, me ensinou muito.

Ao meu esposo Samuel, por ser meu parceiro de vida, por estar ao meu lado com tanto amor, paciência e otimismo, por me incentivar durante todo esse período. Obrigada por tudo, meu amor, amo você.

A minha filha Sophia, que trouxe luz, sentido e muito mais amor a minha vida.

Aos meus pais, Sônia e Edgard, aos meus irmãos, Aline e Lucas, minha cunhada Fernanda, por todo apoio, conselhos, conversas e pela certeza de que sempre estiveram ao meu lado. Amo vocês.

A minha sogra Mary, meu sogro Nilton, cunhados e esposas, Tiago, Suellen, Carol, Davi e minha sobrinha linda Laura, que sempre estiveram me apoiando e torcendo por mim.

A minha avó Dulcinea, que sempre se preocupou comigo e torceu muito para a conclusão desse trabalho, para sempre meu grande amor.

A toda minha família, meu maior tesouro, meu maior presente.

A todos os meus amigos que fazem a minha vida ainda mais especial.

Agradeço de uma forma especial ao meu colega e amigo do LABAInt Guilherme Álvaro Ferreira da Silva que sempre esteve pronto para me ajudar, ensinar, conversar. Um colega que se tornou um amigo muito especial.

Aos meus amigos do LABAInt Renato, Graciana e Welington pela ajuda de sempre.

Aos meus colegas Rafael Fonseca e Carolina Giroto do LABAInt pela ajuda e empenho.

À professora Dra. Ester, pelo apoio, conversas, amizade e trocas de experiências.

À Dra Marta, por todos ensinamentos compartilhados e apoio em todo tempo.

A todos os outros amigos do LABAInt e professores do departamento.

A Adriana, secretária do PPGB, que sempre me ajudou e esteve presente com toda sua competência e amizade.

À Dra. Marília Barbosa por ter sintetizado e confiado os complexos de rutênio II à minha experimentação.

Ao prof. Dr. Angel Maurício Castro Gamero pela orientação.

Enfim, agradeço a todos que conviveram comigo nesse período, a todos que me ouviram, me ajudaram, me ensinaram. Saibam que vocês contribuíram muito para meu aprendizado e têm um lugar especial em meu coração.

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

RESUMO

O melanoma é um tipo câncer de pele muito agressivo e altamente letal quando não diagnosticado em estágio inicial. A sobrevivência média dos pacientes com melanoma metastático é inferior a um ano. Apesar dos avanços nos protocolos terapêuticos com a introdução de agentes imunomoduladores e inibidores de proteínas tirosino-cinases, os resultados clínicos ainda são limitados. Neste contexto, é relevante a busca por novos agentes que possam melhorar as propostas terapêuticas para o melanoma. Estudos mostram que o ácido cinâmico e seus derivados apresentam promissora atividade antitumoral. Além disso, nos últimos anos vários complexos metálicos, a base de rutênio, tem sido obtidos a partir da coordenação desse íon à compostos orgânicos. Os complexos de rutênio tem sido amplamente explorados como candidatos a fármacos antineoplásicos e representam uma alternativa aos compostos de platina, cuja toxicidade é bem conhecida. Estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que complexo de rutênio (II) contendo o ácido piperonílico inibiu a proliferação e induziu apoptose em células derivadas de adenocarcinoma pulmonar. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos de três complexos de rutênio, contendo derivados do ácido cinâmico, sobre células derivadas de melanoma (HT-144, CHL-1, SK-MEL-147 e WM1366). Os complexos denominados de CINAM, TRANSCINAM, e CLOROCINAM foram obtidos a partir da coordenação do rutênio aos ácidos 3,4-metileno-cinâmico, *trans*-4-trifluorometil-cinâmico e *trans*-4-cloro-cinâmico, respectivamente. Os três complexos reduziram a taxa de viabilidade celular em todas as linhagens testadas, contudo o efeito foi dependente da concentração utilizada. Os valores de IC₅₀ variaram entre 2,83 e 13,83 µM e, considerando os perfis de citotoxicidade e de seletividade, o complexo TRANSCINAM foi selecionado para futuras investigações. A linhagem CHL-1 apresentou maior sensibilidade ao TRANSCINAM em relação às linhagens SK-MEL-147 e WM1366, como evidenciado pelos ensaios de ciclo celular e capacidade clonogênica. Assim, os mecanismos associados à capacidade de TRANSCINAM inibir a progressão do ciclo na transição G1/S, na linhagem CHL-1, foram investigados. Os resultados mostraram que TRANSCINAM reduz e aumenta, respectivamente, a expressão de *CCNE2* (ciclina E2) e *CDKN1A* (p21), reguladores críticos da transição G1/S. Além disso, TRANSCINAM induziu apoptose em células CHL-1 e inibiu a capacidade de migração dessas células. O efeito pró-apoptótico foi correlacionado ao aumento da razão *BAX/Bcl-2*. Os dados apresentados no presente estudo mostram que TRANSCINAM tem potencial antitumoral e representa um protótipo promissor, contudo estudos subsequentes devem ser realizados para avaliar sua efetiva contribuição no tratamento de melanoma.

Palavras-chave: Melanoma, derivados de ácido cinâmico, complexos de rutênio, atividade antiproliferativa, apoptose.

ABSTRACT

Melanoma is a rare aggressive skin cancer and highly lethal with late diagnosis. Metastatic melanoma overall survival is lower than a year. Despite advances in the treatment with immunotherapy or protein kinase inhibitors, the clinical outcome is poor. In this scenario, the search for new drugs is imperative for the improvement of melanoma therapeutic proposes. Studies have shown that cinnamic acid and derivatives present promising antitumor activity. In addition, nowadays numerous metallic complexes based in Ruthenium were obtained from its coordination with organic compounds. Ruthenium complexes have been investigated as potential antineoplastic drugs and represent an alternative for platinum compounds that has known toxicity. Previous studies developed by our group showed that Ruthenium complex (II) with piperonic acid inhibited proliferation and induced apoptosis in lung adenocarcinoma cells. In this way, the objective of the present study was to evaluate the effect of three different ruthenium complexes containing cinnamic acid derivatives on melanoma cell lines (HT-144, CHL-1, SK-MEL-147 and WM1366). The complexes named CINAM, TRANSCINAM and CLOROCINAM were obtained by the coordination of ruthenium with 3,4-methylenedioxy-cinnamic, *trans*-4-trifluoromethyl-cinnamic and *trans*-4-chloro-cinnamic acids, respectively. All complexes reduced cell viability in tested cell lines in a concentration-dependent manner. The IC₅₀ values varied from 2.83 to 13.83 μ M. TRANSCINAM was selected for future investigation based on its cytotoxicity and selectivity profiles. CHL-1 cell line was more responsive to TRANSCINAM when compared SKM-MEL-147 and WM1366, considering cell cycle and clonogenic capacity analyses. Therefore, the mechanisms associated to the capacity of TRANSCINAM to inhibit the cell cycle progression at G1/S transition in CHL-1 cells were further investigated. The results showed that TRANSCINAM reduced and increased the expression *CCNE2* (cyclin E2) and *CDKN1A* (p21), respectively, which are critical regulators of G1/S transition. Moreover, TRANSCINAM induced apoptosis on CHL-1 cells and inhibited migration of these cells. Pro-apoptotic effect was associated to increase *BAX/Bcl-2* ratio. Taken together, the data show that TRANSCINAM is a promising antitumor prototype, however further studies should be carried out to evaluate its effective contributing for melanoma treatment.

Key-words: melanoma, cinnamic acid derivatives, ruthenium complexes, antiproliferative activity, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Aspectos gerais relacionados aos mecanismos regulatórios da progressão pela fase 1 e transição G1/S	19
Figura 2 -	Transformação maligna do melanócito	22
Figura 3 -	Estruturas químicas dos complexos de rutênio(III) em fase clínica.....	29
Figura 4 -	Estruturas químicas propostas para os complexos de rutênio (II).....	30
Figura 5 -	Viabilidade celular determinada por MTS na linhagem HT-144.....	41
Figura 6 -	Viabilidade celular determinada por MTS na linhagem SK-MEL-147.....	42
Figura 7 -	Viabilidade celular determinada por MTS na linhagem CHL-1.....	43
Figura 8 -	Viabilidade celular determinada por MTS na linhagem WM1366.....	44
Figura 9 -	Viabilidade celular determinada por MTS em células HT-144.....	45
Figura 10 -	Ensaio de capacidade clonogênica realizado na linhagem CHL-1.....	47
Figura 11 -	Ensaio de capacidade clonogênica realizado na linhagem SK-MEL-147.....	48
Figura 12 -	Ensaio de capacidade clonogênica realizado na linhagem WM1366.....	48
Figura 13 -	Análise da dinâmica de progressão do ciclo celular SK-MEL-147.....	50
Figura 14 -	Análise da dinâmica de progressão do ciclo celular WM1366.....	50
Figura 15 -	Análise da dinâmica de progressão do ciclo celular CHL-1.....	51
Figura 16 -	Imagens ilustrativas, obtidas por microscopia de contraste fase (aumento 60x) mostrando o aspecto morfológico da linhagem CHL-1.....	51
Figura 17 -	Ensaio de coloração de BrdU em CHL-1 após 24h de tratamento.....	53
Figura 18 -	Ensaio de migração celular realizado na linhagem CHL-1.....	57
Figura 19 -	Imagens representativas mostrando o padrão de distribuição de elementos do citoesqueleto.....	58
Figura 20 -	Ensaio de Anexina V em culturas de células CHL-1.....	61
Figura 21 -	Expressão relativa de RNAm de <i>Bax</i> e <i>Bcl-2</i> determinada por RT-PCR na linhagem CHL-1.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sequência de bases dos <i>primers</i> utilizados na PCR em tempo real.....	38
Tabela 2 -	Valores de IC ₅₀ determinados por MTS após 24 horas de tratamento com os diferentes complexos nas linhagens de melanoma.....	45
Tabela 3 -	Índice de seletividade (IS) usando a linhagem CCD-1059Sk como referência.....	46
Tabela 4 -	Índice de seletividade (IS) frente a cultura de fibroblastos isolados a partir de tecido gengival.....	46
Tabela 5 -	Índice de seletividade frente a linhagem NGM.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549	Linhagem celular derivada de adenocarcinoma pulmonar
AC	Ácido cinâmico
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1
AKT ou PKB	Serine/Theronine-Specific Protein Kinase
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated serine-protein kinase
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/Killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchoninic Acid
Bcl-2	B- cell lymphoma 2
Bcl-W	B-cell lymphoma-extra large
Bcl-xL	Linfoma de células B extra grande
BEL-7402	Linhagem celular derivada de carcinoma hepatocelular
Bid	BH3-interacting domain agonist
Bik	Bcl-2-interacting killer
BrdU	Bromodeoxiuridina
Caspase	Cysteine-aspartic acid protease
<i>CCND1</i>	Cyclin D1
CCNE2	Cyclin E
Cdc25	Cell division cycle 25
CKIs	Cyclin-dependent kinases inhibitor protein
CDK	Cyclin-dependent kinase
CF3	Trifluorcarbono
CHL-1	Linhagem celular derivada de melanoma
CKI	Cyclin-dependent kinases inhibitor
CO ₂	Carbon dioxide
CTLA-1	Proteína-4 associada a linfócitos T citotóxicos
DAPI	'6-Diamidino-2'-Phenilindol diidrocloroeto
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid

DP	Desvio padrão
DTIC	Dacarbazina
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinases
FB1	Fibroblasto de cultura primária de tecido gengival
FDA	Food And Drug Administration
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
HCL	Hydrochloric acid
HeLa	Linhagem celular de câncer cervical
HT-144	Linhagem celular derivada de melanoma metastático
IARC	International Agency for Research on CancerCancer
IC ₅₀	Concentração inibitória média
IgG	Imunoglobulina G
IL-2	Interleucina 2
INCA	Instituto Nacional de Câncer no Brasil
INF- α	Interferon α -2b
INK4	Inhibitor of Kinase 4
K-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
M	Molar
mA	Miliampère
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCF-7	Linhagem celular derivada de adenocarcinoma mamário
MDA-MB-231	Linhagem celular derivada de câncer de mama
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mTOR	Mammalian target of rapamyci
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2Htetrazólio)
NF1	Gene neurofibromatose tipo 1
NGM	Linhagem celular derivada de nevus
PBSA	Phosphate Buffered Saline
Peg-INF	Peginterferon α -2b

PI	Propidium iodide
pRb	Retinoblastoma Protein
pTEN	Homólogo de tensina
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
Raf	Serine/threonine-protein kinase
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
Rpm	Rotações por minuto
SBF	Soro Fetal Bovino
SK-MEL-147	Linhagem celular derivada de melanoma metastático
TBS	Tris-buffered saline
TGF- α	Transforming growth factor alfa
TNF	Tumor necrosis fator
TP53	Tumor protein p53
Tregs	Células T reguladoras
TTBS	Tris-Buffered Saline and Tween 20
U251	Linhagem celular derivadas de glioblastoma humano
UV	Ultra violeta
V/cm ²	Volts por centímetro quadrado
VEGF	Vascular endotelial growth factor
WM1366	Linhagem celular derivada de melanoma metastático

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	CÂNCER.....	17
2.2	MELANOMA.....	20
2.3	TRATAMENTOS E ALVOS TERAPÊUTICOS.....	23
2.4	POTENCIAL ANTITUMORAL DO ÁCIDO CINÂMICO E SEUS DERIVADOS.....	26
2.5	COMPLEXOS DE RUTÊNIO.....	27
3	JUSTIFICATIVA.....	31
4	OBJETIVOS.....	32
4.1	OBJETIVO GERAL.....	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
5.1	COMPLEXOS METÁLICOS.....	33
5.2	LINHAGENS CELULARES, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ESQUEMA DE TRATAMENTO.....	33
5.3	VIABILIDADE CELULAR – ENSAIO COLORIMÉTRICO DE MTS.....	34
5.4	ASPECTO MORFOLÓGICO DA CULTURA POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE.....	34
5.5	ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....	34
5.6	ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA.....	35
5.7	ANÁLISE DO CITOESQUELETO.....	35
5.8	INCORPORAÇÃO DE BrdU.....	36
5.9	ENSAIO DE ANEXINA V/7-AAD.....	36
5.10	ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDA.....	37
5.11	RT-QPCR.....	37
5.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6.1	COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO DERIVADOS DE ÁCIDO CINÂMICO SÃO EFETIVOS EM REDUZIR A VIABILIDADE DE CÉLULAS DERIVADAS DE MELANOMA.....	39
6.2	TRANSCINAM TEM EFEITO CITOSTÁTICO NA LINHAGEM CHL-1 QUANDO USADO EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES.....	46
6.3	TRANSCINAM INIBE A MIGRAÇÃO CELULAR E ALTERA O PADRÃO DE ORGANIZAÇÃO DE ELEMENTOS DO CITOESQUELETO NA LINHAGEM CHL- 1.....	55

6.4	TRANSCINAM EXIBE ATIVIDADE PRÓ-APOPTÓTICA FRENTE A LINHAGEM CHL-1 NA CONCENTRAÇÃO 5 μ M.....	59
7	CONCLUSÃO.....	63
8	REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pelo crescimento descontrolado de células que perdem a capacidade de responder aos sinais que regulam proliferação, diferenciação e morte celular. O comportamento alterado das células transformadas é decorrente de alterações genéticas e epigenéticas (SILVA *et al.*, 2005; HODIS *et al.*, 2012; KRAUTHAMMER *et al.*, 2012). O câncer constitui a segunda maior causa de morte da população mundial e está atrás somente das mortes ocasionadas por complicações cardiovasculares (WHO, 2020).

O melanoma cutâneo é um tumor maligno que se origina a partir de melanócitos, células responsáveis pela produção da melanina ou de células precursoras, que migram da crista neural durante o desenvolvimento (LEONARDI *et al.*, 2018). A sua ocorrência está intimamente associada com a cor da pele e da região geográfica considerada. Estudos epidemiológicos confirmam a hipótese de que a maioria dos casos se relaciona, pelo menos em parte, com a exposição excessiva à luz solar, sendo que a maior incidência é em caucasianos (LEITER; GARBE, 2008). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer no Brasil (INCA), a estimativa foi de 8.450 novos casos de melanoma em 2020 e 1.978 óbitos em homens e 819 em mulheres em 2019, e estima-se que o Brasil terá mais de 625 mil casos de câncer entre os anos 2020 a 2022.

As altas taxas de mortalidade estão relacionadas ao diagnóstico tardio, uma vez que lesões iniciais podem ser removidas por intervenção cirúrgica com altos índices de cura. Entretanto, esse tipo de abordagem não se aplica aos pacientes que apresentam a doença em fase avançada (LIMA *et al.*, 2018).

A dacarbazina e seu derivado, a temozolomida, foram amplamente utilizados como medicamentos em protocolos quimioterápicos para o tratamento de melanoma, apesar da pouca efetividade desses medicamentos na remissão dos tumores (PATEL *et al.*, 2011). Estudos clínicos realizados na ocasião mostravam que o aumento na sobrevida dos pacientes era de menos de um ano (7,7 meses para a temozolomida e 6,4 meses para a dacarbazina) (LI *et al.*, 2015).

O conhecimento sobre as características genéticas dos diferentes subtipos de melanoma, bem como das principais mutações envolvidas no processo de transformação maligna permitiram a identificação de alvos terapêuticos que levaram ao desenvolvimento de novos fármacos, os quais atuam como imunomodulares e inibidores de proteínas cinases. Apesar da promissora resposta observada inicialmente a esses fármacos, observou-se um modesto aumento na sobrevida dos pacientes devido a aquisição de resistência e progressão da doença

(SULAIMON; KITCHELL, 2003; NAZARIAN *et al.*, 2010; HODI *et al.*, 2010; RIZOS *et al.*, 2014; LIVINGSTONE *et al.*, 2014; SINGH; SALAMA, 2016; RICHMOND *et al.*, 2019).

Nesse contexto, é relevante a busca por novas substâncias que possam melhorar as propostas terapêuticas para o melanoma.

As substâncias naturais apresentam uma variedade de propriedades farmacológicas e tem sido amplamente estudadas com o objetivo de identificar moléculas com atividade antitumoral (NEWMAN; CREGG, 2016; NEWMAN; CREGG, 2020). O ácido cinâmico (AC) é um composto fenólico conhecido pelas suas propriedades biológicas (LIU *et al.*, 1995; EKMEKCIOGLU *et al.*, 1998; PONTIKI *et al.*, 2014). Tem sido demonstrado que o AC e seus derivados têm atividade antiproliferativa sobre células derivadas de diferentes tipos de câncer, incluindo melanoma (LIU *et al.*, 1995; NIERO *et al.*, 2013; RUWIZHI; ADERIBIGBE, 2020). Além disso, atividade antimetastática também tem sido descrita para essas substâncias (YEN *et al.*, 2011; TSAI *et al.*, 2013; LING *et al.*, 2015; SOLTANIAN *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, vários complexos metálicos têm sido obtidos com o objetivo de identificar novas estruturas químicas que possam contribuir no combate ao câncer, considerando que os compostos a base de platina foram importantes para o controle e combate de alguns tipos de câncer, apesar dos severos efeitos colaterais induzidos. Os complexos de rutênio têm sido considerados promissores agentes antitumorais, uma vez que mostram-se efetivos em inibir proliferação, migração e invasão de células tumorais em ensaios *in vitro*. Esses dados foram críticos para que dois complexos de rutênio (NAMI-A e KP1013/KP1339/NKP1399) fossem selecionados para serem avaliados em ensaios clínicos. NAMI-A apresentou atividade antimetastática em ensaios pré-clínicos, contudo efeitos significativos não foram observados nos ensaios clínicos (RADEMAKER-LAKHAI *et al.*, 2004; CIARIMBOLI *et al.*, 2015; ALESSIO; MESSORI, 2019), enquanto o NKP1399 continua sendo testado em regime de terapia combinada. Assim sendo, é necessário identificar novos protótipos que possam ser úteis para o desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos.

Estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que um complexo de rutênio (II) contendo ácido piperonílico inibiu a proliferação e induziu apoptose em células derivadas de adenocarcinoma pulmonar (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2017). Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos de três complexos de rutênio(II) contendo derivados do ácido cinâmico, sendo estes os ácidos 3,4-metileno-cinâmico, *trans*-4-trifluorometil-cinâmico e *trans*-4-cloro-cinâmico sobre diferentes linhagens celulares derivadas de melanoma que apresentam diferenças no perfil de mutações.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

O câncer constitui um problema de saúde pública mundial. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) divulgou em 2018 o documento GLOBOCAM 2018 apresentando os dados estatísticos referentes a 36 tipos de câncer em 185 países. A estimativa mundial, realizada em 2018 de acordo com este documento apontou incidência de 18,1 milhões de novos casos, com 9,6 milhões de morte por câncer mundialmente.

No Brasil, em 2020, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para novos casos foi de 309.750 em homens e 316.280 em mulheres, e ainda para o triênio 2020 – 2022 a estimativa é a incidência de mais de 625 mil novos casos; além disso, nos Estados Unidos a *American Cancer Society* estimou para 2020 cerca de 1,8 milhões de novos casos diagnosticados 606.520 mortes por câncer nos Estados Unidos.

O câncer é uma doença complexa, heterogênea e altamente dinâmica envolvendo múltiplos eventos moleculares, os quais representam um grande desafio para pesquisadores e clínicos (MOSES *et al.*, 2018). Hanahan e Weinberg (2000; 2011) elencaram algumas habilidades que são compartilhadas pelas células tumorais malignas que incluem alta capacidade de proliferação, resistência aos sinais de indução de morte e alta capacidade de angiogênese, invasão e metástase. Estes achados foram extremamente relevantes para a compreensão dos mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento e progressão do câncer e, conseqüentemente, para a identificação de novos alvos terapêuticos.

O comportamento alterado das células malignas está relacionado a alterações genéticas e epigenéticas. Vale ressaltar que mutações em proto-oncogenes que estão associados à eventos que estimulam a proliferação celular em resposta a estímulos fisiológicos e em genes supressores de tumor são comumente observadas em células cancerosas. Essas formas modificadas dos proto-oncogenes são denominadas oncogenes. Algumas mutações encontradas nessa classe de genes determinam a síntese de isoformas proteicas com hiperatividade, de modo que a proliferação celular seja estimulada e independente de estímulos externos (AMENDOLA; VIEIRA, 2005). Já os genes supressores de tumor estão associados à eventos que regulam negativamente a proliferação celular e, portanto, previnem a proliferação descontrolada. Assim sendo, as mutações que inativam estes genes contribuem diretamente para o desenvolvimento e progressão do tumor (SIMÃO *et al.*, 2002).

As células tumorais, em geral, apresentam alterações no perfil de expressão e ativação de moléculas que estimulam e/ou inibem o ciclo celular. Sendo assim, moléculas capazes de regular a progressão do ciclo celular são promissores agentes antitumorais (DURONIO; XIONG, 2013).

