

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GUILHERME ALVARO FERREIRA DA SILVA

**ESTUDO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE COMPLEXOS DE
RUTÊNIO (II) COORDENADOS A ÁCIDOS ORGÂNICOS SOBRE
CARCINOMA DE PULMÃO HUMANO**

Alfenas/MG

2017

GUILHERME ALVARO FERREIRA DA SILVA

**ESTUDO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE COMPLEXOS DE
RUTÊNIO (II) COORDENADOS A ÁCIDOS ORGÂNICOS SOBRE
CARCINOMA DE PULMÃO HUMANO**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em Biociências
Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de
Alfenas.

Área de Concentração: Fisiopatologia

Orientador: Prof^ª Dr^ª Marisa Ionta.

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Jaqueline Carvalho de
Oliveira.

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Silva, Guilherme Alvaro Ferreira da.
Estudo *in vitro* do potencial antitumoral de complexos de rutênio
(II) coordenados a ácidos orgânicos sobre carcinoma de pulmão
humano / Guilherme Alvaro Ferreira da Silva. -- 2017.
88 f. : il.

Orientadora: Marisa Ionta.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, 2017.
Bibliografia.

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

CDD 616.99424

GUILHERME ÁLVARO FERREIRA DA SILVA

“ESTUDO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE COMPLEXOS DE RUTÊNIO (II) COORDENADOS A ÁCIDOS ORGÂNICOS SOBRE CARCINOMA DE PULMÃO HUMANO”.

A Banca Examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Área de concentração: Fisiopatologia.

Aprovado em: 16/02/17

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

Assinatura:  _____

Prof. Angel Maurício Castro Gamero
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Prof Tiago Góss dos Santos
Instituição: Fundação Antônio Prudente
FAP -

Assinatura:  _____

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dra. Marisa Ionta, meu exemplo de profissionalismo, competência, dedicação e vida.

À Hello, por escolher passar pela vida ao meu lado.

Ao Bernardo, por ter me feito à pessoa mais feliz do mundo.

Aos meus pais, por terem me ensinado o verdadeiro valor das coisas, meus exemplos de bondade, perseverança e amor.

Aos meus irmãos Gustavo e Maria, pela admiração e por estarem no caminho certo.

A toda a minha família, que sempre torceu pelas minhas conquistas.

Ao Paulo e Lazára, por confiarem a vida de sua filha e neto a mim.

Ao Renato, Camila e Guiomar, minha família de Alfenas.

Aos meus melhores amigos Fernanda e Mateus, amigos de uma vida inteira.

Aos amigos do laboratório, Simone, Rodrigo, Leilane, Rafael, Isabel, Glícia e Évila pelas conversas, conselhos, choros e risadas. Tornaram meus dias melhores.

À Neusa, pela amizade e apoio técnico.

À Graciana, pela ajuda incondicional.

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

À Adriana, secretaria do PPGb, um anjo em minha vida.

À Dra. Marília Barbosa, Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto, as alunas Júlia Scaff e Marina Ortega, por terem sintetizado e confiado os complexos de rutênio II a minha experimentação.

Ao Prof. Dr. Angel Maurício Castro Gamero, pelos conselhos e disposição para participar das bancas de qualificação e defesa.

Ao Dr. Tiago Góss dos Santos, pelas críticas e pela participação na banca de aprovação deste trabalho.

À UNIFAL/MG, minha segunda morada.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

A Deus, por ter permitido que eu aprendesse tanto e por ter colocado pessoas excepcionais em meu caminho.

RESUMO

Segundo a última estimativa, realizada em 2012 pelo projeto GLOBOCAN/IARC, o tipo de câncer mais incidente no mundo foi o câncer de pulmão, com mais de 1,8 milhões de casos diagnosticados. No Brasil, em 2016, existiram mais de 17000 e 10000 novos casos de câncer de pulmão entre homens e mulheres, respectivamente. O tabagismo representa a principal causa do câncer de pulmão e os tratamentos disponíveis são pouco efetivos, pois geralmente o diagnóstico é realizado quando a doença encontra-se em estágio avançado. Apesar dos avanços terapêuticos nas últimas décadas, 14% dos pacientes diagnosticados sobrevivem 5 anos. Neste contexto, a busca por novas propostas terapêuticas para o câncer de pulmão torna-se relevante. Os compostos metálicos de rutênio surgiram como uma alternativa promissora aos compostos a base de platina, por serem menos tóxicos e mais seletivos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de novos complexos de rutênio (II), PIPE e CINAM, sobre o comportamento proliferativo de células da linhagem A549, as quais são derivadas de adenocarcinoma de pulmão humano, um dos subtipos de câncer mais frequentemente diagnosticados em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas. Além disso, objetivou-se entender os mecanismos envolvidos com a atividade antiproliferativa e citotóxica dos referidos complexos. A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico (MTS) e ensaio de exclusão por azul de tripano. Adicionalmente foi realizado ensaio de capacidade clonogênica e análise de progressão do ciclo celular. A observação do padrão de distribuição de elementos do citoesqueleto e a determinação do índice mitótico foram feitos a partir de preparações citológicas marcadas para tubulina e actina F. O potencial pró-apoptótico foi investigado através do ensaio de anexina V e ensaio de despolarização de membrana mitocondrial. Os resultados demonstram que ambos os complexos estudados são efetivos em reduzir a viabilidade e inibir a proliferação de células A549, contudo CINAM mostrou-se mais citotóxico em relação ao PIPE. Quando PIPE foi utilizado na concentração de 9 μM foi possível observar aumento na frequência de células em G0/G1 com concomitante redução da população em S, indicando bloqueio do ciclo celular na transição G1/S, provavelmente, em decorrência da redução dos níveis de fosforilação de ERK e redução de expressão de ciclina D1. O efeito citotóxico de PIPE (18 μM) e CINAM (2 e 4 μM) está relacionado com atividade pró-apoptótica desses compostos. Os dados obtidos no presente estudo demonstram que PIPE e CINAM são promissores agentes antitumorais.

Palavras-chave: Câncer de pulmão. Complexos metálicos. Rutênio. Atividade antiproliferativa, apoptose.

ABSTRACT

According to the last estimative performed in 2012 by GLOBOCAN/IARC, lung cancer is the most incident type of cancer with more than 1.8 million of diagnosed cases. In Brazil, there were more than 17,000 and 10,000 new cases of lung cancer in 2016, respectively, between men and women. Smoking represents the main cause of lung cancer, and available treatments are not very effective considering that the disease is commonly diagnosed in advanced stage. Although improving the therapeutic approach in the last decades, only 14% of the patients diagnosed with lung cancer survive for 5 years. In this framework, it is relevant to identify new therapeutic proposes against lung cancer. Ruthenium metal compounds emerge as a promising alternative to platinum-based compounds, therefore they displayed lower cytotoxic and they are more selectivity for tumor cells. Thus, the present study aimed to evaluate the effects of innovative ruthenium(II) complexes (PIPE and CINAM) on proliferative behavior of A549 cells, which are derived from human lung adenocarcinoma, a subtype of lung cancer more frequently diagnosed in patients with non-small cell lung cancer. Moreover, the possible molecular mechanisms involved with antiproliferative and cytotoxic activities of the ruthenium complexes were investigated. Cell viability was evaluated by colorimetric assay (MTS) and trypan blue exclusion assay. Clonogenic capacity assay and cell cycle analysis were also performed. Mitotic index determination and cytoskeleton analysis were carried out from cytological preparations stained for tubulin and F-actin. Pro-apoptotic potential was investigated through anexina V and membrane depolarization assays. Results demonstrated that both complexes (CINAM and PIPE) were effective in reducing cell viability and inhibiting proliferation of A549 cells, however CINAM was more cytotoxic than PIPE. When PIPE was used at 9 μM there was increase in G0/G1 cell population with concomitant reduction in frequency of cell in S-phase, indicating cell cycle arrest in G1/S transition. This event was, probably, due to reduction of phosphorylation levels of ERK and reduction of cyclin D1 expression. Cytotoxic effect of PIPE (18 μM) and CINAM (2 and 4 μM) is related to pro-apoptotic activity these compounds. Taken together, the data demonstrated that PIPE and CINAM are promising antitumor agents.

Key-words: Lung cancer. Metal complexes. Ruthenium. Antiproliferative activity. Apoptosis. A549 cells.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	- <i>Serine/Threonine-Specific Protein Kinase</i>
ALK	- <i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
ATM	- <i>Ataxia Telangiectasia Mutated serine-protein kinase</i>
ATR	- <i>Ataxia Telangiectasia and Rad3 related protein</i>
Bad	- <i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bak	- <i>Bcl-2 homologous antagonist/Killer</i>
Bax	- <i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	- <i>Bicinchoninic Acid</i>
Bcl-xL	- <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Bcl-W	- <i>Antiapoptotic bcl-2 family membe</i>
Bcl-2	- <i>B- cell lymphoma 2</i>
Bid	- <i>BH3-interacting domain agonist</i>
Bik	- <i>Bcl-2-interacting killer</i>
Caspase	- <i>Cysteine-aspartic acid protease</i>
CASP3	- <i>Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
CASP8	- <i>Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
CCND1	- <i>Cyclin D1</i>
Cdc25	- <i>Cell division cycle 25</i>
CDK	- <i>Cyclin-Dependent kinase</i>
Cdk1	- <i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
Cdk2	- <i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
CINAM	- <i>Complexo de Rutênio II coordenado ao ácido 3,4-cinâmico</i>
CKI	- <i>Cyclin-dependent kinases inhibitor</i>
CO₂	- <i>Carbon dioxide</i>
DAPI	- <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	- <i>Meio Eagle Modificado por Dulbecco</i>
DMSO	- <i>Dimetilsulfóxido</i>
DNA	- <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	- <i>Desvio padrão</i>

DXR	- Doxorubicina
ECL	- <i>Enhanced chemiluminescent</i>
EDTA	- <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGF	- Fator de crescimento epidermal
EGFR	- Receptor do fator de crescimento epidermal
EML4	- <i>Echinoderm microtubule-like protein 4</i>
ERK1/2	- <i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>
E2F-1	- Membro da família E2F de fatores de transcrição
FAS	- Receptor de superfície envolvido na ativação da apoptose
FBS	- <i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	- <i>Food And Drug Administration</i>
FITC	- <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
HCL	- <i>Hydrochloric acid</i>
IARC	- <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC₅₀	- Concentração inibitória média
IgG	- <i>Immunoglobulin G</i>
INK4	- <i>Inhibitor of Kinase 4</i>
K-RAS	- <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
M	- Molar
mA	- miliampère
MAPK	- <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCF-7	- Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
MEK	- <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MgCl₂	- <i>Magnesium chloride</i>
m-TOR	- <i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTS	- <i>(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)</i>
PBSA	- <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PI	- <i>Propidium iodide</i>
PIPE	- Complexo de Rutênio II coordenado ao ácido piperonílico
PI3K	- <i>Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase</i>
PVDF	- <i>Polyvinylidene fluoride</i>
pRb	- <i>Retinoblastoma Protein</i>

p21	-	<i>21 KDa protein</i>
p53	-	<i>53 KDa protein</i>
Raf	-	<i>serine/threonine-protein kinase</i>
RIPA	-	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
RNase	-	<i>Ribonuclease</i>
rpm	-	<i> rotações por minuto</i>
SDS	-	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TCT	-	<i>Tomografia computadorizada de tórax</i>
TBS	-	<i>Tris-buffered saline</i>
TGF-α	-	<i>Transforming growth factor alfa</i>
TNF	-	<i>Tumor necrosis factor</i>
TP53	-	<i>Tumor protein p53</i>
TTBS	-	<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
UV	-	<i>Ultra Violeta</i>
V/cm²	-	<i>Volts por centímetro quadrado</i>
μL	-	<i>Microlitros</i>
μM	-	<i>Micromolar</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da Cisplatina e seus análogos.	25
Figura 2 – Esquema dos mecanismos de transporte de cisplatina.	26
Figura 3 – Estrutura química de complexos de rutênio (III)	28
Figura 4 – Estruturas químicas propostas para complexos de rutênio (II)	31
Figura 5 – Estruturas químicas propostas para os complexos PIPE e CINAM.	36
Figura 6 – Valores de IC ₅₀ frente à linhagem HT 144.	44
Figura 7 – Viabilidade celular da linhagem A549 após tratamento com PIPE e CINAM ...	46
Figura 8 – Populações de células viáveis e inviáveis, após tratamento com PIPE.	48
Figura 9 – Populações de células viáveis e inviáveis, após tratamento com CINAM.	49
Figura 10 – Aspecto morfológico das culturas de A549	50
Figura 11 – Análise de lementos do citoesqueleto após tratamento com PIPE.	52
Figura 12 – Análise de elementos do citoesqueleto após tratamento com CINAM.	53
Figura 13 – Índice mitótico em culturas de A549	55
Figura 14 – Capacidade clonogênica após tratamento com PIPE.	56
Figura 15 – Capacidade clonogênica após tratamento com CINAM.	57
Figura 16 – Análise da progressão do ciclo celular após tratamento com PIPE.	58
Figura 17 – Análise da progressão do ciclo celular após tratamento com CINAM.	60
Figura 18 – Diminuição dos níveis de Ciclina D1 após tratamento com PIPE.	63
Figura 19 – Expressão proteica de reguladores do ciclo celular	64
Figura 20 – Ensaio de anexina V em culturas tratadas com PIPE.	66
Figura 21 – Ensaio de Anexina V em culturas tratadas com CINAM.	67
Figura 22 – Despolarização de membrana mitocondrial após tratamento com PIPE.	69
Figura 23 – Despolarização de membrana mitocondrial após tratamento com CINAM	70
Figura 24 – Ensaio de cometa após tratamento com PIPE e CINAM.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características químicas e fisiológicas de complexos de rutênio (II) em estudos de fase pré-clínica.....	32
Tabela 2 – Valores de $CI_{50} \pm DP$ (μM) determinados a partir dos resultados obtidos no ensaio de MTS.....	47
Tabela 3 – Índices de seletividade calculados com base nos valores de CI_{50} obtidos por ensaio de MTS para as linhagens A549 e CCD-1029Sk.	47
Tabela 4 – Porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular mediante tratamento com PIPE por 24 h e 48 h.	59
Tabela 5 – Porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular mediante tratamento com CINAM, por 24 e 48 horas.	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	CÂNCER.....	15
2.2	CÂNCER DE PULMÃO	18
2.3	FÁRMACOS A BASE DE METAL.....	21
2.3.1	COMPLEXOS DE RUTÊNIO.....	27
3	JUSTIFICATIVA	33
4	OBJETIVOS	34
4.1	OBJETIVO GERAL	34
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1	LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	35
5.2	ESQUEMA DE TRATAMENTO.....	35
5.3	VIABILIDADE CELULAR	36
5.3.1	ENSAIO COLORIMÉTRICO (MTS)	36
5.3.2	EXCLUSÃO COM AZUL DE TRIPANO	37
5.4	ASPECTOS MORFOLÓGICOS	37
5.4.1	IMAGENS ILUSTRATIVAS DE MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE.....	38
5.4.2	MARCAÇÃO DE ELEMENTOS DO CITOESQUELETO	38
5.5	DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MITOSES	38
5.6	ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA	39
5.7	ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....	39
5.8	IMUNOMARCAÇÃO PARA CICLINA D1	40
5.9	<i>IMMUNOBLOT</i>	40
5.10	ENSAIO DE ANEXINA V/PI.....	41
5.11	ENSAIO DE DESPOLARIZAÇÃO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	42
5.12	ENSAIO DE COMETA	42
5.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44

6.1	PIPE E CINAM SÃO EFETIVOS EM REDUZIR A VIABILIDADE DE CÉLULAS A549	44
6.2	PIPE E CINAM EXIBEM PROPRIEDADES ANTIPROLIFERATIVA E CITOTÓXICA FRENTE À LINHAGEM A549	47
6.3	PIPE E CINAM PROMOVEM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM CULTURAS DE A549.....	49
6.4	PIPE E CINAM PROMOVEM REDUÇÃO NA FREQUÊNCIA DE MITOSES EM CULTURAS DE A549.....	54
6.5	PIPE E CINAM INIBEM A CAPACIDADE DE CÉLULAS A549 EM FORMAR COLÔNIAS.....	55
6.6	PIPE INDUZ BLOQUEIO DA TRANSIÇÃO G1/S ENQUANTO CINAM PROMOVE AUMENTO EXPRESSIVO DE CÉLULAS EM SUB-G1.....	57
6.7	PIPE REDUZ A EXPRESSÃO DE CICLINA D1 E FOSFORILAÇÃO DE ERK	61
6.8	PIPE E CINAM EXIBEM ATIVIDADE PRÓ-APOPTÓTICA FRENTE À LINHAGEM A549.....	65
6.9	PIPE E CINAM NÃO INDUZEM LESÃO NO DNA	71
7	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado por 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). Estudos mostram que o câncer pode atingir pessoas de todas as idades; contudo, para maioria dos tipos de câncer, o risco de desenvolver a doença aumenta com o envelhecimento (BRANDÃO et al., 2010). O câncer constitui a segunda maior causa de morte da população mundial e está atrás somente das mortes ocasionadas por complicações cardiovasculares (FERLAY et al., 2014).

O câncer de pulmão é a principal causa de morte relacionada ao câncer, resultando em mais de um milhão de mortes por ano em todo o mundo. Cerca de 1,6 milhões de novos casos são diagnosticados a cada ano. O adenocarcinoma pulmonar é um subtipo comum de câncer de pulmão de células não pequenas e a sobrevida em 5 anos é inferior a 15% em pacientes com doença metastática. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer estimou, para 2016, mais de 17000 e 10000 novos casos de câncer de pulmão entre homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2016).

Complexos de platina (cisplatina e os seus análogos) têm sido amplamente utilizados para o tratamento do câncer do pulmão, no entanto, efeitos secundários graves e a resistência do tumor ao tratamento tem limitado sua aplicação clínica. Neste contexto, a identificação de novos protótipos que possam melhorar as propostas terapêuticas para o câncer de pulmão torna-se extremamente relevante. Nos últimos anos, o potencial antitumoral de complexos a base de rutênio tem sido amplamente investigado e os resultados apresentam-se promissores (BERGAMO et al., 2012; CHEN et al. 2013; CHEN et al. 2010; CORREA et al., 2015; FONTANA et al., 2011; HAN et al., 2015; LAI et al., 2015; MONDELLI et al., 2014). Assim sendo, são inúmeras as evidências de que os complexos de rutênio constituem uma alternativa promissora aos fármacos à base de platina para o tratamento de alguns tipos de câncer (DRAGUTAN; DRAGUTAN; DEMONCEAU, 2015; VALENTE; GARCIA, 2014).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão, inicialmente, serão abordados os aspectos epidemiológicos do câncer, bem como, os principais mecanismos regulatórios do processo de carcinogênese. Serão evidenciados também, dados epidemiológicos relativos à incidência de câncer de pulmão no Brasil e no mundo, suas classificações, formas de tratamento e os principais genes comumente alterados no processo de carcinogênese pulmonar. Finalmente, serão abordadas as principais características de complexos metálicos, em especial, os complexos de rutênio, como agentes antitumorais.

2.1 CÂNCER

O câncer constitui um problema de saúde pública mundial, de acordo com o documento *World cancer report 2014* da International Agency for Research on Cancer (IARC). A estimativa mundial, realizada em 2012, pelo projeto Globocan/IARC, apontou a incidência de 14 milhões de novos casos de câncer por ano, com tendência de aumento para 22 milhões nas próximas duas décadas. No mesmo período as mortes por câncer no mundo aumentarão de 8,2 para 13 milhões por ano. Os tipos de câncer mais incidentes no mundo em 2012 foram: pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres o câncer de mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) foram os mais frequentes (FERLAY et al., 2014).

No Brasil, o câncer de pulmão representa a principal causa de morte por câncer entre os homens (INCA, 2016). A alta taxa de mortalidade está, em geral, associada ao diagnóstico tardio da doença, bem como a ineficiência dos tratamentos convencionais incluindo a ressecção cirúrgica associada à radioterapia e quimioterapia (GADGEEL; RAMALINGAM; KALEMKERIAM, 2012)

O câncer é uma doença complexa e de difícil tratamento. O processo de transformação maligna envolve várias etapas, as quais incluem alterações genéticas e epigenéticas. Em geral, as células transformadas não respondem aos sinais que regulam

processos biológicos importantes para a manutenção da homeostasia nos organismos multicelulares como proliferação, diferenciação e morte celular (SILVA et al., 2005).

Mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor são comumente observadas em células cancerígenas. Os proto-oncogenes são genes que regulam positivamente a proliferação celular em resposta a estímulos fisiológicos. Algumas das mutações encontradas nesses genes determinam a síntese de isoformas proteicas permanentemente ativas, de modo que a proliferação celular seja contínua e independente de estímulos externos. Essas formas modificadas dos proto-oncogenes são denominadas oncogenes (AMENDOLA; VIEIRA, 2005). Os genes supressores de tumor 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).

A progressão do ciclo celular é altamente regulada por complexos proteicos que são ciclicamente ativados e, posteriormente, desativados. 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 (PINES, 1995). Assim sendo, nos complexos CDK-ciclinas, a CDK representa a subunidades catalítica, cuja atividade enzimática é regulada pelas ciclinas. Os níveis de expressão das CDKs são estáveis ao longo do ciclo, contudo há variação no perfil de expressão das ciclinas considerando as diferentes fases do ciclo (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

A formação de complexos ciclina D-Cdk4/Cdk6 é essencial para a progressão em G1. Uma vez ativados, os complexos Cdk-ciclina de G1 fosforilam diferentes alvos, incluindo a proteína Rb (pRb), um regulador negativo importante da transição G1/S. Na ausência de estímulo para a progressão do ciclo celular, a pRb é responsável pelo sequestro de membros da família E2F (E2F1, E2F2 e E2F3), os quais atuam como ativadores transcricionais. A fosforilação da pRb, no ponto de restrição ou próximo a ele, leva a liberação desses fatores de transcrição, os quais estimulam a expressão de genes relacionados à progressão do ciclo celular (ZHANG, 1999) incluindo 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 (BREHM et al., 1998; LEES, 1993; KOFF et al., 1992). 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 via proteossomos (RECHSTEINER; ROGERS, 1996).

Diante do exposto, a transição G1/S trata-se de um período crítico, considerando que a passagem pelo ponto de restrição determina a progressão do ciclo até a conclusão do processo de divisão celular. Assim sendo, os mecanismos moleculares que regulam a transição G1/S devem operar adequadamente para manter a homeostasia tecidual. Em cânceres humanos, os mecanismos que regulam a transição G1/S estão frequentemente alterados e, portanto, compostos capazes de inibir essa transição podem ser úteis no combate ao câncer (DURONIO; XIONG, 2013).

Vale ressaltar que a atividade das CDKs pode ser inibida por proteínas específicas, as as CKIs (do inglês *cyclin-dependent kinase inhibitors*), as quais se ligam as CDKs ou aos complexos CDK-ciclina regulando negativamente sua atividade. Duas famílias distintas de CKIs foram descritas, a família INK4 e família Cip/Kip (MALUMBRES; BARBACID, 2009). A família INK4 inclui p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c), p19 (INK4d), que inativam especificamente as CDK4 e CDK6 na fase G1. A formação de complexos estáveis evita a associação dessas CDKs com a ciclina D (ROUSSEL, 1999). A família Cip/Kip, inclui a p21 (WAF1, CIP1), p27 (CIP2), p57 (Kip2), que inibem os complexos CDK2-ciclina A na fase S e CDK1- ciclina B na fase M (CÁNEPA et al., 2007; CHIM et al., 2006). A família p21 inibe todas as Cdk's envolvidas na transição G1/S.

Os níveis de expressão de p21 estão sob o controle transcricional de p53, proteína codificada pelo gene supressor de tumor *TP53*, envolvida com o bloqueio do ciclo celular em resposta a danos no DNA. Adicionalmente, p53 pode atuar na indução de apoptose, caso as lesões no DNA não sejam reparadas ou em resposta a outros tipos de estresse celular (TAKAHASHI; RAYMAN; DYNLACHT, 2000). Assim sendo, a inativação das funções de p53 está associada ao processo de desenvolvimento e progressão de muitos tipos de câncer em humanos incluindo o câncer de pulmão (DURONIO; XIONG, 2013; HOLSTEGE et al., 2010; SHAH et al., 2012; STIEWE, 2007; SUZUKI; MATSUBARA, 2011; VOUSDEN; PRIVES, 2009).

A resistência a apoptose constitui uma característica da célula tumoral e envolve alterações nos perfis de expressão e de atividade de uma vasta gama de proteínas incluindo as caspases iniciadoras (8 e 9, principalmente) e executoras (3, 6 e 7) bem como os membros pró- e anti-apoptóticos da família Bcl-2 (WANG; CHEN; STREUTKER, 2013). A caspase 8 é ativada quando receptores de morte, localizados na superfície celular, são estimulados pela presença de ligante (via extrínseca); enquanto a caspase 9 é ativada em resposta a diferentes

tipos de estresse que leva a alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial com liberação de citocromo c para o citosol (via intrínseca) (KAUFMANN; EARNSHAW, 2000).

2.2 CÂNCER DE PULMÃO

O câncer de pulmão emergiu como o tipo de câncer mais comum no mundo há décadas atrás: em 1980, existiram mais de 600 mil casos e os números se igualaram aos de câncer de estômago, até então, o tipo mais incidente. Segundo a última estimativa mundial, realizada em 2012, existiram mais de 1,8 milhões de novos casos da neoplasia, sendo o câncer de pulmão o tipo mais incidente em homens em todo o mundo (1,2 milhões, 16,7% do total). A doença também representa a principal causa de morte por câncer no mundo, responsável por uma morte em cada cinco (1,59 milhões de mortes, 19,4% do total) (FERLAY et al., 2014).

No Brasil, para 2016, estimam-se 17330 de casos novos de câncer de pulmão entre homens e 10.890 entre mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 17,49 casos novos a cada 100 mil homens e 10,54 para cada 100 mil mulheres. O câncer de pulmão é o segundo tipo de câncer mais incidente em homens (o primeiro lugar é ocupado pelos tumores de pele) nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste com 36, 23 e 15 casos diagnosticados por 100000 habitantes, respectivamente. O câncer de pulmão ocupa o terceiro lugar de maior incidência nas regiões sudeste, nordeste e norte com 19,02, 9,75 e 8,07 casos para cada 100 mil habitantes, respectivamente (BRASIL, 2016).

Doll e Hill, em um estudo clássico em 1950, identificaram a estreita associação entre consumo de cigarros e câncer de pulmão, portanto, o tabagismo representa a principal causa de câncer no mundo; entretanto, a doença também se desenvolve em indivíduos que não apresentam o hábito de fumar. De acordo com a revisão conduzida pela Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*), são 20 os tumores malignos associados ao tabagismo, incluindo o câncer de ovário e o de cólon (FILHO et al., 2010).

O câncer de pulmão é uma doença complexa, heterogênea e extremamente letal com sobrevida média em cinco anos que varia entre 7 a 10% em países desenvolvidos. Diferentes

fatores podem estar relacionados ao desenvolvimento da doença incluindo a exposição ocupacional e ambiental a carcinógenos (exposição a amianto e radônio, por exemplo), tabagismo, fatores genético e epigenético (DUARTE; PASCHOAL, 2006; MULLAPUDI et al., 2015).

Segundo a revisão publicada por Duarte; Paschoal (2006), em média 87% de todos os casos de câncer de pulmão diagnosticados são decorrentes da exposição excessiva ao tabaco, por conseguinte, os fumantes possuem 24 a 30 vezes mais chances de desenvolver a doença quando comparados a pessoas que nunca fumaram. Isto ocorre principalmente devido aos carcinógenos encontrados na fumaça do cigarro, bem como, hidrocarbonetos policíclicos (benzopireno, por exemplo), nitrosaminas e as aminas aromáticas, que, quando metabolizados, são ativados, ocasionando mutações no material genético e assim, instalação do processo de carcinogênese.

O diagnóstico precoce para pacientes com câncer de pulmão é imprescindível para o bom prognóstico da doença e manutenção da qualidade de vida, portanto, os sinais e sintomas que sejam compatíveis com a doença devem ser imediatamente investigados. Para Uehara, Santoro e Jamnik (2000), o principal exame utilizado para detecção de câncer de pulmão é a radiografia de tórax, com alta sensibilidade, baixo custo e risco insignificante. Já através da tomografia computadorizada de tórax (TCT) é possível ter noção do tamanho, localização e níveis de invasão do tumor. Com a TCT é possível também o estudo tomográfico do fígado e supra-renais, que são alvos frequentes das metástases de pulmão. Contudo, também podem ser utilizadas outras técnicas complementares como ressonância magnética, citologia do escarro, biópsia por agulha transcutânea, biópsia a céu aberto, toracocentese e a broncofibroscopia (método utilizado como diagnóstico definitivo da doença).

O câncer de pulmão pode ser classificado em dois subtipos principais: (1) carcinoma de células pequenas e (2) carcinoma de células não pequenas, os quais representam 15% de 85%, respectivamente, do total de casos de câncer de pulmão diagnosticados. Essas classes de tumores apresentam diferentes perfis biológicos que refletem em diferenças de prognóstico e resposta terapêutica.

O carcinoma de células não pequenas, em geral, é diagnosticado em fase avançada apresentando pior prognóstico. Pode ser classificado em 3 subtipos, considerando características histológicas: carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de células grandes (NOVAES et al., 2008). O adenocarcinoma é o subtipo histológico mais frequentemente diagnosticado, incluindo o grupo de pacientes que não apresentam histórico de tabagismo (ROVIELLO, 2015).

O diagnóstico diferencial é imprescindível para a escolha da conduta terapêutica, pois as propostas de tratamento variam bastante em decorrência do tipo histológico. Adicionalmente, a análise do perfil molecular do tumor também auxilia não apenas na conduta da proposta terapêutica, mas também no entendimento da etiologia do tumor (HERBST, HEYMACH, LIPPMAN, 2008).

Os genes mais frequentemente alterados no adenocarcinoma incluem *TP53*, *EGFR*, *K-RAS*, *ALK*, *c-myc* (KUMAR; ERNANI; OWONIKOKO, 2015; TAN et al., 2016;). Tem sido descrito que o desenvolvimento, bem como, a progressão do câncer de pulmão de células não pequenas está relacionado à superexpressão de *EGFR* (SATO et al. 2007; SUN; SCHILLER; GAZDAR, 2007; TANG et al. 2005; WEIHUA et al. 2008), sendo essa característica molecular um indicativo de pior prognóstico. Apesar disso, nos últimos anos, terapias-alvo têm sido desenvolvidas para pacientes portadores de adenocarcinoma, especialmente aqueles que apresentam mutações para o gene que codificada EGFR e translocação de ALK (TAN et al. 2016;).

O EGFR, também conhecido por HER1, é um dos 4 receptores tirosina-quinases envolvido na transdução de sinal do EGF. O EGFR é ativado por ligantes específicos que incluem o EGF e o TGF- α e regulam processos importantes como proliferação, apoptose, migração, invasão e angiogênese. Esses eventos podem ser mediados pela ativação das vias de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK e PI3K/AKT/mTOR (CIARDIELLO; TORTORA, 2008). Pacientes que apresentam expressão aumentada de receptores tirosina-cinase ou apresentam alterações em seus domínios catalíticos podem responder aos tratamentos que empregam inibidores sintéticos de tirosina-cinase ou anticorpos monoclonais (MITSUDOMI et al., 2010; ROSELL et al., 2012).

ALK é um receptor tirosina-quinase, membro da superfamília dos receptores de insulina e EML4 é uma proteína necessária para a correta formação dos microtúbulos que está envolvida em sua estabilização. Estudos mostram a ocorrência de um rearranjo entre os genes que codificam a AKL e EML4 em câncer de pulmão de células não pequenas (CAMIDGE et al., 2010) que, embora seja um evento raro (entre 2% e 5% em adenocarcinomas, em pacientes jovens do sexo feminino e em pacientes não fumantes), apresenta terapia específica. Crizotinibe, um inibidor de tirosina-quinase, foi aprovado pela FDA para ser utilizado em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células em estágio avançado e metastático que apresentavam rearranjos de ALK (GRIDELLI et al., 2014; KWAK et al., 2010).

Vale ressaltar que mesmo entre os pacientes diagnosticados com adenocarcinoma ainda há uma grande heterogeneidade de tumores considerando o perfil diferencial de

acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. Tais alterações podem determinar a ativação de diferentes vias moleculares, as quais estão relacionados às diferenças observadas entre os pacientes que são submetidos as mesmas propostas terapêuticas. Assim sendo, informações mais detalhadas sobre a biologia e a genética das células que constituem o tumor podem contribuir significativamente para a identificação de novos alvos terapêuticos, bem como para o desenvolvimento de quimioterápicos mais efetivos (ROVIELLO, 2015).

Apesar dos pacientes responderem as terapias alvo-dirigidas, os tumores normalmente adquirem resistência e a sobrevida dos pacientes não aumenta consideravelmente (SWEIS et al., 2016).

O estadiamento da doença é realizado considerando as características histológicas e genéticas do tumor que evidenciam o seu comportamento proliferativo/invasivo. O grau de estadiamento é fundamental para o prognóstico. Quanto mais avançado o estadiamento, menor será a sobrevida em cinco anos. A presença dos marcadores tumorais (*c-myc*, *Kras*, *c-erb B-2*) está associada à menor sobrevida aos pacientes (UEHARA; SANTORO; JAMNIK, 2000).

A grande maioria dos pacientes que são diagnosticados com a doença apresentam estádios avançados (III e IV) no momento do diagnóstico e apenas um terço destes pacientes submete-se à ressecção cirúrgica do tumor. A maioria dos pacientes passa pela quimioterapia e radioterapia que são tratamentos paliativos (JAMNIK et al., 2006). Apenas um pequeno número de pacientes sobrevive mais de cinco anos. A proporção dos pacientes que morrem da doença (taxa de mortalidade) é maior que 90%. Assim sendo, novas abordagens terapêuticas devem ser desenvolvidas.

2.3 FÁRMACOS A BASE DE METAL

O cenário de pesquisa e desenvolvimento farmacêutico tem sofrido grandes mudanças nos últimos anos, motivadas pelo aumento do conhecimento sobre o genoma humano, o incremento nas técnicas de identificação de possíveis alvos terapêuticos e determinação de estruturas moleculares com potencial farmacológico (HAMBLEY, 2007; SWEIS et al., 2016). Os inibidores de tirosina-quinase, os tinibes, representam a grande inovação na terapêutica do câncer no século XXI (PINTO; BARREIRO, 2013).

O Meristato de Imatinibe (Glivec), primeiro exemplar da classe dos tinibes, é uma molécula que compete pelo sítio de ligação do ATP na enzima tirosino-quinase. Quando ocorre a ligação do fármaco à enzima, sua atividade quinase é inibida. O medicamento é capaz de inibir a ação de três membros de tirosino-quinases: os proto-oncogenes *ABL* (*BCR-ABL*, *TEL-ABL*) e *c-Kit* e PGDFR (Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas). Este medicamento é muito utilizado para o tratamento da Leucemia Mieloide Crônica (LMC), pois, neste tipo de câncer, existe a fusão do gene *BCR* ao proto-oncogene *ABL*, o que leva a um aumento da atividade tirosino-quinase das células-tronco hematopoiéticas (NADAL; OLAVARRIA, 2004). Apesar de ser um medicamento extremamente inovador, desenvolvido para agir em um sítio específico, os tinibes também desencadeiam efeitos colaterais graves. Pesquisas mostram que altas doses podem causar aborto em coelhos e ter efeito teratogênico em ratos. A grande maioria dos pacientes com LCM tolera adequadamente o tratamento, contudo, existem relatos de casos graves de hepatotoxicidade e mielosupressão. O tratamento também pode induzir a morte de cardiomiócitos e causar cardiotoxicidade e insuficiência cardíaca severa em muitos pacientes (DRUKER et al., 2006).

Devido ao risco eminente a saúde dos pacientes, as autoridades reguladoras têm colocado barreiras para a aprovação de novos fármacos, fato que tem contribuído para a queda de medicamentos aprovados para uso clínico, por conseguinte, a toxicidade tornou-se então, um grande obstáculo a ser ultrapassado por novos candidatos a medicamentos. Neste contexto, os metalofármacos, despontam como uma alternativa da química inorgânica medicinal aos derivados orgânicos, com exemplares de uso clínico ou em estudos de fase clínica ou pré-clínica (HAMBLEY, 2007).

Os íons metálicos são importantes por desempenharem funções específicas que mantêm o equilíbrio dos organismos vivos, incluindo o transporte de oxigênio através das hemácias, regulação do metabolismo da glicose, bem como, de muitos complexos enzimáticos (HOLM; KENNEPOHL; SOLOMON, 1996). No entanto, os íons metálicos têm sido cada vez mais utilizados para fins terapêuticos e de diagnóstico por serem estruturas capazes de interagir com moléculas biológicas e pela alta seletividade e especificidade desta interação (GUO; SADLER, 1999). Também, as propriedades cinéticas e termodinâmicas dos complexos metálicos lhes conferem características, as quais não são observadas nas substâncias orgânicas convencionais (FREZZA et al., 2010).

A utilização de elementos inorgânicos para fins curativos iniciou-se há séculos: há mais de 5000 mil anos, o zinco já era utilizado para cicatrização por árabes, chineses e europeus. Durante o Renascimento, o mercúrio era utilizado como diurético e o ferro como

suplemento nutricional. O primeiro relato do uso racional de metais na medicina foi para o tratamento da tuberculose, mais tarde foram também empregados para leishmaniose e infecções bacterianas (ORVIG; ABRAMS, 1999). Atualmente, os complexos metálicos são utilizados para tratamento de uma diversidade de patologias. A sulfadiazina de prata é um medicamento utilizado como antimicrobiano e antifúngico (DIAS et al., 2006), a desferroxamina (quelante de ferro) é utilizada para malária (CABANTCHIK et al., 1996), os compostos de bismutos são utilizados para diarreia, constipação, gastrites e úlceras (SUN et al., 2001); nitroprussiato de sódio (Fe^{2+}) é utilizado em situações de emergência para controlar a pressão arterial (GUO; SADLER, 1999); tiolato de ouro para tratamento da artrite reumatoide (HELM et al., 1995).

Para Haas e Franz (2009), os metais, elementos inorgânicos que correspondem a grande maioria da tabela periódica, possuem características químicas que justificam sua grande diversidade de aplicações: (1) Carga: Os íons metálicos são carregados positivamente em solução aquosa. A carga pode ser manipulada dependendo do ambiente e do modo de coordenação do metal ao ligante; (2) Interações com ligantes: Os íons metálicos interagem com ligantes (orgânicos e inorgânicos), através de interações fortes e seletivas. Os ligantes podem ter funcionalidade própria e ajustar as propriedades do complexo; (3) Estrutura e ligação: Complexos de metal-ligante abrangem uma gama de geometrias de coordenação que lhes dão formas únicas em comparação às moléculas orgânicas. Os comprimentos de ligação, ângulos de ligação e o número de locais de coordenação podem variar, dependendo do metal e o seu estado de oxidação; (4) Caráter ácido de Lewis: Íons metálicos com elevada afinidade por elétrons podem polarizar significativamente grupos que são coordenados com eles, facilitando reações de hidrólise; (5) Atividade redox: Os complexos metálicos possuem a capacidade, como muitos metais de transição, de sofrer reações de oxidação e redução de um par de elétrons.

Hambley, em 2007, classificou os metalofármacos em sete categorias distintas: (1) os complexos inertes, onde a estrutura como um todo é ativa, (2) os complexos onde o metal é ativo, (3) aqueles onde os fragmentos do complexo são ativos, (4) os complexos onde seus produtos de biotransformação são ativos, (5) os complexos onde o metal é agente potencializador de radiação, (6) os complexos com metal radioativo e (7) os complexos onde os ligantes são responsáveis pela atividade.

Os complexos metálicos inertes são aqueles ativos na forma intacta, ou seja, que não passam por processos de biotransformação. São estruturas relativamente simples que oferecem novas oportunidades estruturais por possuírem geometria que comporta até seis

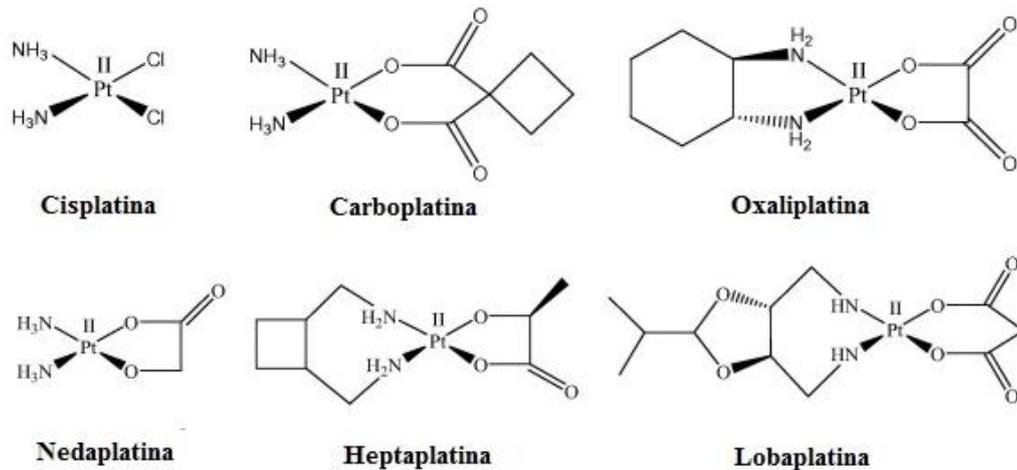
ligantes (HAMBLEY, 2007). Smalley et al. (2007) sintetizaram um série de complexos com o metal rutênio, que se encaixam na categoria de complexos metálicos inertes. Os complexos denominados DW 1/2 ativaram p53 e induziram apoptose em células de melanoma humano, bem como apresentaram uma potente capacidade de inibir proteina-quinases.

Geralmente, os complexos metálicos constituem “pró-fármacos”, que são ativados por vias de metabolização através de processos de substituição do ligante ou reações de oxidação-redução, todavia, o grande desafio da química inorgânica medicinal está na construção de complexos inertes, que mantenham suas características até atingirem o sítio de ação (ROMERO-CANELÓN; SADLER, 2013).

O uso de metais para o tratamento do câncer iniciou-se com a descoberta acidental da atividade antiproliferativa da cisplatina por Rosenberg e colaboradores em 1967. O uso clínico da cisplatina foi aprovado em 1978 e, desde então, o medicamento tem sido utilizado como tratamento para vários tipos de câncer, os quais incluem: testículo, ovário, cabeça e pescoço, intestino, estômago (REED; CHABNER, 2011), cervical, melanoma e linfomas (WONG; GIANDOMENICO, 1999). Contudo, o uso quimioterápico da cisplatina acarreta muitos efeitos colaterais aos pacientes que incluem nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade e náusea. Além disso, alguns cânceres como o colorretal e o câncer de pulmão de células não-pequenas são naturalmente resistentes ao tratamento com cisplatina, também os cânceres de ovário e pulmão de células pequenas adquirem facilmente resistência ao tratamento (FUERTES; ALONSO; PÉREZ, 2003).

Atualmente, os complexos de platina fazem parte de 50% de todos os regimes de quimioterapia utilizados clinicamente e três destes complexos (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina – Figura 1) são aprovados pelo FDA para uso médico. (ZAKI; ARJMAND; TABASSUM, 2016). Como citado anteriormente, a toxicidade e resistência tumoral são problemas enfrentados pelos pacientes que utilizam a cisplatina para o tratamento. Na tentativa de minimizar os efeitos secundários foram desenvolvidos os análogos de cisplatina, a carboplatina e a oxaliplatina, através de modificações estruturais na molécula da cisplatina, a fim de, diminuir a toxicidade e resistência tumoral (AMABLE, 2016).

Figura 1 - Estrutura química da Cisplatina e seus análogos de segunda (carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina) e terceira (heptaplatina e lobaplatina) geração.

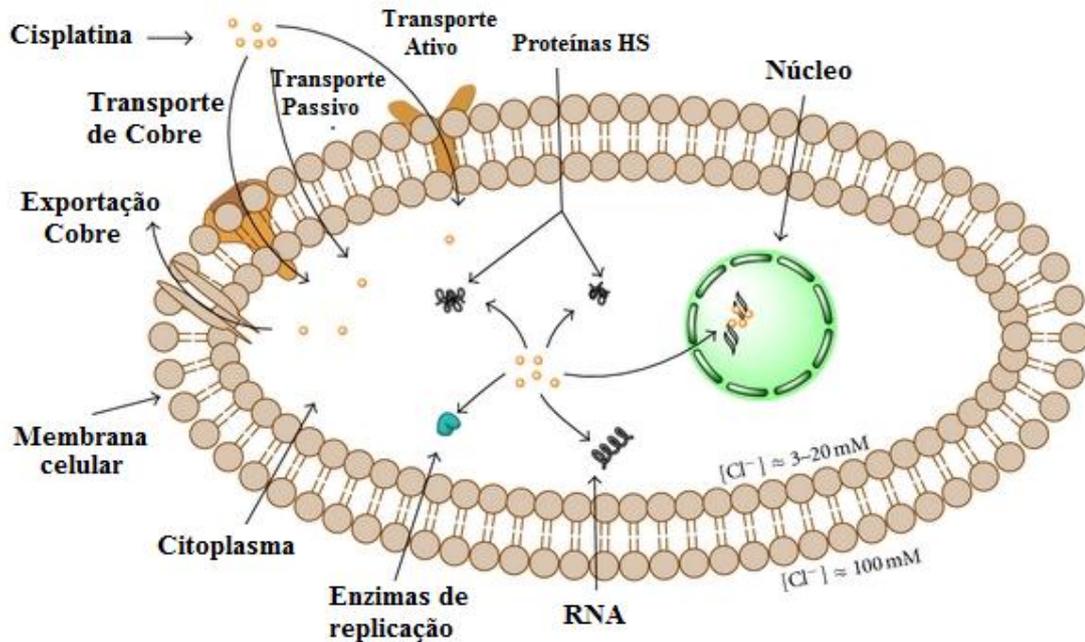


Fonte: ZAKI; ARJMAND; TABASSUM, 2016 (modificado).

Segundo Amable (2016), a carboplatina apresentou ineficácia contra células germinativas malignas em comparação à cisplatina; e a oxaliplatina mostrou-se eficiente para o tratamento do câncer de cólon que é resistente à cisplatina. Carboplatina possui um espectro de atividade muito parecido com a cisplatina, contudo, não é efetiva contra tumores resistentes à cisplatina. É utilizada para o tratamento de câncer ovariano e câncer de pulmão de pequenas células. Já a oxaliplatina é amplamente utilizada em tumores que são resistentes à cisplatina e carboplatina. Quando combinada ao 5-fluoracil é eficiente contra câncer colorretal metastático. Além disso, foram desenvolvidos outros análogos como nedaplatina, lobaplatina e heptaplatina utilizados em países asiáticos, para tratamento, principalmente, do câncer de pulmão de células não-pequenas e pequenas células, leucemia mieloide crônica e câncer gástrico, respectivamente.

Com relação aos mecanismos de ação da cisplatina, é interessante notar, que a molécula, na corrente sanguínea, não interage com proteínas plasmáticas e é transportada na forma intacta pelo sangue. Ao atingir a célula, a cisplatina atravessa a membrana plasmática por difusão ou via receptores específicos (transporte ativo) e também é capaz de utilizar os transportadores de cobre (figura 2). Além disso, é sabido que a cisplatina pode interagir com diferentes receptores de membrana e modular desta forma, o comportamento fisiológico da célula (GOMEZ-RUIZ et al., 2012)

Figura 2 - Esquema simplificado dos mecanismos de transporte da cisplatina para o interior celular e possíveis alvos moleculares.



Fonte: GOMEZ-RUIZ et al., 2012 (modificado).