O processo normal de progressão do ciclo celular é altamente regulado por complexos proteicos que são ciclicamente ativados. A ativação de cinases dependentes de ciclina (CDK) representa um evento crítico para a progressão do ciclo celular e ocorre principalmente devido a sua interação com ciclinas específicas, cujos níveis de expressão variam ao longo do ciclo celular (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

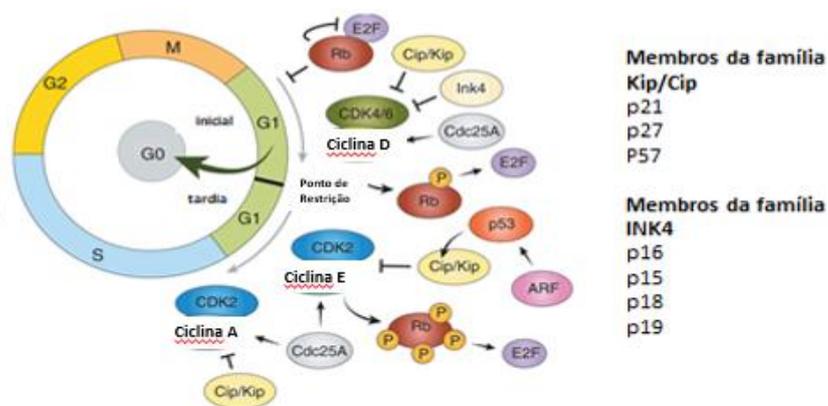
A ativação do complexo ciclina D-CDK4/6, em resposta a sinais mitogênicos por exemplo, é crítica para a progressão na fase G1 (MALUMBRES; BARBACID, 2001) e passagem pelo ponto de restrição. Complexos ciclina D-CDK4/6 ativados fosforilam diferentes alvos, incluindo a proteína Rb (pRb), um regulador negativo do ciclo celular. Dessa forma, a fosforilação inibitória de Rb contribui para a transição da fase G1 para S, via a expressão de ciclina E, que por sua vez ativa a CDK2. A formação do complexo ciclina E-CDK2 contribui para o estado hiperfosforilado de pRb levando a sua completa inativação (LUNDBERG; WEINBERG, 1998). Na ausência de estímulo para a progressão do ciclo celular a pRb é responsável pelo sequestro de fatores de transcrição da família E2F (E2F1, E2F2 e E2F3). A fosforilação de pRb, no ponto de restrição ou próximo a ele, leva a liberação desses fatores de transcrição, os quais estimulam a expressão de genes relacionados a progressão do ciclo celular (XIONG *et al.*, 1993) incluindo as ciclinas E e A, bem como a fosfatase Cdc25 que remove o fosfato inibitório dos complexos ciclina-Cdk. A ativação do complexo ciclina E-Cdk2 é crítica para transição G1-S, ao passo que a progressão pela fase S depende da ativação do complexo ciclina A-Cdk2, o qual mantém o estado hiperfosforilado da pRb (Figura 1). A progressão pela fase G2 é regulada pelos complexos ciclina A-Cdk1, enquanto a transição G2/M e os eventos iniciais da mitose são eventos regulados pelos complexos ciclina B-Cdk1 (ARELLANO; MORENO, 1997). A inativação dos complexos Cdk-ciclinas ocorre em pontos específicos do ciclo celular devido à proteólise das ciclinas, as quais são poliubiquitinizadas e encaminhadas à degradação nos proteossomos (VERMEULEN *et al.*, 2003).

É importante ressaltar que a atividade das CDKs pode ser inibida por proteínas específicas, CDIs (inibidores de cinases dependentes de ciclina), as quais se ligam as CDKs ou ao complexo ciclina-CDK regulando negativamente sua atividade. Essa atividade das CDKs é regulada por duas famílias de inibidores: as proteínas INK4 (INK4A, INK4B, INK4C e INK4D) e a família Cip e Kip composta por p21, p27 e p57 (MALUMBRES; BARBACID, 2005).

A proteína p21, membro da família Kip/Cip, é regulada em diferentes níveis (transcricional e pós-transcricional). A p53, é codificada pelo gene supressor de tumor *TP53*, representa o principal ativador transcricional de p21 (FIGURA 1). A proteína p53 está envolvida em uma série de eventos que incluem monitoramento na integridade genômica e bloqueio do ciclo celular em resposta a danos no DNA. Adicionalmente, p53 pode atuar na indução de apoptose frente a diferentes tipos de estresse celular incluindo aqueles associados à lesões irreparáveis no DNA (TAKAHASHI; RAYMAN; DYNLACHT, 2000).

A capacidade de p53 inibir o crescimento do tumor está associada à sua capacidade de regular a expressão de genes que modulam a dinâmica de progressão do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose. Contudo, mutações em p53 são frequentemente observados em tumores humanos *TP53* (VOGELSTEIN *et al.*, 2000).

Figura 1 - Aspectos gerais relacionados aos mecanismos regulatórios da progressão pela fase 1 e transição G1/S



Fonte: Strauss *et al.*, 2012 (modificada).

A resistência a apoptose constitui uma característica importante das células tumorais. A apoptose é um tipo de morte programada que desempenha um papel essencial no desenvolvimento do organismo e na homeostase dos tecidos. No entanto, células tumorais se mostram resistentes aos sinais indutores de apoptose devido a uma série de alterações que ocorre durante o processo de transformação maligna e inclui modulação do perfil de expressão e de ativação de genes críticos associados ao processo de sobrevivência celular (OKADA, MAK, 2004).

A apoptose pode ser desencadeada pela via extrínseca e intrínseca. A via extrínseca é iniciada pela interação de ligantes como receptores de morte na superfície celular (FAS, TAIL-R1/2 e TNFR). A ativação desses receptores induz uma cascata de eventos que leva a ativação da caspase-8 que, por vez, cliva e ativa diretamente as caspases executoras 7 e 3. Estas cisteínas

proteases clivam diferentes substratos e orquestram o processo de apoptose. Por outro lado, a via intrínseca é modulada por membros da família Bcl-2, a qual inclui proteínas com atividade pró-apoptótica (BAX, BAK, BID, PUMA, NOXA, BIM e BAD) e antiapoptótica (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 e Bcl-w). De forma que o balanço entre esses fatores está diretamente relacionado à ocorrência ou não de apoptose. Os membros pró-apoptóticos são classificados como efetores (BAX e BAK), ativadores (BID, PUMA, BIM) ou sensibilizadores (NOXA e BAD) (SINGH *et al.*, 2019). Em resposta a diferentes tipos de estresse celular, as proteínas pró-apoptóticas ativadoras e sensibilizadoras inibem a ação repressora do membros antiapoptóticos sobre as proteínas pró-apoptóticas efetoras. Além disso, as proteínas ativadoras se ligam de forma não covalente às proteínas efetoras induzindo modificações alostéricas que favorecem oligomerização dessas proteínas, as quais formam poros na membrana mitocondrial externa. A permeabilização da membrana mitocondrial permite a liberação de citocromo *c* e outras moléculas reguladoras de apoptose para o citoplasma. A presença de citocromo *c* no citoplasma é crítica para a formação do apoptossomo e ativação da caspase 9 que, por sua vez, ativa as capases executoras 3 e 7. Vale ressaltar que p53 regula positivamente a transcrição de BAX, PUMA e BID ou pode inibir Bcl-2, que antagoniza BAX, favorecendo a apoptose (KAUFMANN; EARNSHAW, 2000; MASOOD *et al.*, 2011; MOHAMMAD *et al.*, 2015).

A resistência das células tumorais está associada a alterações no perfil de expressão de proteínas da família Bcl-2. Estudos mostram que muitos tipos de câncer apresentam elevados níveis de proteínas anti-apoptóticas, o que favorece a sobrevivência das células tumorais (ANAI *et al.*, 2007; TUCKER *et al.*, 2008; AZMI; MOHAMMAD, 2009; AZMI *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013).

2.2 MELANOMA

A incidência mundial do melanoma tem aumentado mais que qualquer outro tipo de câncer (ALI *et al.*, 2013). Em 2012 ele ocupou a 15ª posição entre os cânceres mais comuns em todo o mundo. A sua incidência varia em decorrência da localização geográfica, tipo de pele e exposição solar. Além disso, diferentemente de outros tumores sólidos, o melanoma afeta jovens e adultos de meia idade (RASTRELLI *et al.*, 2014; FERLAY *et al.*, 2015).

O melanoma é uma das formas mais agressivas de câncer de pele, sendo responsável por 80% das mortes relacionadas ao câncer de pele devido ao seu alto potencial metastático (MILLER *et al.* 2016). Estudos demonstraram que o melanoma é proveniente de uma série de alterações genéticas e epigenéticas que favorecem o processo de invasão e progressão tumoral

(MORO; ZIGRINO, 2014; LEE *et al.*, 2014; CHIRIBOGA *et al.*, 2016; SANDRI *et al.*, 2016; FALZONE *et al.*, 2016; GUARNERI *et al.*, 2017). O melanoma afeta principalmente a população caucasiana de ambos os sexos e tem prognóstico muito ruim quando é diagnosticado em estágio avançado (BOMBELLI *et al.*, 2014; FERLAY *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2017). Sendo assim a identificação precoce do melanoma é crucial para o sucesso do tratamento. As diretrizes de prática clínica preconizadas pela *European Society for Medical Oncology* para melanoma cutâneo destacam a importância de um diagnóstico detalhado para o estabelecimento do estágio do tumor (DUMMER *et al.*, 2015).

De acordo com a análise histológica, 5 estágios podem ser observados entre a lesão benigna e o melanoma metastático: 1) nevus, uma lesão benigna caracterizada pelo aumento quantitativo de melanócitos; 2) nevus displásico, caracterizado por uma atípica organização das células; 3) melanoma em fase de crescimento radial, estágio em que os melanócitos proliferam intensamente na epiderme; 4) melanoma em fase de crescimento vertical, estágio em que as células penetram a lâmina basal e invadem a derme e o tecido subcutâneo; 5) melanoma metastático, caracterizado pelo espalhamento das células na pele e em outros órgãos. Contudo, sabe-se que o processo de transformação maligna pode ocorrer de forma não linear (HERLYN M., 1990)

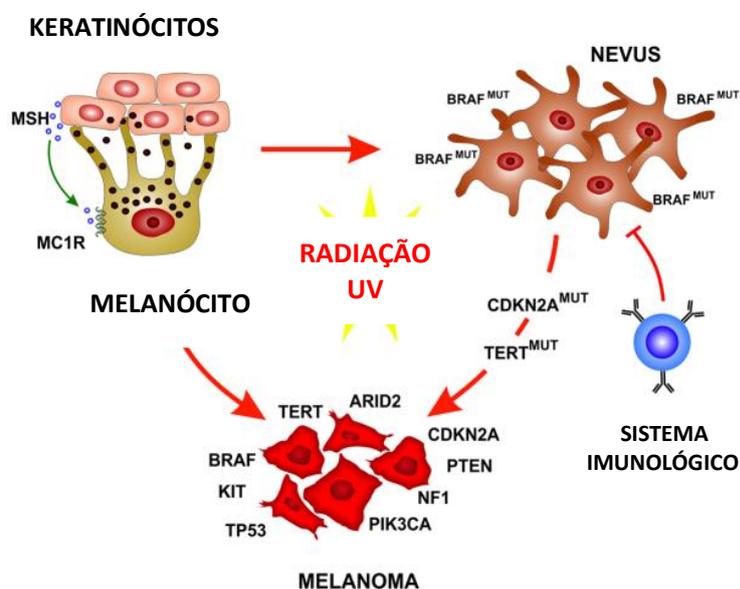
A radiação ultravioleta (UV) da luz solar é o principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento do melanoma (GILCHREST *et al.*, 1999; FALZONE *et al.*, 2016). Contudo, o número de nevus melanocíticos congênitos e adquiridos, a suscetibilidade genética e a história familiar são fatores associados ao desenvolvimento da doença (BAUER; GARBE, 2003; HAWKES *et al.*, 2016). Assim, o melanoma é uma doença heterogênea que envolve diferentes subtipos de tumor, os quais apresentam diferentes comportamentos e características clínicas dependendo dos fatores associados ao seu desenvolvimento (EMRI *et al.*, 2018).

Estudos mostram que o melanoma está associado a uma série de mutações somáticas em genes que regulam proliferação celular, sobrevivência e morte (VOGELSTEIN *et al.*, 2013; AKBANI *et al.*, 2015; HODIS *et al.*, 2012) incluindo *BRAF*, *NRAS*, *TP53*, *PTEN* e *CDKN2A* (HODIS *et al.*, 2012), os quais codificam RAF, RAS, p53, PTEN e p16/p14^{ARF}, respectivamente.

A figura 2 mostra um esquema que ilustra os eventos associados ao processo de transformação maligna de melanócitos. Conforme mostra o esquema, pode ocorrer uma série de alterações nos melanócitos que afetam genes críticos como *TP53*, *NF1* e *PTEN* e levam ao desenvolvimento do melanoma; ou a ocorrência de nevus, que abriga a mutação *BRAF*^{V600E} em aproximadamente 80% dos casos, indicando que essa mutação não é suficiente para induzir

tumorigênese. Entretanto, os raios ultravioleta podem induzir mutações adicionais (*TERT* e *CDKN2A*) que levam à transformação maligna de nevus (LEONARDI *et al.*, 2018).

Figura 2 - Transformação maligna do melanócito.



Fonte: LEONARDI *et al.*, 2018 (modificada).

Nota: MSH, hormônio estimulador de melanócitos; MC1R, receptor de melanocortina 1; BRAF, proto-oncogene B-Raf; CDKN2A, inibidor da quinase dependente de ciclina 2A; TERT, transcriptase reversa da telomerase; ARID2, domínio 2 de interação rico em AT; PTEN, homólogo de fosfatase e tensina; NF1, neurofibromina 1; TP53, proteína tumoral p53; KIT, KIT receptor proto-oncogene tirosina quinase.

Mutações somáticas em *BRAF* (58%), *NRAS* (28%) e *NF1* (14%) representam as mais relevantes para a hiperativação da via RAS/RAF/MEK/ERK, a qual está associada a eventos de proliferação, sobrevivência e migração (SULAIMON; KITCHIE, 2003. CURTIN *et al.*, 2005; GIEHL, 2005; HANDOLIAS *et al.*, 2010; HODIS *et al.*, 2012; JAKOB *et al.*, 2012; NISSAN *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016). Mutações em *BRAF* e *NRAS* estão associadas a um pior prognóstico (LONG *et al.*, 2011; JAKOB *et al.*, 2012; HAUSCHILD *et al.*, 2012) e, em geral, alterações em *BRAF* estão relacionadas a substituição da valina na posição 600 (RUBINSTEIN *et al.*, 2010).

Mutações em *NRAS* e *PTEN* em melanoma envolvem mais comumente a ativação da via PI3K/AKT. Mutações somáticas em *PTEN* são observadas em 14% dos casos, de acordo com dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (PAPPALARDO *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016).

Dois genes frequentemente estudados que desempenham um papel na proliferação desregulada de células de melanoma são os *CDKN2A* e *CDKN1A* que codificam proteínas

inibidoras de cinases dependentes de ciclinas. *CDKN1A* codifica p21, enquanto *CDKN2A* codifica por *splicing* alternativo p14^{ARF} e p16, sendo a p21 uma inibidora de CDKs, p14^{ARF} e p16 proteínas que atuam como supressores de tumor.

Embora mutações somáticas relacionadas ao gene *TP53* estejam presentes em 15% dos melanomas, a compreensão de mudanças moleculares associadas com o papel deste gene supressor de tumor é importante, pois mutações no gene *TP53* podem resultar na perda da função supressora de tumor da p53 ou na aquisição de funções oncogênicas e, portanto, são críticas no processo de progressão tumoral (LEVINE *et al.*, 1991; WADE *et al.*, 2010; GANNON; JONES, 2012). Além disso, aproximadamente 60% dos melanomas apresentam mutações somáticas em genes relacionados à via de p53, incluindo *CDKN2A* (44%), *TP53* (15%) ou *MDM2* (5%) (HODIS *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2016).

2.3 TRATAMENTOS E ALVOS TERAPÊUTICOS

Nos últimos 25 anos, intensas pesquisas tem sido realizada para compreender as mudanças genômicas associadas ao desenvolvimento e progressão do melanoma. O entendimento dos mecanismos moleculares relacionados ao processo de transformação foi importantíssimo para o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos para pacientes diagnosticados com este tipo de câncer.

Para que um tratamento seja eficaz clinicamente é importante que o estadiamento deste câncer seja feito. De acordo com a Sociedade Americana do Câncer (2019), o estadiamento do melanoma é a forma em que se define o estágio em que o câncer se encontra definindo sua gravidade e então escolhendo a melhor forma de tratamento. Dependente das características do tumor, como sua localização, estágio e perfil genético, as opções terapêuticas podem se resumir em ressecção cirúrgica, quimioterapia, radioterapia, terapia fotodinâmica, imunoterapia ou terapia direcionada (BATUS *et al.*, 2013; MILLER *et al.*, 2016). Gershenwald e colaboradores (2017) mostraram em estudos anteriores que este estadiamento não apenas informa a avaliação do prognóstico e a tomada de decisão clínica, mas também facilita a notificação centralizada do registro do câncer, a condução e a análise dos ensaios clínicos.

Como dito anteriormente, o melanoma continua sendo uma doença altamente letal, especialmente devido ao diagnóstico tardio, se a doença for detectada em fases iniciais, a intervenção cirúrgica e remoção da lesão levam a cura em 80-90% dos casos. Entretanto, esse tipo de abordagem não se aplica aos pacientes que apresentam a doença em fase avançada, cujos tratamentos são pouco eficientes (BERWICK; WIGGINS, 2006; DAVEY *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, alguns fármacos foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA para o tratamento de melanoma metastático (VAN ZEIJL *et al.*, 2017; AUSTIN *et al.*, 2017). Contudo, efeitos adversos e a resistência das células tumorais aos fármacos disponíveis representam limitações importantes na terapia do melanoma. Tem sido observado frequentemente toxicidade cutânea e problemas gastrointestinais em resposta aos medicamentos utilizados (WIDAKOWICH *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2015; AUSTIN *et al.*, 2017).

A dacarbazina, um agente alquilante, e seu análogo temozolomida são medicamentos utilizados na quimioterapia para o melanoma. Contudo as respostas clínicas não são satisfatórias, uma vez que o aumento na sobrevida gira em torno de 6 meses (MIDDLETON *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2010; CHAPMAN *et al.*, 2011).

A técnica de eletroquimioterapia também é utilizada no tratamento de melanoma e consiste na combinação de drogas citotóxicas, como a bleomicina e cisplatina, com pulsos elétricos de alta intensidade, o que facilita a entrada do medicamento nas células (MARTY *et al.*, 2006; MATTHIESSEN *et al.*, 2011; MIKLAVČIČ *et al.*, 2012; TESTORI *et al.*, 2017).

A terapia fotodinâmica pode ser empregada como método paliativo ao tratamento de melanoma metastático (AUSTIN *et al.*, 2017). Os elementos utilizados nessa terapia não são tóxicos, mas induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, por sua vez, desencadeiam danos irreversíveis às células tumorais e ativam respostas imunológicas e inflamatórias (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992; DOUGHERTY *et al.* 1998; BROWN *et al.*, 2004; YIN *et al.*, 2014; LONGO *et al.*, 2015). Embora esta técnica possa ser usada, quando utilizada de forma isolada tem baixa eficácia em melanomas (HUANG *et al.*, 2013).

INF- α , Peginterferon α -2b (Peg-INF) e interleucina -1 (IL-2) podem ser utilizados em terapia adjuvante no tratamento de melanoma. IFN- α tem efeito antitumoral atuando como imunomodulador. Dependendo da dose, pode inibir a proliferação de células e induzir apoptose (RAFIQUE *et al.*, 2015; SANLORENZO *et al.*, 2017). Peg-INF e IL-2 tem se mostrado pouco eficazes no tratamento de melanoma (KRIEG *et al.*, 2010; EFFERMONT *et al.* 2018).

A imunoterapia e a terapias alvo-dirigidas representam uma perspectiva promissora para o tratamento do melanoma. A imunoterapia é um tipo de tratamento que utiliza imunomoduladores que potencializam as respostas imunológicas. As terapias alvo-dirigidas atuam em alvos específicos que, em geral, são proteínas cinases. Embora ambas as terapias sejam promissoras, o aumento na sobrevida é pouco expressivo (HODI *et al.*, 2010; SULAIMON; KITCHELL, 2013; SINGH; SALAMA, 2016).

O anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 (ipilimumab) suprime a regulação negativa de CTLA4 sobre linfócitos e leva a tolerância imunológica. Dessa forma, os anticorpos anti-CTLA4 induzem ativação linfocitária (BRUNET *et al.*, 1987; WATERHOUSE *et al.*, 1995; HANSON *et al.*, 2014; RIBAS *et al.*, 2009). A imunoterapia empregando o ipilimumab apresentou respostas satisfatórias em vários ensaios clínicos (CHAPMAN *et al.*, 2011; HERSH *et al.*, 2011; KAPLAN *et al.*, 2013) como o aumento da sobrevida, em média, de 11 meses. A combinação, por exemplo, do ipilimumab com dacarbazina apresentou resultados melhores em relação ao uso desses fármacos em regime de monoterapia, principalmente no que diz respeito a redução de efeitos colaterais (CHAPMAN *et al.*, 2011).

O nivolumabe é um anticorpo monoclonal anti-PD-1 de alta afinidade que inibe a ligação entre o receptor PD-1 e seus ligantes, o uso deste medicamento foi aprovado pelo FDA e vem sendo utilizado em melanomas já em fase metastática (RAEDLER L.A., 2015). O bloqueio da interação entre PD-1 e seus ligantes medeia as respostas imunológicas que inibem a progressão tumoral. O nivolumabe parece ser mais eficiente do que ipilimumabe quando usado em regime de monoterapia. A combinação dos dois fármacos (nivolumabe e ipilimumabe) aumentou a sobrevida média para 11,5 meses, mostrando uma resposta superior ao observado quando esses fármacos foram administrados de forma isolada (SPECENIER P., 2016; FRANKLIN *et al.*, 2017).

A resistência primária e adquirida à imunoterapia é comum e pode ser devida à falta de reconhecimento pelas células T. Além disso, pode envolver vários componentes do microambiente tumoral incluindo células T reguladoras [Tregs] e macrófagos (M2) (SHARMA *et al.*, 2017; GIDE *et al.*, 2018).