Embora o DNA seja um alvo importante para a atividade antitumoral da cisplatina, estima-se que 75-85% na concentração intracelular do medicamento interaja com constituintes nucleofílicos como peptídeos contendo tiol, proteínas, enzimas de replicação e RNA (FUERTES; ALONSO; PÉREZ, 2003) e a preferência por outros alvos moleculares, explica, em parte, os efeitos tóxicos e a resistência tumoral ao tratamento (GOMEZ-RUIZ et al., 2012). Horacek e Drobnik (1971) propuseram pela primeira vez o mecanismo de ativação da cisplatina no microambiente celular. Segundos estudos, a molécula de cisplatina reage com o DNA após ser bioativada em consequência da substituição nucleofílica dos íons cloreto por moléculas de água, uma reação facilitada pela baixa concentração de íons cloreto do meio intercelular. A ligação da platina ao DNA (CIS-DNA) forma adutos irreversíveis e acontece, preferencialmente, ao N7 da guanina (G), contudo, pode ocorrer também no nucleotídeo adenina (A). De acordo com Egger et al. (2008) cerca de 65% das interações CIS-DNA ocorre entre G-G intrafita, 25% são ligações cruzadas A-G intrafita, 13% são ligações G-G interfitas ou G-x-G intrafitas e menos de 1% formam adutos monofuncionais.

As vias de sinalização decorrentes dos danos causados ao DNA em resposta à cisplatina são bem descritas na literatura. A revisão publicada em 2005 por Wang e Lippard mostra que diferentes componentes de vias de sinalização como, AKT, c-Abl, p53, MAPK/JNK/ERK/p38, podem ser moduladas pela cisplatina e parecem estar envolvidos com

a sua citotoxicidade. A resistência aos regimes quimioterapêuticos à base de platina, especialmente relacionados às neoplasias de pulmão, parecem estar relacionados aos seguintes eventos: inativação da cisplatina por glutathione ou metalotioneínas, aumento das taxas de reparo, redução na concentração do medicamento intracelular por alterações do perfil de absorção e efluxo, e falhas na indução de apoptose (CHEN; KUO, 2010; MORAES et al., 2012; TRILLER et al., 2006)

Rapp et al. (1988) realizaram um estudo randomizado com 251 pacientes para dois regimes de quimioterapia: VP (vindesina e cisplatina) e PAC (ciclofosfamida, doxorrubicina e cisplatina). O estudo mostrou que houve melhora na sobrevida global dos pacientes tratados com VP (sobrevida média de 32,6 semanas) e PAC (24,7 semanas) em relação aos pacientes que não foram tratados (17 semanas). Contudo, o regime terapêutico mostrou-se tóxico, com leucopenia grave ocorrendo em 37,8% e 40,0% nos pacientes tratados com PAC e VP, respectivamente. Constatou-se ainda, vômitos severos em 12,2% (PAC) e 23,3% (VP) dos pacientes tratados e neurotoxicidade grave em 15,6% (VP) destes.

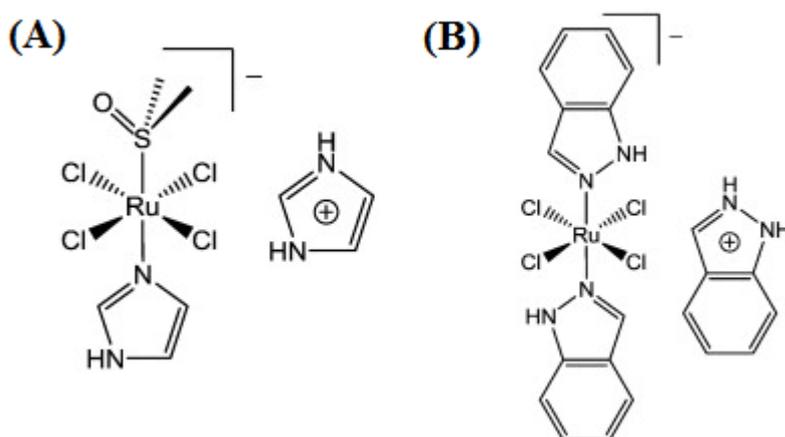
Apesar do uso clínico generalizado da cisplatina e de seus análogos, ainda existe a grande necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer que causem menos efeitos secundários e consigam contornar os mecanismos de resistência tumoral (ZAKI; ARJMAND; TABASSUM, 2016). Neste contexto, a ação antitumoral de vários metais tem sido investigada e o metal rutênio ocupa uma posição de destaque. Os complexos com este metal têm despontado como alternativas promissoras aos complexos de platina, devido as suas propriedades bioquímicas e, também, do reduzido perfil de toxicidade em comparação aos medicamentos a base de platina (LEE et al., 2014; LIPPARD; GRAF, 2012;).

2.3.1 Complexos de Rutênio

Fármacos de platina vêm sendo utilizados há décadas para o tratamento de diferentes tipos de câncer e mesmo frente a efeitos adversos e mecanismos de resistência tumoral adquiridos com o tratamento, tornaram-se componentes essenciais de muitas terapias antineoplásicas. Embora, atualmente, nenhum complexo de rutênio seja aprovado para uso clínico como medicamento anticancerígeno, o sucesso obtido pelos ensaios clínicos do NAMI-A e KP1019 (Figura 3A e B, respectivamente) tem incentivado a busca por novos

complexos metálicos capazes de contornar os efeitos indesejados da terapia com a platina, em especial, aqueles com o metal rutênio em sua estrutura de coordenação (GRANSBURY et al., 2016)

Figura 3 – Estrutura química de complexos de rutênio (III), em fase de estudos clínicos



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

Nota: (A) *trans*-[RuCl₄(Im)(DMSO)][ImH] Im = imidazol – NAMI-A. (B) *trans*-[RuCl₄(Ind)₂][IndH] Ind = indazol) – KP1019.

De acordo com Jakupec et al. (2008), as vantagens da utilização de rutênio no desenvolvimento de fármacos antitumorais à base de metal incluem: (1) química de coordenação bem desenvolvida, proporcionando rotas confiáveis para formação de novos complexos; (2) a troca de ligante, pode ser ajustada através da coordenação de ligantes auxiliares adequados; (3) a geometria octaédrica, em contraste com a geometria quadrada planar de platina, o que implica em reatividade e modos de ação diferentes; (4) as alterações dos estados de oxidação 2⁺, 3⁺ e 4⁺ sob condições fisiológicas e a capacidade para ajustar as taxas de transferência de elétrons e potenciais de oxi-redução, (5) a capacidade de rutênio em mimetizar o ferro na ligação a biomoléculas, tais como transferrina e outras proteínas, o que faz com que estes agentes sejam menos tóxicos do que a platina e (6) a grande gama de estudos que proporcionam o aumento do conhecimento sobre os efeitos biológicos dos complexos de rutênio.

Musgrove et al., em 1984, já justificavam o uso clínico dos complexos de rutênio como agentes antitumorais através das suas principais características: (1) a possibilidade de obtenção de pró-fármacos com o íon rutênio no estado de oxidação +3, que pode ser reduzido e ativado seletivamente na massa tumoral, onde o baixo teor de oxigênio pode criar um ambiente de redução e (2) esses complexos são transportados, seletivamente, para as células

tumorais por transferrinas, já que essas células necessitam de maior aporte de ferro para suprir o rápido crescimento.

Para Allardice e Dyson (2001), os complexos de rutênio podem formar ligações cruzadas com as moléculas de DNA através de interações que diferem daquelas realizadas pela cisplatina devido a sua geometria octaédrica. Assim, as linhagens tumorais que podem reparar os danos ao DNA ocasionados pela cisplatina são ainda suscetíveis ao rutênio. Estudos mostram que, além de interagirem diretamente com o DNA, os complexos de rutênio que são capazes de interromper a atividade das topoisomerasas I e II e desta forma, impedir a transcrição e replicação celular (DU et al., 2011).

O complexo NAMI-A (*trans*-[RuCl₄(Im)(DMSO)][ImH] Im = imidazol), é um complexo de Rutênio (III) atualmente estudado como tratamento de segunda escolha em pacientes com câncer de pulmão de células não-pequenas metastático em combinação com gemcitabina. Foi o primeiro complexo de rutênio a completar estudo de fase I e o primeiro a entrar em ensaios clínicos. O uso do complexo, em estudos pré-clínicos com modelos de tumores sólidos metastáticos, reduziu 100% das metástases de carcinoma de pulmão de Lewis, adenocarcinoma mamário de camundongo (BERGAMO et al., 1999), e melanoma (GAVA et al., 2006). Foi observado também redução de 90% de metástases em modelo xenográfico de câncer de pulmão de células não-pequenas (SAVA et al., 2003). Segundo os estudos de Sava et al. (2004) e Frausin et al. (2005) frente a linhagem MDA-MB-231, o tratamento com NAMI-A pode aumentar a forma ativa de β 1-integrina na superfície celular e de RhoA-GTP, que promove a reorganização de citoesqueleto com aumento do estresse das fibras de actina. Estes eventos ocorrem em paralelo ao bloqueio do ciclo celular em G₂/M e acarretam morte celular. As interações com DNA são poucas e mais fracas do que aquelas formadas pela cisplatina, contudo, o complexo mostrou-se ativo contra tumores intrinsecamente resistentes à cisplatina.

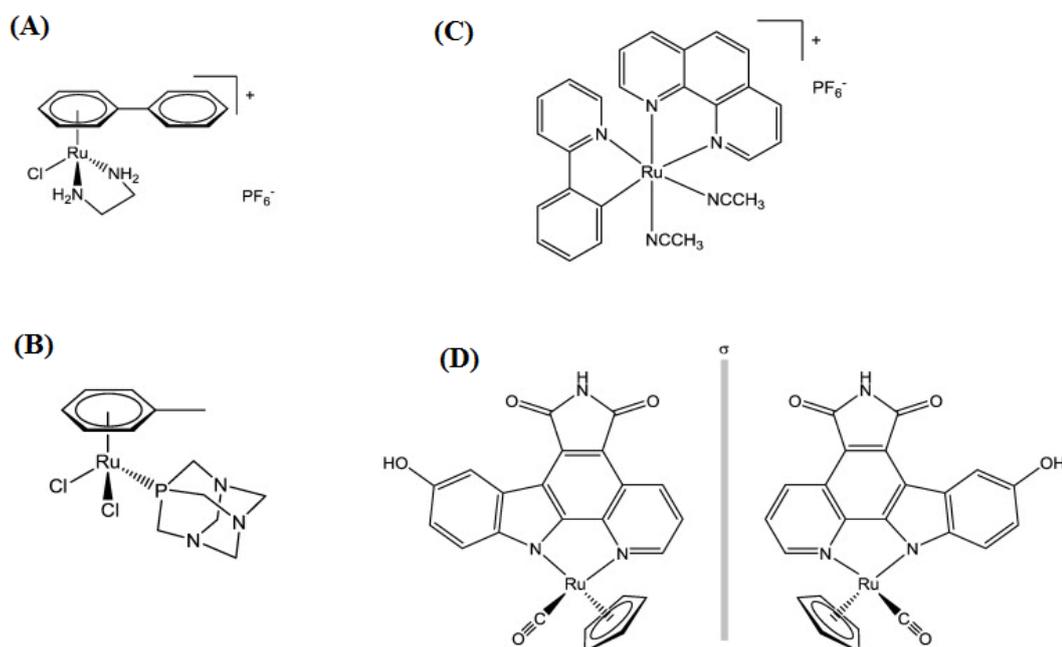
Em 1989, Keppler et al., desenvolveram um série de complexos de rutênio (III) caracterizados por quatro cloretos equatoriais e dois heterociclos e o complexo KP1019 (*trans*-[RuCl₄(Ind)₂][IndH] Ind = indazol), mostrou-se ativo contra linhagens celulares de câncer colorretal (Frühaufer; Zeller, 1991; Kaptiza et al., 2005) e *in vivo* no carcinoma de colón resistente à quimioterapia (Hartinger et al., 2008). Nos estudos o complexo mostrou características clássicas de atividade citotóxica, incapacidade de agir sobre metástases e capacidade de interação com a transferrina. A molécula tem caráter citotóxico após sofrer redução e provoca principalmente apoptose pela ativação da via intrínseca, entretanto, ocorre também produção de espécies reativas de oxigênio e interações com DNA, de forma

semelhante à cisplatina, mas com menor intensidade. Hartinger et al. (2006) administraram doses fixas a partir de 25 mg por paciente, a qual foi subsequentemente, ajustadas para 600 mg por paciente. As administrações ocorreram por até 10 semanas em 8 pacientes e 5 destes mostraram estabilização da doença.

A Figura 4 mostra exemplos de complexos de Rutênio (II) em fase de estudos pré-clínicos e os possíveis mecanismos moleculares responsáveis pela atividade antitumoral destes complexos estão listados na Tabela 1. Os complexos têm demonstrado mecanismos de ação alternativos, espectros variados de atividade contra diferentes tipos de câncer, baixa citotoxicidade e aparentam ser menos sensíveis aos mecanismos de resistência observados para a cisplatina. Em especial o Rapta-T parece ser seletivo, assim como o NAMI-A, para metástases. Se esta característica for confirmada, os dois complexos constituirão umas das poucas alternativas em desenvolvimento para tratamento das metástases que constituem um aspecto importante para a progressão tumoral e implicam no baixo sucesso das terapias contra o câncer (BERGAMO et al. 2012).

Han et al. (2015), após síntese e caracterização de novos complexos de rutênio, verificou-se que as moléculas intercalam entre os pares de bases de DNA. Os complexos apresentaram maior citotoxicidade quando comparados à cisplatina para as linhagens HeLa (colocarcinoma humano) 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 favorece indução de apoptose.

Figura 4 – Estruturas químicas propostas para complexos de rutênio (II), em fase de estudos pré-clínicos.



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

Nota: (A) RM175 (B) RAPTA-T (C) RDC11 (D) Enântiômeros DW 1 (esquerda) e 2 (direita).

Em ensaios preliminares a fim de avaliar a atividade citotóxica de novos complexos de rutênio sobre linhagens celulares tumorais, Mondelli et al. (2014) notaram que os referidos complexos eram muito ativos contra a linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, cujo valor de IC_{50} encontrado foi de $0,11 \pm 0,02 \mu\text{M}$. O complexo em questão também apresentou atividade moderada contra HeLa, nenhuma atividade contra U251 (glioma humano) e pouca atividade contra fibroblastos normais de hamster (V79). Os resultados indicaram uma certa seletividade dos complexos para a linhagem tumoral derivada de câncer de mama.

Diante do exposto, os complexos a base de rutênio são promissores protótipos de candidatos a fármacos (DRAGUTAN; DRAGUTAN; DEMONCEAU, 2015) e representam uma alternativa aos fármacos convencionais utilizados na terapêutica do câncer (VALENTE; GARCIA, 2014).

Tabela 1 – Características químicas e fisiológicas de complexos de rutênio (II) em estudos de fase pré-clínica.

	RM175	Rapta-T	RDC11	DW 1/2
Estado de oxidação	II	II	II	II
Interação com DNA	Coordenação com Guanina N7 e interações não covalentes	Pouca	Pouca interação e danos limitados em comparação a cisplatina	Nenhuma interação com DNA
Superação da resistência a cisplatina	Ativo no carcinoma do ovário A2780 resistente a cisplatina	Desconhecido	Menos sensível para mecanismos de resistência a cisplatina	Desconhecido
Atividade <i>in vivo</i>	Citotóxica para os tumores primários	Alguma seletividade para metástases	Citotóxica para os tumores primários	Não determinado
Tipo de tumor afetado	Sem tipo histológico específico (animal, humana)	Testado no adenocarcinoma de mama (camundongo)	Sem tipo histológico específico (animal, humana)	Não determinado
Prováveis alvos	DNA	Desconhecido	provavelmente DNA	GSK3 β e PI3k.
Mecanismo de ação	Ativação de p53/p21 para bloqueio de ciclo e p53/Bax na resposta pró-apoptótica	Modulação de elementos do citoesqueleto	Modulação de genes da via de estresse do Retículo Endoplasmático	Apoptose mediada por p53 e ativação da via intrínseca em células de melanoma
Estágio de desenvolvimento	Pré-clínica	Pré-clínica	Pré-clínica	Pré-clínica

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

3 JUSTIFICATIVA

O câncer de pulmão de células não pequenas, que se encontra entre os mais frequentes em todo o mundo, apresenta respostas modestas a todos os esquemas quimioterápicos disponíveis. Com a monoterapia existe resposta parcial em 15% a 20% dos casos, ao passo que as terapias combinadas são parcialmente efetivas em cerca de 40% a 50%. Por conseguinte, a morbidade associada aos quimioterápicos ainda é um obstáculo significativo. (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Portanto, considerando a altíssima taxa de mortalidade entre os portadores de adenocarcinoma de pulmão, o desenvolvimento de alternativas terapêuticas se faz necessário no intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes, trazendo melhorias na sobrevida e diminuindo os efeitos adversos.

Nos últimos anos, os complexos de rutênio têm sido investigados quanto suas propriedades antitumorais e estudos mostraram que alguns complexos são efetivos frente a diversos tipos de câncer e apresentam baixa citotoxicidade. Além disso, os mecanismos de ação dos complexos de rutênio parecem ser diferentes quando comparado aos da cisplatina (CHELOPO et al., 2013).

Assim sendo, o presente estudo foi motivado por resultados prévios do nosso laboratório que demonstraram promissora atividade citotóxica de uma série inédita de complexos de rutênio (II), coordenados a ácidos orgânicos, frente à linhagem HT 144 (melanoma humano).

4 OBJETIVOS

A seguir, serão abordados o objetivo geral e objetivos específicos deste estudo.

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos complexos de Rutênio (II), PIPE e CINAM, frente à linhagem A549, a qual é derivada de adenocarcinoma de pulmão humano.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a capacidade de PIPE e CINAM em:

- a) Alterar a viabilidade e o comportamento proliferativo de células A549;
- b) Interferir na progressão do ciclo celular;
- c) Reduzir a capacidade de expansão clonal;
- d) Alterar a organização do citoesqueleto (microtúbulos e microfilamentos);
- e) Modular o perfil de expressão de reguladores do ciclo celular;
- f) Induzir lesões no DNA e apoptose;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta sessão, serão abordadas as metodologias utilizadas para realização deste estudo, bem como, os materiais e reagentes utilizados nos ensaios *in vitro*.

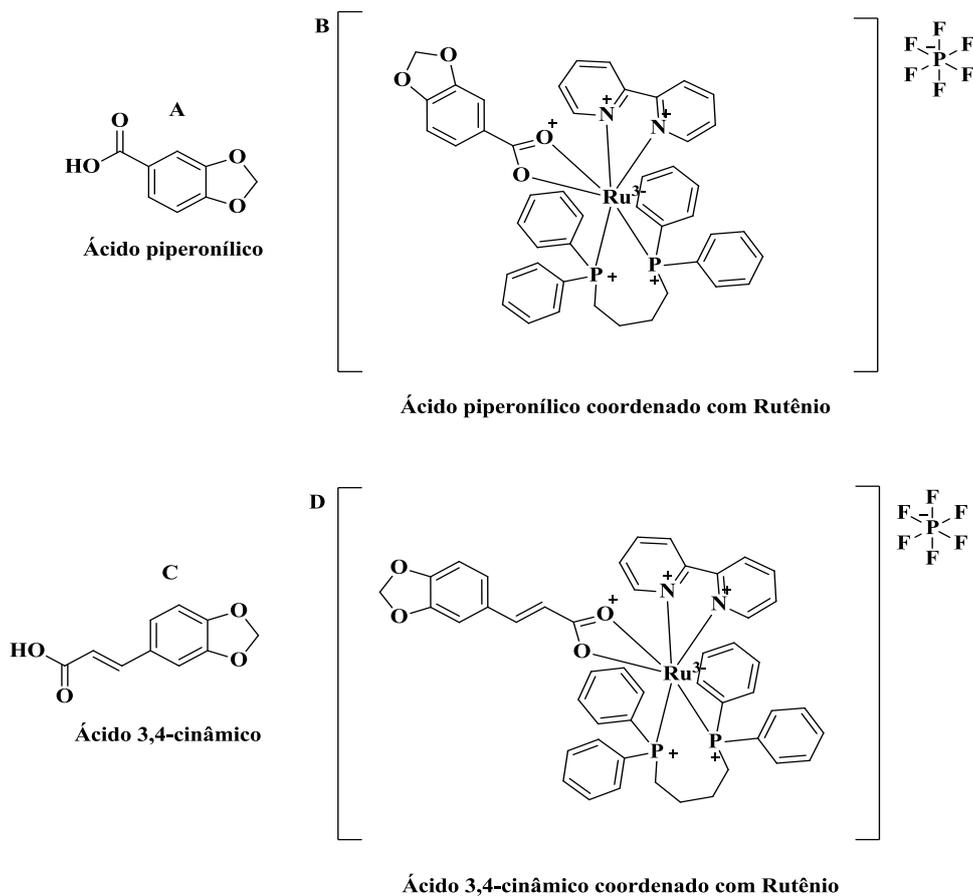
5.1 LINHAGEM CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTIVO

No presente estudo foram utilizadas as linhagens A549 (derivada de carcinoma de pulmão humano) e CCD-1059Sk (fibroblastos derivado de pele normal humana). As linhagens foram adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro e 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.

5.2 ESQUEMA DE TRATAMENTO

Após plaqueamento e adesão celular (24h), as culturas foram tratadas com os complexos de rutênio (II) em estudo. O tempo de tratamento e as concentrações utilizadas, bem como, o inóculo das linhagens e placas de cultivo, variaram em decorrência da abordagem experimental utilizada. Os complexos PIPE e CINAM (Figura 5) foram solubilizados em DMSO e mantidos a -20°C em solução estoque de 20 mM. A concentração final de DMSO utilizado nos ensaios não ultrapassou 0,1%. Os complexos foram obtidos devido a uma colaboração estabelecida com a Dra. Marília I. F. Barbosa e com o Dr. Antonio Carlos Doriguetto, ambos do Instituto de Química da UNIFAL-MG.

Figura 5 - Estruturas químicas propostas para os complexos PIPE e CINAM.



Fonte: Do autor.

5.3 VIABILIDADE CELULAR

Para elucidação da atividade dos complexos testados sobre a viabilidade celular da linhagem A549 foram realizados os ensaios de MTS e Exclusão com Azul de tripano.

5.3.1 Ensaio colorimétrico (MTS)

A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico, o MTS 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 enzimática (desidrogenases) do sal tetrazólio em formazano, o qual absorve luz a 490 nanômetros (nm). A taxa de absorbância é diretamente proporcional ao número de células vivas. Os valores de absorbância obtidos nas amostras tratadas foram comparados com os valores de absorbância das amostras que não expostas ao tratamento. Para este ensaio as linhagens A549 e CCD-1059Sk foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 5×10^3 células/poço. Os complexos PIPE e CINAM foram testados nas concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 μM por 24 e 48 horas de tratamento. O valor de IC_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento) foi determinado usando o programa GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). O Índice de seletividade (IS) foi determinado através da razão entre o valor de IC_{50} da célula normal e tumoral. Os valores representam a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

5.3.2 Exclusão com Azul de Tripiano

As células foram semeadas em placa de 24 poços com densidade de 5×10^4 células/poço. Após adesão (24 horas), as células foram tratadas com PIPE e CINAM nas concentrações de 9 (IC_{25}) e 18 (IC_{50}) μM e 2 (IC_{25}) e 4 (IC_{50}) μM , respectivamente, durante 24, 48 e 72 horas. Nos dias de interesse, as células foram contadas em hemocítmetro na presença do corante azul de tripiano (0,4%). Os valores no gráfico referem-se à média de 3 experimento independentes realizados em triplicata.

5.4 ASPECTOS MORFOLÓGICOS

O aspecto morfológico das culturas de A549 após tratamento com PIPE e CINAM foi avaliado com o auxílio de imagens obtidas por microscopia de contraste de fase e também por preparações citossólicas fluorescentes evidenciando elementos do citoesqueleto.

5.4.1 Imagens ilustrativas de 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 PIPE e CINAM nas concentrações de 9 e 18 μM e 2 e 4 μM , respectivamente. 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.

5.4.2 Marcação de elementos do citoesqueleto

Foram obtidas preparações citológicas evidenciando elementos da citoesqueleto (microfilamentos e microtúbulos). As células foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro (1×10^5 células/placa) sobre lamínula. As amostras foram tratadas com PIPE (9 e 18 μM) e CINAM (2 e 4 μM), por 24 horas. Ao término do tratamento, as células foram fixadas em 3,7% de formaldeído por 30 minutos e incubadas com Triton X-100 (0,5%) por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram incubadas com anti-tubulina (1:100, Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) a 4° C pernoite. No dia seguinte, após lavagens em PBSA, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho, 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 diidrocloroeto, Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos). As lâminas foram montadas com crioprotetor (Vecta Shield) e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon), aumento 400x.

5.5 DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MITOSES

As células foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro (1×10^5 células/placa) sobre lamínula. As culturas foram tratadas com PIPE (9 e 18 μM) e CINAM (2 e 4 μM), por 24 horas. Ao término do tratamento, as culturas foram lavadas com PBSA incubadas com DAPI (Molecular Probes-LifeTechnologies). Os dados apresentados referem-se á média \pm DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

5.6 ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA

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 PIPE e CINAM nas concentrações de 9 (IC_{25}) e 18 (IC_{50}) μM e 2 (IC_{25}) e 4 (IC_{50}), respectivamente, por 24 horas. Decorrido o tempo de tratamento, o meio foi substituído por meio fresco e as placas foram mantidos em estufa por a 37°C, contendo 5% de CO_2 , por 15 dias. Após o período de incubação as células serão 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 estereomicroscópico (aumento 20x). Foram consideradas na análise as colônias que tinham, pelo menos, 50 células. Os dados apresentados representam a média \pm desvio padrão (DP) de 3 experimentos independentes.

5.7 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

As células foram semeadas em placa de 24 poços com densidade de 5×10^4 células/poço. Após adesão (24 horas), as células foram tratadas com PIPE e CINAM nas concentrações de 9 (IC_{25}) e 18 (IC_{50}) μM e 2 (IC_{25}) e 4 (IC_{50}) μM , respectivamente, durante 24 e 48 horas. Após tratamento 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 1000 rpm). As amostras foram fixadas com etanol gelado (75% em PBSA-Salina fosfato tamponada) por 30 minutos. Após nova centrifugação, as células foram coradas por 1 hora em uma solução contendo PBSA, RNase (10 mg/mL) e Iodeto de Propídio (300 µg/mL) (Guava Technologies-Merck Millipore). A análise foi realizada em citômetro de fluxo (Guava Mini EasyCyte, 8HT) usando o *software* GuavaSoft 2.7. Os dados apresentados referem-se à média±DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

5.8 IMUNOMARCAÇÃO PARA CICLINA D1

As células foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro (1×10^5 células/placa) sobre lamínula. As culturas foram tratadas com PIPE (9 e 18 µM) por 24 horas. Ao término do tratamento, as células foram fixadas em 3,7% de formaldeído por 30 minutos e incubadas com Triton X-100 (0,5%) por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram incubadas com anti-Ciclina D1 (1:100, Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) a 4° C pernoite. No dia seguinte, após lavagens em PBSA, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho, 1:100, Sigma) conjugado a fluoresceína por 2 horas. Os núcleos foram contracorados com DAPI (4',6-Diamidino-2'-Phenilindol diidrocloreto, Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos). As lâminas foram montadas com (Vecta Shield, Vector, California, Estados Unidos) e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon), aumento de 400x.

5.9 IMMUNOBLOT

As células foram semeadas em placas de 100mm de diâmetro (4×10^5 células/placa). Após adesão (24h) as culturas foram tratadas com PIPE (9 e 18 µM) por 24 horas. As células foram homogeneizadas em tampão RIPA (NaCl 150mM, NP-40 1,0

%, ácido deoxicolato de sódio 1% em Tris-HCL 50 mM, pH= 7,5) contendo inibidores de proteases na concentração final de 2% (mix da Sigma Aldrich LTDA, Brasil). Após centrifugação a 12000 g por 10 minutos o sobrenadante foi coletado e a quantificação de proteínas foi realizada pelo método BCA (GE Healthcare). A leitura da absorbância foi realizada por ELISA utilizando filtro de 562 nm.

As amostras foram diluídas em tampão de amostra 4x (Tris 0,5 M – pH 6,8, 4 ml de glicerol, SDS 10%, azul de bromofenol 1% e betamercaptoetanol 1% em água deionizada) e desnaturadas por 5 minutos (100°C). O fracionamento das proteínas foi realizado em minigel de poliacrilamida 12% com SDS (2,5 horas a 100V). Em cada poço foi colocado 30 µg de proteínas totais.

A transferência para membrana de PVDF (Amersham Pharmacia) foi realizada por 2 horas a 200mA em tampão (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol a 20% em água destilada). Após a transferência das proteínas, a membrana foi corada em solução de Ponceau 0,5% por 3 minutos para verificar a eficiência da transferência. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes em TBS (solução salina tamponada com Tris) a 0,02 M (10 minutos cada lavagem). O bloqueio foi realizado com TBS a 0,02 M contendo leite desnatado em pó (Molico – Nestlé) a 5% e tween 20 (Pharmacia) a 0,05% por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação.

Os anticorpos primários, ERK1 (K-23) (1:200 Santa-Cruz Biotechnologies sc-94), p-ERK (E-4) (1:200 Santa-Cruz Biotechnologies sc-7383), Ciclina D1 (1:200 Sigma-Aldrich C5588 SIGMA) e α -Tubulin (1:1000 Sigma-Aldrich LTDA, Brasil), foram diluídos em solução de bloqueio e a membrana foi incubada com os diferentes anticorpos, por 12 h, a 4°C sob agitação. Após sucessivas lavagens com TBS e TTBS (Tampão tris-salina acrescido de 0,1% de tween 20), a membrana foi incubada com anticorpos secundários *anti-IgG* de camundongo ou de coelho (1:1000) (Kit ECL[®], Amersham Pharmacia), lavada novamente e revelada por quimioluminescência (ECL[®], Amersham Pharmacia) conforme especificações do fabricante. Os resultados foram registrados em filme *Hyperfilm Amershan*. A quantificação das bandas foi realizada usando ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

5.10 ENSAIO DE ANEXINA V/PI

O ensaio foi realizado utilizando o *Kit Guava Nexin Reagent* (Merck/millipore) de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com PIPE (9 e 18 μM) e CINAM (2 e 4 μM), por 24 horas. 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, lavadas em PBSA gelado e homogeneizadas em solução contendo anexina conjugada a FITC e Iodeto de Propídio. 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) através do *software* GuavaSoft 2.7. Os dados apresentados referem-se à média \pm DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicata

5.11 ENSAIO DE DESPOLARIZAÇÃO DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

O ensaio foi realizado utilizando o *Kit Guava MitoPotential* (Merck/millipore) de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com PIPE (9 e 18 μM) e CINAM (2 e 4 μM), por 24 horas. 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, lavadas em PBSA gelado e homogeneizadas em solução contendo JC-1/7-AAD. As amostras foram incubadas por 30 minutos em estufa, 37°C e 5% CO₂. A aquisição e análise foi feita no citômetro de fluxo (Guava Mini Easy Cyte, 8HT) através do *software* GuavaSoft 2.7. Os dados apresentados referem-se à média \pm DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

5.12 ENSAIO DE COMETA

As células foram semeadas em placas de 24 poços (5x10⁴ células/poço). As culturas foram tratadas com PIPE (9 μM) e CINAM (2 μM), por 24 horas. A suspensão celular foi obtida por digestão enzimática (*Trypsin-EDTA solution*/Sigma-Aldrich LTDA, Brasil). As amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O

precipitado foi ressuspenso em 100 μ L de meio de cultura. Foi realizada contagem em hemocítmetro na presença de azul de tripano (1:1) para ajuste de inóculo (5×10^5 células/lâmina) e 70% de viabilidade. O material foi homogeneizado com 100 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (Sigma-Aldrich LTDA, Brasil). A amostra adicionada sobre lâminas revestidas previamente com agarose ponto padrão de fusão (Sigma Aldrich LTDA, Brasil). As lâminas foram mantidas a 4°C em solução tampão de lise.

A eletroforese foi realizada em cuba horizontal em condições alcalinas por 20 minutos, 20 volts e 300 mA. Deste modo, foi aplicado $1\text{v}/\text{cm}^2$. Após eletroforese, as lâminas foram transferidas para tampão de neutralização por 15 minutos, secas e coradas com Sybr Green (*Molecular Probes SYBR® Green I nucleic acid gel stain*) para observação em microscopia de fluorescência (Microscópio de Fluorescência Zeiss Axio Scope.A1, NY, USA). Foram analisados 50 cometas por lâmina através do software OpenComet /ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Os resultados apresentados referem-se à média \pm DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

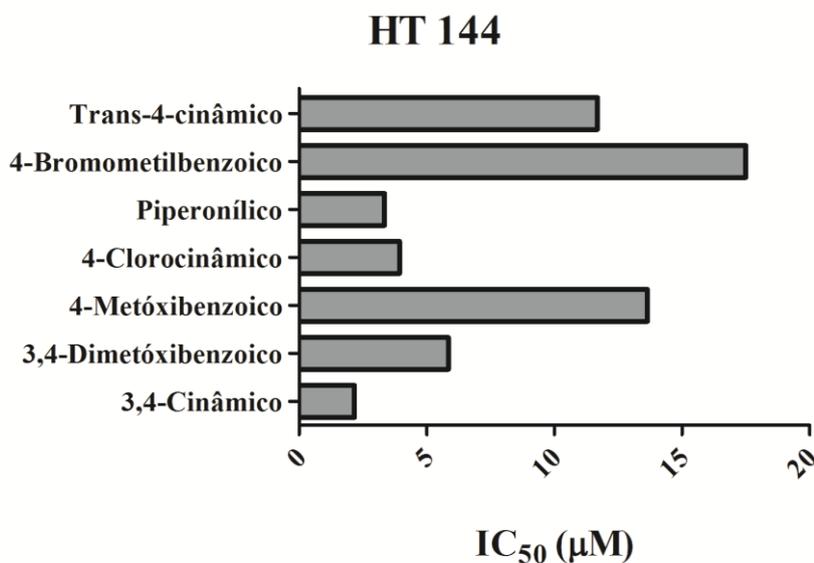
5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados preliminares do nosso laboratório, ainda não publicados, demonstraram grande atividade citotóxica de uma série inédita de complexos de Rutênio (II) coordenados a diferentes ácidos orgânicos frente células derivadas de melanoma (HT 144) (Figura 6). Dentre os sete complexos testados, dois deles foram mais efetivos: Rutênio(II)/Ácido Piperonílico, denominado PIPE; e Rutênio(II)/Ácido 3,4-Cinâmico, denominado CINAM. Considerando os resultados prévios, esses dois complexos foram selecionados e testados contra células da linhagem A549, a qual representa um modelo de câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC).

Figura 6 - Valores de IC_{50} obtidos por ensaio de MTS após tratamento por 48 horas com os complexos de rutênio coordenados a ácidos orgânicos frente à linhagem HT 144, derivada de melanoma humano.



Fonte: Do autor.

6.1 PIPE E CINAM SÃO EFETIVOS EM REDUZIR A VIABILIDADE DE CÉLULAS A549

O estudo frente à linhagem A549 demonstrou significativa redução da viabilidade celular após 24 e 48 horas de tratamento (Figuras 7A e 7B), cujos valores de

CI₅₀ foram $16,99 \pm 0,39$ e $4,11 \pm 0,27$ μM para PIPE; $3,31 \pm 0,16$ e $0,16 \pm 0,06$ μM para CINAM, respectivamente (Tabela 2). A cisplatina foi utilizada como controle positivo e os valores de CI₅₀ encontrados foram $61,84 \pm 7,75$ e $24,70 \pm 4,78$ μM , respectivamente, após 24 e 48 horas de tratamento. Assim sendo, PIPE e CINAM foram mais efetivos em reduzir a viabilidade em relação à cisplatina, um agente altamente citotóxico usado em protocolos de quimioterapia para alguns tipos de câncer incluindo o câncer de pulmão.

Vale ressaltar que durante o processo de síntese dos complexos em estudo, os ácidos orgânicos, que dão nome as moléculas, foram coordenados ao precursor *CisBipy*, um esqueleto carbônico que contém o átomo de rutênio. A reação de síntese foi realizada em um sistema a vácuo, com atmosfera inerte, para evitar a oxidação do metal (BARBOSA et al., 2015). No presente estudo, foi avaliada a possível influência desses precursores, bem como, dos ácidos orgânicos isolados (piperonílico e 3,4-cinâmico) sobre a viabilidade de células A549, após 48 h de tratamento. Os resultados mostraram baixa atividade citotóxica dessas substâncias com valores de CI₅₀ superiores a 100 μM . Os dados demonstram, portanto, que a grande atividade citotóxica observada para os complexos de rutênio está relacionada exclusivamente com a estrutura coordenada dos mesmos, indicando a importância do metal para a atividade biológica observada.

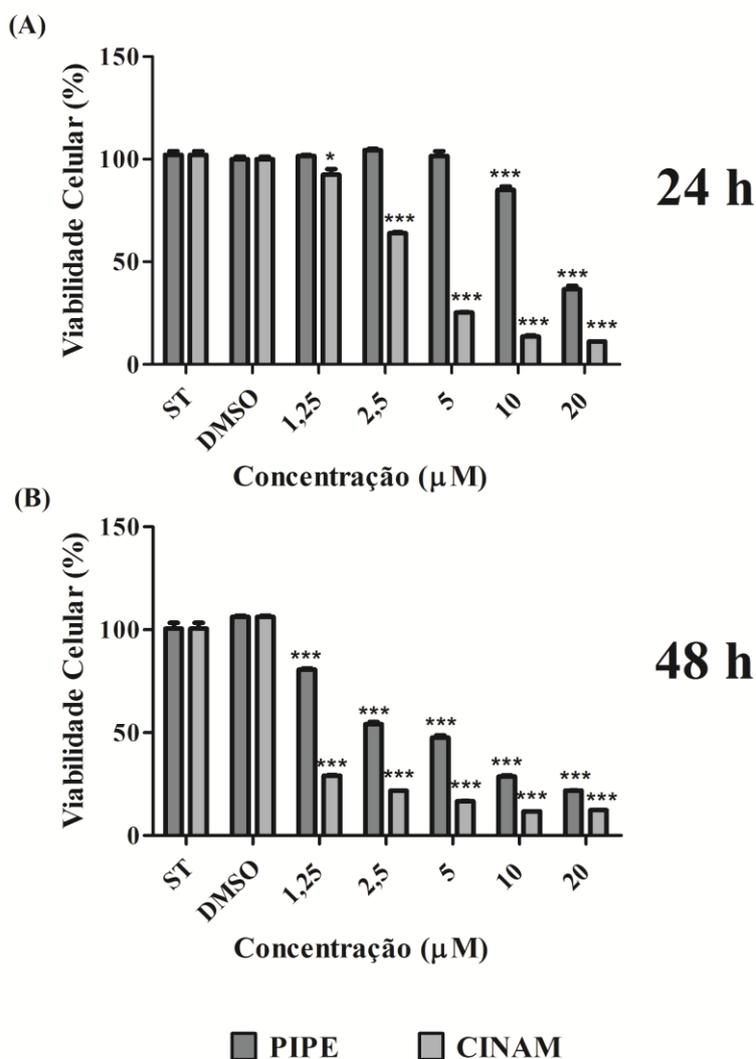
Li et al. (2015) investigaram a atividade citotóxica de 4 complexos sintetizados por seu grupo sobre a viabilidade das linhagens A549, BEL-7402 (hepatoma), MG-63 (osteossarcoma) e HeLa (cervical), usando o ensaio colorimétrico MTT. Os resultados mostraram que os complexos 3 e 4 efetivamente reduziram a viabilidade de células A549 com baixos valores de CI₅₀, contudo, o efeito citotóxico foi moderado contra BEL-7402. Além disso, as linhagens MG-63 e HeLa mostraram-se resistentes. Segundo os autores, o efeito dos complexos 3 e 4 sobre a linhagem A549 foi menor quando comparado à Cisplatina para a mesma linhagem testada.

O efeito sobre a viabilidade celular de PIPE e CINAM também foi avaliado sobre células normais (CCD-1059Sk), as quais são derivadas de fibroblastos de pele normal humana. De acordo com os valores de CI₅₀ obtidos, a citotoxicidade é menor em célula normal em comparação com a célula tumoral. Os valores referentes ao índice de seletividade (IS) foram 3,02 e 30 para PIPE e CINAM, respectivamente (Tabela 3). Resultados semelhantes foram descritos por Correa et al. (2015) que evidenciaram maior efetividade de complexos de rutênioII/tiureia em reduzir a viabilidade de células DU-145 (derivadas de câncer de próstata humana) e A549 quando comparado aos

efeitos da cisplatina. Além disso, os autores demonstraram que um dos complexos apresentou maior seletividade para a célula tumoral DU-145 em relação a linhagem normal (L929).

Segundo Suffness; Pezzuto; Hostettmann (1991), o Índice de Seletividade - IS (razão entre o CI_{50} da substância teste em linhagem de células normais e CI_{50} da substância teste sobre as linhagens tumorais) é um indicativo da potencial utilização da substância em ensaios clínicos. Por conseguinte, um valor maior que 2 é indicativo de seletividade da substância para células tumorais.

Figura 7 - Viabilidade celular da linhagem A549 (carcinoma de pulmão humano), determinada por ensaio de MTS, após tratamento com PIPE e CINAM em diferentes concentrações (μM) por 24 (A) e 48 (B) horas.



Fonte: Do autor

Notas: Os valores de viabilidade celular representados no gráfico referem-se à média do experimento realizado em triplicata e a barra de erros representa o desvio padrão. (ST: sem tratamento DMSO: veículo). *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Tabela 2 - Valores de $CI_{50} \pm DP$ (μM) determinados a partir dos resultados obtidos no ensaio de MTS.

	24h	48h
PIPE	17,99 \pm 0,39	4,11 \pm 0,27
CINAM	4,31 \pm 0,16	0,16 \pm 0,06
Ácido piperonílico	n.d	> 100
Ácido 3,4-cinâmico	n.d	> 100
CisBipy	n.d	> 100
CIS*	61,84 \pm 7,75	24,70 \pm 4,78

*Cisplatina = fármaco de referência. n.d. = não determinado.

Fonte: Do autor.

Tabela 3 - Índices de seletividade calculados com base nos valores de CI_{50} obtidos por ensaio de MTS para as linhagens A549 e CCD-1059Sk após 48h de tratamento.

	CCD-1059Sk	A549	IS*
PIPE	12,43 \pm 0,37	4,11 \pm 0,27	3,02
CINAM	4,80 \pm 0,29	0,16 \pm 0,06	30

*IS = $IC_{50}CCD-1059Sk/IC_{50}A549$

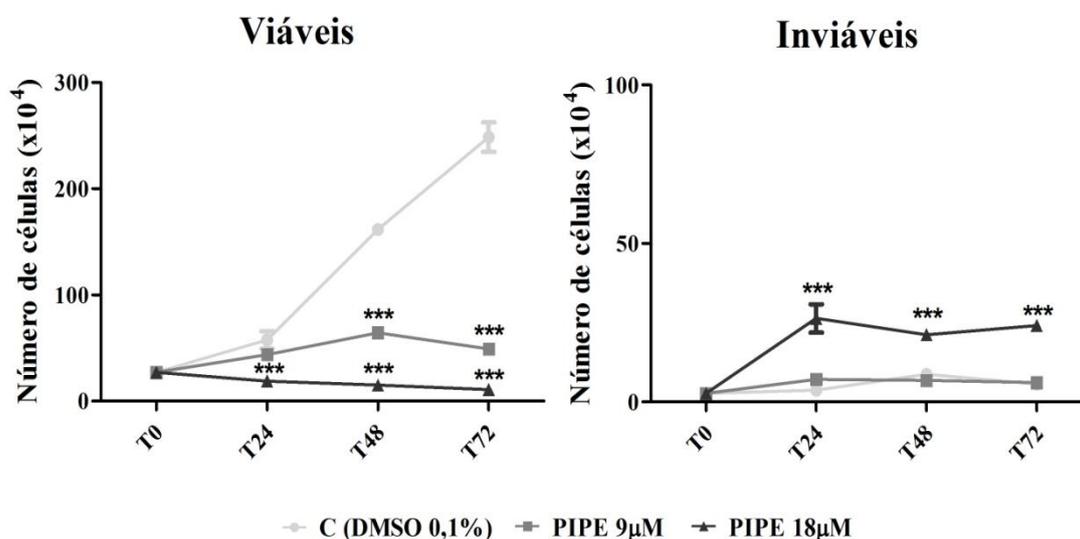
Fonte: Do autor.

6.2 PIPE E CINAM EXIBEM PROPRIEDADES ANTIPROLIFERATIVA E CITOTÓXICA FRENTE À LINHAGEM A549

Os ensaios colorimétricos, em especial os baseados na conversão de sais de tetrazolio, são metodologias amplamente utilizadas para estudar o efeito de diferentes compostos sobre a viabilidade celular, todavia, não permitem avaliar se a redução da viabilidade celular é decorrente de inibição da proliferação e/ou morte celular. Desta forma, foi utilizado o ensaio de exclusão com Azul de Tripano como um parâmetro adicional para avaliar a viabilidade celular. Essa abordagem metodológica permite distinguir as populações de células viáveis e inviáveis, já que, o corante azul de tripano penetra somente em células que perderam a integridade da membrana e, portanto, marcam as células mortas (HYNES et al., 2003; MINERVINI et al., 2004).

De acordo com dados obtidos pelo ensaio de exclusão com azul de tripano, a frequência de células viáveis é drasticamente reduzida em culturas de A549 tratadas com PIPE (9 μM). Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, houve redução de 25%, 60% e 80%, respectivamente, no número de células viáveis em relação ao controle. Entretanto, não foi observado aumento significativo na frequência de células mortas. Quando as culturas foram tratadas com PIPE (18 μM), o número de células viáveis foi menor nas culturas tratadas por 24 h (68%), 48 h (91%) e 72 h (96%) quando comparado às culturas controles. Além disso, o tratamento com PIPE a 18 μM também provocou aumento significativo no número de células mortas, pois foi observado 52% de células inviáveis nas culturas tratadas por 24 horas e esse panorama se manteve nas culturas tratadas por 48 h e 72 h. Os resultados indicam, portanto, que PIPE na concentração de 9 μM tem efeito, preferencialmente, antiproliferativo frente a linhagem A549; ao passo que quando utilizado a 18 μM , seu efeito é citotóxico (Figura 8).

Figura 8 - Populações de células viáveis e inviáveis, após tratamento com PIPE, determinadas por contagem em câmara de Neubauer após ensaio de exclusão com Azul de Tripiano.



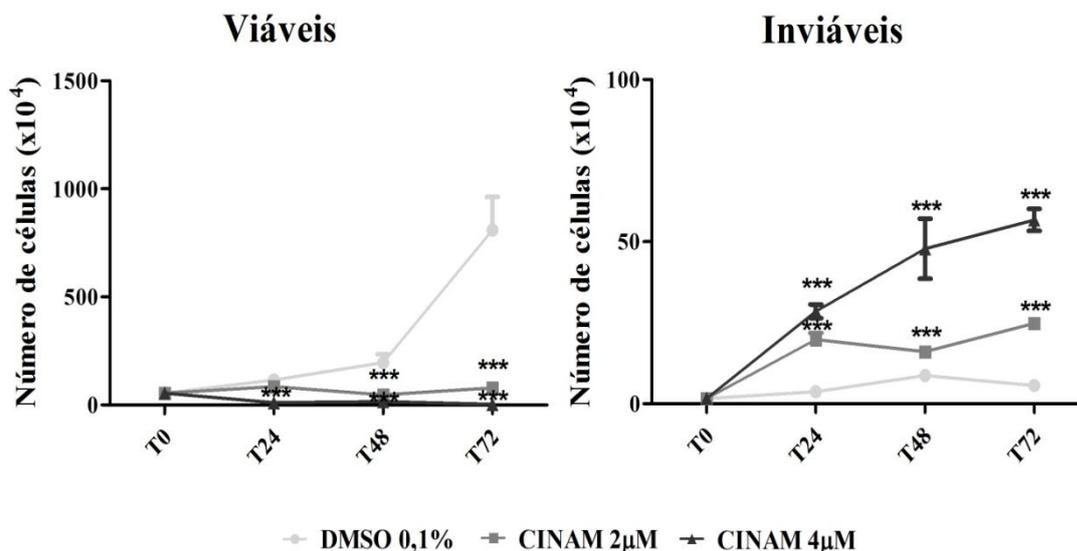
Fonte: Do autor.