Terapias que tem como alvo membros de vias oncogênicas podem contribuir para superar a resistência aos inibidores de *BRAF*. *BRAF* é uma serina-treonina cinase chave da via de sinalização da proteína MAPK e 50% dos melanomas cutâneos abrigam mutações no gene que codifica RAF. Mutações no gene *BRAF* estão associadas à ativação constitutiva da via de sinalização MAPK e ao aumento da proliferação (BROSE *et al.*, 2002; BALLANTYNE; GARNOCK 2013; BATUS *et al.*, 2013). MEK é um alvo de RAF e, em contraste com os inibidores de RAF, os inibidores de MEK mostraram atividade em melanomas que carregam mutação em *NRAS*. O bloqueio de MEK1/2 resulta na inibição da sinalização celular mediada por fatores de crescimento e reduzem a proliferação de células tumorais (FLAHERTY *et al.*, 2012). O uso de inibidores de RAF tem sido promissor quando combinado com inibidor de MEK. O uso concomitante de inibidores de RAF e MEK inibem a proliferação e minimizam a resistência (LONG; MENZIES, 2014). Entretanto, o benefício clínico dessas terapias-alvos

dirigidas é limitado, devido ao rápido desenvolvimento de múltiplos mecanismos de resistência (RIZOS *et al.*, 2014). As terapias combinadas parecem ser uma boa estratégia a fim de superar esses mecanismos de resistência (LIVINGSTONE *et al.*, 2014).

Embora o tratamento do melanoma metastático tenha evoluído com uso de imunoterapia e inibidores de RAF e MEK, a resistência a essas modalidades de tratamento continua sendo um problema clínico substancial (RICHMOND *et al.*, 2019).

2.4 POTENCIAL ANTITUMORAL DO ÁCIDO CINÂMICO E SEUS DERIVADOS

Na busca por novos fármacos que possam melhorar as propostas terapêuticas para o tratamento do câncer, os produtos naturais representam fontes importantes na identificação de novos compostos (CRAGG; NEWMAN, 2020). Compostos fenólicos vêm sendo estudados há muito tempo quanto suas propriedades quimiopreventivas e quimioterapêuticas (BOLDEN *et al.*, 2006; THAKUR *et al.*, 2012; EDIRIWEERA *et al.*, 2016). Estudo realizado por Prasad e Katiyar (2015) mostrou que os compostos fenólicos são efetivos em reduzir a viabilidade e a capacidade de formar colônias em linhagens de células derivadas de melanoma. Os autores atribuem os efeitos observados à habilidade dos compostos fenólicos testados em reduzir a atividade de histona desacetilase (HDAC) e aumentar a atividade de histona aciltransferase (HAT). Além disso, os compostos foram efetivos em induzir danos no DNA e alterar o perfil de expressão de regulares críticos do ciclo celular da transição G1/S.

O ácido cinâmico (AC) é um membro da família de compostos fenólicos que possui diferentes isoformas na natureza que podem ser encontrados no café, maçã, frutas cítricas, óleos vegetais, própolis e vinho (LIU *et al.*, 1995; EKMEKCIOGLU C. *et al.*, 1998). Este ácido consiste em um ácido aromático encontrado em várias plantas superiores, podem ser encontrados normalmente na natureza em sua forma geométrica *cis* ou *trans* e pertence a uma classe de hormônios vegetais que regulam o crescimento e a diferenciação celular (SHARMA *et al.*, 2011).

O AC tem sido amplamente investigado devido as suas propriedades biológicas que incluem as atividades antiproliferativa, antioxidante, antiangiogênica e antitumorigênica (PONTIKI *et al.*, 2014; SU *et al.*, 2015). Como exemplo, Yen e colaboradores (2011) mostraram a atividade antimigratória das formas *cis* e *trans* desta substância em adenocarcinoma de pulmão humano. Além disso, outros derivados do AC também foram capazes de inibir o comportamento invasivo destas mesmas células (TSAI *et al.*, 2013).

Estudos mostram efeitos antitumorais promissores do ácido cínâmico e seus derivados em diferentes tipos de câncer (LOZYNSKYI *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2016; RUWIZHI; ADERIBIGBE, 2020). E ainda, estudos relacionam a atividade antiproliferativa do AC à sua capacidade de inibir a via de sinalização MAPK (YEN *et al.*, 2011; TSAI *et al.*, 2013). Vale destacar que Niero e colaboradores (2013) mostraram que o ácido cinâmico foi efetivo em induzir apoptose e alterar o padrão de distribuição do citoesqueleto em células derivadas de melanoma.

2.5 COMPLEXOS DE RUTÊNIO

O desenvolvimento de novos alvos terapêuticos no tratamento de câncer tem sido uma busca constante. Em 1984, Musgrove e colaboradores relataram que devido suas características o uso clínico dos complexos de rutênio como agentes antitumorais era promissor. Sendo assim, alguns estudos foram realizados. Em 2006, Hartinger e colaboradores descreveram as vantagens da utilização do rutênio no desenvolvimento de novos fármacos. Mais tarde essas características também foram relatadas por Bergamo e colaboradores em 2012, dentre essas características estão: a possibilidade destes complexos apresentarem vários estágios de oxidação, podendo favorecer uma ação por meio do mecanismo redox, versatilidade na troca de ligantes, por apresentarem em sua estrutura uma geometria de coordenação octaédrica que se caracteriza por possuir maior número de sítios de coordenação e ainda por possuírem capacidade de mimetizar o ferro na ligação a biomoléculas, tais como a transferrina. Além disso, estudos mostraram que estes complexos têm sido considerados promissores agentes antitumorais, pois apresentaram boa atividade em alguns tipos de células tumorais e foram bem tolerados em ensaios *in vivo* (PÉREZ-SACAU *et al.*, 2007; da SILVA *et al.*, 2010; ANG *et al.*, 2011; ORAMAS-ROYO *et al.*, 2013; MARI *et al.*, 2014).

A coordenação octaédrica dos compostos de rutênio aumenta a possibilidade de interação com alvos específicos. Dessa forma, estes complexos têm sido mais seletivos em relação aos compostos de platina por exemplo, fato que minimiza os efeitos colaterais em protocolos clínicos (ALLARDICE; DYSON, 2001; DU *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2014). Estudos mostram que, além de interagirem diretamente com o DNA, os complexos de rutênio são capazes de interromper a atividade das topoisomerasas I e II e desta forma, impedem a transcrição e replicação celular (DU *et al.*, 2011), tais vantagens permitiram o desenvolvimento

de estruturas moleculares que estão sob testes clínicos (HARTINGER *et al.*, 2006; ANG, *et al.*, 2011; BERGAMO, *et al.*, 2012; MONDELI, *et al.*, 2014).

Em 1989, Keppler *et al.* desenvolveram um série de complexos de rutênio (III), um dos complexos dessa série, KP1019 (*trans*-[RuCl₄(Ind)₂][IndH] Ind = indazol), mostrou-se ativo contra linhagens celulares de câncer colorretal (FRÜHAUF; ZELLER, 1991; KAPTIZA *et al.*, 2005) e em animais com carcinoma de cólon resistente à quimioterapia (HARTINGER *et al.*, 2006).

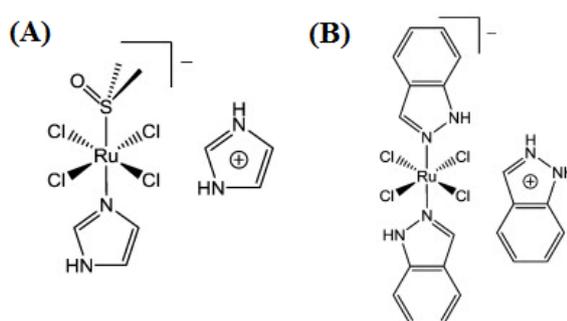
Bergamo e colaboradores (2012) demonstraram possíveis mecanismos moleculares responsáveis pela atividade antitumoral de complexos de rutênio. Os complexos apresentaram mecanismos de ação alternativos, espectros variados de atividade contra diferentes tipos de câncer, baixa citotoxicidade e aparentaram ser menos sensíveis aos mecanismos de resistência. Em especial os complexos Rapta-T e NAMI-a que mostraram ser mais efetivos como agentes anti-metastáticos.

Mondelli *et al.* (2014) observaram que compostos de rutênio foram seletivos contra a linhagem tumoral de mama MDA-MB-231. Han *et al.* (2015), após síntese e caracterização de novos complexos de rutênio, verificaram que as moléculas intercalam entre os pares de bases de DNA. Os complexos apresentaram maior citotoxicidade quando comparados à cisplatina para as linhagens HeLa e MCF-7. O tratamento com os complexos também induziu parada do ciclo celular nas fases G₀/G₁ e apoptose. Na linhagem BEL-7402 (carcinoma hepatocelular humano) o tratamento causou aumento dos níveis de radicais livres e diminuição do potencial de membrana mitocondrial; tendo sido observado redução dos níveis de expressão de *Bcl-2* e aumento de *Bax*, fenômenos que favorecem indução de apoptose.

Apesar de nenhum complexo de rutênio ter sido aprovado, ainda, para uso clínico como medicamento anticancerígeno, dois complexos de rutênio passaram por ensaios clínicos (NAMI-A e KP1019) (Figura 3A e B, respectivamente). De acordo com os estudos o NAMI-A tinha promissora atividade como agente antimetastático, contudo os resultados obtidos mostraram pouca eficiência desse composto sobre diferentes tipos de tumores sólidos (RADEMAKER-LAKHAI *et al.*, 2004). Ao contrário, KP1019 foi submetido a estudos clínicos de fase I em grupo pequeno de pacientes com câncer em estágio avançado e, na maioria deles, a doença ficou estabilizada por aproximadamente 9 semanas, contudo KP1019 apresentou problemas de solubilidade o que limitou o estabelecimento da dose máxima tolerada (HARTINGER *et al.*, 2006; LENTZ *et al.* 2009). Na sequência, o estudo foi retomado com um grupo maior de pacientes utilizando um derivado mais solúvel, KP1339/IT-139 e os dados mostraram estabilidade da doença por um período maior com mínimos efeitos colaterais

(BURRIS *et al.*, 2016). Apesar dos dados promissores observados principalmente para KP1339/IT-139 este complexo ainda está sob investigações e testes farmacológicos, pois foi considerado instável por sofrer transformações químicas facilmente, além disso, seu mecanismo de ação é pouco conhecido. As pesquisas realizadas no estudo destes fármacos favoreceram e estimularam a busca por novos complexos de rutênio com ação anticâncer (ALESSIO, MESSORI, 2019).

Figura 3 - Estrutura química de complexos de rutênio (III) em fase clínica.



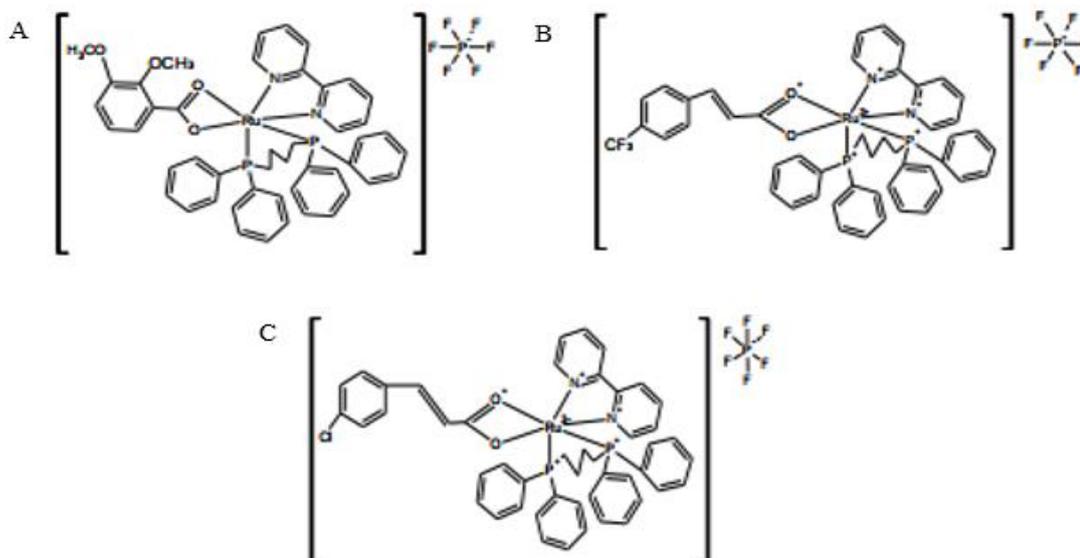
Fonte: BERGAMO *et al.*, 2012 (modificado)

Legenda: A) *trans*-[RuCl₄(Im)(DMSO)][ImH] Im = imidazol – NAMI-A.

B) (*trans*-[RuCl₄(Ind)₂][IndH] Ind = indazol) – KP1019.

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que um complexo de rutênio (II) contendo ácido piperonílico foi efetivo em inibir a proliferação de células derivadas de adenocarcinoma pulmonar (A549). Foi demonstrado que a atividade antiproliferativa do composto avaliado foi devido a sua capacidade de inibir ERK e reduzir os níveis de expressão de ciclina D. Esses resultados motivaram a obtenção de novos protótipos. Assim sendo, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos de três complexos de rutênio contendo derivados do ácido cinâmico (3,4-metileno-cinâmico, *trans*-4-trifluorometil cinâmico e *trans*-4-clorocinâmico (Figura 4) sobre diferentes linhagens celulares derivadas de melanoma, as quais apresentam diferenças no perfil de mutações.

Figura 4 - Estruturas químicas propostas para os complexos de rutênio(II)



Fonte: Da autora.

Legenda: A) [Ru(3,4-metileno-cinâmico)(dppb)(bipy)]PF₆ (CINAM)

B) [Ru(*trans*-4-trifluorometil-cinâmico)(dppb)(bipy)]PF₆ (TRANSCINAM).

C) [Ru(*trans*-4-cloro-cinâmico)(dppb)(bipy)]PF₆ (CLOROCINAM).

3 JUSTIFICATIVA

O melanoma maligno é uma doença caracterizada por um comportamento biológico altamente agressivo. Apesar das melhorias nas propostas terapêuticas, essa doença apresenta alta taxa de mortalidade que está associada à resistência aos tratamentos. Muitos estudos foram realizados para avaliar os mecanismos relacionados ao comportamento das células derivadas de melanoma a fim de identificar novos protótipos candidatos a fármacos. No entanto, o melanoma continua sendo um tipo letal de câncer principalmente quando diagnosticado em estágio avançado (LEONARDI *et al.*, 2018), de modo que novos estudos devem ser conduzidos para identificar novos protótipos que possam contribuir no combate ao melanoma.

Os complexos de rutênio têm sido investigados quanto suas propriedades antitumorais e estudos mostraram que alguns complexos são efetivos em inibir a proliferação de células tumorais com efeitos mínimos em células saudáveis. Além disso, os complexos de rutênio têm mecanismos de ação que diferem daqueles observados aos compostos a base de platina (CHELOPO *et al.*, 2013).

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que complexos metálicos a base de rutênio, contendo ácido piperonílico reduziu significativamente a proliferação de células derivadas de adenocarcinoma pulmonar, esses resultados motivaram a obtenção de novos protótipos, cujas propriedades farmacológicas serão avaliadas sobre células de melanoma.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de complexos de rutênio(II), contendo derivados do ácido cinâmico (3,4-metileno cinâmico, trans-4-trifluorometil-cinâmico e trans-4-cloro cinâmico) frente as linhagens celulares derivadas de melanoma metastático HT-144, SK-MEL-147, WM1366 e CHL-1.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analisar o potencial citotóxico dos diferentes complexos de rutênio sobre células derivadas de melanoma com diferentes características genéticas;
- 2) Selecionar o complexo mais promissor baseado em sua seletividade para célula tumoral versus célula normal;
- 3) Avaliar interferência na progressão do ciclo celular e possível modulação em reguladores críticos do ciclo celular;
- 4) Investigar se o potencial citotóxico está relacionado à atividade pró-apoptótica do complexo;
- 5) Avaliar possível influência no comportamento migratório na linhagem mais sensível

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 COMPLEXOS METÁLICOS

Os complexos metálicos (Figura 4) foram sintetizados em colaboração com o prof. Dr. Antonio Carlos Doriguetto e a Dra. Marília I. F. Barbosa do Instituto de química da UNIFAL. Os complexos apresentam a mesma estrutura com exceção dos ligantes. A figura 4 mostra a estrutura do complexo contendo como ligante o ácido 3,4 metileno-cinâmico (A), trans-4-trifluorometil-cinâmico (B) e trans-4-cloro-cinâmico (C) (FIGURA 4).

5.2 LINHAGENS CELULARES, CONDIÇÕES DE CULTIVO E ESQUEMA DE TRATAMENTO

No presente estudo foram utilizadas as seguintes linhagens derivadas de melanoma: HT-144, CHL-1, SK-MEL-147 (derivada de melanoma humano metastático) e WM 1366, e linhagens normais: CCD-1029Sk (fibroblastos derivados de pele normal), NGM (derivada de *nevus*) e FB1 (fibroblasto de cultura primária de tecido gengival).

As linhagens foram cultivadas em DMEM (Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, SP, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO₂) e subculturas foram feitas regularmente a cada 2 ou 3 dias.

As culturas primárias (FB1) foram obtidas a partir de tecido gengival. Fragmentos de 1,5 x 1,5 mm, foram transferidos para placas de Petri de 35 mm com meio de cultura DMEM/F12 e adição de 10% de soro fetal bovino, 50 unidades/50 µg/ml de penicilina/estreptomicina e 2,5 µg/ml de anfotericina B. Após o crescimento de células com aspecto morfológico característico de fibroblastos, os fragmentos de tecido gengival foram removidos e as células foram subcultivadas em uma garrafa T25. Protocolo de aprovação no comitê de ética: 69453817.9.0000.5142).

Os complexos de rutênio foram solubilizados em DMSO, sendo que a concentração da solução-estoque foi de 20mM. As diluições foram realizadas em meio de cultura imediatamente antes do uso. A quantidade de DMSO (v/v) não foi superior a 0,1%.

As células foram semeadas em placas com diferentes áreas de crescimento, dependendo da abordagem experimental. Após adesão (24 h), as células foram tratadas com os diferentes

complexos de rutênio (II) por 12, 24 ou 48 horas em diferentes concentrações, cuja estrutura química pode ser observada na figura 4.

5.3 VIABILIDADE CELULAR – ENSAIO COLORIMÉTRICO DE MTS

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células por poço. A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimético, MTS (3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio), usando o *Kit CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega Corporation, Madison, WI, USA), descrito por Cori *et al* (1991). Este ensaio é baseado na conversão do sal tetrazólio em formazano, o qual absorve luz a 490 nanômetros (nm). A taxa de absorbância é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas. Os valores de absorbância obtidos nas amostras tratadas foram comparados com os valores de absorbância das amostras controles. Os valores de IC_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento) foram determinados a partir de curvas de regressão não linear usando o programa GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

5.4 ASPECTO MORFOLÓGICO DA CULTURA POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE

O aspecto morfológico das culturas de CHL-1 após tratamento com TRANSCINAM foi avaliado com o auxílio de imagens obtidas por microscopia de contraste de fase. As células foram semeadas em placas de 35 mm com densidade de 1×10^5 células/placa. Após adesão, as células foram tratadas com TRANSCINAM nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5,0 μM . Após 24 horas de tratamento as imagens das culturas foram obtidas através de um sistema de captura de imagens acoplado ao microscópio invertido de contraste de fase

5.5 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

As células foram semeadas em placas de Petri com 35 mm de diâmetro a uma densidade de 2×10^5 células por placa. Após tratamento com TRASCINAM nas concentrações 1,25, 2,5 e 5,0 μM por 24 horas, as células foram coletadas por digestão enzimática (Trypsin-EDTA solution/Sigma Aldrich LTDA, Brasil) e transferidas para tubos Falcon. O precipitado de células foi obtido por centrifugação (5 minutos a 1500 rpm). As amostras foram fixadas com

etanol gelado (75% em PBSA-Salina fosfato tamponada) por 24 horas. Após nova centrifugação, as células foram coradas por 1 hora em uma solução contendo PBSA, RNase (3 mg/mL) e Iodeto de Propídio (100 µg/mL). A análise foi realizada em citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) usando o software GuavaSoft 2.7.

5.6 ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGENICA

Células foram semeadas em baixa densidade (500 células por placa de 35mm de diâmetro), de forma que 24h após o plaqueamento as culturas exibam células aderidas, porém isoladas. Após adesão as culturas foram tratadas com TRANSCINAM nas concentrações de 1,25 e 2,5 µM, por 24 horas. Decorrido o tempo de tratamento, o meio foi substituído por meio fresco e as placas foram mantidos em estufa a 37°C, contendo 5% de CO₂, por 12 dias. Após o período de incubação as células foram lavadas com PBSA, fixadas por 30 minutos com Metanol P.A (Sigma Aldrich LTDA, Brasil). Após secagem, as amostras foram coradas com solução Giemsa 1:4 (Sigma Aldrich LTDA, Brasil), por 5 minutos, depois lavadas com água destilada. A contagem do número de colônias foi realizada com auxílio de estereomicroscópio (aumento 20x). Foram consideradas na análise as colônias que tinham, pelo menos, 50 células. Os dados apresentados representam a média ± desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes.

5.7 ANÁLISE DO CITOESQUELETO

As células foram cultivadas sobre lamínulas em placas de Petri com 35 mm de diâmetro a uma densidade de 1×10^5 células/placa. Ao término do tratamento, as amostras foram fixadas com formaldeído 3,7% por 15 minutos e incubadas com Triton X-100 (0,5%) por 10 minutos. Em seguida, o anticorpo anti- α -tubulina (1:50, Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) foi adicionado às amostras, as quais ficaram em câmara úmida a 4° C por 12 horas. Após sucessivas lavagens em PBS, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo, 1:100, Sigma) conjugado a fluoresceína por 2 horas. Para análise de F-Actina, as amostras foram coradas com faloidina conjugada a TRITC (Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos). Os núcleos foram contracorados com DAPI (4',6-Diamidino-2'-Phenilindol diidrocloreto, Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos). As lâminas foram montadas com *anti-fading* (Vecta Shield) e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon), usando aumento 400x. Imagens foram obtidas usando o programa NisElements.

5.8 INCORPORAÇÃO DE BrdU

As células foram cultivadas sobre lamínulas em placas de Petri com 35 mm de diâmetro a uma densidade de 1×10^5 células/placa. Duas horas antes do término do tratamento, o meio de cultura foi substituído por meio fresco suplementado com BrdU (EMD Biociences) $97 \mu\text{M}$. Após esse período, as amostras foram lavadas em PBSA e fixadas em formaldeído 3,7% por 15 minutos. A permeabilização das membranas foi realizada com Triton X-100 (Sigma Aldrich LTDA, Brasil) (0.5%) 10 minutos. Na sequência, as amostras foram tratadas com HCl (1.5 M) por 30 minutos para hidrólise do DNA e sucessivas lavagens em PBS foram realizadas. O anti-BrdU (1:100 Bu20a Mouse mAb/ Cell Signaling Technology) foi adicionado às amostras, as quais foram acondicionadas em câmara úmida à 4°C por 12h. Em seguida, as amostras foram incubadas com anti-IgG de camundongo (1:100 Sigma Aldrich LTDA, Brasil) por 2 horas a temperatura ambiente. Os núcleos foram corados com DAPI (Molecular Probes-LifeTechnologies) por 30 minutos e as preparações citológicas foram montadas com anti-fading (Vecta-Shield, Vector-Lab).

As amostras foram analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Scope.A1, NY, USA) e foram contadas 1000 células por lâmina usando aumento 400x. Os experimentos foram feitos em duplicata e os resultados apresentados representam a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes.

5.9 ENSAIO DE ANEXINA V/7-AAD

As células foram semeadas em placas de Petri com 35 mm de diâmetro a uma densidade de 2×10^5 células por placa. As amostras foram tratadas com TRANSCINAM 2,5 e $5,0 \mu\text{M}$. O ensaio foi realizado utilizando o *Kit Guava Nexin Reagent* (Merck/millipore) de acordo com instruções do fabricante. Após o tempo de tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática (Trypsin-EDTA solution/Sigma Aldrich LTDA, Brasil), centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a 4°C , lavadas em PBSA gelado e homogeneizadas em solução contendo anexina conjugada a FITC e 7-AAD. As amostras foram incubadas por 20 minutos, protegidas da luz em temperatura ambiente e a análise foi feita no citômetro fluxo (Guava Mini Easy Cyte, 8HT) GuavaSoft 27.

5.10 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDA

As células foram semeadas em placa de 6 poços a uma densidade de 5×10^5 células/placa e mantidas a DMEM suplementado com 10% de SFB por 24h. Em seguida o meio de cultura foi substituído por DMEM suplementado a 1% de SFB e as feridas foram realizadas na monocamada, com o auxílio de uma ponteira de 200 μ L, 24 horas depois. As culturas foram lavadas e os tratamentos foram realizados. Imagens foram capturadas usando sistema acoplado no microscópio de contraste de fase (aumento de 40x). Os pontos a serem registrados foram determinados fazendo uma marca na superfície da placa dos limites superior e inferior campo de visão. Dessa forma, imagens foram obtidas a partir dos mesmos campos nos tempos 0 e 24 h. A análise foi realizada usando o software de domínio público ImageJ (NIH). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes.

5.11 RT-QPCR

As células foram semeadas em placas de Petri com 35 mm de diâmetro a uma densidade de 2×10^5 células por placa. As células foram coletadas por digestão enzimática e após centrifugação (1000 rpm por 5 minutos a 4°C), o precipitado de células foi ressuscitado em 350 μ L de tampão de lise do *kit RNeasy Mini*[®] (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA).

As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento da extração do RNA. O RNA total de cada grupo experimental (n=4) foi extraído utilizando o *kit RNeasy Mini*[®] (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA) de acordo com as instruções do fabricante e, então, eluído em 30 μ L de água livre de RNase. A concentração de RNA total das amostras foi mensurada através do espectrofotômetro NanoDrop[®] ND 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Em seguida 1 μ g de RNA total foi incubado com DNase (1U; Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) para eliminação de possível contaminação com DNA genômico e então submetido à reação de transcrição reversa (RT) utilizando *Randon primers* e *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*[®] (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Os reagentes foram incubados a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e então, 85°C por 5 min para a inativação da enzima.

A abundância de mRNA dos genes alvos (*CCND1*, *CCNE2*, *BAX*, *BCL-2*) foi investigada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, utilizando o termociclador ABI Prism7500[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o protocolo de amplificação do *kit Power Syber Green Master Mix*[®] (Applied Biosystems).

Os valores de expressão dos genes alvos foram normalizados pela expressão do gene constitutivo *β -actina*. A abundância relativa de RNAm de cada gene foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência e utilizando uma amostra controle como calibradora (Pfaffl, 2001). Os valores médios de eficiência para cada gene foram calculados através do perfil de amplificação de cada amostra utilizando-se o programa LinRegPCR (RAMAKERS *et al.*, 2003).

Tabela 1 - Sequência de bases dos *primers* utilizados na PCR em tempo real.

GENE	SEQUÊNCIA DE PRIMER
<i>CCND1</i> (Ciclina D1)	F:5'- GGGTTGTGCTACAGATGATAGAG-3' R:5'-AGACGCCTCCTTTGTGTTAAT-3'
<i>CDKN1A</i> (p21)	F:5'- CCATAGCCTCTACTGCCACCATC -3' R: 5'- GTCCAGCGACCTTCCTCATCCA – 3'
<i>CCNE</i> (Ciclina E2)	F:5'-GGCTATGCTGGAGGAAGTAAAT-3' R:5'- GCTCTTCGGTGGTGCATAAT-3'
<i>BCL-2</i>	F:5'-CAGAAGTCTGGGAATCGATCTG-3' R:5'-AATCTTCAGCACTCTCCAGTTATAG-3'
<i>BAX</i>	F:5'-TTCCTTACGTGTCTGATCAATCC-3' R:5'-GGGCAGAAGGCACTAATCAA-3'
<i>ACTB</i> (β -actina)	F:5'- AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3' R:5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG – 3'

Fonte: Da autora.

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram apresentados como a média \pm desvio padrão de, pelo menos, 3 experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram determinadas de acordo com test *t* ou análise de variância one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunnet usando o software GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO DERIVADOS DE ÁCIDO CINÂMICO SÃO EFETIVOS EM REDUZIR A VIABILIDADE DE CÉLULAS DERIVADAS DE MELANOMA

A atividade citotóxica de complexos de rutênio(II), contendo derivados do ácido cinâmico, foi avaliada sobre linhagens derivadas de melanoma que apresentam diferentes perfis de mutação. A linhagem HT-144 tem mutação no gene *BRAF* (V600E) (YANG *et al.*, 2014), enquanto a linhagem SK-MEL-147 carrega mutação em *NRAS* (Q61R) (GORDEN *et al.*, 2003; KAUFMANN *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2011). A linhagem WM1366 tem mutações em *NRAS* (Q61L) e *TP53* (E258K) (YANG *et al.*, 2014), ao passo que a linhagem CHL-1 tem mutações em *TP53* (H193R) e *CDKN2A* (W110stop). As mutações descritas em *BRAF* (HT-144) e *NRAS* (SK-MEL-147 e WM1366) conferem hiperatividade aos seus produtos gênicos; enquanto as mutações relatadas para *TP53*, nas linhagens WM1366 e CHL-1, estão associadas à perda parcial ou total de p53. Devido a presença da mutação truncada em *CDKN2A*, na linhagem CHL-1, seus produtos gênicos (p16^{INK4} e p14^{ARF}) não são formados (YANG *et al.*, 2014). As linhagens celulares usadas neste estudo são representativas de diferentes subtipos de melanoma e tem sido amplamente usadas como modelo de estudo (KAUFMANN *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014).

Os complexos [Ru(3,4-metileno-cinâmico)(dppb)(bipy)]_{PF6}, [Ru(*trans*-4-trifluorometil-cinâmico)(dppb)(bipy)]_{PF6} e [Ru(*trans*-4-cloro-cinâmico)(dppb)(bipy)]_{PF6} serão referenciados ao longo do texto como CINAN, TRANSCINAM e CLOROCINAN, respectivamente, para simplificar a discussão. Vale ressaltar que a diferença estrutural entre os complexos de rutênio se deve a presença de diferentes ligantes. De acordo com os resultados, os complexos reduziram a viabilidade nas linhagens celulares testadas (Figuras 5 – 8). O efeito foi dependente da concentração utilizada e variou entre as linhagens. De modo interessante, TRANSCINAM reduziu o percentual de células viáveis em culturas de HT-144 e CHL-1 quando concentrações inferiores a 5 µM foram usadas (Figuras 5 e 7). Evento similar ocorreu em culturas de CHL-1 tratadas com CINAM (Figura 4). Os valores IC₅₀ foram determinados (Tabela 2) e ficaram entre 2,83 e 13,83 µM (Tabela 2). Os menores valores de IC₅₀ encontrados foram para o TRANSCINAM nas linhagens HT-144 (3,25 µM ± 0,89) e CHL-1 (2,95 µM ± 1,12), e CINAM na linhagem celular CHL-1 (2,83 µM ± 1,17) (Tabela 2).

Estudos mostram que o AC e seus derivados são capazes de inibir a proliferação e/ou induzir morte em células tumorais, contudo a potência em reduzir a viabilidade dos complexos CINAM, TRANSCINAM e CLOROCINAM foi drasticamente maior em relação aos dados descritos na literatura para o AC e derivados (LIU *et al.*, 1995; NIERO *et al.*, 2013; SOLTANIAN *et al.*, 2018). Liu e colaboradores (1995) demonstraram que o AC tem atividade antiproliferativa sobre células derivadas de glioblastoma e de carcinomas de próstata e de pulmão, com valores de IC₅₀ entre 1,0 e 4,5 mM. Niero e colaboradores (2013) mostraram que o AC inibe a proliferação de células derivadas de melanoma (HT-144), contudo o valor de IC₅₀ determinado no estudo foi de 3,2 mM. Soltanian e colaboradores (2018) relataram atividade antiproliferativa do AC sobre células derivadas de carcinoma de cólon (HT-29), quando as concentrações entre 6,4 a 51,2 mM foram usadas.

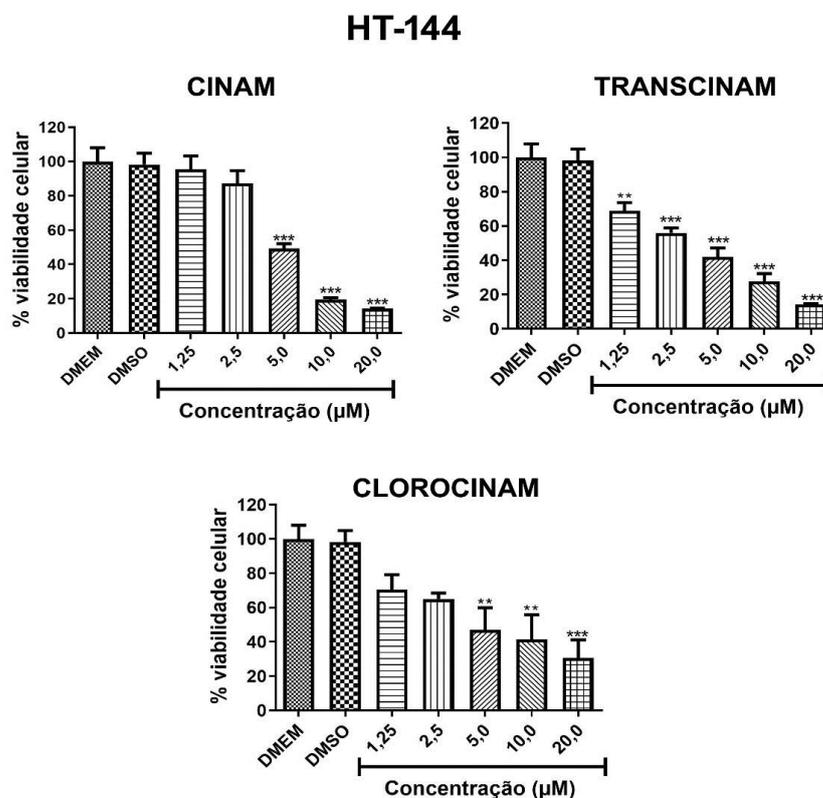
O perfil de citotoxicidade dos derivados de ácido cinâmico, usados como ligantes na obtenção dos complexos metálicos estudados, foi avaliado sobre a linhagem HT-144 (Figura 9). Os resultados mostraram que os ácidos orgânicos não alteram a taxa de viabilidade após 24 horas de tratamento, quando usados na mesma faixa de concentração em que os complexos foram testados (0,0 - 20,0 µM). Assim sendo, a efetiva capacidade dos complexos de rutênio em inibir a viabilidade em linhagens celulares de melanoma está associada à coordenação desses ácidos orgânicos ao rutênio.

A atividade citotóxica de CINAM, TRANSCINAM e CLOROCINAM foi também avaliada sobre células derivadas de nevus (NGM) e células normais (fibroblastos derivados de pele, CCD-1059Sk; e fibroblastos derivados de tecido gengival, FB1). Essa investigação foi realizada com o objetivo de avaliar os perfis de seletividade dos complexos de rutênio para as células tumorais. Esse parâmetro é importante para avaliar a futura aplicabilidade clínica dos compostos estudados (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990). Os valores de IC₅₀ variaram de 7,48 a 15,03 µM, contudo foi possível observar que os valores de IC₅₀ encontrados para os complexos CINAM e TRANSCINAM foram semelhantes ao comparar os resultados obtidos nas linhagens NGM e CCD-1059Sk (Tabela 2). Entretanto, o mesmo evento não foi observado em relação às culturas de fibroblastos estabelecidos a partir de tecido gengival (FB1), cujos valores de IC₅₀ foram discrepantes em relação aos encontrados para as linhagens NGM e CCD-1059Sk (Tabela 2). Esses achados podem ser decorrentes de diferenças metabólicas/comportamentais comumente encontradas entre fibroblastos que são provenientes de diferentes sítios anatômicos (SCHOL *et al.*, 1996; HÄKKINEN; UITTO; LARJAVA, 2000). No presente estudo, não foi possível comparar tais parâmetros em relação ao CLOROCINAM, uma vez que o referido

complexo não foi testado na linhagem NGM, contudo os valores de IC_{50} obtidos na CCD-1059Sk e FB1 foram relativamente próximos.

Os índices de seletividade (IS) foram determinados confrontando os valores de IC_{50} obtidos em células normais (CCD-1059Sk e FB1) e células não transformadas (NGM) com as linhagens de melanoma (Tabelas 3 – 5). Valores igual ou superior a 3,0 foram considerados bons índices de seletividade (BÉZIVIN *et al.*, 2003). Assim sendo, CINAM (IS = 4,63) e TRANSCINAM (IS = 3,30) mostram-se seletivos para a linhagem CHL-1 (Tabela 3), considerando a linhagem CCD-1059Sk como referência. TRANSCINAM foi seletivo para as linhagens HT-144 e CHL-1 (IS = 4,26 e 4,70, respectivamente), usando FB1 como parâmetro de célula normal (Tabela 4), e quando NGM foi usada como referência, CINAM (IS = 5,31) foi seletivo para a linhagem CHL-1 (Tabela 5).

Figura 5 - Viabilidade celular determinada por MTS na linhagem HT-144 após 24 horas de tratamento com os complexos CINAN, TRANSCINAN e CLOROCINAN em diferentes concentrações.



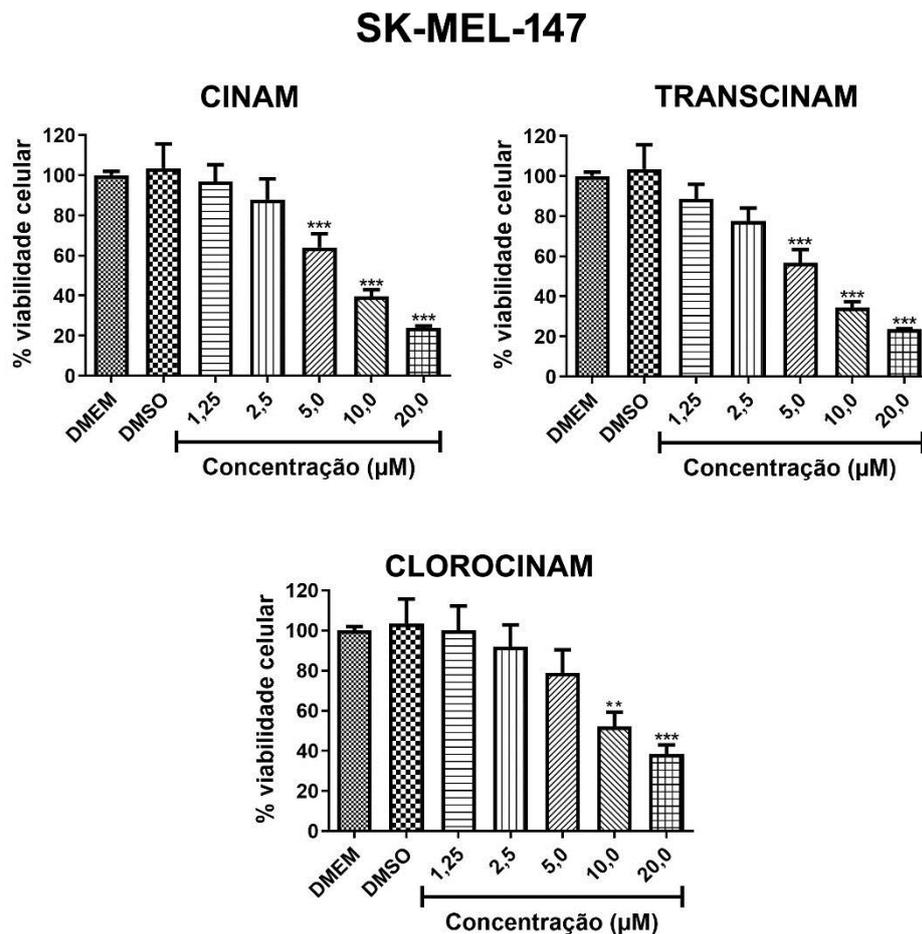
Fonte: Da autora.

Nota: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ de acordo com ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnet.

Com base nos resultados de viabilidade e nos perfis de seletividade, CINAM e TRANSCINAM parecem promissores sobre a linhagem CHL-1. Contudo, estudos mostram que o ligante de TRANSCINAM contém o grupo CF_3 na posição 4 do anel aromático, o qual

favorece sua penetração na célula e aumenta a possibilidade de interação com moléculas-alvo (MUELLER *ET AL.*,2007; HAGMANN, 2008; LUZINA; POPOV, 2014). Assim sendo, abordagens experimentais adicionais foram realizadas somente com TRANSCINAM para comprovar a maior sensibilidade da linhagem CHL-1 em relação as linhagens SK-MEL-147 e WM1366.

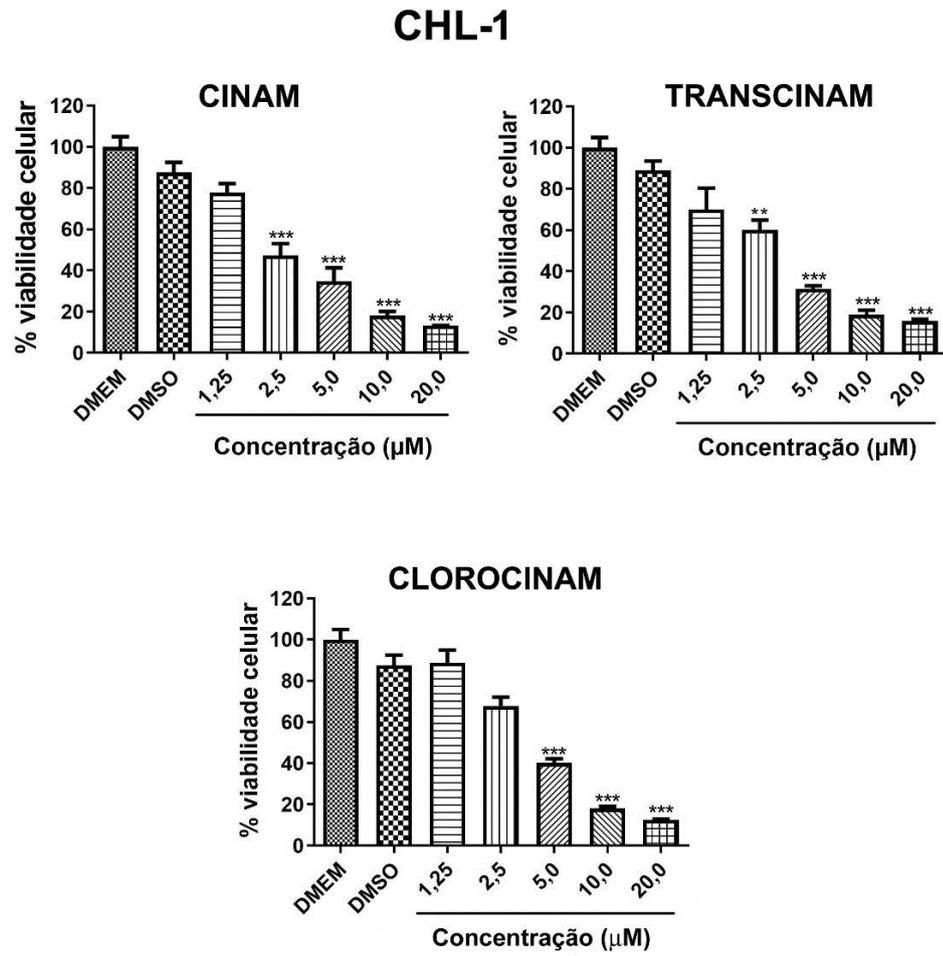
Figura 6 - Viabilidade celular determinada por MTS na linhagem SK-MEL-147 após 24 horas de tratamento com os complexos CINAN, TRANSCINAM e CLOROCINAM em diferentes concentrações.



Fonte: Da autora.

Nota: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ de acordo com ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnet.