Quando as culturas foram tratadas com CINAM a 2 μM houve redução acentuada do número de células viáveis em todos os tempos de tratamento avaliados. Foi possível observar também um aumento do número de células mortas. Já nas culturas tratadas com 4 μM , o número de células mortas correspondiam a 72%, 84% e 94% do

total de células contadas, após 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Portanto, o tratamento com CINAM mostrou-se mais citotóxico que PIPE, pois induziu aumento significativo no número de células mortas mesmo quando utilizado a 2 μM (Figura 9).

Considerando que os complexos estudados neste trabalho são inéditos, não existem dados na literatura relacionados à atividade antiproliferativa e/ou citotóxica dos mesmos, contudo, Fontana et al. (2011) mostraram que um complexo de rutênio coordenado com açúcar foi efetivo em reduzir a viabilidade de células da linhagem A375 (melanoma metastático) após 72 h de tratamento, contudo esses resultados foram alcançados quando o referido complexo foi utilizada a 100 μM .

Figura 9 - Populações de células viáveis e inviáveis, após tratamento com CINAM, determinadas por contagem em câmara de Neubauer após ensaio de exclusão com Azul de Tripano.



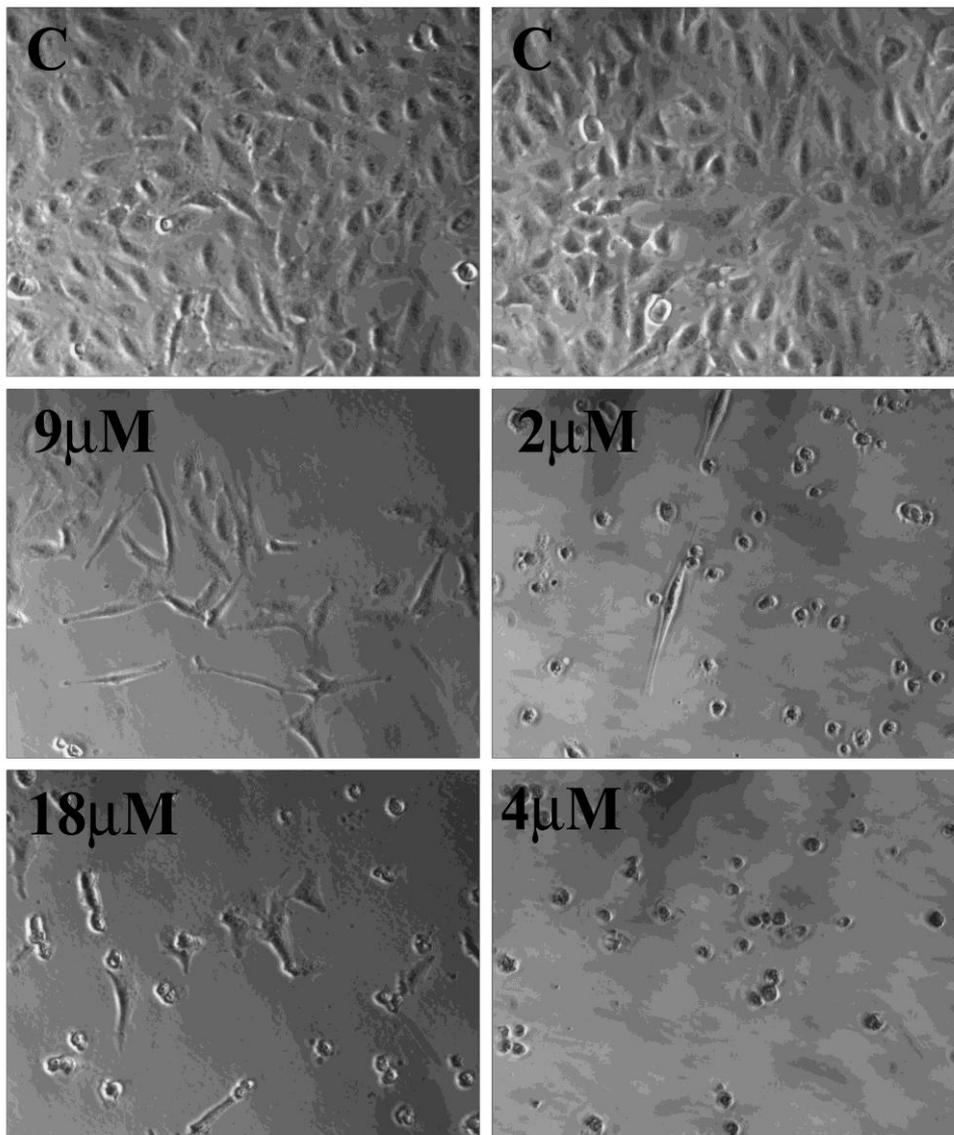
Fonte: Do autor.

6.3 PIPE E CINAM PROMOVEM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM CULTURAS DE A549

A figura 10 mostra, de forma ilustrativa, a morfologia de células A549 após 24h de tratamento. É possível notar que tanto PIPE quanto CINAM são efetivos em reduzir a densidade de células na cultura. Alterações morfológicas podem ser

evidenciadas nas culturas tratadas com PIPE (18 μM) e com CINAM (2 e 4 μM), considerando que as células tornaram-se arredondas.

Figura 10 - Imagens ilustrativas do aspecto morfológico das culturas de A549 tratadas com PIPE (esquerda) e CINAM (direita) por 24 horas, obtidas em microscópio invertido de contraste de fase.



Fonte: Do autor.

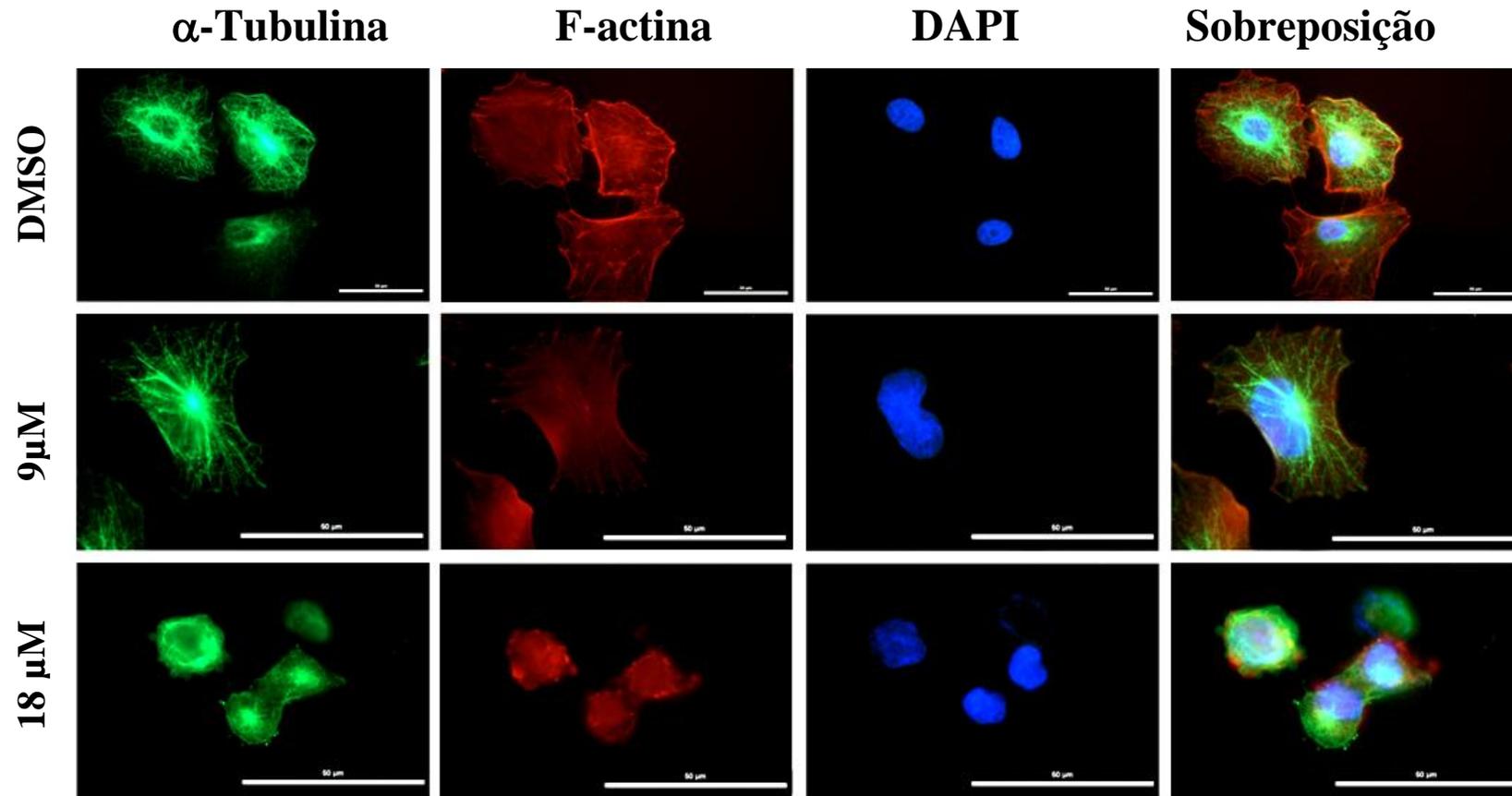
Considerando as alterações morfológicas observadas por microscopia de contraste de fase após tratamento com os complexos estudados, foram realizadas preparações citológicas para investigar possível influência no arranjo normal de elementos do citoesqueleto (microtúbulos e microfilamentos) das culturas de A549 mediante ao tratamento com PIPE e CINAM.

Moléculas capazes de interferir na polimerização de microtúbulos e microfilamentos são consideradas agentes antitumorais promissores (KORB et al., 2004; YAMAGUCHI; CONDEELIS, 2007), já que, eventos coordenados de polimerização e despolimerização de microtúbulos são essenciais para a separação das cromátides irmãs durante a anáfase e, a instabilidade dinâmica da actina está intimamente relacionada aos processos de citocinese, migração e invasão (NURNBERG; KITZING; GROSSE, 2011).

As preparações citológicas marcadas para tubulina e actina-F evidenciaram o padrão normal de distribuição de microtúbulos e de microfilamentos em células A549. O tratamento com PIPE alterou o padrão normal de distribuição desses elementos, contudo as respostas parecem ter sido diferentes considerando as concentrações de 9 μM e 18 μM (Figura 17). Quando utilizado na concentração de 18 μM , PIPE induziu drástica desorganização da rede de microtúbulos e de microfilamentos. Entretanto, nas culturas tratadas com PIPE a 9 μM foi possível observar longos microtúbulos distribuídos no citoplasma, ao invés do padrão em rede, sugerindo que os microtúbulos possam ter sido estabilizados em decorrência do tratamento. Quanto aos microfilamentos, quando PIPE foi utilizado em concentração subtóxica menos filamentos de actina foram visualizados no citoplasma, sendo esse efeito mais proeminente na região do córtex (Figura 11). O tratamento com CINAM também alterou o padrão normal de distribuição de microtúbulos e microfilamentos e os efeitos foram mais evidentes após tratamento com 4 μM , com drástica desorganização do citoesqueleto de tubulina e actina (Figura 12).

A cisplatina, devido ao seu caráter multi-alvo, também exibe atividade contra componentes do citoesqueleto. Kopfer-Maier; Muhlhausen (1992) estudaram as alterações no padrão do citoesqueleto das linhagens G22 (carcinoma escamoso de estômago de camundongo) e L266 (carcinoma escamoso de pulmão humano) expostas por 90 minutos a baixas concentrações de cisplatina ($2,5 \times 10^{-6}$, 5×10^{-6} e 10^{-5}M) e recuperadas por 24 horas. Os autores relataram que a molécula pode interagir com proteínas associadas a elementos do citoesqueleto como as MAP's (proteínas associadas aos microtúbulos) e IFAP's (proteínas associadas aos filamentos intermediários). O fármaco também pode se ligar diretamente aos grupos sulfidríla das moléculas de tubulina e induzir assim colapso da rede.

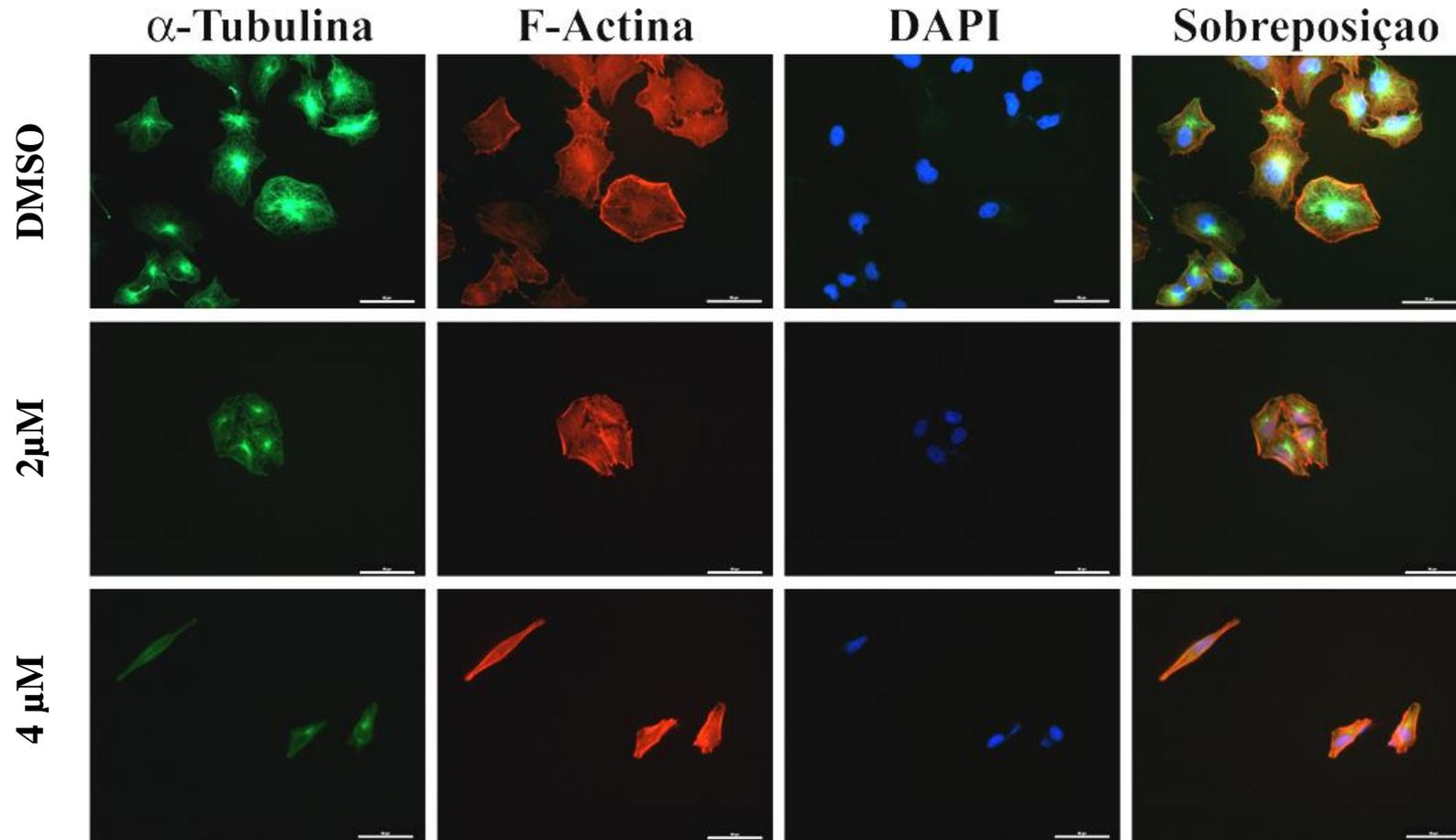
Figura 11- Imagens obtidas por microscopia de fluorescência evidenciando os elementos do citoesqueleto após tratamento com PIPE



Fonte: Do autor.

Notas: As culturas foram tratadas com 9 e 18 μ M de PIPE por 24 horas. Os microtúbulos são evidenciados pela imunomarcagem com anti-alfa tubulina conjugado a FITC (verde) e os microfilamentos foram evidenciados pela marcação com faloidina conjugada à TRITC (vermelho). Os núcleos foram contraincorados com DAPI. A imagem mostra que o padrão normal de distribuição filamentos de actina e dos microtúbulos foi alterado em decorrência do tratamento com PIPE.

Figura 12- Imagens obtidas por microscopia de fluorescência evidenciando os elementos do citoesqueleto após tratamento com CINAM



Fonte: Do autor.

Notas: As culturas foram tratadas com 2 e 4 μ M de CINAM por 24 horas. Os microtúbulos foram evidenciados pela imunomarcagem com anti-alfa tubulina conjugado a FITC (verde) e os microfilamentos foram evidenciados pela marcação com faloidina conjugada à TRITC (vermelho). Os núcleos foram contracolorados com DAPI. A imagem mostra que o padrão normal de distribuição filamentos de actina e dos microtúbulos foi alterado em decorrência do tratamento com CINAM.

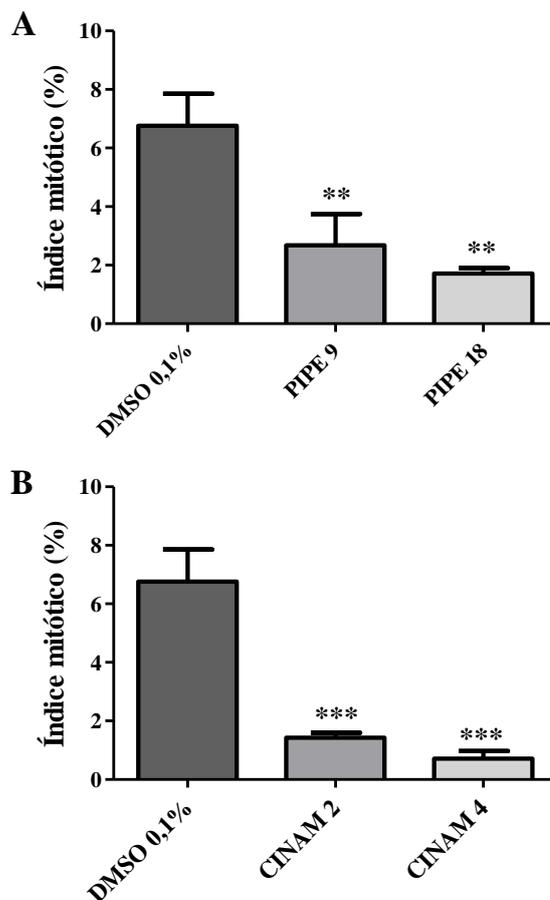
Não existem relatos na literatura acerca da atividade de complexos de rutênio(II) sobre os microtúbulos, contudo, o efeito citotóxico de alguns fármacos é mediado por alterações na dinâmica de polimerização dos microtúbulos induzem aumento na frequência de células em mitose, bem como, aumento na população de células com fuso mitótico aberrante (KUZNETSOV et al., 2009). Nas amostras tratadas com PIPE e CINAM esses eventos não foram observados.

Os efeitos dos complexos PIPE e CINAM sobre o citoesqueleto podem ter sido decorrentes de sua interferência direta na instabilidade dinâmica dos microtúbulos e microfilamentos, ou de processos indiretos que possam perturbar o mecanismo de polimerização/despolimerização dos dímeros de tubulina e actina. Alternativamente, os complexos podem ter alterado o perfil de expressão das proteínas que constituem esses elementos do citoesqueleto. Embora esses aspectos não tenham sido investigados no presente estudo, a observação de que os referidos complexos exercem efeito sobre o citoesqueleto é extremamente relevante e fortalece a proposta de que PIPE e CINAM possam ser um promissor agente antitumoral.

6.4 PIPE E CINAM PROMOVEM REDUÇÃO NA FREQUÊNCIA DE MITOSES EM CULTURAS DE A549

No presente trabalho também foi avaliada a frequência de mitoses em culturas de A549 tratadas com PIPE e CINAM, considerando as alterações em elementos do citoesqueleto e dados obtidos por citometria de fluxo que mostraram uma redução significativa na frequência de células em G₂/M (dados mostrados adiante no item 6.7). O índice mitótico diminuiu significativamente após as 24 horas de tratamento, com redução de 62% e 76% nas culturas tratadas com 9 e 18 µM, respectivamente (Figura 13A). O tratamento com CINAM foi ainda mais drástico que PIPE, reduzindo em 79% a frequência de mitoses após 24 horas de tratamento a 2 µM. Quando as culturas foram tratadas com 4 µM a redução do índice mitótico chegou a 90 (Figura 13B)

Figura 13 - Índice mitótico em culturas de A549 após tratamento com os complexos PIPE.e CINAM



Fonte: Do autor

Notas: As culturas foram tratadas com 9 e 18 μM de PIPE (A) e 2 e 4 μM de CINAM (B) por 24 horas. Após o tratamento os núcleos foram contracorados com DAPI e as lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência, no aumento 400x. Os valores contidos no gráfico referem-se à frequência de mitoses em 1000 células contadas e estão representados como a média de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

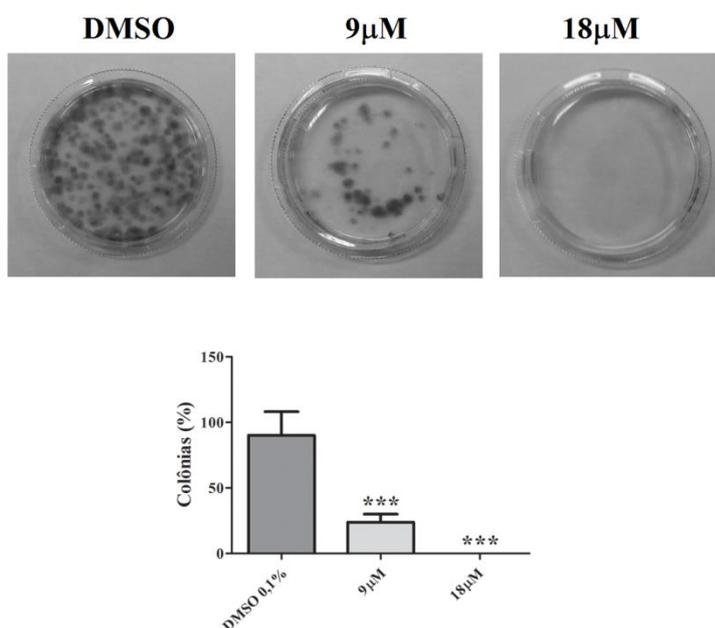
6.5 PIPE E CINAM INIBEM A CAPACIDADE DE CÉLULAS A549 EM FORMAR COLÔNIAS

Considerando os dados prévios, objetivou-se avaliar a capacidade dos complexos PIPE e CINAM em inibir a proliferação de células A549 por períodos prolongados. Para isso, foram realizados ensaios de capacidade clonogênica. Após

tratamento de 24 horas com PIPE (9 μM) houve redução de 63% na formação de colônias. Quando as culturas foram tratadas pelo mesmo período com PIPE a 18 μM não foi observado crescimento de colônias (Figura 14).

O tratamento com 2 μM de CINAM inibiu em 94% a capacidade das células em formar colônias. Quando as culturas foram tratadas com CINAM 4 μM , a capacidade clonogênica foi totalmente inibida, uma vez que não foram observadas colônias (Figura 15). Desta forma, os resultados indicam que o tratamento por 24 horas com ambos os complexos foi efetivo em inibir a proliferação por um período prolongado, um aspecto importante considerando que a progressão do tumor envolve a intensa atividade proliferativa das células tumorais, as quais podem adquirir fenótipo invasivo e formar metástase (EVAN; VOUSDEN, 2001).

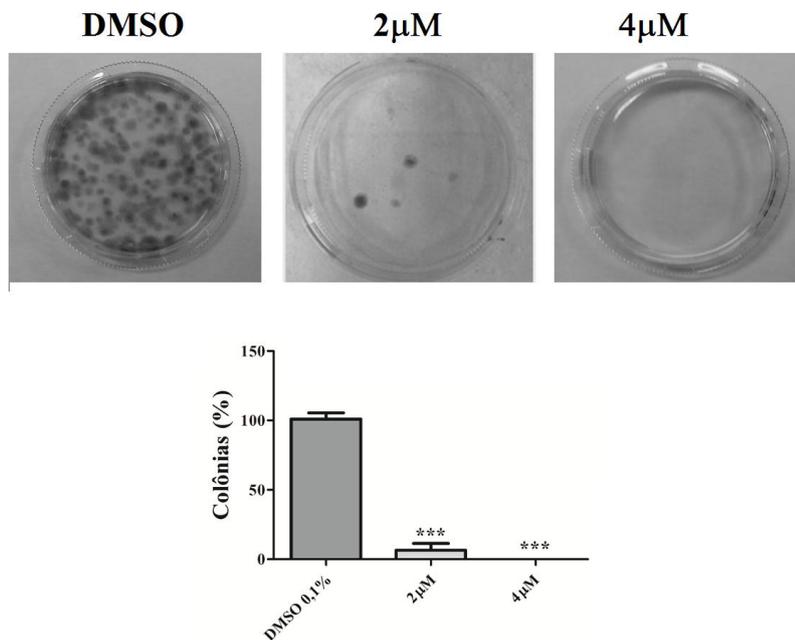
Figura 14 - Capacidade clonogênica da linhagem A549 após tratamento com PIPE por 24 horas.



Fonte: Do autor.

Notas: Análise da capacidade clonogênica de células A549 após exposição de 24h ao PIPE 9 e 18 μM , evidenciando redução significativa da capacidade de formar colônias. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Imagens ilustrativas do ensaio clonogênico são mostradas na parte superior. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 15 - Capacidade clonogênica da linhagem A549 após tratamento com CINAM por 24 horas.



Fonte: Do autor.

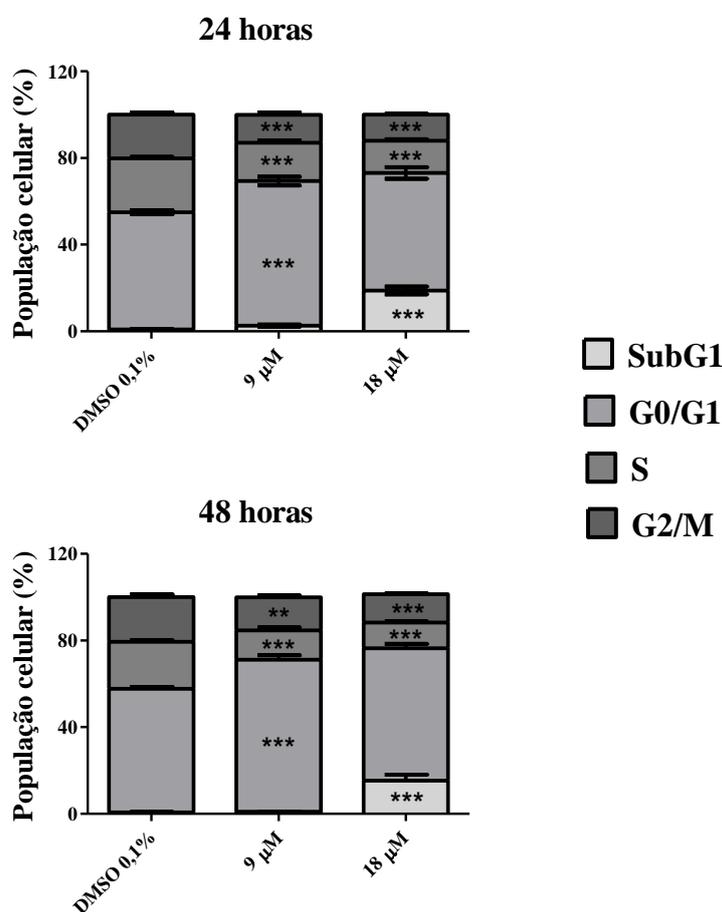
Notas: Análise da capacidade clonogênica de células A549 após exposição de 24h ao CINAM 2 e 4 µM, evidenciando redução significativa da capacidade de formar colônias. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Imagens ilustrativas do ensaio clonogênico são mostradas na parte superior. *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

6.6 PIPE INDUZ BLOQUEIO DA TRANSIÇÃO G₁/S ENQUANTO CINAM PROMOVE AUMENTO EXPRESSIVO DE CÉLULAS EM SUB-G₁

A cinética de progressão do ciclo celular também foi avaliada no presente estudo. Os resultados obtidos por citometria de fluxo estão apresentados nas figuras 16 e 17. Nas culturas tratadas com PIPE por 24 h (9 µM) houve aumento significativo da população G₀/G₁ com concomitante redução das populações S e G₂/M. Quando as culturas foram tratadas com 18 µM de PIPE pelo mesmo período, foi observado aumento na população de células em Sub-G₁ e redução na frequência de células nas fases S, G₂/M (Figura 16 e Tabela 4). O mesmo perfil foi observado quando as culturas foram submetidas ao tratamento por 48 horas (Figura 16 e Tabela 4).

O aumento da população Sub-G1 é um indicativo de citotoxicidade, uma vez que, esta população é constituída por células que apresentam conteúdo de DNA inferior a 2C, fato que ocorre quando há fragmentação do DNA, um indicativo de morte celular (SOARES et al., 2013). Assim sendo, os dados de citometria de fluxo corroboraram aqueles obtidos nos ensaios de viabilidade, pois houve significativo aumento na população sub-G₁ quando PIPE foi utilizado na concentração de 18 μ M, ao passo que, em concentrações menores (9 μ M) parece induzir bloqueio do ciclo celular na transição G₁/S, reforçando a hipótese de que tem, preferencialmente, atividade antiproliferativa quando utilizado em baixas concentrações.

Figura 16 - Análise da progressão do ciclo celular, após 24 h e 48 h de tratamento com PIPE.



Fonte: Do autor.

Notas: As células foram tratadas por 24 e 48 horas com PIPE 9 e 18 μ M e coradas com solução de Iodeto de Propídio. Os valores representados no gráfico referem-se à média de 3 experimentos independentes e a barra de erros representa o desvio padrão ***p<0,001 e **p<0,01 de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Tabela 4 – Porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular mediante tratamento com PIPE por 24 h e 48 h.

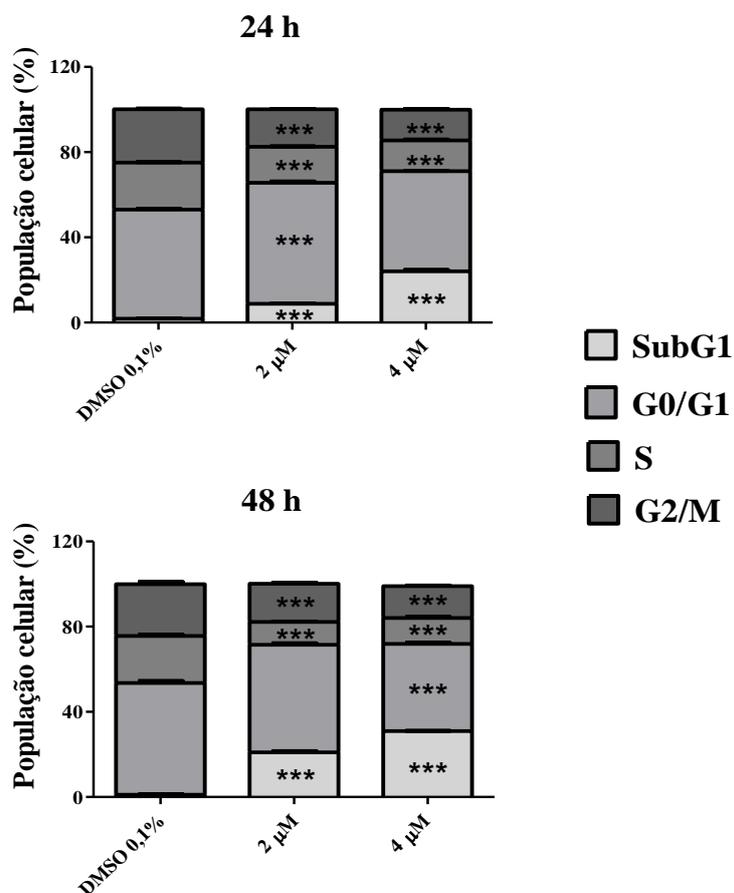
		Sub-G₁	G₀/G₁	S	G₂/M
24 h	DMSO 0,1%	0,89 ± 0,64	54,08 ± 2,98	24,93 ± 2,17	20,10 ± 3,54
	9 µM	2,68 ± 1,50	66,65 ± 6,71	17,76 ± 3,44	12,92 ± 3,53
	18 µM	18,84 ± 6,06	54,26 ± 4,65	14,85 ± 2,46	12,04 ± 1,42
48 h	DMSO 0,1%	0,64 ± 0,36	57,09 ± 1,75	21,73 ± 1,62	20,53 ± 2,85
	9 µM	0,91 ± 0,25	70,28 ± 4,62	13,48 ± 3,14	15,33 ± 1,75
	18 µM	15,33 ± 6,27	61,13 ± 4,47	11,79 ± 1,19	13,15 ± 0,75

Fonte: Do autor.

O tratamento com CINAM (2 µM), durante as primeiras 24 horas induziu aumento expressivo na frequência de células em Sub-G₁. Paralelamente foi observado aumento na população de células na fase G₀/G₁ e diminuição na frequência de células nas fases S e G₂/M. Nas culturas tratadas pelo mesmo período com CINAM na concentração de um aumento drástico na frequência de células em Sub-G₁ em comparação ao controle com concomitante redução na população de células em S e G₂/M. Um perfil semelhante foi observado quando as culturas foram tratadas por 48 h (Figura 17 e tabela 5).

Diante dos resultados obtidos por citometria de fluxo, novamente há a indicação de maior citotoxicidade do CINAM em comparação ao PIPE, devido ao grande acúmulo de células em Sub-G₁ após 24 horas de tratamento. Resultado semelhante foi descrito por Li et al., (2014), onde o tratamento com complexos de rutênio/polipiridil levaram ao aumento da população de células A549 com DNA fragmentado.

Figura 17 - Análise da progressão do ciclo celular, após 24 h e 48 h de tratamento com CINAM.



Fonte: Do autor.

Notas: As células foram tratadas por 24 e 48 horas com CINAM 2 e 4 μM e coradas com solução de Iodeto de Propídio. Os valores representados no gráfico referem-se à média de três experimentos independentes e a barra de erros representa o desvio padrão *** $p < 0,001$ acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Tabela 5 – Porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular mediante tratamento com CINAM, por 24 e 48 horas.

		SubG ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
24 h	DMSO 0,1%	1,84 ± 0,37	51,23 ± 0,49	22,02 ± 0,45	25,03 ± 0,52
	2 μM	8,89 ± 0,27	56,72 ± 1,07	16,89 ± 0,45	17,61 ± 0,50
	4 μM	24,02 ± 1,32	47,04 ± 0,1	14,44 ± 0,77	14,48 ± 0,60
48 h	DMSO 0,1%	1,10 ± 0,35	52,47 ± 1,55	22,13 ± 1,01	24,23 ± 1,75
	2 μM	21,00 ± 1,13	50,47 ± 1,31	10,77 ± 0,35	17,97 ± 0,76
	4 μM	30,93 ± 0,15	40,90 ± 1,01	12,20 ± 0,78	14,88 ± 0,66

Fonte: Do autor.

As propriedades antitumorais do complexo Polipiridil/Rutênio (Ru1) sintetizado por Lai et al., (2015) foram avaliadas sobre as linhagens A549, BEL-7402 e MG-63. A análise do ciclo celular da linhagem A549, após tratamento com Ru1, demonstrou que tal complexo pode aumentar cerca de 8% o número de células da população G_0/G_1 com redução de 7% de células na fase S. Nas linhagens BEL-7402 e MG-63 houve aumento expressivo de células nas fases G_2/M e redução da população em G_0/G_1 . Desta forma os autores sugeriram que Ru1 é capaz de inibir a proliferação celular por induzir bloqueio na transição G_1/S em células A549.

O bloqueio na transição G_1/S pode ocorrer em decorrência a múltiplos eventos, contudo danos ao DNA podem levar o recrutamento e ativação de ATM/ATR com consequente ativação das proteínas de *checkpoints*, as quais fosforilam p53 tornando-a estável. Esta, por sua vez, induz a expressão de p21 que inibe os complexos ciclina-Cdk de G_1 . A p53 pode também contribuir para a indução de apoptose, caso o dano ao DNA não seja reparado (KASTAN; BARTEK, 2004).

6.7 PIPE REDUZ A EXPRESSÃO DE CICLINA D1 E FOSFORILAÇÃO DE ERK

Considerando que a ciclina D representa um regulador crítico da progressão pela fase G_1 (ZHANG et al., 2010), foram realizadas preparações citológicas imunomarcadas para a ciclina D1. A figura 18 mostra o padrão de marcação para a ciclina D em células A549. Foi possível observar que a localização de ciclina D1 foi predominante nuclear tanto em células controles como nas tratadas. Embora não tenha sido feita análise quantitativa desta imagem, houve menor frequência de células marcadas por campo nas culturas tratadas em comparação ao controle. A quantificação dos níveis de expressão de ciclina D1 foi realizada por *immunoblot* e os resultados indicaram que os níveis de expressão de ciclina D1 diminuíram significativamente em decorrência do tratamento com PIPE 9 e 18 μM (Figura 19C)

De acordo com a revisão de Gautschi et al. (2006), o processo de carcinogênese pulmonar é complexo, com alterações em muitos oncogenes e genes supressores de tumor incluindo o gene *CCND1*, que codifica a proteína ciclina D1. O fumo induz o acúmulo nuclear de ciclina D1 em epitélio bronquial humano, fato que favorece a atividade proliferativa e pode contribuir para progressão e invasão

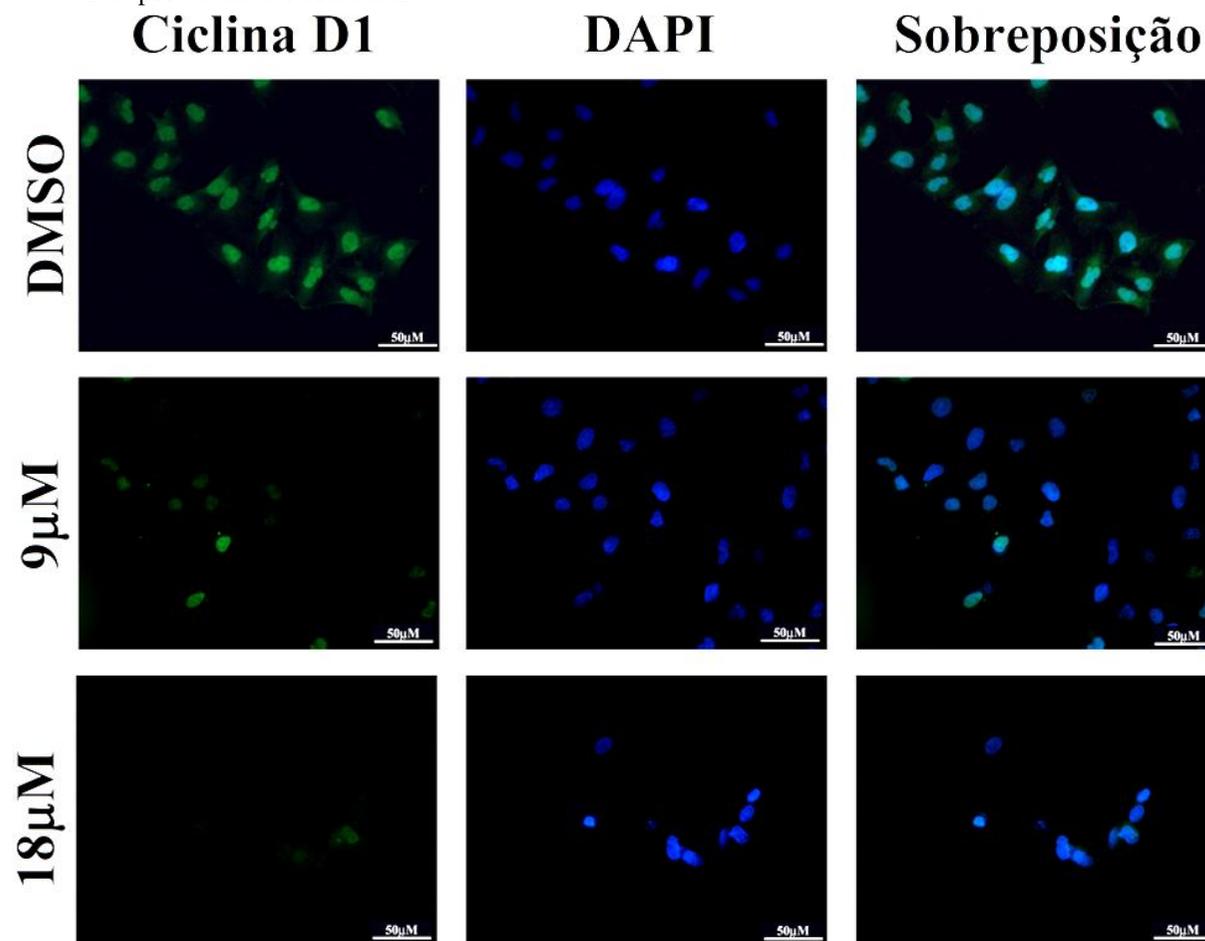
tumoral. Assim sendo, PIPE pode estar induzindo bloqueio do ciclo celular na transição G₁/S, pelo menos em parte, por inibir a expressão de ciclina D. Segundo Chen et al. (2016), o complexo de rutênio (II) metilimidazol, sintetizado por seu grupo, induziu bloqueio na transição G₁/S em células A549, sendo esse processo acompanhado pelo aumento nos níveis de fosforilação de p53 e diminuição nos níveis de expressão de ciclina D1. Os autores também demonstraram que esses fenômenos foram críticos e contribuíram para a indução de apoptose.

Segundo Tang et al. (2005), mutações no domínio quinase do *EGFR* ocorrem no início do desenvolvimento dos adenocarcinomas e tais mutações não estão relacionadas ao tabagismo. Mutações do gene *KRAS* também podem ocorrer no início do adenocarcinoma e estão estritamente relacionadas ao hábito de fumar dos pacientes. No câncer de pulmão, de acordo com Herbst, Heymach e Lippman (2008), as mutações dos genes *EGFR* e *KRAS*, levam a superativação de vias de sinalização que controlam o crescimento e a progressão tumoral, em especial, a via RAS-RAF-MEK-ERK. Neste contexto, o perfil de ativação de ERK também foi investigado por *immunoblot* e os resultados mostraram que houve significativa redução da fosforilação de ERK em culturas de A549 tratadas por 24 horas com 9 e 18 µM de PIPE (Figura 19B).

O complexo de Ru(II)/polipiridil sintetizado e caracterizado por Chen et al. (2016) apresentou citotoxicidade seletiva para a linhagem A549 e estudos revelaram que atividade citotóxica observada foi decorrente de bloqueio G₂/M e indução de apoptose mediada por espécies reativas de oxigênio (ERO). O complexo induziu dano ao DNA e ativação de ATM, Histona H2AX e p53. Interessantemente, o complexo causou aumento nos níveis de fosforilação de ERK. O que constitui o primeiro relato de um complexo de rutênio capaz de induzir apoptose com ativação de ERK.

Em oposição ao que foi descrito por Chen e seu grupo, os dados aqui apresentados, indicam que a atividade antiproliferativa de PIPE observada com o bloqueio do ciclo celular na transição G₁/S parece estar envolvido com redução dos níveis de fosforilação de ERK, bem como, diminuição dos níveis de expressão de Ciclina D1. Esses resultados são muito interessantes considerando que a ativação de ciclina D1 pode ser estimulada por ERK (ALBANESE et al., 1995; LAVOIE., 1996; MELOCHE; POYSSÉGUR, 2007).

Figura 18 - Imagens obtidas por microscopia de fluorescência evidenciando a diminuição dos níveis de expressão de Ciclina D1 após tratamento com PIPE.

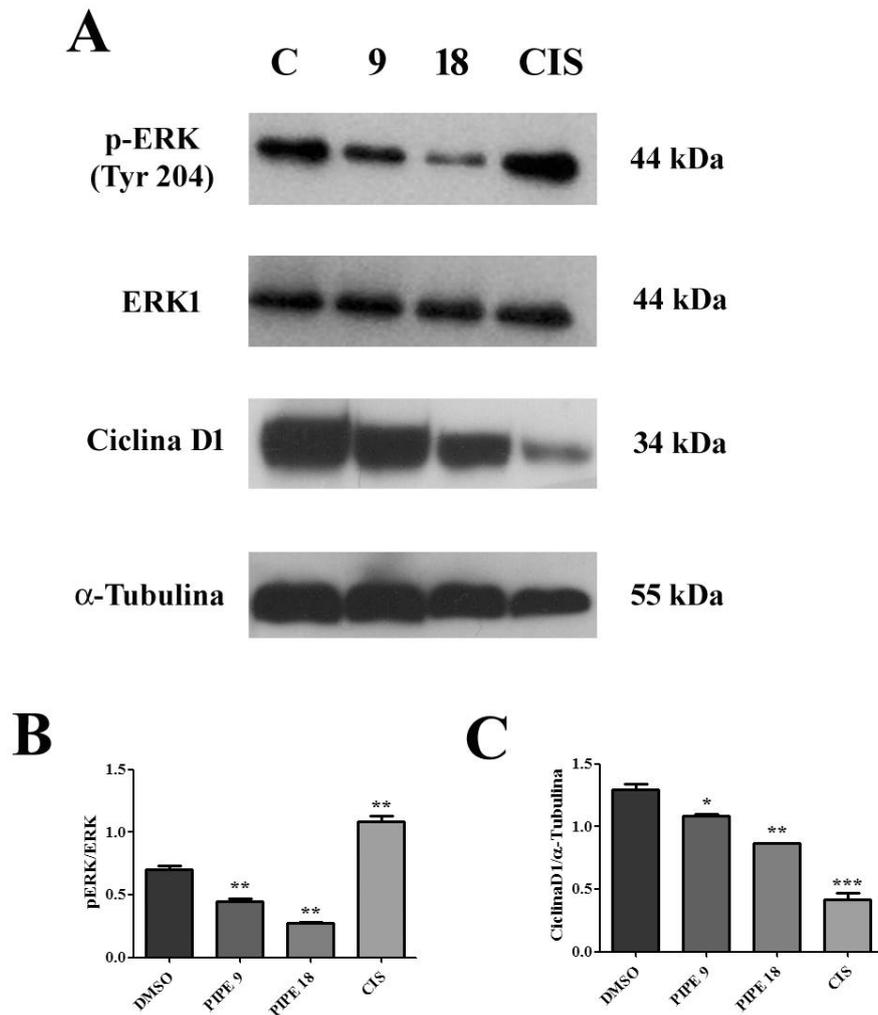


Fonte: Do autor

Notas: As culturas foram tratadas com PIPE 9 e 18 µM por 24 horas. Após tratamento as células foram incubadas com anti-Ciclina D1 conjugado à FITC (verde). Os núcleos foram contracolorados com DAPI. .

Os resultados de *immunoblot*, aqui apresentados, também demonstraram que o tratamento com cisplatina pode induzir o aumento na fosforilação de ERK, o que corrobora os dados publicados por Chen et al. (2015), que tratou culturas de A549 com cisplatina e demonstrou aumento expressivo de ERK fosforilada. Todavia, é descrito na literatura, que a hiper-ativação de ERK e AKT pode ser responsável pela resistência aos tratamentos de vários tipos de tumores sólidos (BALMANNO; COOK, 2009).

Figura 19 – Perfil de expressão proteica de reguladores do ciclo celular determinada por *immunoblot*



Fonte: Do autor.