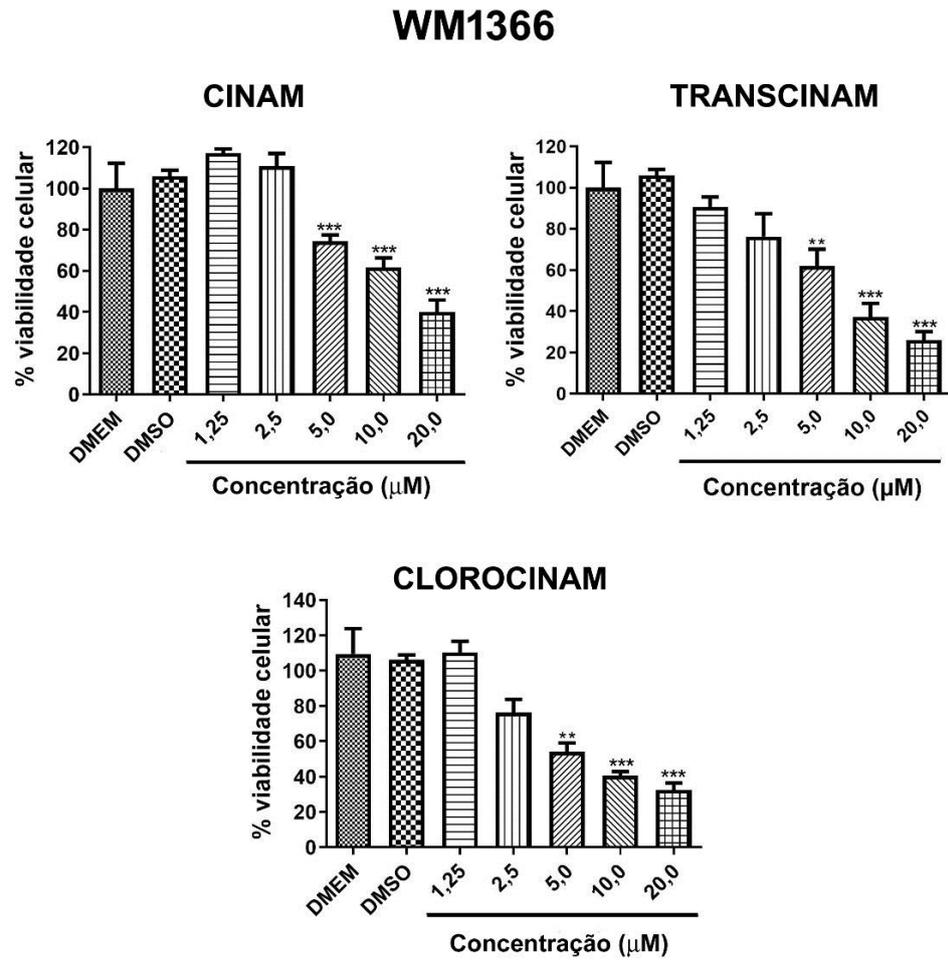
Figura 7 - Viabilidade celular determinada por MTS na linhagem CHL-1 após 24 horas de tratamento com os complexos CINAN, TRANSCINAM e CLOROCINAM em diferentes concentrações.



Fonte: Da autora.

Nota: ** p < 0,01, *** p < 0,001 de acordo com ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnet.

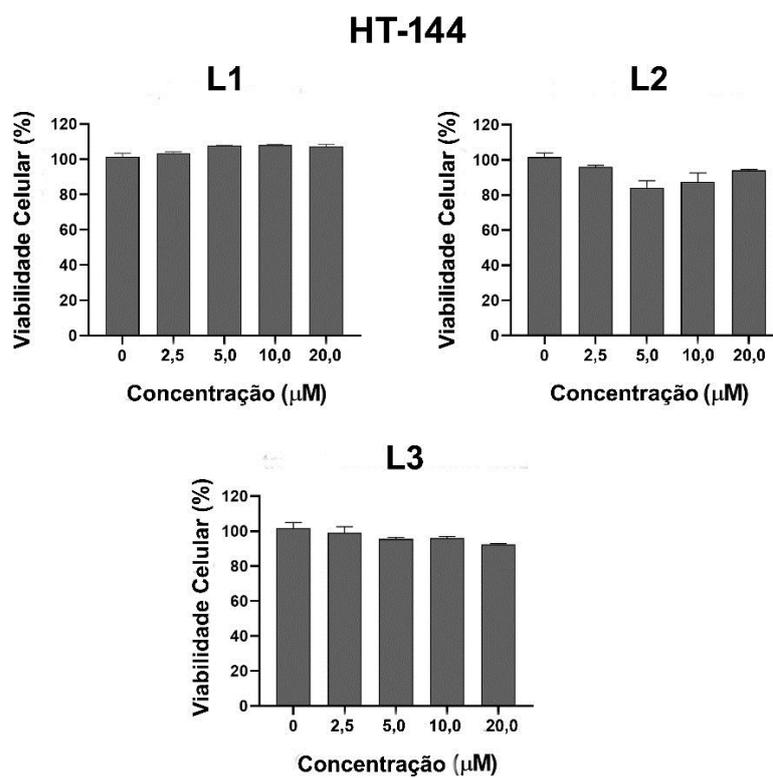
Figura 8 - Viabilidade celular determinada por MTS na linhagem WM 1366 após 24 horas de tratamento com os complexos CINAN, TRANSCINAM e CLOROCINAM em diferentes concentrações.



Fonte: Da autora.

Nota: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ de acordo com ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnet.

Figura 9 - Viabilidade celular determinada por MTS em células HT-144 após 24 horas de tratamento com os ligantes em diferentes concentrações. L1: ácido 3,4-metileno-cinâmico, L2: ácido trans-4-fluorometil-cinâmico, e L3: ácido trans-4-cloro-cinâmico



Fonte: Da autora.

Tabela 2 - Valores de IC₅₀ determinados por MTS após 24 horas de tratamento com os diferentes complexos nas linhagens de melanoma (SK-MEL-147, HT-144, CHL-1 e WM1366), nas linhagens NGM (derivada de *nevus*) e CCD-1059Sk (derivada de pele humana), e em cultura primária derivada de tecido gengival (FB1).

LINHAGEM CELULAR	CINAN	TRANSCINAM	CLOROCINAM
SK-MEL-147	7,99 ± 1,49	6,48 ± 1,21	12,48 ± 1,38
HT-144	5,32 ± 2,07	3,25 ± 0,89	5,34 ± 0,64
CHL-1	2,83 ± 1,17	2,95 ± 1,12	4,03 ± 1,56
WM1366	14,39 ± 1,70	7,24 ± 1,17	7,81 ± 1,23
NGM	15,03 ± 0,84	7,55 ± 1,29	NR
CCD-1059Sk	13,11 ± 2,55	9,74 ± 1,92	9,54 ± 2,70
FB1	7,48 ± 2,91	13,86 ± 3,57	7,58 ± 3,31

Fonte: Da autora.

Nota: Os valores de CI₅₀ foram determinados a partir de curvas de regressão não linear usando o programa GraphPad Prim®. NR: não realizado.

Tabela 3 - Índice de seletividade (IS) usando a linhagem CCD-1059Sk como referência.

LINHAGEM CELULAR	CINAM	TRANSCINAM	CLOROCINAM
HT-144	2,46	2,97	1,79
SK-MEL-147	1,64	1,50	0,76
CHL-1	4,63	3,30	2,37
WM1366	0,91	1,34	1,22

Fonte: Da autora.

Nota: IS = IC₅₀ CCD-1059Sk/IC₅₀ linhagens de melanoma.

Tabela 4 - Índice de seletividade (IS) frente a cultura de fibroblastos isolados a partir de tecido gengival

LINHAGEM CELULAR	CINAM	TRANSCINAM	CLOROCINAM
HT-144	1,40	4,26	1,42
SK-MEL-147	0,94	2,14	0,60
CHL-1	2,64	4,70	1,88
WM1366	0,52	1,91	0,97

Fonte: Da autora.

Nota: IS = IC₅₀ FB1/IC₅₀ linhagens de melanoma.

Tabela 5 - Índice de seletividade frente a linhagem NGM

LINHAGEM CELULAR	CINAM	TRANSCINAM
HT-144	2,82	2,32
SK-MEL-147	1,88	1,16
CHL-1	5,31	2,55
WM1366	1,04	1,04

Fonte: Da autora.

Nota: IS = IC₅₀ NGM/IC₅₀ linhagens de melanoma.

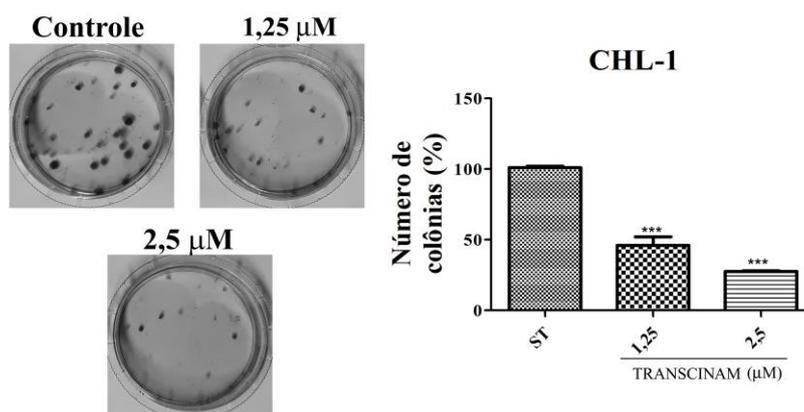
6.2 TRANSCINAM TEM EFEITO CITOSTÁTICO NA LINHAGEM CHL-1 QUANDO USADO EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES

Análise de progressão do ciclo celular e ensaio de capacidade clonogênica foram realizados para avaliar os efeitos de TRANSCINAM, em concentrações inferiores a 5 µM, sobre o comportamento proliferativo das linhagens SK-MEL-147, CHL-1 e WM1366.

Os resultados mostraram que TRANSCINAM reduziu a capacidade clonogênica na linhagem CHL-1 quando utilizado as concentrações de 1,25 e 2,5 µM, indicando alta

sensibilidade dessas células ao TRANSCINAM (Figura 10). O número de colônias nas culturas tratadas com TRANSCINAM foi significativamente menor nas culturas tratadas em relação aos controles. Além disso, as colônias formadas aparentemente foram menores no grupo tratado comparado ao grupo controle (Figura 10). Na linhagem SK-MEL-147, TRANSCINAM reduziu a capacidade de formar colônias somente nas culturas tratadas com 2,5 μM , sendo que o percentual de inibição foi menor em relação ao observado na CHL-1 (Figura 11). A exemplo do que foi observado na linhagem CHL-1, as colônias formadas em culturas de SK-MEL-147 tratadas com TRANSCINAM a 2,5 μM foram menores em relação ao grupo controle (Figura 11). Assim sendo, TRANSCINAM inibe a capacidade clonogênica na linhagem SK-MEL-147, embora com menor potência quando comparado ao seu efeito na linhagem CHL-1. Diferenças significativas não foram evidenciadas em culturas de WM1399 tratadas com TRANSCINAM em relação ao grupo controle (Figura 12), indicando que TRANSCINAM em baixas concentrações não tem atividade citotóxica nem tão pouco afeta o comportamento proliferativo de células WM1399. Os dados obtidos são promissores e mostram que TRANSCINAM inibe a proliferação de células CHL-1 e SK-MEL-147 por períodos prolongados.

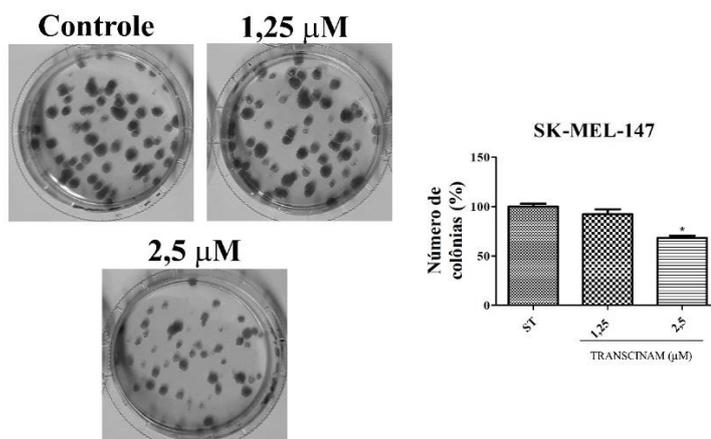
Figura 10 - Ensaio de capacidade clonogênica realizado na linhagem CHL-1.



Fonte: Da autora.

Nota: As células foram exposta ao TRANSCINAM por 24 horas e recuperadas por 12 dias em meio fresco. (A) Imagens ilustrativas obtidas em estereomicroscópio (Aumento 20x). (B) Análise das colônias formadas. Foram consideradas na análise as colônias com mais de 50 células. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Imagens ilustrativas do ensaio clonogênico são mostradas na parte superior. ST: controle. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Dunnet.

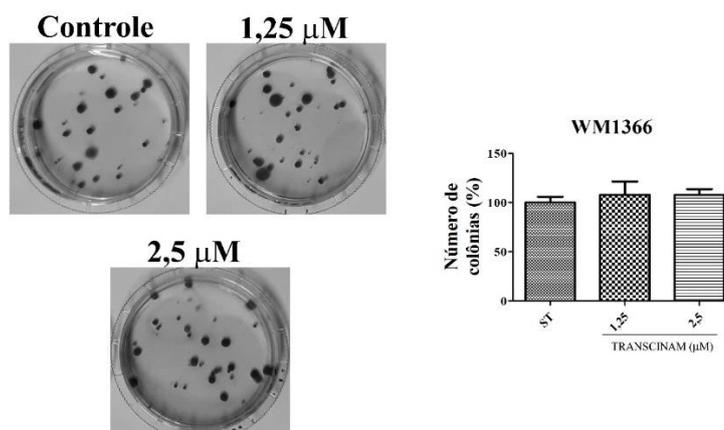
Figura 11: Ensaio de capacidade clonogênica realizado na linhagem SK-MEL-147



Fonte: Da autora..

Nota: As células foram expostas ao TRANSCINAM por 24 horas e recuperadas por 12 dias em meio fresco. (A) Imagens ilustrativas obtidas em estereomicroscópio (Aumento 20x). (B) Análise das colônias formadas. Foram consideradas na análise as colônias com mais de 50 células. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Imagens ilustrativas do ensaio clonogênico são mostradas na parte superior. ST: controle. * $p < 0,05$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Dunnet.

Figura 12: Ensaio de capacidade clonogênica realizado na linhagem WM1366.



Fonte: Da autora.

Nota: As células foram expostas ao TRANSCINAM por 24 horas e recuperadas por 12 dias em meio fresco. (A) Imagens ilustrativas obtidas em estereomicroscópio (Aumento 20x). (B) Análise das colônias formadas. Foram consideradas na análise as colônias com mais de 50 células. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Imagens ilustrativas do ensaio clonogênico são mostradas na parte superior. ST: controle.

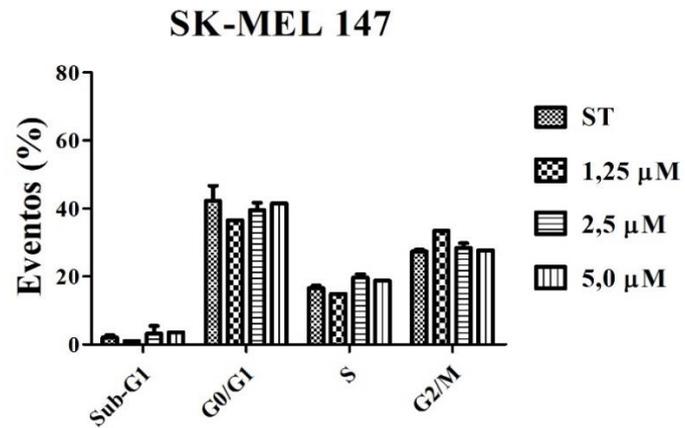
A influência dos complexos de rutênio sobre a capacidade clonogênica de células derivadas de melanoma não tem sido explorada, contudo estudos mostram que complexo de rutênio(II) contendo ácido piperonílico inibe a capacidade clonogênica de células A549

(derivadas de adenocarcinoma pulmonar) e complexos de rutênio(II) contendo os derivados de ácido cinâmico (4-hidroxi-cinâmico e 3,4-diidroxi-cinâmico) inibem a capacidade de células MDA-MB-231 (carcinoma de mama) formarem colônia (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2017; GRAMINHA *et al.*, 2020).

A cinética de progressão do ciclo celular também foi avaliada após tratamento com TRANSCINAM nas linhagens SK-MEL-147, WM1366 e CHL-1 (Figuras 13-15). Não foram evidenciadas alteração na frequência das populações celulares sub-G1, G0/G1, S e G2/M ao comparar amostras de SK-MEL-147 e WM1366 tratadas com TRANSCINAM (1,5, 2,5 ou 5 μM) ao grupo controle após 24 horas de tratamento (Figuras 13 e 14). Os dados de ciclo celular corroboram àqueles obtidos no ensaio de capacidade clonogênica, uma vez que TRANSCINAM em baixas concentrações não afetou o comportamento proliferativo da linhagem WM1366. Em relação a SK-MEL-147, o fato de TRANSCINAM, em concentrações inferiores a 5 μM , não ter induzido mudanças na dinâmica de progressão do ciclo celular pode estar associado ao curto período de tratamento (24 h). No ensaio de capacidade clonogênica, as culturas foram expostas ao TRANSCINAM por 24 h e foram analisadas somente 12 dias após a exposição. Considerando as diferenças metodológicas empregadas nessas abordagens experimentais, é plausível que não se tenha observado diferenças significativas na análise de progressão do ciclo celular na linhagem SK-MEL-147, cuja análise foi realizada 24 h após o tratamento. No entanto, as culturas de células CHL-1 tratadas com TRANSCINAM a 2,5 μM apresentaram aumento da subpopulação G0/G1 com redução concomitante da subpopulação G2/M (Figura 15A e 15B).

A análise do ciclo celular evidenciou também aumento significativo na população Sub-G1 em amostras tratadas com TRANSCINAM a 5 μM , indicando alta citotoxicidade do composto nesta concentração (Figura 16), uma vez que a população Sub-G1 é constituída por células com DNA fragmentado (SOARES *et al.*, 2013). As alterações morfológicas evidenciadas em culturas de CHL-1 tratadas com TRANSCINAM reforçam os dados obtidos por citometria de fluxo. As células tratadas com TRANSCINAM (1,5 μM) exibem aspecto morfológico semelhante ao observado nas células do grupo controle. Nas culturas tratadas com TRANSCINAM na concentração de 2,5 μM , as células exibem prolongamentos citoplasmáticos alongados, cujo padrão difere daquele observado em células do grupo controle. As culturas tratadas com TRANSCINAM (5 μM) apresentaram células em suspensão e *debris* celulares (Figura 16), indicando alta citotoxicidade de TRANSCINAM nessa concentração. Os dados de citometria de fluxo indicam que TRANSCINAM inibe a progressão do ciclo celular na transição G1/S e induzem morte celular em células CHL-1.

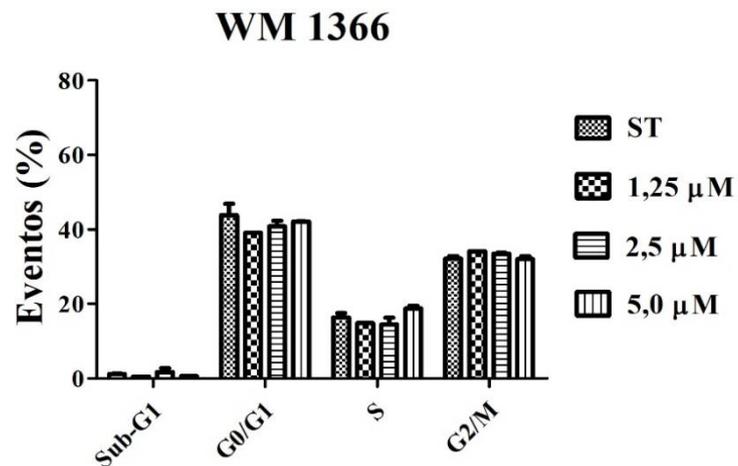
Figura 13 - Análise da dinâmica de progressão do ciclo celular realizada na linhagem SK-MEL 147 após 24 horas de tratamento com TRANSCINAM em diferentes concentrações



Fonte: Da autora.

Nota: Os valores representados no gráfico referem-se à média de 3 experimentos independentes e a barra de erros representa o desvio padrão. ST: controle.

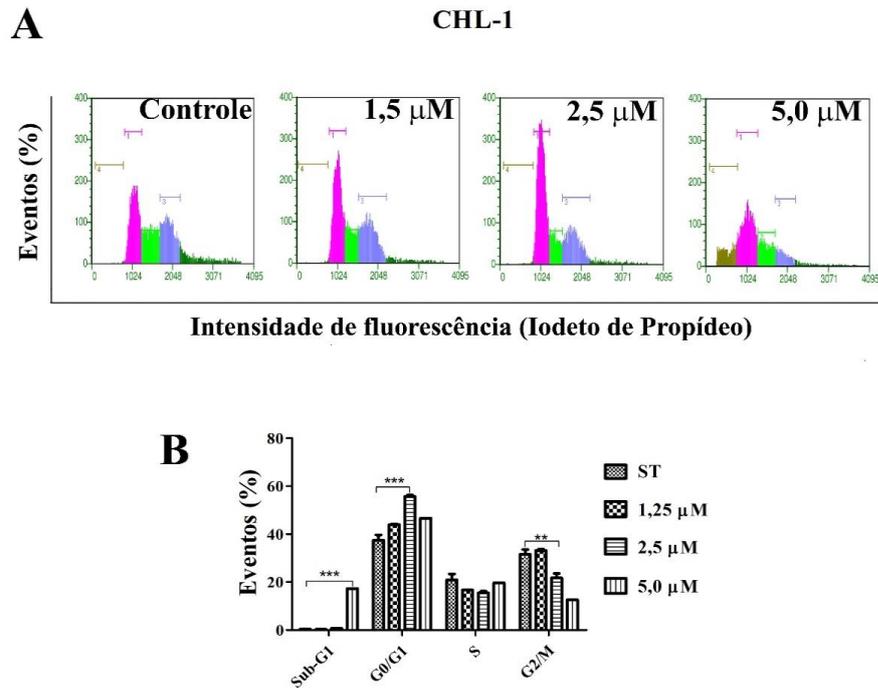
Figura 14 - Análise da dinâmica de progressão do ciclo celular realizada na linhagem WM1366 após 24 horas de tratamento com TRANSCINAM em diferentes concentrações



Fonte: Da autora.

Nota: Os valores representados no gráfico referem-se à média de 3 experimentos independentes e a barra de erros representa o desvio padrão. ST: controle.

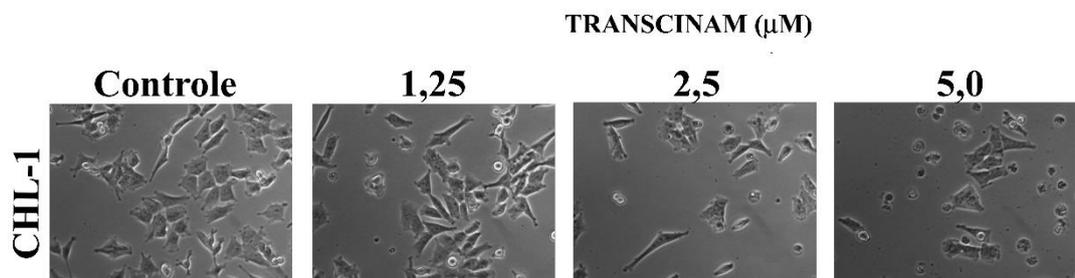
Figura 15 - Análise da dinâmica de progressão do ciclo celular realizada na linhagem CHL-1 após 24 horas de tratamento com TRANSCINAM em diferentes concentrações.



Nota: (A) Imagem ilustrativa referente aos histogramas obtidos pela citometria de fluxo, onde o eixo Y mostra o número de eventos (células) e o eixo X mostra a intensidade de fluorescência do iodeto de propídeo, a qual é diretamente proporcional ao conteúdo de DNA presente nas diferentes populações (sub-G1: marrom; G0/G1: rosa; S: verde claro; G2/M azul). (B) Análise realizada a partir dos dados obtidos por citometria de fluxo. Os valores representados no gráfico referem-se à média de 3 experimentos independentes e a barra de erros representa o desvio padrão. ST: controle. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Dunnet.