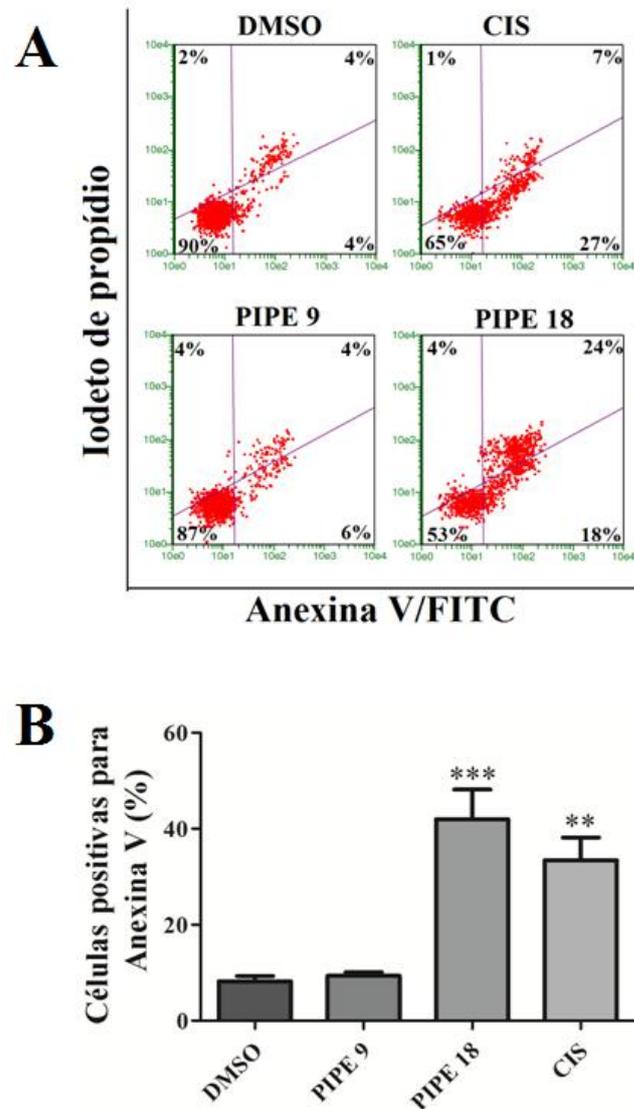
Notas: As culturas de A549 foram tratadas com 9 e 18 mM de PIPE por 24 horas. Após processamento das amostras o perfil de expressão de p-ERK, ERK e Ciclina D1 foi determinado. (A) Imagens ilustrativas das bandas imunorreativas. (B) Expressão relativa de ERK fosforilada. (C) Expressão relativa de Ciclina D1. A quantificação de bandas foi realizada pelo software ImageJ. α -tubulina foi utilizada como controle de carregamento. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

6.8 PIPE E CINAM EXIBEM ATIVIDADE PRÓ-APOPTÓTICA FRENTE À LINHAGEM A549

A atividade pró-apoptótica de PIPE e CINAM foi investigada considerando que foi detectada atividade citotóxica dos complexos sobre células A549. O ensaio de Anexina V e de despolarização de membrana mitocondrial foram utilizados para a identificação de células apoptóticas após tratamento com os complexo estudados. O ensaio de anexina V permite a identificação de apoptose em fase inicial e tardia, bem como, de eventos de morte por necrose (CORNELISSEN et al. 2002). Atividade pró-apoptótica de PIPE foi evidenciada em culturas tratadas com 18 μM . Cerca de 41% de células foram positivas para anexina V. Quando as culturas foram tratadas com 9 μM foi observado 10% de células positivas para anexina V, sendo que essa diferença não foi significativa quando comparadas ao controle (8%). Os resultados também indicaram que o percentual de células necróticas não foi significativamente maior nas culturas tratadas em relação ao controle (Figura 20).

De modo interessante, o tratamento com CINAM mostrou potencial pró-apoptótico superior quando comparado a PIPE, devido ao aumento expressivo de células positivas para anexina V mesmo quando utilizado em concentração subtóxica. No tratamento com 2 μM , as células positivas pra anexina V constituíram em média 25% do número total de células contadas, valor significativamente ($p < 0,05$) maior em relação ao controle não tratado (13%). Quando as culturas foram tratadas com 4 μM , em média 42% das células contadas, possuíam marcação positiva para anexina V (Figura 21).

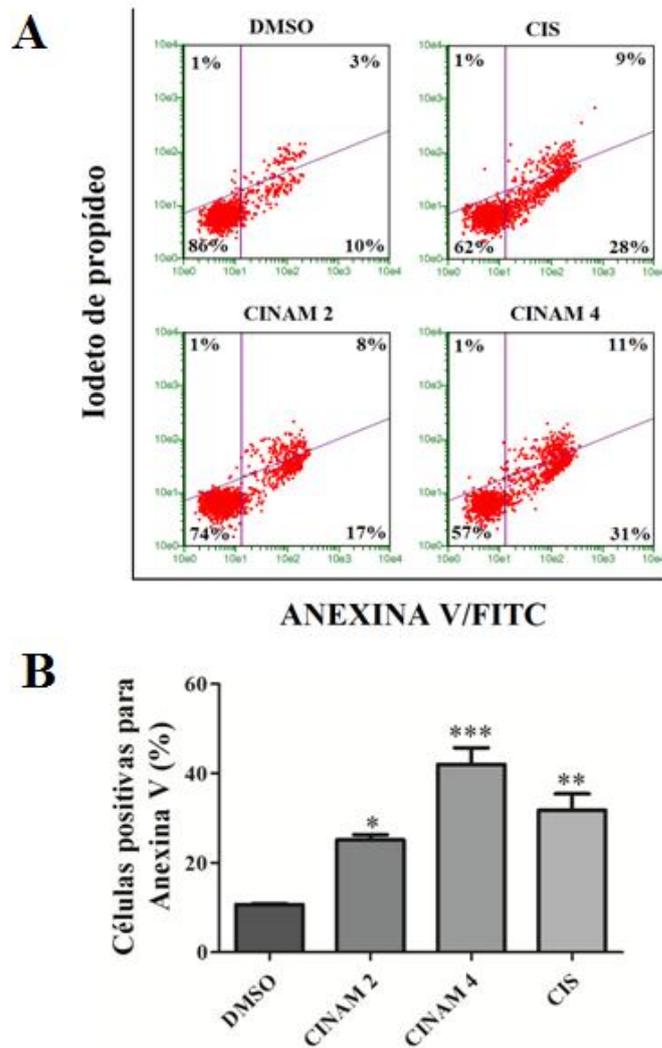
Figura 20 - Ensaio de anexina V em culturas tratadas por 24 h com PIPE.



Fonte: Do autor.

Notas: (A) Dot plot evidenciando as diferentes populações celulares após o ensaio de anexinaV/PI. Quadrante inferior esquerdo – células negativas para iodeto de propídio (IP) e anexinaV (AV). Inferior direito – células positivas para AV e negativas para IP. Superior direito – células positivas para IP e AV. Superior esquerdo – células positivas para IP e negativas para AV. (B) Frequência de células positivas para anexina V. Os valores contidos no gráfico referem-se à média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata e a barra de erros representa o desvio padrão. CIS-cisplatina *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 21 - Ensaio de Anexina V em culturas tratadas por 24 h com CINAM



Fonte: Do autor.

Notas: (A) Dot plot evidenciando as diferentes populações celulares após o ensaio de anexinaV/PI. Quadrante inferior esquerdo – células negativas para iodeto de propídeo (IP) e anexinaV (AV). Inferior direito – células positivas para AV e negativas para IP. Superior direito – células positivas para IP e AV. Superior esquerdo – células positivas para IP e negativas para AV. (B) Frequência de células positivas para anexina V. Os valores contidos no gráfico referem-se à média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata e a barra de erros representa o desvio padrão. CIS-cisplatina *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

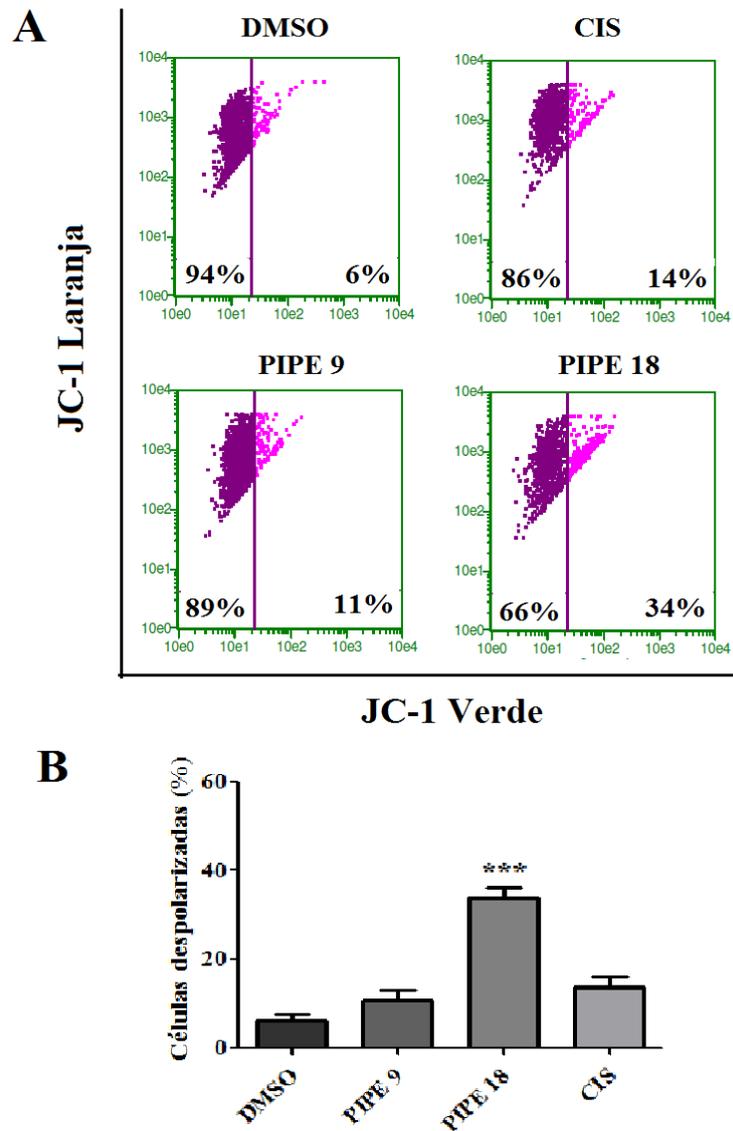
Com o objetivo de elucidar se o processo de apoptose induzido por PIPE e CINAM envolve ativação da via intrínseca, foi utilizado o ensaio de despolarização de membrana mitocondrial. Segundo Perelman et al. (2012), a sonda catiônica JC-1 é amplamente utilizada para detecção do potencial mitocondrial, pois, em células altamente polarizadas a sonda forma agregados que tem um pico de emissão de fluorescência no vermelho/laranja (JC-1 laranja). Já em células que perderam o potencial de membrana mitocondrial, JC-1 forma monômeros, que emitem fluorescência verde.

O tratamento com 18 μM de PIPE causou aumento significativo de células positivas para JC-1 verde (34%) em relação ao controle (6%), por conseguinte, o tratamento com 9 μM (11%) não alterou significativamente o potencial de membrana mitocondrial de células A549 após 24 horas de tratamento (Figura 22). O complexo CINAM foi mais efetivo, quando comparado à PIPE, em induzir alterações do potencial de membrana mitocondrial mesmo quando utilizado em baixas concentrações. O tratamento com 2 e 4 μM de CINAM por 24 horas promoveu, em média, 44% e 46%, respectivamente, de células comprometidas com a despolarização de membrana (Figura 23).

As mitocôndrias desempenham funções imprescindíveis para a sobrevivência celular, em especial a fosforilação oxidativa para produção de ATP (HENGARTNER, 2000). Contudo, estas organelas, também são importantes durante o processo de morte celular, já que, as alterações mitocondriais promovem a liberação de fatores que levam a ativação de caspases e fragmentação do DNA, bem como, a perda do potencial de membrana mitocondrial, são tidos como eventos que caracterizam o processo de apoptose (KROEMER; ZAMZAMI; SUSIN, 1997).

Considerando os dados aqui apresentados, obtidos através da pesquisa dos marcadores específicos de apoptose, anexina V e potencial de membrana mitocondrial, o potencial citotóxico dos complexos PIPE e CINAM está relacionado à indução de apoptose em células da linhagem A549, principalmente por ativação da via intrínseca da apoptose (GURP et al. 2003; HENGARTNER, 2000).

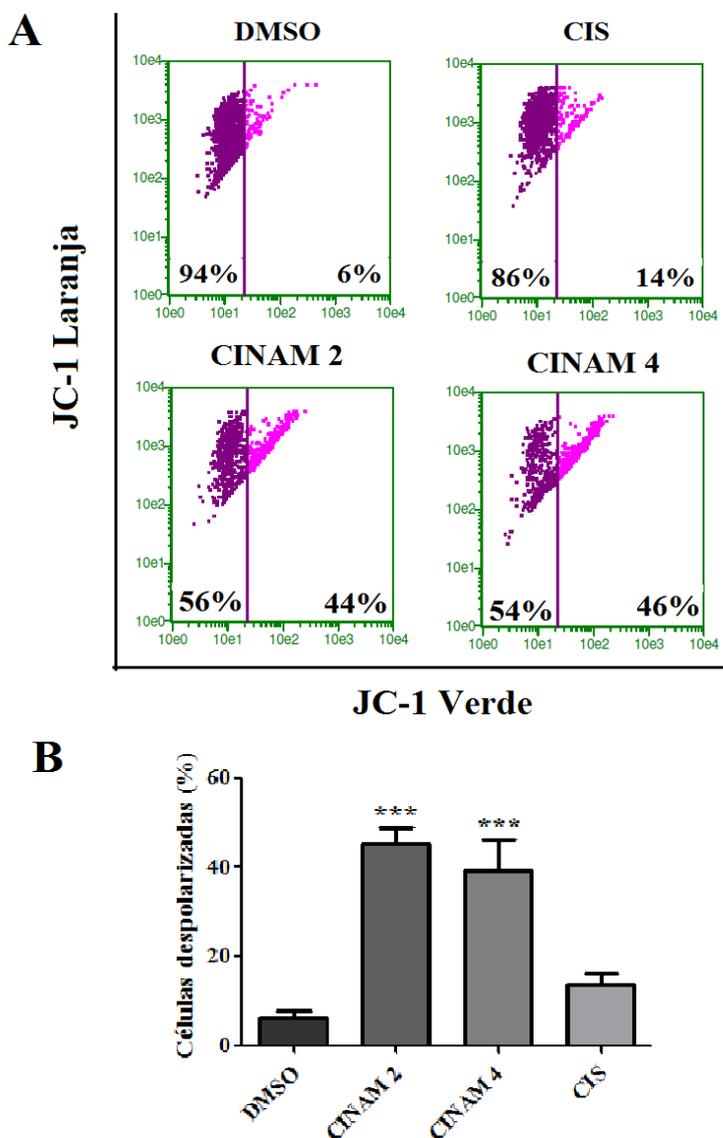
Figura 22 – Ensaio de despolarização de membrana mitocondrial em culturas de A549 após tratamento com PIPE por 24 horas



Fonte: Do autor

Notas: (A) Dot plot evidenciando as diferentes populações celulares após o ensaio de despolarização de membrana mitocondrial. Quadrante esquerdo (roxo) refere-se à células polarizadas. Quadrante direito (rosa) refere-se a células comprometidas com a despolarização de membrana. (B) Frequência de células despolarizadas. Os valores contidos no gráfico referem-se à média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata e a barra de erros representa o desvio padrão. CIS-cisplatina *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Figura 23 – Ensaio de despolarização de membrana mitocondrial em culturas de A549 após tratamento com CINAM por 24 horas.



Fonte: Do autor

Notas: (A) Dot plot evidenciando as diferentes populações celulares após o ensaio de despolarização de membrana mitocondrial. Quadrante esquerdo (roxo) refere-se a células polarizadas. Quadrante direito (rosa) refere-se a células comprometidas com a despolarização de membrana. (B) Frequência de células despolarizadas. Os valores contidos no gráfico referem-se à média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata e a barra de erros representa o desvio padrão. CIS-cisplatina *** $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Desta forma, em conjunto, os resultados indicam que quando utilizado em concentração ao redor do IC_{25} (9 μM), PIPE apresenta, preferencialmente, efeito antiproliferativo, contudo, em concentrações ao redor do IC_{50} (18 μM), PIPE mostrou potencial atividade pró-apoptótica. Já o complexo CINAM demonstrou maior potencial pró-apoptótico em relação à PIPE, mesmo quando utilizado em baixas concentrações (2 e 4 μM).

O complexo de rutênio (II) metilimidazol, sintetizados por Yang et al. (2012), induziu apoptose em células A549 através de ativação da via intrínseca da apoptose mediada por alterações no potencial de membrana mitocondrial.

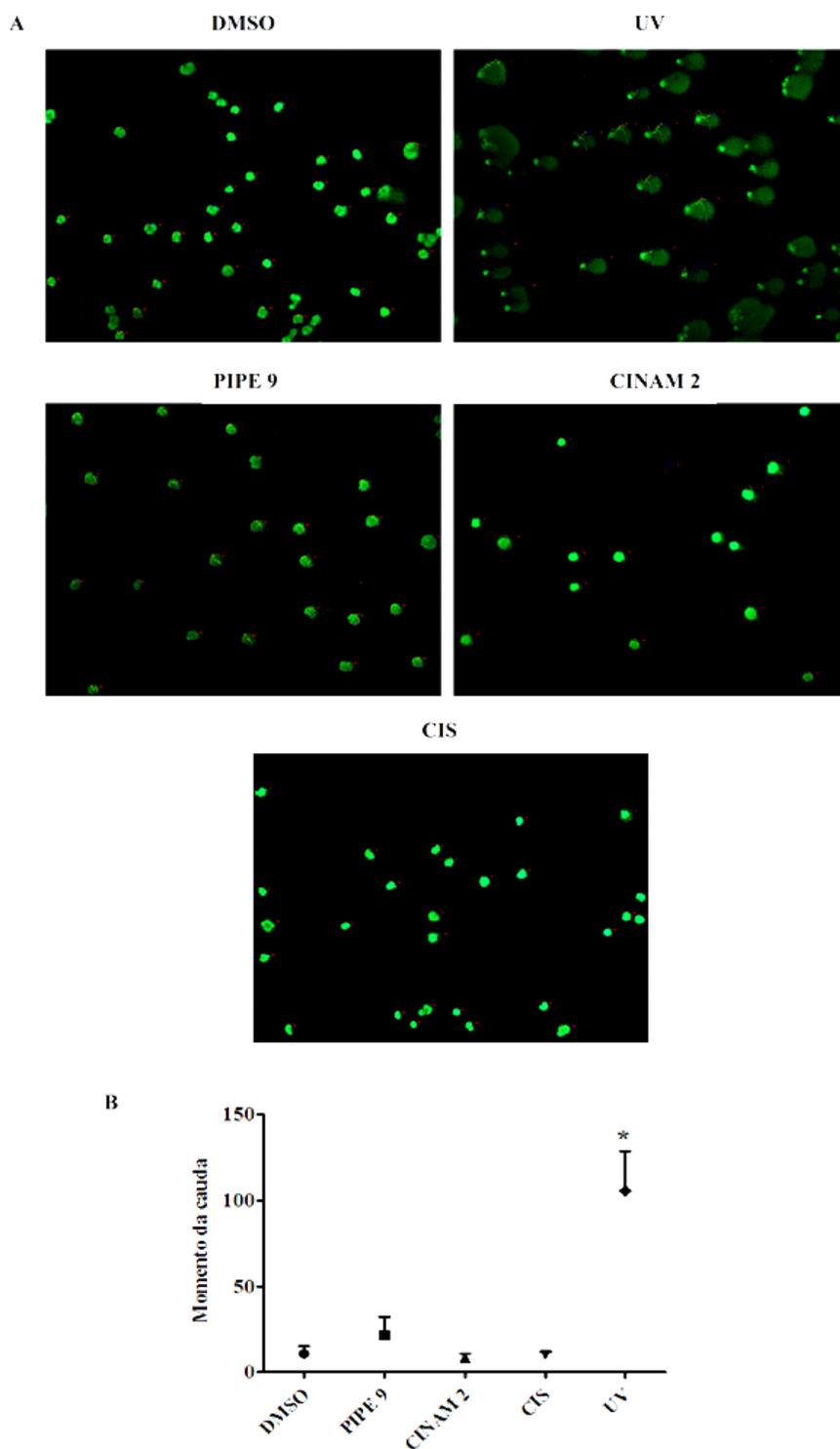
O potencial pró-apoptótico de complexos de rutênio (II) é bem descrito na literatura (Chen et al., 2016; Chen et al. 2016; Chen et al., 2013; Zeng et al., 2016; Sun et al., 2016; Li et al., 2015; Lai et al., 2015; Han et al., 2015, Li et al., 2014; Wang et al. 2014;). Segundo Birge et al. (2009) a identificação de moléculas com atividade pró-apoptótica em células tumorais é extremamente relevante na pesquisa contra o câncer.

6. 9 PIPE E CINAM NÃO INDUZEM LESÃO NO DNA

Como metodologia para avaliação do potencial genotóxico de PIPE e CINAM foi realizado o ensaio do Cometa em condições alcalinas (SPEIT; HARTMANN, 2005). Desta forma, as células A549 foram tratadas com PIPE e CINAM nas concentrações de 9 e 2 μM , respectivamente.

Interessantemente, a análise dos resultados deste estudo demonstrou que tanto PIPE quanto CINAM não induziram danos ao DNA nas culturas de A549 após 24 horas de tratamento (Figura 24), em oposição aos dados reportados na literatura que evidenciam o potencial genotóxico de complexos metálicos de rutênio (Chen et al., 2016; Chen et al. 2016; Lai et al., 2015; Zeng et al., 2016;). As concentrações utilizadas no ensaio corresponderam ao IC_{25} dos complexos testados, pois, o protocolo utilizado exige que as culturas no momento do processamento exibam, ao menos, 70% de viabilidade celular.

Figura 24 – Ensaio de cometa em culturas de A549 após tratamento com PIPE e CINAM por 24 horas



Fonte: Do autor

Notas: (A) Imagens ilustrativas dos cometas corados com *SiberGreen* e visualizados em microscópio de fluorescência. (B) Quantificação de 50 cometas por lâmina através do *software* OpenComet. Os dados do gráfico referem-se ao parâmetro momento da cauda e estão representados como a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata e a barra de erros representa o desvio padrão. CIS-cisplatina. UV-ultravioleta * $p < 0,05$ de acordo com a análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey.

Existem poucos relatos na literatura sobre as propriedades biológicas do ácido piperonílico (ligante do complexo PIPE). A síntese do ácido piperonílico é feita por meio de hidrólise alcalina da piperina, um alcaloide isolado da pimenta preta (*Piper nigrum* L.), cujas propriedades farmacológicas têm sido investigadas. Estudos mostram que a piperina tem atividade anti-diarreica (BAJAD et al., 2001), anti-inflamatória e analgésica (GUPTA et al., 200), e hepatoprotetora (KOUL; KAPIL, 1993). Além disso, a piperina possui uma elevada atividade antioxidante que tem sido explorada para o tratamento de Alzheimer (CHONPATHOMPIKUNLERT; WATTANATHORN; MUCHIMAPURA, 2010). Segundo Zarai et al. (2013) e Si et al. (2013) o ácido piperonílico possui atividade antioxidante mais acentuada que a piperina, seu precursor.

As atividades biológicas do ácido cinâmico, ligante orgânico do complexo CINAM, têm sido amplamente investigadas e incluem: atividade antiproliferativa, antioxidante, antiangiogênica e antitumoral (PONTIKI et al., 2014; SU et al., 2015). Estudos demonstram efeitos antitumorais promissores e baixa citotoxicidade do ácido cinâmico e seus derivados em diferentes tipos de câncer (LI et al., 2015; LOZYNSKYI et al., 2014; XU et al., 2016). Segundo Yen et al. (2011) e Tsai et al. (2013) o efeito inibidor desta molécula está relacionado à inibição da via das MAP quinases. Sova e colaboradores (2013) investigaram os efeitos citotóxicos de derivados de ácido cinâmico e verificaram inibição do crescimento celular e indução de morte. 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.

Vale ressaltar que para Azzoli et al. (2009) os tratamentos dos diferentes tipos histológicos de câncer de pulmão, em especial o NSCLC, são baseados, principalmente, em quimioterapia, com complexos metálicos derivados de platina. Como o uso clínico da cisplatina apresenta grande toxicidade e, ainda, pode levar à resistência tumoral, os complexos metálicos com rutênio têm sido considerados alternativas promissoras aos complexos de platina (AMABLE, 2016; LEE et al., 2014). Neste contexto e diante dos resultados obtidos no presente estudo, PIPE e CINAM são moléculas promissoras e estudos futuros devem ser realizados para elucidar mecanismos envolvidos com o potencial antitumoral destes protótipos frente outros tipos de câncer de pulmão.

7 CONCLUSÃO

Os complexos mostraram-se efetivos em reduzir a viabilidade de células A549 e alteraram o comportamento proliferativo destas células.

Quando utilizado em concentração próxima ao IC_{25} (9 μ M) PIPE demonstrou atividade antiproliferativa, contudo, em concentração ao redor do IC_{50} (18 μ M) exibiu atividade citotóxica. O tratamento com CINAM teve efeito mais citotóxico em relação ao PIPE, mesmo quando utilizados em baixas concentrações.

PIPE utilizado em concentrações sub-tóxicas altera o padrão normal de distribuição de microtúbulos e microfilamentos e induz bloqueio do ciclo na transição G1/S, sendo que este último evento está relacionado à diminuição dos níveis de fosforilação de ERK, bem como, diminuição dos níveis de expressão de Ciclina D1.

PIPE e CINAM induziram ativação da via intrínseca da apoptose.

PIPE e CINAM não induziram danos ao DNA.

Portanto, os resultados deste estudo demonstram promissora atividade antitumoral dos complexos PIPE e CINAM frente células derivadas de câncer de pulmão.

REFERÊNCIAS

ALBANESE, C. et al. Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. **J. Biol. Chem.**, Chicago, v. 270, n. 40, 23589-97, 1995.

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

AMABLE, L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. **Pharmacological Research**, Bethesda, v. 106, p. 27-36, 2016.

AMENDOLA, L. C.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n.4, p. 325-330, 2005.

ARELLANO, S.; MORENO, S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. **Int J Biochem Cell Biol.**, Salamanca, v. 29, n. 4, p. 559-73, 1997.

AZZOLI, C. G. et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol**, Alexandria, v. 27, p. 6251–6266, 2009.

BAJAD, S. et al. Antidiarrhoeal activity of piperine in mice. **Planta Med**, Jammu, v. 67, p. 284–287, 2001.

BALMANN, K.; COOK, S. J. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. **Cell Death Differ.**, Cambridge, v. 16, p. 368-377, 2009.

BARBOSA, M. I. F. et al. Ruthenium(II) complexes with hydroxypyridinecarboxylates: Screening potential metallodrugs against *Mycobacterium tuberculosis*. **Polyhedron**, São Carlos, v. 85, p. 376–382, 2015

BERGAMO, A. et al. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Trieste, v. 106, n. 1, p. 90–99, 2012.

BERGAMO, A. et al. In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors, and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. **J Pharmacol Exp Ther.**, Trieste, v. 289, n. 1, p. 559-64, 1999.

BIRGE, R. B. et al. Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. **Cell Communication and Signaling**, Nova Jersey, v. 7, n. 13, 2009.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, Feira de Santana, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer, 2016. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao>> Acesso 27.07.16.

BREHM, A. et al. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. **Nature**, Cambridge, v. 391, n. 597-601, 1998.

CABANTCHIK, Z. I. et al. Iron chelators: mode of action as antimalarials. **Acta Haematol.**, Jerusalem, v. 95, p.70-77, 1996.

CAMIDGE, D. R. et al. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for alk inhibitor treatment. **Clin Cancer Res.**, Aurora, v. 16, p. 5581–5590, 2010.

CÁNEPA, E.T. et al. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. , Buenos Aires, v. 59, n. 7, p. 419-26, 2007.

CHELOPO, M. P. et al. Anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes bearing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline amino alcohol ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, KwaZulu-Natal, v. 66, p. 407-414, 2013.

CHEN, H. H. W.; KUO, M. T. Role of Glutathione in the Regulation of Cisplatin Resistance in Cancer Chemotherapy. **Met Based Drugs**, Tainan, 2010a .

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, 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**, Zhanjiang, v. 156, p. 64–74, 2016.

CHEN, T. F. et al. Ruthenium Polypyridyl Complexes That Induce Mitochondria-Mediated Apoptosis in Cancer Cells. **Inorg. Chem.**, Guangzhou, v. 49, p. 6366, 2010.

CHEN, T-J. et al. NBM-T-BMX-OS01, an Osthole Derivative, Sensitizes Human Lung Cancer A549 Cells to Cisplatin through AMPK-Dependent Inhibition of ERK and Akt Pathway. **Cell Physiol Biochem.**, Shaanxi, v. 36, p. 893-906, 2015.

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

CHIM, C. S. et al. Methylation of INK4 and CIP/KIP families of cyclin-dependent kinase inhibitor in chronic lymphocytic leukaemia in Chinese patients. **J Clin Pathol.**, Hong Kong, v. 59, n. 9, p. 921-926, 2006.

CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. **Food Chem Toxicol.**, Khon Kaen, v. 48, p. 798–802, 2010.

CIARDIELLO, F.; TORTORA, G. EGFR antagonists in cancer treatment. **N Engl J Med.**, Naples, v. 358, p. 1160–1174, 2008.

CORNELISSEN, M. et al. Annexin V expression in apoptotic peripheral blood lymphocytes: An electron microscopic evaluation. **Apoptosis**, Gante, v. 7, p. 41-47, 2002.

CORREA, R. S. et al. Ru(II)-based complexes with N-(acyl)-N',N'- (disubstituted)thiourea ligands: synthesis, characterization, BSA- and DNA – binding studies of new cytotoxicity agents against lung and prostate tumor cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, São Carlos, v. 150, p. 63-71, 2015.

CORY, A. H. et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Commun**, Greenville, v. 3, p. 207-212, 1991.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim.** Ceará, v. 2, n. 1, p. 47-48, 2010.

DIAS, H. V. et al. Antimicrobial properties of highly fluorinated silver(I) tris(pyrazolyl)borates. **J Inorg Biochem**, Arlington, v. 100, p. 158-160, 2006.

DOLL, R.; HILL, A.B. Smoking and carcinoma of the lung: preliminary report. **Br Med J.**, London, v. 2, p. 739-748, 1950.

DRAGUTAN, I.; DRAGUTAN, V.; DEMONCEAU, A. Editorial of Special Issue Ruthenium Complex: The Expanding Chemistry of the Ruthenium Complexes . **Molecules**, Bucarest, v. 20, p. 17244-17274, 2015.

DRUKER, B. J. et al. Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia. **N Engl J Med.**, Portland, v. 355, p. 2408-2417, 2006.

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

DUARTE, R. L.; PASCHOAL, M.E. Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking. **J Bras Pneumol.**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 56-65, 2006.

DURONIO, R. J.; XIONG, Y. Signaling Pathways that Control Cell Proliferation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, Chapel Hill, v. 5, n. 3, 2013.

EGGER, A. E. et al. High resolution mass spectrometry for studying the interactions of cisplatin with oligonucleotides. **Inorganic Chemistry**, Viena, v. 47, p. 10626–10633, 2008.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, São Francisco, v. 411, p. 342-348, 2001.

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

FILHO, V. W. et al. Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol.**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 175-187, 2010.

FONTANA, G. et al. Synthesis, chemical characterization and preliminary *invitro* antitumor activity evaluation of new ruthenium (II) complexes with sugar derivatives. **Polyhedron**, Palermo, v. 30, p. 1671-1679, 2011.

FRAUSIN, F. et al. Free Exchange across Cells, and Echistatin-Sensitive Membrane Target for the Metastasis Inhibitor NAMI-A (Imidazolium*trans*-Imidazole Dimethyl Sulfoxide Tetrachlororuthenate) on KB Tumor Cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Trieste, v. 313, p. 227–233, 2005.

FREZZA, M. et al. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. **Current Pharmaceutical Design**, Detroide, v. 16, p. 1813-1825, 2010.

FRÜHAUF, S.; ZELLER, W. New platinum, titanium, and ruthenium complexes with different patterns of DNA damage in rat ovarian tumor cells. **Cancer Research**, Heidelberg, v. 51, p. 2943–2948, 1991.

FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; PÉREZ, J. M. Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance, **Chemical Reviews**, Madri, v. 103, p. 645–662, 2003.

GADGEEL, S. M.; RAMALINGAM, S. S.; KALEMKERIAN, G. P. Treatment of Lung Cancer. **Radiologic Clinics of North America**, Detroide, v. 50, n. 5, p. 961–9, 2012.

GAUTSCHI, O. et al. Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: A key driver of malignant transformation. **Lung Cancer**, Berna, v. 55, n. 1, p. 1-14, 2007.

GAVA, B. et al. Inhibition of B16 melanoma metastases with the ruthenium complex imidazolium *trans*-imidazoledimethylsulfoxide-tetrachlororuthenate and down-regulation of tumor cell invasion. **J Pharmacol Exp Ther.**, Trieste, v. 317, n. 1, p. 284-91, 2006.

GÓMEZ-RUIZ, S. et al. On the discovery, biological effects, and use of cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, Mostoles, v. 2012, p. 1-14, 2012.

GRANSBURY, G. K. et al. Comparison of KP1019 and NAMI-A in tumour-mimetic environments. **Metallomics**, Adelaide, v. 8, n. 8, p. 762-773, 2016.

GRIDELLI, C. et al. ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. **Cancer Treat Rev.**, Avellino, v. 40, n. 2, p. 300–306, 2014.

GUO, Z.; SADLER, S. P. Medicinal Inorganic Chemistry. **Advances in Inorganic Chemistry**, Edinburgo, v. 49, p. 183-306, 1999.

GUPTA, S. K. et al. Comparative antinociceptive, anti-inflammatory and toxicity profile of nimesulide vs nimesulide and piperine combination. **Pharmacol Res.**, Nova Deli, v. 41, p. 657–662, 2000.

GURP, M. V. et al. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Ghent, v. 304, p. 487-497, 2003.

HAAS, K. L.; FRANZ, K. J. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. **Chem Rev.**, Durhan, v. 109, p. 4921-4960, 2009.

HAMBLEY, T. W. Developing new metal-based therapeutics: challenges and opportunities. **Daton Trans.**, Sydney, v. 21, n. 43, p. 4929-37, 2007.

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

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). **Journal of Inorganic Biochemistry**, Viena, v. 100, p. 891–904, 2006.

HARTINGER, C. G. et al. KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. **Chemistry & Biodiversity**, Viena, v. 5, p. 2140–2155, 2008.

HELM, K. F. et al. Topical auranofin ointment for the treatment of plaque psoriasis. **J Am Acad Dermatol**, Hershey, v. 33, p. 517-519, 1995.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, Nova York, v. 407, p. 770-776, 2000.

HERBST, R. S.; HEYMACH, J. V.; LIPPMAN, S. M. Lung cancer. **The New England Journal of Medicine**, Houston, v. 359, n. 13, p. 1367-1380, 2008.

HOLM, R. H.; KENNEPOHL, P.; SOLOMON, E. I. Structural and functional aspects of metal sites in biology. **Chem Rev.**, Stanford, v. 96, p. 2239-2214, 1996.

HOLSTEGE, H. et al. BRCA1-mutated and basal-like breast cancers have similar aCGH profiles and a high incidence of protein truncating TP53 mutations. **BMC Cancer**, Amsterdã, v. 10, n. 654, p.1-15, 2010.

HORACEK, P.; DROBNIK, J. Interaction of cis-dichlorodiammineplatinum(II) with DNA. **Biochim. Biophys. Acts**, Praga, v. 254, p. 341-347, 1971.

HYNES, J. et al. Fluorescence-based cell viability screening assays using water-soluble oxygen probes. **Journal of biomolecular screening**, Cork, v. 8, n. 3, p. 264-272, 2003.

JAKUPEC, M. A. et al. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. **Dalton Trans.**, Viena, p. 183–194, 2008.

JAMNIK, S. et al. Carcinoma broncogênico: tratamento oncológico clínico e radioterapia. Guias de medicina ambulatorial e hospitalar. **Unifesp / Escola Paulista de Medicina: pneumologia**. São Paulo, p. 511-28, 2006.

KAPITZA, S. et al. Heterocyclic complexes of ruthenium(III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells. **J. Cancer Res. Clinical Oncology**, Viena, v. 131, p. 101–110, 2005.

KAUFMANN, S. H.; EARNSHAW, W. C. Caspases and caspase inhibitors. **Trends Biochem Sci.**, Edinburgo v. 22, n. 10, p. 388-393, 2000.

KEPPLER, B. K. et al. New ruthenium complexes for the treatment of cancer. **Progress in Clinical Biochemistry and Medicine**, Berlin, v. 10, p. 41–69, 1989.

KOFF, A. et al. Formation and activation of a cyclin E–cdk2 complex during the G₁ phase of the human cell cycle. **Science**, Seattle, v. 257, p. 1689–1694, 1992.

KOPF-MAIER, P.; MUHLHAUSEN, S. K. Changes in the cytoskeleton pattern of tumor cells by cisplatin in vitro. **Chem.-Biol. Interactions**, Berlin, v. 82, p. 295-316, 1992.

KORB, T. et al. Integrity of actin fibers and microtubules influences metastatic tumor cell adhesion. **Experimental cell research**, Münster, v. 299 (1), p. 236-247, 2004.

KOUL, I. B.; KAPIL, A. Evaluation of the liver protective potential of piperine, an active principle of black and long peppers. Jammu, **Planta Med**, v. 59, p. 413-417, 1993.

KROEMER, G.; ZAMZAMI, N.; SUSIN, S. A. Mitochondrial control of apoptosis. **Immunol Today**, Villejuif, v. 18, p. 44-51, 1997.

KUMAR, M.; ERNANI, V.; OWONIKOKO, T. K. Biomarkers and targeted systemic therapies in advanced non-small cell lung cancer. **Molecular aspect of Medicine**, Atlanta, v. 45, p. 55-66, 2015.

KUZNETSOV, G. et al. Tubulin-based antimetabolic mechanism of E7974, a novel analogue of the marine sponge natural product hemiasterlin. **Mol. Cancer Therap.**, Andover, v. 8, p. 2852-2860, 2009.

KWAK, E. L. et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med.**, Boston, v. 363, p. 1693-1703, 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. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Guangzhou, v. 152, p. 1-9, 2015.

LAVOIE, J. N. et al. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. **J Biol Chem.**, Nice, v. 271, p. 20608-20616, 1996.

LEE, H. Z. S. et al. Oxidative sequence of a ruthenocene-based anticancer drug candidate in a basic environment. **Organometallics**, Paris, v. 33, p. 4904-4946, 2014.

LEES, J.A. et al. The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. **Mol. Cell. Biol.**, Charlestown, v. 13, p. 7813-7825, 1993.

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**, Guangzhou , v. 150, p. 127-134, 2015

LI, W. et al. Ruthenium (II) complexes: DNA-binding, cytotoxicity, apoptosis, cellular localization, cell cycle arrest, reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential and western blot analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**, Guangzhou , v. 140, p. 94-104, 2014.

LIPPARD, S. J.; GRAF, N. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. **Adv. Drug Deliv.**, Cambridge, v. 64, p. 993–1004, 2012.

MELOCHE, S; POYSSÉGUR, J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. **Oncogene**, Montreal, v. 26, p. 3227-3239, 2007.

MINERVINI, F. et al. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, depxinivalenol, and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. **Toxicology in Vitro**, Bari, v. 18, p. 21-8, 2004.

MITSUDOMI, T. et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol.**, Nagoya, v. 11, p. 121-128, 2010.

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**, São Carlos, v. 68, p. 312–318, 2014.

MORAES, M. C. S. et al. Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. **Cancer Letter**, São Paulo, v. 314, n. 1, p. 108–118, 2012

MULLAPUDI, N. et al. Genome wide methylome alterations in lung cancer. **PlosOne**, Nova York, v. 10, n. 12, p. 1-21, 2015.

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.

NADAL, E.; OLAVARRIA, E. Imatinib mesylate (Gleevec/Glivec) a molecular-targeted therapy for chronic myeloid leukaemia and other malignancies. **Int. J. Clin. Pract.**, Londres, v. 58, p. 511–51, 2004.

NOVAES, F. T. et al. Câncer de pulmão: histologia, estágio, tratamento e sobrevida. **J. Bras. Pneumol.**, São Paulo, v. 34, n. 8, p. 595-600, 2008.

NÜRNBERG, A.; KITZING, T.; GROSSE, R. Nucleating actin for invasion. **Nature reviews Cancer**, v. 11, n. 3, p. 177-187, 2011.

OLIVE, P. L.; BANÁT, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols: Cell and Developmental Biology**, Vancouver, v. 1, p. 23-29, 2006.

ORVIG, C.; ABRAMS, M. J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chem Rev.**, Vancouver, v. 99, p. 2201-2204, 1999.

PEREMAN, A. et al. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. **Cell Death and Disease**, Ramat-Gan, v. 3, p. 430, 2012.

PINES, J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. **Biochem J.**, Cambridge, v. 308, p. 697-711, 1995.

PINTO, A. C.; BARREIRO, E. J. Challenges of the brazilian pharmaceutical industry. **Quím. Nova**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 1557-1560, 2013.

RAPP, E. et al. Chemotherapy can prolong survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer—report of a Canadian multicenter randomized trial. **J. Clin. Oncol.**, Kingston, v. 6, p. 633-641, 1988.

RECHSTEINER, M.; ROGERS, S. W. PEST sequences and regulation by proteolysis. **Trends Biochem Sci.**, Salt Lake, v. 21, n. 7, p. 267-71, 1996.

REED, E.; CHABNER, B. A. Platinum analogues. In: Chabner, B. A.; Longo, D. L. editors. **Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, p. 310-322, 2011.

- ROMERO-CANELON, I.; SADLER, P. J. Next-generation metal anticancer complexes: multitargeting via redox modulation. **Inorg. Chem.**, Warwik, v. 52, p. 12276-12291, 2013.
- ROSELL, R. et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol.**, Badalona, v. 13, p. 239-246, 2012.
- ROUSSEL, M. F. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. **Oncogene**, Memphis, v.18, p. 5311–5317, 1999.
- ROVIELLO, G. The distinctive nature of adenocarcinoma of the lung. **OncoTargets and Therapy**, Brescia, v. 8, p. 2399-2406, 2015.
- SATO, M. et al. A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. **J Thorac Oncol.**, Dallas, v. 2, p. 327-343, 2007.
- SAVA, G. et al. Dual Action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: selective targeting of metastatic cells and binding to collagen. **Clin. Cancer Res.**, Trieste, v. 9, n. 5, p. 1898-1905, 2003.
- SAVA, G. et al. Actin-dependent tumour cell adhesion after short-term exposure to the antimetastasis ruthenium complex NAMI-A. **European Journal of Cancer**, Trieste, v. 40, p. 1383-1396, 2004.
- SHAH, S. P. et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. **Nature**, Vancouver, v. 486, p. 395-9, 2012.
- SI, Y et al. Effects of piperonylic acid on tyrosinase: Mixed-type inhibition kinetics and computational simulations. **Process Biochemistry**, Ningbo, v. 48, n. 11, p. 1706-1714, 2013.
- 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. **International Journal of Cancer**, Rio de Janeiro, v.101, n.1, p.69–73, sep. 2002.

SMALLEY, K. S. M. et al. An organometallic protein kinase inhibitor pharmacologically activates p53 and induces apoptosis in human melanoma cells. **Cancer Res.**, Filadelfia, v. 67, p. 209-217, 2007.

SOARES, N. C. P. et al. Influence of Lycopene on Cell Viability, Cell Cycle, and Apoptosis of Human Prostate Cancer and Benign Hyperplastic Cells. **Nutrition and Cancer**, Rio de Janeiro, v. 65, n. 7, p. 1076-1085, 2013.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. **Métodos Mol. Biol.**, Ulm, v. 291, p. 85-95, 2005.

STIEWE, T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. **Nat Rev Cancer**. Wurzburg, v. 7, n. 3, p. 165-168, 2007.

SUFFNESS, M., PEZZUTO, J. M.; HOSTETTMANN, K. Assays for Bioactivity in Methods in Plant Biochemistry. **Academic Press**, San Diego, v. 6, p. 71-134, 1991.

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

SUN, H. et al. Competitive binding of bismuth to transferrin and albumin in aqueous solution and in blood plasma. **J. Biol. Chem.**, Edinburgh, v. 276, p. 8829-8835, 2001.

SUN, S.; SCHILLER, J. H.; GAZDAR, A. F. Lung cancer in never smokers – a different disease. **Nat Rev Cancer.**, Dallas, v. 7, p. 778-790, 2007.

SUZUKI, K.; MATSUBARA, H. Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Chiba, v. 2011, p. 1-7, 2011.

SWEIS, R. F. et al. Concurrent EGFR mutation and ALK translocation in non-small cell lung cancer. **Cureus**, Chicago, v. 8, n. 2, p. e513, 2016.

TAKAGAKI, T. Y. Avanços no tratamento do câncer pulmonar. **J. Bras. Pneumol.**, São Paulo, v. 31, n. 6, 2005.

TAKAHASHI, Y.; RAYMAN, J.B.; DYNLACHT, B. D. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families *in vivo*: distinct E2F proteins mediate activation and repression. **Genes Dev.**, Cambridge, v. 14, p. 804–816. 2000.

TAN, W. et al. Novel therapeutic targets on the horizon for lung cancer. **Lancet Oncol.**, Singapore, v. 17, p. 347-362, 2016.

TANG, X. et al. EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients. **Cancer Res.**, Houston, v. 65, p.7568-7572, 2005.

TRILLER, N. et al. Multidrug resistance in small cell lung cancer: Expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naive patients and in relapsed disease. **Lung Cancer**, Golnik, v. 54, n. 2, p. 235–40, 2006.

UERAHA, C.; SANTORO, I. L.; JAMNIK, S. Lung cancer: comparison between sexes. **J. Pneumologia**, São Paulo, v. 26, n. 6, 2000.

VALENTE, A.; GARCIA, M. H. Síntese de compostos de rutênio macromoleculares: Uma nova abordagem para a busca de drogas anticâncer. **Inorgânicos**, v. 2, p. 96-114, 2012.

VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. **Cell**. Glasgow, v. 137, n. 3, p. 413-431, 2009.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, Cambridge, v. 4, p. 307-320, 2005.

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.**, Guangzhou, v.19, p. 335–348, 2014.

WANG, T.; CHEN, Z. W.; STREUTKER, C. J. Melanosis coli sparing adenomatous polyps: novel findings using cleaved caspase-3 immunohistochemistry. **Histopatologia**, v. 62, n. 5, p. 819-821, 2013.

WEIHUA, Z. et al. Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity. **Cancer Cell**, Houston, v. 13, p. 385-393, 2008.

WONG, E.; GIANDOMENICO, C. M. Current status of platinum-based antitumor drugs. **Chem. Rev.**, Columbia, v. 99, p. 2451-2466, 1999.

YAMAGUCHI, H.; CONDEELIS, J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, Bronx, v. 1773, n. 5, p. 642-652, 2007.

YANG, X. et al. Ruthenium methylimidazole complexes induced apoptosis in lung cancer A549 cells through intrinsic mitochondrial pathway. **Biochimie**, Guangzhou, v. 94, p. 345-353, 2012.

ZAKI, M.; ARJMAND, F.; TABASSUM, S. Current and future potential of metallo drugs: Revisiting DNA-binding of metal containing molecules and their diverse mechanism of action. **Inorganica Chimica Acta**, Aligarh, v. 444, p. 1-22, 2016.

ZARAI, Z. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **LWT-Food Sci Technol**, Sfax, v. 50, p. 634-641, 2013.

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

ZHANG, H. S.; POSTIGO, A. A.; DEAN, D. C. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G₁ arrest triggered by p16INK4a, TGF β , and contact inhibition. **Cell**, Washington, v. 97, p. 53-61, 1999.

ZHANG, X. et al. Alpha-santalol, a chemopreventive agent against skin cancer, causes G₂/M cell cycle arrest in both p53-mutated human epidermoid carcinoma A431 cells and p53 wild-type human melanoma UACC-62 cells. **BMC Research Notes**, Brookings, v. 220, n.3, p. 1-15, 2010.