Fonte: Da autora.

Figura 16 - Imagens ilustrativas, obtidas por microscopia de contraste fase (aumento 60x) mostrando o aspecto morfológico da linhagem CHL-1



Fonte: Da autora.

Nota: As culturas foram tratadas com TRANSCINAM por 24 horas.

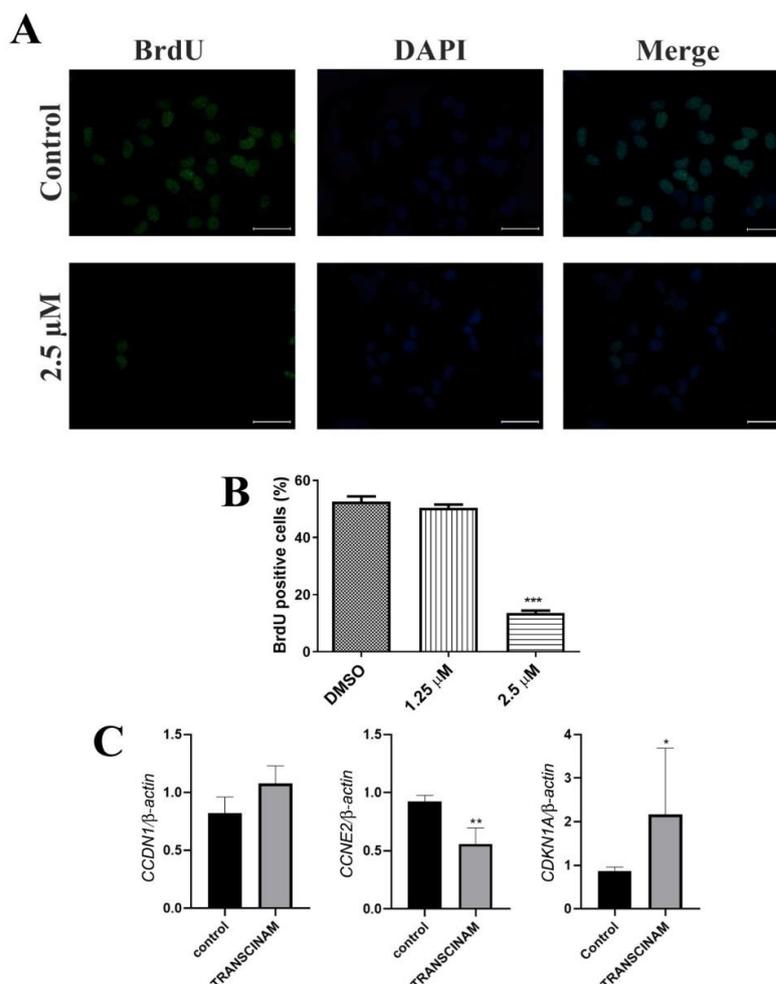
Em uma etapa subsequente, a população de células na fase S do ciclo celular foi determinada usando um marcador específico para demonstrar a eficiência de TRANSCINAM em inibir o ciclo celular na transição G1/S.

Os resultados obtidos pela incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina, mostraram que TRANSCINAM reduziu significativamente a frequência de células marcadas para BrdU. A frequência de células positivas no grupo controle foi, aproximadamente, 50%, enquanto no grupo tratado com TRANSCINAM (2,5 μ M) foi cerca de 13% (Figuras 17A e 17B).

Diante dos dados obtidos, o perfil de expressão de reguladores do ciclo celular na transição G1/S foram investigados. Vale lembrar que a linhagem CHL-1 carrega a mutação em *CDKN2A*, que por *splicing* alternativo, codifica p16^{INK4} e p14^{ARF}. Assim sendo, os perfis de expressão dos genes (*CCND1*, *CCNE2* e *CDKN1A*) que codificam para as ciclinas D1 e E2 e p21, respectivamente, foram investigados. As ciclina D e E são essenciais para a ativação das CDKs 4/6 e CDK2, respectivamente, e conseqüente progressão pela fase G1 e transição G1/S. Ao passo que a p21 é capaz de inibir diferentes CDKs (XIONG *et al.*, 1993; KARIMIAN *et al.* 2016).

Os dados obtidos por RT-PCR mostraram que TRANSCINAM (2,5 μ M) reduziu significativamente a abundância de mRNA de *CCNE2* e aumentou os níveis de mRNA de *CDKN1A* após 12 h de tratamento (Figura 17C). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de mRNA de *CCND1* nas condições experimentais avaliadas em resposta ao TRANSCINAM (Figura 17C).

Figura 17 - Ensaio de coloração de BrdU em CHL-1 após 24h de tratamento



Fonte: Da autora.

Nota: (A) Imagens ilustrativas obtidas por microscópio de fluorescência mostrando o padrão de coloração de BrdU após 24h de tratamento com TRANSCINAM. (B) População da fase S determinada pela incorporação de BrdU após 24h de tratamento com TRANSCINAM a 1,25 e 2,5 μ M. *** p <0,001 de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Dunnet. (C) expressão relativa de mRNA determinada por q-RT-PCR de *CCDN1* (codifica ciclina D1), *CCNE2* (codifica ciclina E2), *CDKN1A* (codifica p21) após 12h de tratamento com TRANSCINAM a 2,5 μ M. ** p <0,01 e * p <0,05 de acordo com test *t*.

Existem muitos estudos que demonstraram a capacidade de complexos de rutênio em inibir a progressão do ciclo celular, embora o perfil de atividade seja variável de acordo com o tipo de complexo considerado (GAVA *et al.*, 2005; GAIDDON *et al.*, 2005; FILAK *et al.*, 2010; STEPANENKO *et al.*, 2011; DE LIMA *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2014; FERREIRA-SILVA *et al.*, 2017); entretanto, poucos estudos tem demonstrado os mecanismos moleculares relacionados à capacidade dos complexos de rutênio em inibir a progressão do ciclo celular em células tumorais, especialmente os complexos de rutênio (II). Estudo prévio mostrou que complexo de rutênio (II) contendo ácido piperonílico inibiu a progressão do ciclo celular na transição G1/S em células A549 devido a sua capacidade de reduzir os níveis de ativação de

ERK e, por consequência, reduzir a expressão de ciclina D (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2017). Estudos envolvendo a investigação dos mecanismos moleculares relacionados a capacidade dos complexos de rutênio em inibir a progressão do ciclo em células de melanoma não foram encontrados na literatura.

Diante dos dados obtidos, é possível propor que o bloqueio do ciclo celular na transição G1/S em CHL-1, pelo menos em parte, está associado à capacidade de TRANSCINAM modular os perfis de expressão de ciclina E e p21. Aumento na expressão de p21 tem sido usada como um parâmetro de resposta a fármaco (KREIS *et al.*, 2019) e também pode ser uma forma eficaz de prevenir o crescimento tumoral e metástases (SHAMLOO *et al.*, 2019). Contudo, futuras investigações devem ser realizadas para compreender melhor o mecanismo associado ao aumento no perfil de expressão de p21 em células CHL-1 em resposta ao TRANSCINAM, uma vez que essas células carregam mutação em *TP53*.

A proteína p53 é o principal regulador da transcrição de p21, entretanto a mutação em *TP53* (H193R), encontrada na CHL-1, determina uma mudança de conformação na proteína fazendo com que os domínios de ligação ao DNA não sejam expostos. Assim, a atividade transcricional de p53 é inferior a 20% em células que contêm essa mutação *missense* (DONEHOWER *et al.*, 2019). Além disso, como mencionado anteriormente, a CHL-1 não expressa p14^{ARF}, proteína que estabiliza p53 em situações de estresse celular por sequestrar MDM2 (ubiquitina ligase a E3). Nesse contexto, o aumento no perfil de expressão de p21 em células CHL-1, induzido por TRANSCINAM, parece ser independente de p53, de modo que tal evento precisa ser investigado.

Yi e colaboradores (2017) reprimiram a transcrição de *c-Myc* em células MCF-7 para demonstrar a correlação inversa entre os níveis de expressão de *c-Myc* e *CDKN1A*. Os autores demonstraram que a inibição de Myc- em nível transcricional resultou em aumento no perfil de expressão *CDKN1A* e bloqueio do ciclo celular na transição G1/S. Estudos mostram que melanomas apresentam níveis elevados de expressão de *c-Myc*, os quais são correlacionados ao processo de progressão tumoral e estabelecimento de metástase (KRAEHN *et al.*, 2001; ZHUANG *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2012). De acordo com Lin e colaboradores (2012), *c-Myc* induz metástase por aumentar os níveis de expressão de genes envolvidos na transição epitélio-mesenquimal. Novos estudos deverão ser realizados para avaliar se o aumento nos níveis de expressão de *CDKN1A* e, conseqüentemente, o bloqueio do ciclo celular na transição G1/S, em células CHL-1 tratadas TRANSCINAM, são eventos associados à redução dos níveis de expressão de *c-Myc*.

6.3 TRANSCINAM INIBE A MIGRAÇÃO CELULAR E ALTERA O PADRÃO DE ORGANIZAÇÃO DE ELEMENTOS DO CITOESQUELETO NA LINHAGEM CHL-1

Considerando que o processo de progressão tumoral envolve mudanças no comportamento celular incluindo maior capacidade de migração e invasão, no presente estudo foi avaliado se TRANSCINAM é capaz de inibir a capacidade de migração de CHL-1. A análise foi realizada pelo ensaio de ferida e os resultados mostraram que TRANSCINAM inibe a capacidade de migração de células CHL-1. As células do grupo controle migraram em direção a área da ferida e a lesão foi praticamente reparada após 24 h de tratamento. Ao contrário, nas culturas tratadas com TRANSCINAM nas concentrações de 1,25 e 2,5 μM , a capacidade de migração celular foi reduzida em cerca de 25% e 50%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Figura 18).

Os resultados encontrados são corroborados por outros estudos que mostram o potencial dos complexos rutênio em inibir a capacidade de migração e invasão em células tumorais derivadas de carcinoma de mama, de adenocarcinoma pulmonar e carcinoma hepatocelular (BERGAMO *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2016; GRAMINHA *et al.*, 2020). Wu e colaboradores (2014) mostraram que o complexo de areno-rutênio(II) (RAWQ11) inibiu a capacidade de migração e invasão de células derivadas de câncer de mama (MDA-MB-231) devido a sua capacidade de modular o perfil de expressão de genes, cujos produtos estão associados a organização do complexo proteico que configura a adesão focal. Além disso, os autores mostraram que o complexo RAWQ11 altera a organização do citoesqueleto de actina.

Considerando os resultados prévios, relacionados à inibição de TRANSCINAM na capacidade de migração de células CHL-1, e que os processos de migração e invasão envolvem reorganização do citoesqueleto (MUTHUSWAMY; XUE, 2012), possíveis influências de TRANSCINAM sobre microfilamentos e microtúbulos foram avaliadas.

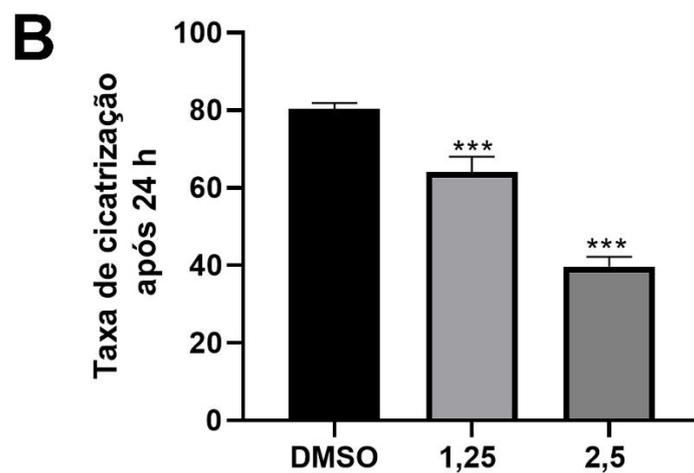
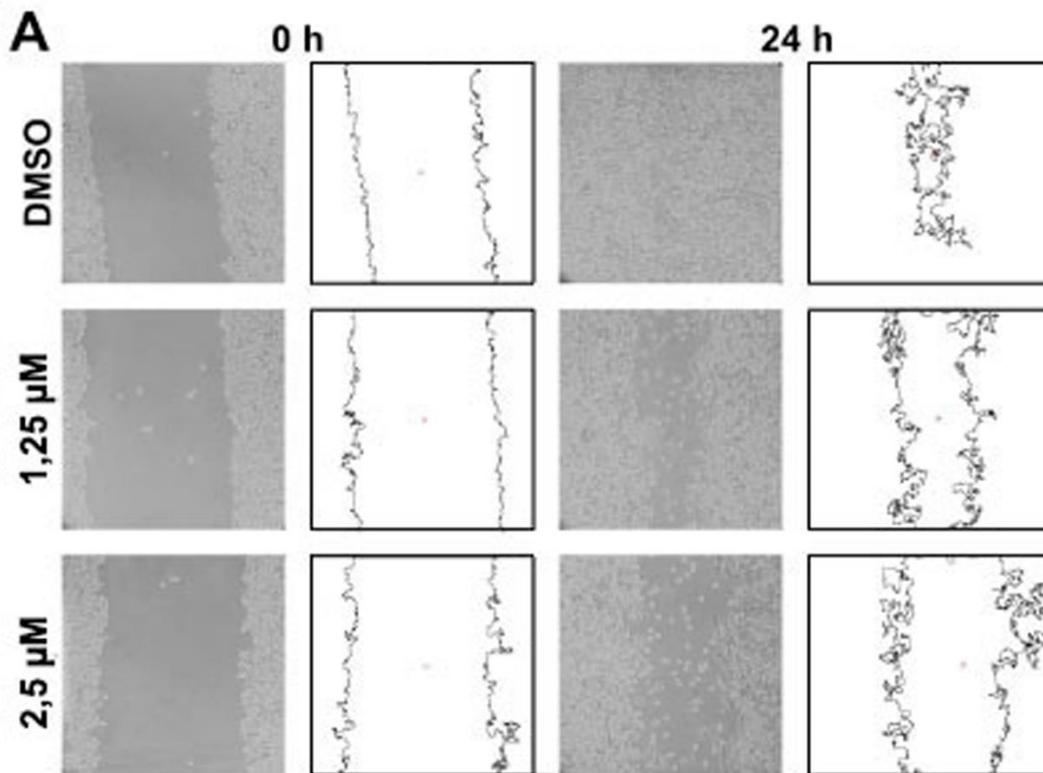
Os resultados mostraram que TRANSCINAM altera o padrão de organização dos microtúbulos e dos filamentos de actina quando utilizado na concentração de 2,5 μM . Nas células do grupo controle foi possível observar microtúbulos se irradiando a partir do centróssomo, os quais formam uma rede amplamente distribuída no citoplasma. Contudo, no grupo tratado (TRANSCINAM a 2,5 μM), os microtúbulos são menos visíveis e parecem se concentrar na região próxima ao centróssomo (Figura 19).

Em relação aos filamentos de actina, foi possível observar uma grande concentração desses filamentos na região cortical em células do grupo controle e proeminentes agregados de actina no citoplasma, contudo no grupo tratado a deposição dos filamentos na região próxima

à membrana bem como os agregados citoplasmáticos de actina foram menos perceptíveis quando comparado ao grupo controle (Figura 19). Assim, é possível que as alterações morfológicas, descritas anteriormente pela observação das culturas CHL-1 tratadas com TRANSCINAM (2,5 μ M) por microscopia de contraste fase, e a inibição da capacidade de migração sejam eventos associadas à alterações no padrão de organização do citoesqueleto. Além disso, é possível que TRANSCINAM tenha alterado o perfil de expressão e/ou ativação de componentes que formam os invadopódios. Contudo, estudos subsequentes deverão ser realizados para correlacionar os efeitos de TRANSCINAM sobre a capacidade migratória e invasiva de células CHL-1 com possíveis influência na estrutura de invadopódios, que são estruturas complexas e envolvem múltiplos constituintes, incluindo actina F e proteínas associadas (cortactina, cofilina, talina, N-WASP e Arp2/3), moléculas de adesão (integrinas, vinculina e paxilina) e GTPases da família Rho (LINDER *et al.*, 2011; BEATY; CONDEELIS, 2014; EDDY *et al.*, 2017).

A despeito das investigações que serão realizadas para investigar os alvos moleculares de TRANSCINAM que estão envolvidos com sua capacidade de inibir migração em células CHL-1, os dados são promissores uma vez os melanomas apresentam alta capacidade de formar metástase.

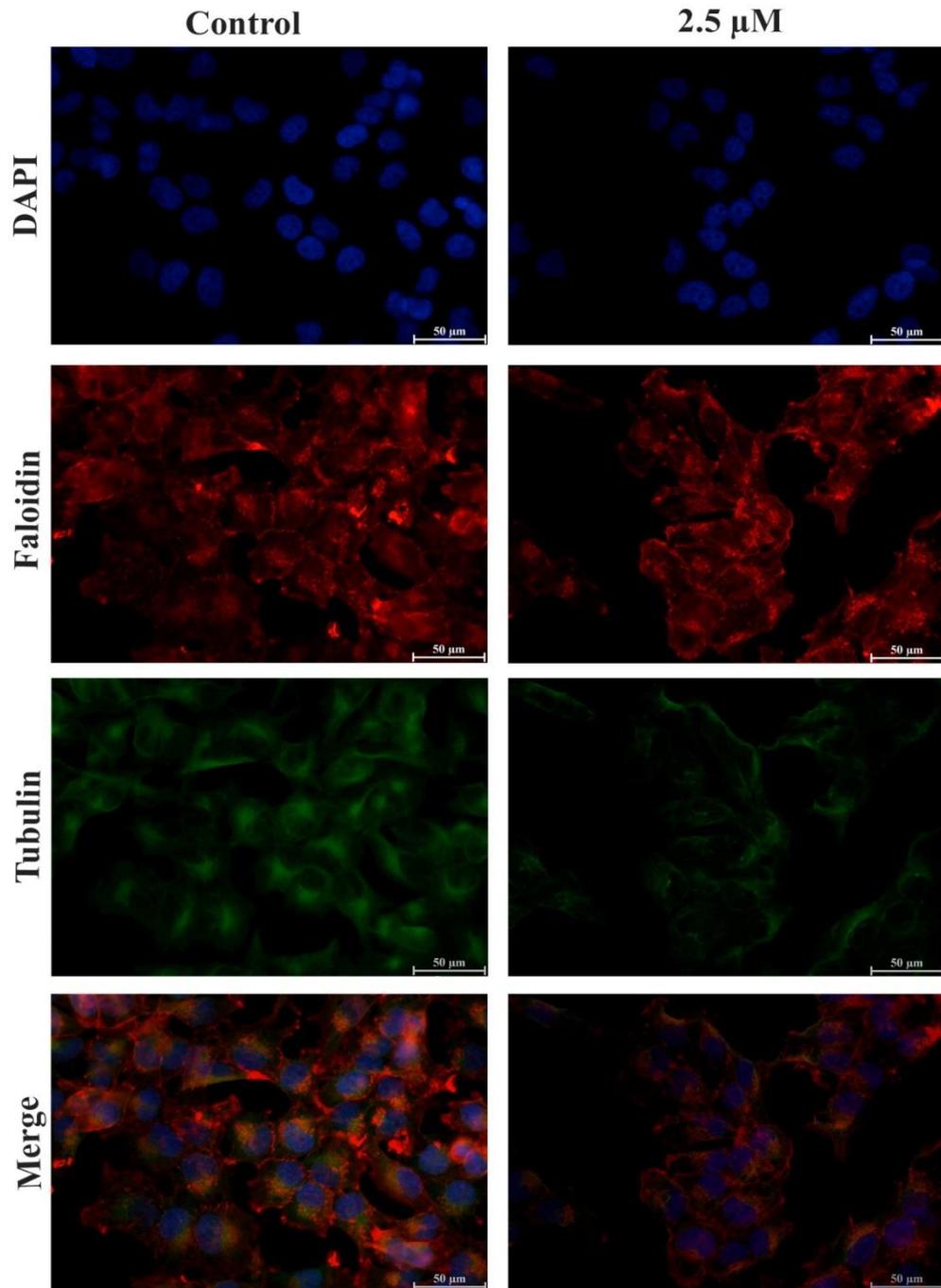
Figura 18 - Ensaio de migração celular realizado na linhagem CHL-1.



Fonte: Da autora.

Nota: (A) Imagens ilustrativas das culturas (aumento 40x) imediatamente após a realização da ferida (0h) e após 24 h de tratamento com TRANSCINAM (1,25 e 2,5 μM). A análise foi realizada usando o software de domínio público ImageJ. (B) Análise dos dados. *** $p < 0,001$ de acordo com análise de variância e pós-teste de Dunnet.

Figura 19 - Imagens representativas mostrando o padrão de distribuição de elementos do citoesqueleto.



Fonte: Da autora.

Nota: (Vermelho) actina e (verde) microtúbulos, os quais foram evidenciados pela coloração com faloidina/TRITC e imunomarcação com anti- α -tubulin revelada com anti-mouse/FITC. Os núcleos foram corados com DAPI.

6.4 TRANSCINAM EXIBE ATIVIDADE PRÓ-APOPTÓTICA FRENTE A LINHAGEM CHL-1 NA CONCENTRAÇÃO 5 μ M

Considerando os dados obtidos por citometria de fluxo que mostraram aumento da população Sub-G1 em amostras tratadas com TRANSCINAM, o potencial pró-apoptótico desse complexo foi avaliado usando o ensaio de anexina V que permite a detecção de células em apoptose (fase inicial e tardia) e em necrose (CORNELISSEN *et al.* 2002). Os ensaios foram realizados usando TRANSCINAM nas concentrações de 2,5 e 5,0 μ M por 24 e 48h. Os resultados mostraram que TRANSCINAM induziu apoptose em células CHL-1, uma que foi observado aumento significativo na frequência de células positivas para anexina V nas amostras tratadas com TRANSCINAM a 2,5 μ M (48 h) e 5,0 μ M (24 e 48 h) em comparação ao grupo controle (Figura 20B). Esses resultados parecem coerentes, uma vez que dados anteriores já mostraram a alta atividade citotóxica de TRANSCINAM a 5 μ M. Considerando que não foi observado aumento significativo na população de células em necrose, a atividade citotóxica de TRANSCINAM parece estar associada à indução de apoptose (Figuras 20). Uma observação interessante foi que em culturas tratadas com TRANSCINAM (2,5 μ M), aumento significativo na frequência de células apoptóticas foi observado somente após 48 h de tratamento, o que pode ser consequência de bloqueio do ciclo celular, claramente observado quando TRANSCINAM foi usado na concentração de 2,5 μ M por 24 h. Vale ressaltar que a cisplatina (100 e 50 μ M, respectivamente, para os tempos de 24 e 48 h de tratamento) foi incluída na análise de anexina V para validar o método de análise. A escolha das concentrações foi baseada no valor de IC₅₀ (44,92 \pm 1,71) da cisplatina determinado na linhagem CHL-1 após 48 h de tratamento.

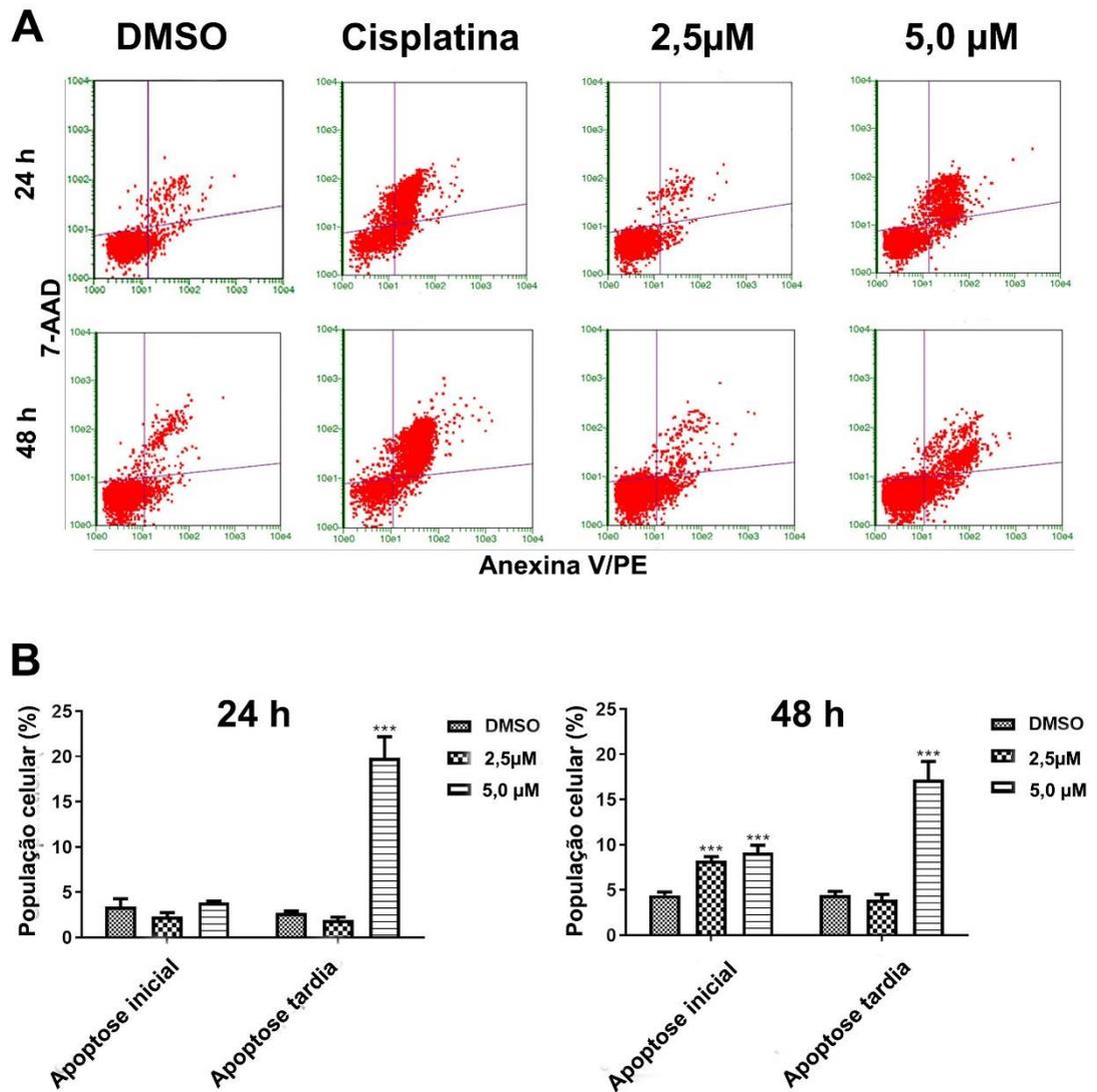
Os resultados de Anexina V mostraram que TRANSCINAM apresenta atividade pró-apoptótica sobre células CHL-1. Dados semelhantes foram encontrados em estudos recentes. Bhatti *et al.*, (2019) demonstraram a atividade pró-apoptótica do complexo de rutênio (II), [(Ru(η 6-p-cymene)Cl)₂(1,3-bis(2-methyl-6-(pyridin-2-yl)pyrimidin-4-yl)benzene)] sobre células derivadas de câncer de pulmão de pequenas células. O referido complexo foi efetivo em induzir apoptose devido a sua capacidade de estimular a expressão da proteína pró-apoptótica (Bax) e induzir ativação das caspases 3/9. VELOZO-SÁ *et al.* (2019) evidenciaram que os complexos de rutênio, [Ru(N-S)(dppm)₂]_{PF₆} e [Ru(N-S)(dppe)₂]_{PF₆}, atuaram como agentes pró-apoptóticos em culturas derivadas de carcinoma de pulmão de células não-pequenas (A549) e sobre células derivadas de carcinoma de mama triplo negativas (MDA-MB-231).

A atividade pró-apoptótica de complexos de rutênio (II) é bem descrito na literatura (CHEN *et al.* 2013; 2016; ZENG *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2015; LAI *et al.*,

2015; HAN *et al.*, 2015, LI *et al.*, 2014; WANG *et al.* 2014) e representa um aspecto importante para proposição de que os complexos de rutênio são promissores agentes antitumorais (ZHENG *et al.*, 2017; KISOVA *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014; DAN WAN *et al.*, 2017). Com o objetivo de avaliar os mecanismos associados à atividade de TRANSCINAM em células CHL-1, perfil de expressão de *Bcl-2* e *BAX* foi investigado. Os níveis de RNAm para *Bcl-2* e *BAX* foram determinados após 12 h de tratamento com TRANSCINAM a 2,5 μ M. Os resultados mostraram que TRANSCINAM modulou o perfil de expressão desses, uma vez que foi observado aumento na abundância de RNAm para *BAX* e redução dos níveis de RNA de *Bcl-2*, em comparação com os grupos controles (Figura 21). Assim, a atividade pro-apoptótica de TRANSCINAM sobre células CHL-1 está associada, pelo menos em parte, ao aumento na razão *BAX/Bcl-2* e ativação da via intrínseca (RAISOVA *et al.*, 2001; ZHU *et al.*, 2016).

Os resultados apresentados no presente estudo mostram que o complexo de rutênio(II), contendo o ácido trans-4-trifluorometil-cinâmico (TRANSCINAM), inibe proliferação e migração de células CHL-1, as quais são derivadas de melanoma e carregam mutações inativadoras nos genes supressores de tumor *TP53* e *CDKN2A*. O bloqueio no ciclo celular foi associado, pelo menos parcialmente, à capacidade de TRANSCINAM modular a expressão de ciclina E e p21, críticos reguladores da transição G1/S, em especial, na linhagem CHL-1 que não expressa p16^{INK4}. Além disso, TRANSCINAM tem atividade pró-apoptótica e, em baixas concentrações, e induz apoptose pela ativação da via intrínseca. Tomados em conjunto, os dados mostram que TRANSCINAM representa um protótipo promissor para futuras investigações *in vivo* que avaliem sua possível aplicabilidade clínica no tratamento de melanoma.

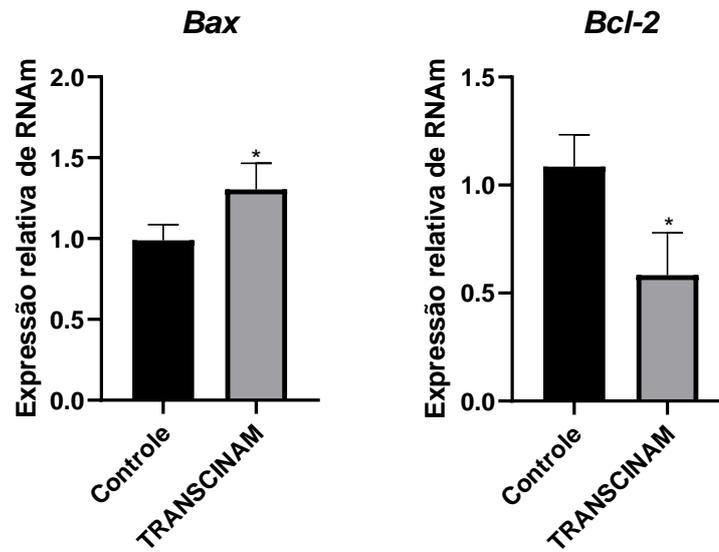
Figura 20 - Ensaio de Anexina V em culturas de células CHL-1 tratadas por 24 horas e 48 horas com TRANSCINAM



Fonte: Da autora.

Nota: (A) Dot plots representativos de 2 experimentos independentes evidenciando as diferentes populações celulares. Quadrante inferior esquerdo: células viáveis; Quadrante inferior direito: células em fase inicial de apoptose. Quadrante superior direito: células em fase avançada do processo de apoptose; Quadrante superior esquerdo: células necróticas. (B) Análise quantitativa do ensaio de anexina V considerando os dados relacionados à apoptose inicial. CIS (cisplatina) foi usada como um controle positivo. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Dunnet.

Figura 21 - Expressão relativa de RNAm de Bax e Bcl-2 determinada por RT-PCR na linhagem CHL-1 após 12 horas de tratamento com TRANSCINAM na concentração de 2,5 μ M.



Fonte: Da autora.

Nota: ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ de acordo com test t .

7 CONCLUSÃO

- 1) Os complexos de rutênio avaliados inibiram a viabilidade de células derivadas de melanoma, ao passo que seus respectivos ligantes não apresentaram efeito citotóxico quando testados, nas mesmas condições experimentais, na linhagem HT-144;
- 2) CINAM e TRANSCINAM foram seletivos para a linhagem CHL-1 em relação às linhagens SK-MEL-147 e WM1366;
- 3) TRANSCINAM, em baixa concentração, inibe a proliferação e, por consequência, induz apoptose em células da linhagem CHL-1;
- 4) As atividades antiproliferativa e pro-apoptótica de TRANSCINAM foram associadas à sua capacidade de modular a expressão de ciclina E e p21, bem como de Bax e Bcl-2;
- 5) TRANSCINAM inibe a capacidade de migração de células CHL-1 e induz reorganização dos filamentos de actina e microtúbulos;
- 6) TRANSCINAM representa um protótipo promissor para futuras investigações na busca por candidatos a fármacos antineoplásicos.

REFERENCIAS

AKBANI, R. *et al.* Cancer Genome Atlas Network: Genomic classification of cutaneous melanoma. **Cell.**, v. 161, p. 1681–1696, 2015.

ALI, Z.; YOUSAF, N.; LARKIN, J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. **EJC.**, Suppl.11, p. 81–91, 2013.

ALI, M. *et al.* In vitro cytotoxicity screening of wild plant extracts from Saudi Arabia on human breast adenocarcinoma cells. **Genet. Mol. Res.**, v. 13, p. 3981–3990, 2014.

ALLARDICE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and futures prospects. *Platinum Metals Review*. **Hesl.**, v.45, n. 2, p. 62-69, 2001.

ALESSIO, E.; MESSORI, L. NAMI-A and KP1019/1339, two iconic ruthenium anticancer drug candidates face-to-face: A case story in medicinal inorganic chemistry. **Molecules.**, v. 24 p. 10, 2019.

AMENDOLA, L. C.; VIEIRA, R. The contribution of BRCA genes in the hereditary predisposition to breast cancer. **Ver. Bras. de Canc.**, v. 51, n. 4, p. 325330, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Melanoma skin cancer treatment**. Ilumina.

Disponível em:

<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estadiamento-do-cancer-de-pele-melanoma/558/187/>
acesso em: 12 apr., 2021.

ANAI, S. *et al.* Downregulation of BCL-2 induces downregulation of carbonic anhydrase IX, vascular endothelial growth factor, and pAkt and induces radiation sensitization. **Urology**, v. 70, p. 832 – 837, 2007.

ANG W. H. *et al.* Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action. **Organomet. Chem.**, v. 696, p. 989-998, 2011.

ARELLANO, M.; MORENO, S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 29, p. 559-573, 1997.

AUSTIN, E. *et al.* Laser and light-based therapy for cutaneous and soft-tissue metastases of malignant melanoma: a systematic review. **Arch Dermatol Res.**, v. 390, p. 229–242, 2017.

AZMI, A.S.; MOHAMMAD, R.M. Non-peptidic small molecule inhibitors against Bcl-2 for cancer therapy. **J. Cell Physiol.**, v. 218, p. 13–21, 2009

AZMI, A.S. *et al.* Emerging Bcl-2 inhibitors for the treatment of cancer. **Exp. Op. Em. Drug.**, v. 16, p. 59–70, 2011.

BAGULEY, B.C. Multidrug resistance in cancer. **Methods Mol Biol.**, v. 96, p. 1–14, 2010.

BALLANTYNE, A.D.; GARNOCK-JONES, K.P. Dabrafenib: first global approval. **Drugs.**, v. 73, p. 1367–1376, 2013.

BATUS, M. *et al.* Optimal management of metastatic melanoma: current strategies and future directions. **Am J Clin Dermatol.**, v. 14, p. 179–194, 2013.

BAUER, J.; GARBE, C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. Uma revisão abrangente dos dados epidemiológicos. **Pigment Cell Res.**, v. 16, p. 297–306, 2003.

BEATY, B. T.; CONDEELIS, J. Digging a little deeper: the stages of invadopodium formation and maturation. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 93, p. 438–444, 2014.

BERGAMO, A. *et al.* Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **Jour.l of Inorg. Biochem.**, v. 106, p. 90-99, 2012.

BÉZIVIN, C. *et al.* Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytom.**, v. 10, p. 499-503, 2003.

BERWICK, M.; WIGGINS, C. The current epidemiology of cutaneous malignant melanoma. **Front Biosci.**, v. 11, p. 1244–1254, 2006.

BHATTI, M.Z. *et al.* Anticancer activity and mechanism of bis-pyrimidine based dimetallic Ru(II)(η^6 -p-cymene) complex in human non-small cell lung cancer via p53-dependent pathway. **J. Inorg Biochem.**, v. 194, p. 52-64, 2019.

BOLDEN, J.E.; PEART, M.J.; JOHNSTONE, R.W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 5, p.769-784, 2006.

BOMBELLI, F.B. *et al.* The scope of nanoparticle therapy for future metastatic melanoma treatment. **Lancet Oncol.**, v. 15, p. e22 – e32, 2014.

BRASIL. Tipo de Câncer. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, Brasília, 2018.

Disponível em:<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao>>
Acesso 30 mar., 2021.

BROSE, M.S. *et al.* BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. **Cancer Res.**, v. 62, p. 6997–7000, 2002.

BROWN, S.B.; BROWN, E.A.; WALKER I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncol.**, v. 5, p. 497–508, 2004.

BRUNET, J-F. *et al.* A new member of the immunoglobulin superfamily CTLA-4. **Nature.**, v. 328, p. 267–270, 1987.

BURRIS, H.A. *et al.* Safety and activity of IT-139, a ruthenium-based compound, in patients with advanced solid tumours: A first-in-human, open-label, dose-escalation phase I study with expansion cohort. **ESMO. Open.**, v. 1, p. e000154, 2016.

CHAPMAN, P.B.*et al.* Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **N Engl J Med.**, v. 364, p. 2507–2516, 2011.

CHELOPO, M.P. *et al.* Anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes bearing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline amino alcohol ligands. **Eur J Med Chem.**, v. 66, p. 407-414, 2013.

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

CHEN, J. *et al.* Investigation of inducing apoptosis in human lung cancer A549 cells and related mechanism of a ruthenium(II) polypyridyl complex. **Inorganic Chemistry Communications, Zhanjiang**, v. 69, p. 35–39, 2016

CHEN, L. *et al.* The studies on the cytotoxicity in vitro, cellular uptake, cell cycle arrest and apoptosis-inducing properties of ruthenium methylimidazole complex [Ru(MeIm)₄(p-cpip)]²⁺. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 156, p. 64–74, 2016.

CHEN, Y. *et al.* A ruthenium(II) beta-carboline complex induced p53-mediated apoptosis in cancer cells. **Biochimie**, v. 95, p. 2050-2059, 2013.

CHIRIBOGA, L. *et al.* Endothelin-1 in the tumor microenvironment correlates with melanoma invasion. **Melanoma Res.**, v. 26, p. 236–244, 2016.

CIARIMBOLI, G. *et al.* D membrane transporters as mediators of cisplatin side-effects. **Anticancer research.**, v. 34, p. :547–50, 2014.

CURTIN, J.A. *et al.* Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **N Engl J Med.**, v. 353, p. 2135–2147, 2005.

DAN WAN, *et al.* Synthesis and anticancer properties of ruthenium (ii) complexes as potent apoptosis inducers through mitochondrial disruption. **Eur J Med Chem.**, v. 139, p. 180-190, 2017.

DAVEY, R.J.; WESTHUIZEN, A.V.; BOWDEN, N.A. Metastatic melanoma treatment: Combining old and new therapies. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 98, p. 242-253, 2016.

de LIMA A.P., *et al.*. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by ruthenium complex cis-(dichloro)tetramineruthenium(III) chloride in human lung carcinoma cells A549. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 147, p. 8-15, 2012.

DONEHOWER, L.A., *et al.* Integrated Analysis of TP53 gene and pathway alterations in The cancer genome atlas. **Cell Rep.**, v. 30, p. 1370-1384.e5, 2019.

DOUGHERTY, T.J. *et al.* Photodynamic therapy. **J Natl Cancer Inst.**, v. 90, p. 889–905, 1989.

DU K.J. *et al.* Synthesis, DNA-bindings and topoisomerase inhibitory activity of ruthenium (II) polypyridyl complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry.**, v. 46, p. 1056-1065, 2011.

DU, T.A. Cell death: balance through a bivalent regulator. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 14, p. 546, 2013.

DU, K. J. *et al.* Synthesis, DNA-bindings and topoisomerase inhibitory activity of ruthenium (II) polypyridyl complexes. **Eur. Jour. of Med. Chemistry.**, v. 46, p. 1056-1065, 2011.

DUMMER, R. *et al.* Melanoma cutâneo: diretrizes de prática clínica ESMO para diagnóstico, tratamento e acompanhamento. **Ann Oncol.**, Suppl. 5, v. 126-132, 2015.

DURONIO, R.J.; XIONG, Y. Signaling pathways that control cell proliferation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 5, p. a008904, 2013.

EDDY, R. J. *et al.* Tumor cell invadopodia: invasive protrusions that orchestrate metastasis. **Trends Cell Biol.**, v. 27, p. 595–607, 2017.

EDIRIWEERA, M.K. *et al.* A study of the potential anticancer activity of *Mangifera zeylanica* bark: Evaluation of cytotoxic and apoptotic effects of the hexane extract and bioassay-guided fractionation to identify phytochemical constituents. **Oncol Lett.**, v. 11, p. 1335-1344, 2016.

EKMEKCIOGLU, C. *et al.* Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. **Cancer Lett.**, v. 128, p. 137-144, 1998.

EMRI, G. *et al.* Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: An update. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 185, p. 169-175, 2018.

FALZONE, L. *et al.* Occupational exposure to carcinogens: benzene, pesticides and fibers (Review). **Mol Med Rep.**, v. 14, p. 4467–4474, 2016.

FALZONE, L, *et al.* MMP-9 overexpression is associated with intragenic hypermethylation of MMP9 gene in melanoma. **Aging.**, v. 8, p. 933–944, 2016.

FERLAY, J. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer.**, v. 136, p. E359-386, 2015.

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN. **Int J Cancer**, v. 136, p. E359–E386, 2012.

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, p. 359-386, 2014.

FERREIRA-SILVA, G. A. *et al.* [Ru (tubo) (dppb) (bipy)] PF₆: A novel ruthenium complex that effectively inhibits ERK activation and cyclin D1 expression in A549 cells. **Toxicol In Vitro**, v. 44, p. 382-391. 2017.

FILAK, L.K., *et al.* Organometallic indolo[3,2-c]quinolines versus indolo[3,2-d]benzazepines: synthesis, structural and spectroscopic characterization, and biological efficacy. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 15, p. 903-918, 2010.

FISCHER, G.M. *et al.* Metabolic strategies of melanoma cells: Mechanisms, interactions with the tumor microenvironment, and therapeutic implications. **Pigment Cell Melanoma Res.**, v. 31, p. 11– 30, 2018.

FLAHERTY, K.T. *et al.* Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. **N Engl J Med.**, v. 367, p. 107–114, 2012.

FLAHERTY, K.T. Targeting metastatic melanoma. *Annu. Rev Med.*, v. 63, p. 171–183, 2012.

FRANKLIN, C. *et al.* Immunotherapy in melanoma: recent advances and future directions. **Eur J Surg Oncol.**, v. 43, p. 604–661, 2017.

GAIDDON, C. *et al.* Ruthenium (II)-Derived Organometallic Compounds Induce Cytostatic and Cytotoxic Effects on Mammalian Cancer Cell Lines through p53-Dependent and p53-Independent Mechanisms. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, p. 1403–1411, 2005.

GAVA, B. *et al.* Inhibition of B16 melanoma metastases with the ruthenium complex imidazolium trans-imidazoledimethylsulfoxide-tetrachlororuthenate and downregulation of tumor cell invasion. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 317, p. 28491, 2006

GERSHENWALD, J.E. Experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. **J Clin Oncol.**, v. 17, p. 976–983, 1999.

GERSHENWALD, J.E. *et al.* Melanoma of the skin. In: Amin MB, Edge SB, Greene FL, *et al.*, editors. **AJCC Cancer Staging Manual: Springer International Publishing**, p. 563–585, 2017.

GIDE, T.N. *et al.* Primary and acquired resistance to immune checkpoint inhibitors in metastatic melanoma. **Clin Cancer Res.**, v. 24, p. 1260–1270, 2018.

GIEHL, K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. **Biol Chem.**, v. 386, p. 193–205, 2005.

GILCHREST, B.A. *et al.* A patogênese do melanoma induzido por radiação ultravioleta. **N Engl J Med.**, v. 340, p. 1341–1348, 1999.

GORDEN, A. *et al.* Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. **Cancer Res.**, v. 63, p. 3955-7, 2003.

GRAMINHA, A.E. *et al.* Evaluation of the biological potential of ruthenium(II) complexes with cinnamic acid. **J Inorg Biochem.**, v. 206, p. 111021, 2020.

GUARNERI, C. *et al.* NF- κ B inhibition is associated with OPN/MMP 9 downregulation in cutaneous melanoma. **Oncol Rep.**, v. 37, p.737–746, 2017.

HAGMANN, W.K. The Many Roles for Fluorine in Medicinal Chemistry. **J. Med. Chem.**, v. 51, p. 4359–4369, 2008.

HAN, B. *et al.* DNA interaction, antioxidant activity and bioactivity studies of two ruthenium (II) complexes. *Spectrochimica Acta part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 135, p. 840-849, 2015.

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

HANAHAHAN, R.A.; WEINBERG, D. The hallmarks of cancer. **Cell.**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HANDOLIAS, D. *et al.* Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure. **Pigment Cell Melanoma Res.**, v. 23, p. 210–215, 2010.

HANSON, D.C. *et al.* Preclinical in vitro characterization of anti-CTLA4 therapeutic antibody CP-675,206. **Am Assoc Cancer Res.**, v. 64, p. 877, 2004.

HARTINGER, C. G.; DYSON, P. J. Bioorganometallic chemistry-from teaching paradigms to medicinal applications. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, p. 391-401, 2009.

HARTINGER, C.G. *et al.* From bench to bedside--preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). **J Inorg Biochem.**, v. 100, p. 891-904, 2006.

- HAWKES, J.E. *et al.* Genetic predisposition to melanoma. **Semin Oncol.**, v. 43, p: 591–597, 2016.
- HENDERSON, B.W.; DOUGHERTY, T.J. How does photodynamic therapy work? **Photochem Photobiol.**, v. 55, p. 145–157, 1992.
- HERLYN, M. Human melanoma: development and progression. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 9, p. 101-12, 1990.
- HODI, F.S. *et al.* Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **N Engl J Med.**, v. 363, p. 7411-723, 2010.
- HODIS, E. *et al.* A landscape of driver mutations in melanoma. **Cell**, v. 150, p. 251–263, 2012
- HUANG, Y-Y. *et al.* Melanoma resistance to photodynamic therapy: new insights. **Biol Chem.**, v. 394, p. 239–250, 2013.
- HYNES, J. *et al.* Fluorescence-based cell viability screening assays using water-soluble oxygen probes. **Jour. of biomol. Screen.**, v. 8, p. 264-272, 2003.
- JAKOB, J. A. *et al.* NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. **Cancer**, v. 118, p. 4014–4023J, 2012.
- JIANG, B.P. *et al.* Poly(N-phenylglycine)-based nanoparticles as highly effective and targeted near-infrared photothermal therapy/photodynamic therapeutic agents for malignant melanoma. **Small**, v. 13, p. 1–15, 2017.
- KARIMIAN, A.; AHMADI, Y.; YOUSEFI, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **DNA Repair (Amst)**, v. 42, p. 63-71, 2016.

KAUFMANN, W. K. *et al.* Defective cell cycle checkpoint functions in melanoma are associated with altered patterns of gene expression. **J Invest Dermatol.**, v. 128, p. 175-87, 2008.

KIM, C. *et al.* Long-term survival in patients with metastatic melanoma treated with DTIC or temozolomide. **Oncologist.**, v. 15, p. 765–771, 2010.

KISOVA, A. *et al.* Differences in the cellular response and signaling pathways between cisplatin and monodentate organometallic Ru(II) antitumor complexes containing a terphenyl ligand. **Mol Pharm.**, v. 6;8, p. 949-957, 2011.

KRAEHN, G.M. *et al.* Extra c-myc oncogene copies in high risk cutaneous malignant melanoma and melanoma metastases. **Br J Cancer**, v. 84, p. 72–79, 2001.

KRAUTHAMMER, M., *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. **Nat Genet.**, v. 44, p. 1006–1014, 2012.

KREIS, N. N.; LOUWEN, F.; YUAN, J. The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/*CDKN1A*) in cell differentiation, migration and cancer therapy. **Cancers (Basel)**, v. 11, p. 1220, 2019.

KRIEG, C. *et al.* Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, p. 11906–11911, 2010.

LAI, S. *et al.* Cytotoxicity activity, DNA damage, cellular uptake, apoptosis and western blot analysis of ruthenium (II) polypyridyl complex against human lung carcinoma A549 cell. **Jour. of Inorg. Biochem.**, v. 152, p. 1-9, 2015.

LARKIN, J. *et al.* Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. **The New Eng. jour. of medic.**, v. 373, p. 23-34, 2015.

LEE, J. H.; CHOI, J. W.; KIM, Y. S. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. **Br J Dermatol.**, v. 164, p. 776-84, 2011.

LEE, J.T.; HERLYN, M. MEK'ing the most of p53 reactivation therapy in melanoma. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, p. 263-265, 2012.

LEE, K.R. *et al.* Polysaccharide from inonotus obliquus inhibits migration and invasion in B16-F10 cells by suppressing MMP-2 and MMP-9 via downregulation of NF- κ B signaling pathway. **Oncol Rep.**, v. 31, p. 2447–2453, 2014.

LEITER, U.; GARBE, C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer – The role of sunlight, sunlight, vitamin D and skin cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 624, p. 89-103, 2008.

LENTZ, F. *et al.* Central European Society for anticancer drug research-EWIV. pharmacokinetics of a novel anticancer ruthenium complex (KP1019, FFC14A) in a phase I dose-escalation study. **Antic. Drugs.**, v. 20, p. 97-103, 2009.

LEONARDI, G.C. *et al.* Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy. **Inter. Jour. of Oncology**, v. 52, p. 1071-1080, 2018.

LEVINE, A.J.; MOMAND, J.; FINLAY, C.A. The p53 tumour suppressor gene. **Nature**, v. 351, p. 453–456, 1991.

LI, J. *et al.* Recent advances in targeted nanoparticles drug delivery to melanoma. **Nanomedicine**, v. 111, p. 769–794, 2015.

LI, W. Ruthenium(II) complexes: DNA-binding, cytotoxicity, apoptosis, cellular localization, cell cycle arrest, reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential and western blot analysis. **J.Photoch. Photobio. B.**, v. 140, p. 94-104, 2014.

LI, L. *et al.* Synthesis, in vitro e in vivo da actividade antitumoral scopoletin- cinnamic acid hybrids. **Eur J Med Chem.**, v. 93, p. 300-307, 2015.

LI, W. *et al.* Anticancer activity studies of a ruthenium(II) polypyridyl complex against human hepatocellular (BEL-7402) cells. **Spectrochimica Acta part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 150, p. 127-134, 2015.

LIMA, L.P. *et al.* Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium(II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PLoS One**, v. 9, p. 1-11, 2014.

LIMA, G. D. d. A. *et al.* Synthesis and antimetastatic activity evaluation of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions. **Toxic. in Vit.**, v. 53, p. 1–9, 2018.

LIN, C.Y. *et al.* Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. **Cell**, v. 151, p. 56–67, 2012.

LINDER, S., WIESNER, C., HIMMEL, M. Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v. 27, p. 185-211, 2011

LING, Y. *et al.* Novel FTS-diamine/cinnamic acid hybrids inhibit tumor cell proliferation and migration and promote apoptosis via blocking Ras-related signaling in vitro, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, v. 75, p. 381–392, 2015.

LIU L. *et al.* Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention. **Int J Cancer**, v. 62, p. 345-350, 1995.

LIVINGSTONE, E. *et al.* BRAF, MEK and KIT inhibitors for melanoma: adverse events and their management. **Chin Clin Oncol.**, v. 3, p. 29, 2014.

LONG, G.V *et al.* Adjuvant dabrafenib plus trametinib in stage III BRAF-mutated melanoma. **N Engl J Med.**, v. 377, p. 1813-1823, 2017

LONG, G. V. A. *et al.* Prognostic and clinic pathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 29, p. 1239–1246, 2011.

LONGO, J. *et al.* Preventing metastasis by targeting lymphatic vessels with photodynamic therapy based on nanostructured photosensitizers. **J Nanom.**, v. 6, p. 1, 2015.

LOZYSKYI, A.; ZIMENKOVSKY, B.; LESYK, R. Synthesis and anticancer activity of new thiopyrano[2,3-d]thiazoles based on cinnamic acid amides. **Sci. Pharm.**, v. 82, p. 723-733, 2014.

LUNDBERG, A. S.; WEINBERG, R. A. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin cdk complexes. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, p. 753–761, 1998.

LUZINA, E. L.; POPOV, A.V. Synthesis and anticancer activity evaluation of 3,4-mono- and bicyclosubstituted *N*-(het)aryl trifluoromethyl succinimides. **J Fluor Chem.**, v. 168, p. 121-127, 2014.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin dependent kinases. **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, p. 630–641, 2005.

MALUMBRES, M.; ARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nature Rev. Cancer**, v. 1, p. 222–231, 2001.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Rev. Cancer**, v.9, p. 153–166, 2009.

MARTY, M. *et al.* Electrochemotherapy: an easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. **Eur J Cancer Suppl.**, v. 1, p. 3–13, 2006.

MATTHIESSEN, L.W. *et al.* Management of cutaneous metastases using electrochemotherapy. **Acta Oncol.**, v. 50, p. 621–629, 2011.

MIDDLETON, M.R. *et al.* Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. **J Clin Oncol.**, v. 18, p.158–166, 2000.

MIKLAVČIČ, D. *et al.* Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. **Med Biol Eng Comput.**, v. 50, p. 1213–1225, 2012.

MILLER, A.J, MIHM, M.C. Jr. Melanoma. **N Engl J Med.**, v. 355, p. 51–65, 2006.

MILLER, K.D. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 69, p. 363-385, 2019.

MOHAMMAD, R.M. *et al.* Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. **Semin Cancer Biol.**, Suppl. 0, p. S78-S103, 2015.

MONDELLI, M. A. *et al.* Ruthenium(II)/4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine complexes: synthesis, characterization, X-ray structures and in vitro cytotoxicity activities on cancer cell lines. **Polyhedron.**, v. 68, p. 312–318, 2014.

MORO, N.; MAUCH, C.; ZIGRINO, P. Metalloproteinases in melanoma. **Eur J Cell Biol.**, v. 93, p. 23–29, 2014.

MOSES, C. *et al.* Hallmarks of cancer: The CRISPR generation. **Eur J Cancer.**, v. 93, p. 10-18, 2018.

MUELLER, K.; FAEH, C.; DIEDERICH, F. Fluorine in Pharmaceuticals: looking beyond intuition. **Science**, v. 317, p. 1881–1886, 2007.

MUSGROVE, E. *et al.* Ruthenium in Medicine: current clinical uses and futures prospects. **Platinum Metals Review**, v.45, p. 62-69, 2001.

MUSGROVE, E. *et al.* Transferrin receptor expression during exponential and plateau phase growth of human tumour cells in culture. **Journal of Cellular Physiology**, v. 118, p. 6-12, 1984.

MUTHUSWAMY, S.K.; XUE, B. Cell polarity as a regulator of cancer cell behavior plasticity. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v. 28, p. 599-625, 2012.

NAZARIAN, R. *et al.* Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. **Nature.**, v. 468, p. 973-977, 2010.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.**, v. 79, p. 629–661, 2016.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **J. Nat. Prod.**, v. 83, p. 770-803, 2020

NIERO, E.; SANTELLI, M. Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma. **Jour. of Exper. and Clin. Cancer Research**, v. 32, p. 31, 2013.

NISSAN, M.H. *et al.* Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. **Cancer Res.**, v. 74, p. 2340–2350, 2014.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 592 - 603, 2004.

ORAMAS-ROYO, S. Synthesis and cytotoxic activity of metallic complexes of lawsone. **Bioorg.Med.Chem.**, v. 21, p. 2471-2477, 2013.

PAPPALARDO, F. *et al.* Computational Modeling of PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways in Melanoma Cancer. **PLoS ONE**, v. 11, p. e0152104, 2016.

PÉREZ-SACAU, E. Synthesis and pharmacophore modeling of naphthoquinone derivatives with cytotoxic activity in human promyelocytic leukemia HL-60 cellline. **J. Med. Chem.**, v. 50, p. 696-706, 2007.

PATEL, P. M. *et al.*, EORTC Melanoma Group. Extended schedule, escalated dose temozolomide versus dacarbazine in stage IV melanoma: final results of a randomised phase III study (EORTC 18032). **Eur J Cancer**, v., 47, p. 1476-1483, 2011.

PONTIKI, E. *et al.* Novel cinnamic acid derivatives as antioxidant and anticancer agents: design, synthesis and modeling studies. **Molecules**, v. 19, p. 9655-9674, 2014.

PRASAD, R.; KATIYAR, S. K. Polyphenols from green tea inhibit the growth of melanoma cells through inhibition of class I histone deacetylases and induction of DNA damage. **Genes Cancer**, v. 6, p. 49-61, 2015.

PRÉVEL, C. *et al.* Fluorescent peptide biosensor for monitoring CDK4/cyclin D kinase activity in melanoma cell extracts, mouse xenografts and skin biopsies. **Biosens Bioelectron.**, v. 85, p. 371–380, 2016.

RADEMAKER-LAKHAI, J. M. *et al.* A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. **Clin Cancer Res.**, v. 10, p. 3717-27, 2004.

RAEDLER, L. A. Opdivo (nivolumab): second PD-1 inhibitor receives FDA approval for unresectable or metastatic melanoma. **Am Health Drug Benefits.**, v. 8, p. 180–183, 2015.

RAFIQUE, I.; KIRKWOOD, J. M.; TARHINI, A. A. Immune checkpoint blockade and interferon- α in melanoma. **Semin Oncol.**, v. 42, p. 436–447, 2015.

RASTRELLI, M. *et al.* Melanoma: Epidemiologia, fatores de risco, patogênese, diagnóstico e classificação. **Na Vivo**, v. 28, p. 1005–1011, 2014.

RAYSOVA, M. *et al.* The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, p. 333-340, 2001.

RIBAS, A. *et al.* Intratumoral immune cell infiltrates, FoxP3, and indoleamine 2,3-dioxygenase in patients with melanoma undergoing CTLA4 blockade. **Clin Cancer Res.**, v. 15, p. 390–399, 2009.

RICHMOND, C.S. *et al.* Sequential treatment failures in response to BRAF/MEK and immune checkpoint inhibitors mediated by MAP2K2 and B2M mutations in melanoma. **Exp Mol Pathol.**, v. 10, p. 104260, 2019.

RIDLEY, A. J. *et al.* Cell migration: Integrating signals from front to back. **Science.**, v. 302, p. 1704–1709, 2003.

RIZOS, H. *et al.* BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical impact. **Clin Cancer Res.**, v. 20, p. 1965–1977, 2014.

RUBINSTEIN, J.C. *et al.* Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. **J Transl Med.**, v. 8, p. 67, 2010.

RUWIZHI, N.; ADERIBIGBE, B.A. Cinnamic acid derivatives and your biological efficacy. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, p. 5712, 2020

SANDRI, S. *et al.* Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. **Pharmacol Res.**, v. 111, p. 523–533, 2016.

SANLORENZO, M. *et al.* Role of interferon in melanoma: old hopes and new perspectives. **Expert Opin Biol Ther.**, v. 17, p. 475–483, 2017.

SAVA, G.; BERGAMO, A.; DYSON, P. J. Metal-based antitumour drugs in the post-genomic era: what comes next? **Dalton Trans.**, v. 40, p. 9069-9075, 2011.

SCHOR, S.L. *et al.* Subpopulations of fetal-like gingival fibroblasts: characterisation and potential significance for wound healing and the progression of periodontal disease. **Oral Disease**, v. 2, p. 155–166, 1996.

SHAMLOO, B.; USLUER, S. p21 in Cancer Research. **Cancers (Basel)**, v. 11, p. 1178, 2019.

SHARMA, P. *et al.* Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. **Cell**, v. 168, p. 707–723, 2017.

SHARMA, A.; PRASAD, D.; SINGH, R. K. Journal of chemical and pharmaceutical research. **J. Chem.**, v. 3, p. 424–431, 2011.

SILVA, L. R. J. *et al.* Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and material risk for down syndrome in Brazil. **Am. J. Med. Genet.**, v. 135, p. 263-267, 2005.

SIMÃO, T. A. *et al.* Tp53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio de Janeiro, Brazil: association with risk factors and tumor characteristics. **Inter. Jour. of Cancer**, v.101, p. 69–73, 2002.

SINGH, B.P.; SALAMA, A.K. Updates in Therapy for Advanced Melanoma. **Cancers (Basel.)**, v. 8, p. 17, 2016.

SINGH, R.; LETAI, A.; SAROSIEK, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 20, p. 175-193, 2019.

SOLTANIAN, S. Effect of Cinnamic acid and FOLFOX in diminishing side population and downregulating cancer stem cell markers in colon cancer cell line HT-29. **Daru.**, v. 26, p. 19–29, 2018.

SPECENIER, P. Nivolumab in melanoma. **Expert Rev Anticancer Ther.**, v. 16, p. 1247–1261, 2016.

STEPANENKO, I. N. *et al.* Conjugation of organoruthenium(II) 3-(1H-benzimidazol-2-yl)pyrazolo[3,4-b]pyridines and indolo[3,2-d]benzazepines to recombinant human serum albumin: a strategy to enhance cytotoxicity in cancer cells. **Inorg. Chem.**, v. 50, p. 12669-12679, 2011.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M.; HOSTETTMANN, K. Assays for bioactivity in methods in plant biochemistry. **Academic Press.**, v. 6, p. 71-134, 1991.

SULAIMON, S. S.; KITCHELL, B. E. The Basic Biology of Malignant Melanoma: Molecular Mechanisms of Disease Progression and Comparative Aspects. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, p. 760–772, 2003.

SUN, D. *et al.* Anti-tumor activity and mechanism of apoptosis of A549 induced by ruthenium complex. **J Biol Inorg Chem.**, v. 16, p. 1391-1896, 2016.

TESTORI, A.; RIBERO, S.; BATAILLE, V. Diagnosis and treatment of in-transit melanoma metastases. **Eur J Surg Oncol.**, v. 43, p. 544–560, 2017.

THAKUR, V.S.; GUPTA, K.; GUPTA, S. Green tea polyphenols causes cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells by uppressing class I histone deacetylases. **Carcinogenesis**, v. 33, p. 377-384, 2012.

TSAI, C. M. *et al.* Molecular mechanism depressing PMA-induced invasive behaviors in human lung adenocarcinoma cells by cis- and trans-cinnamic acid. **Eur J Pharm Sci.**, v. 48, p. 494-501, 2013.

TSAI, C. M. J. *et al.* Assessment of the antiinvasion potential and mechanism of select cinnamic acid derivatives on human lung adenocarcinoma cells. **Mol. Pharm.**, v. 10, p. 1890–1900, 2013.

TUCKER, C. A. *et al.* Silencing Bcl-2 in models of mantle cell lymphoma is associated with decreases in cyclin D1, nuclear factor-kappaB, p53, bax, and p27 levels. **Mol Cancer Ther.**, v. 7, p. 749–758, 2008.

VAN ZEIJL, M. C. *et al.* (Neo)adjuvant systemic therapy for melanoma. **Eur J Surg Oncol.**, v. 43, p. 534-543, 2017.

VELOZO-SÁ, V. S. *et al.* *In vitro* toxicity evaluation of in vitro and zebrafish toxicity of Ru(ii) / 2-mercaptopyrimidine complexes. **Dalton Trans.**, v. 48, p. 6026-6039, 2019.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell proliferation**, v. 36, p. 131-149, 2003.

VOGELSTEIN, B.; LANE D.; LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, p. 307–310, 2000.

VOGELSTEIN, B. *et al.* Genome landscapes. **Science**, v. 339, p. 1546–1558, 2017

WANG, Y.F. *et al.* Apoptosis induction in human melanoma cells by inhibition of MEK is caspase-independent and mediated by the Bcl-2 family members PUMA, Bim, and Mcl-1. **Clin Cancer Res.**, v. 13, p. 4934–4942, 2007.

WANG, J-Q. *et al.* Mitochondria are the primary target in the induction of apoptosis by chiral ruthenium(II) polypyridyl complexes in cancer cells. **J Biol Inorg Chem.**, v. 19, p. 335–348, 2014.

WATERHOUSE, P. *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4. **Science**, v. 270, p. 985–985, 1995.

WHO. World Health Statistics: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: **World Health Organization**, 2020.

WIDAKOWICH, C. *et al.* Side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. **Oncologist.**, v. 12, p. 1443–1455, 2007.

WU, B. Specific DNA structural attributes modulate platinum anticancer drug site selection and cross-link generation. **Nucleic Acids. Res.**, v. 39, p. 8200-82017, 2011.

WU, Q. *et al.* Arene ruthenium(ii) complex, a potent inhibitor against proliferation, migration and invasion of breast cancer cells, reduces stress fibers, focal adhesions and invadopodia. **Metallomics: integrated biometal science**, v. 6, p. 2204–2212, 2014.

XIONG, Y. *et al.* p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. **Nature**, v. 366, p. 701-704, 1993.

XU, C.C. *et al.* Synthesis and in vitro antitumor evaluation of dihydroartemisinin-cinnamic acid ester derivatives. **Eur J Med Chem.**, v. 107, p. 182-203, 2016.

YANG, J. *et al.* Novel small molecule XPO1/CRM1 inhibitors induce nuclear accumulation of TP53, phosphorylated MAPK and apoptosis in human melanoma cells. **PLoS One**, v. 9, p. e102983, 2014.

YEN, G.C. *et al.* A comparative study on the effectiveness of cis- and trans-form of cinnamic acid treatments for inhibiting invasive activity of human lung adenocarcinoma cells. **Eur J Pharm Sci.**, v. 44, p. 281-287, 2011.

YI, L. *et al.* Dynamic imaging of MYC and CDKN1A mRNA as an indicator of cell G1-phase arrest. **Chemical communications**, v. 53, p. 1900-1903, 2017.

YIN, R. *et al.* Photodynamic therapy with decacationic [60]fullerene monoadducts: effect of a light absorbing electron-donor antenna and micellar formulation. **Nanomedicine**, v. 10, p. 795–808, 2014.

ZENG, C.C. *et al.* Synthesis, characterization and anticancer activity studies of ruthenium(II) polypyridyl complexes on A549 cells. **Journal of Photochemistry & Photobiology: Biology**, v. 161, p. 295–303, 2016.

ZHANG, T. *et al.* The genomic landscape of cutaneous melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res.**, v. 29, p. 266–283, 2016.

ZHENG, K. *et al.* Ruthenium(II) complexes as potential apoptosis inducers in chemotherapy. **Anticancer Agents Med Chem.**, v. 17, p. 29-39, 2017.

ZHU, B. Inhibition of histone deacetylases by trans-cinnamic acid and its antitumor effect against colon cancer xenografts in athymic mice. **Mol Med Rep.**, v. 13, p. 4159-66, 2016.

ZHUANG, D. *et al.* C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells. **Oncogene**, v. 27, p. 6623-6634, 2008.