



Universidade de Brasília
Faculdade de Planaltina
Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais

Síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de *trans*-imidazoldimetilsulfóxidotetraclororutenato III de imidazólio (NAMI-A) em células de carcinoma mamário

Nome: Priscilla Amaral Guedes
Orientadora: Prof^ª. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro

Linha de pesquisa: Aplicações de materiais nanoestruturados.

Planaltina-DF, 2016

Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais

Síntese, caracterização e avaliação da atividade citotóxica de *trans*-imidazoldimetilsulfóxidotetraclororutenatoIII de imidazólio (NAMI-A) em células de carcinoma mamário

PRISCILLA AMARAL GUEDES

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
de Materiais, UnB.

Orientadora: Prof^a. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro

Planaltina-DF, 2016

PRISCILLA AMARAL GUEDES

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CITOTÓXICA DE *TRANS-*
IMIDAZOLDIMETILSULFÓXIDOTETRACLORORUTENATOIII DE
*IMIDAZÓLIO***

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Prof^a. Dra. Sônia Nair Bão
(membro titular)

Prof^a. Dra. Renata Aquino da Silva de Souza
(membro titular)

Prof. Dra. Otilie Eichler Vercillo
(membro suplente)

Planaltina, maio de 2016

Dedicatória

*À Deus por ter me dado força, coragem e paciência ao longo desta caminhada.
Aos meus pais, irmãs e entes queridos, pelo amor, carinho e constante apoio em toda a
minha vida.*

Agradecimentos

A Deus, pela vida e linda família que tenho, por todas as oportunidades concedidas, por ter me dado coragem, saúde e muita força de vontade de lutar pelos meus sonhos e superar as minhas dificuldades;

É difícil agradecer todas as pessoas que de algum modo, nos momentos serenos e ou apreensivos, fizeram ou fazem parte da minha vida, por isso primeiramente agradeço à todos de coração.

Aos meus pais, Joaquim e Zélia, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

As minhas doces irmãs, Paula e Patrícia, as quais eu amo infinitamente, mesmo que eu mal demonstre, mas não consigo imaginar minha vida sem elas. Agradeço a elas pela compreensão, devido a minha ausência em alguns momentos importantes, e pelo profundo apoio e credibilidade na minha pessoa.

Ao meu cunhado Ernane, pelas suas sábias palavras, conselhos, pelas longas discussões sobre o universo da Química e da vida, pelo seu carinho e atenção que sempre demonstrou ter por mim.

Ao meu namorado Rodolfo, pela paciência, compreensão e incentivo, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem nos momentos de dificuldades.

Quero agradecer a todos os meus queridos amigos, em especial a minha amiga Isis, que esteve presente na minha vida em todos momentos, tanto profissional quanto pessoal, trazendo palavras de incentivo, apoio, paciência, esclarecimentos e confiança.

A Prof^ª. Dra Marcella Lemos Brettas Carneiro, pela orientação, apoio, confiança, ensinamentos e motivação para o prosseguimento deste trabalho.

Ao prof. Dr. Aparecido de Souza Nunes e seus colaboradores pela assistência na síntese do composto utilizado neste trabalho.

A M.^a Natália Lemos Chaves, pela paciência em me explicar e auxiliar na execução dos experimentos in vitro. Pelos seus ensinamentos e dedicação, sendo sempre prestativa, atenciosa e disposta a ajudar.

Aos professores deste Programa de Pós-graduação em Ciências de Materiais, em especial aos professores Prof. Dr. Alex Fabiano e Prof^a. Dra. Renata Aquino da Silva de Souza, pelo aprendizado e dedicação de todos seus ensinamentos, pelas palavras motivacionais durante as aulas do programa.

A banca examinadora que gentilmente aceitou o convite de participar na defesa deste trabalho.

Agradeço a todos os professores que encontrei ao longo da minha formação acadêmica, por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que proporcionaram a elaboração deste trabalho, bem como a minha formação.

“Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los”.

“Duvidar de tudo ou crer em tudo. São duas soluções igualmente cômodas, que nos dispensam, ambas de refletir.”
Henri Poincaré.

RESUMO

O câncer é uma doença extremamente agressiva. Entre os tipos de cânceres, o carcinoma mamário é o segundo mais frequente no mundo e o que mais ocorre no sexo feminino. Dessa forma, torna-se imperativo o estudo de medidas alternativas que visem o tratamento eficaz desta doença. Sabe-se que os tratamentos mais utilizados apresentam algumas limitações. Um dos grandes empecilhos enfrentados na quimioterapia, por exemplo, é a sua falta de especificidade em relação às células tumorais e a quimiorresistência. Desse modo, com o objetivo de melhorar a eficácia da quimioterapia, várias propostas têm sido sugeridas e estudadas no intuito de oferecer melhor expectativa de vida e maior taxa de sobrevivência aos indivíduos. Complexos metálicos têm mostrado resultados promissores como agentes quimioterápicos para tratamento de câncer. Dentre eles, os complexos de rutênio (Ru) vêm se tornando cada vez mais atraentes porque além de apresentarem atividade anticancerígena, estes apresentam: (1) capacidade em mimetizar íons de ferro (Fe), se ligando a biomoléculas responsáveis por transportar o Fe, como a transferrina e a albumina e, dessa forma, íons de Ru são transportados mais especificamente nas células tumorais; (2) importante papel em reações de oxirredução, o que permite a existência dos mais importantes estados de oxidação em fluidos biológicos e (3) mecanismos de atuação que podem superar os problemas de resistência encontrados nas drogas de platina. Em nosso estudo, realizamos a síntese e a caracterização de NAMI-A por meio de ressonância magnética nuclear e por infravermelho, bem como avaliamos seu efeito citotóxico e citostático em células de carcinoma mamário murino da linhagem 4T1 (linhagem que apresenta potencial metastático) e normais de fibroblastos da linhagem NIH-3T3. A cisplatina foi usada como controle positivo. Para avaliar estes efeitos, inicialmente realizou-se testes de viabilidade celular por meio do ensaio colorimétrico de MTT. As células foram tratadas com doses que variaram entre 1,25 a 4000 μM por períodos de 24, 48 ou 72 horas. Notou-se que o NAMI-A foi citotóxico em doses acima de 200 μM e a partir de 48 h. Já a cisplatina apresentou-se mais citotóxica, pois inibiu a viabilidade celular a partir da dose de 50 μM em 24 h. Ainda, no tratamento com 250 a 4000 μM de NAMI-A, a citotoxicidade foi proporcional ao aumento da dose sendo que, em 72 horas de tratamento, os efeitos citotóxicos foram mais pronunciados em células tumorais (4T1) do que em células saudáveis (NIH-3T3). Nas análises posteriores, adotamos avaliar apenas a linhagem 4T1 e a dose que inibiu 50% das células (IC_{50} – 1800 $\mu\text{M} \pm 0,7$) no período de 24 h. Por conseguinte, analisamos os efeitos de NAMI-A sob a morfologia, fragmentação do DNA e perfil do ciclo celular por meio de análise em microscópio óptico e em citômetro de fluxo. Após 24 horas de exposição das células 4T1 com 1800 μM de NAMI-A foram observadas várias alterações morfológicas e estruturais como arredondamento das células, condensação da cromatina e aumento da quantidade de vesículas em relação ao controle. Além disso, notou-se um aumento da fragmentação do DNA e acúmulo de células na subfase G2, indicando o efeito citostático de NAMI-A e, mais uma vez, corroborando seu efeito citotóxico na linhagem tumoral. Portanto, sugerimos que o NAMI-A induziu citotoxicidade que foi dependente da dose, tempo e linhagem celular e também que este composto induziu alterações morfológicas e estruturais na célula e no seu DNA e ainda no perfil do ciclo celular. Assim, este estudo confirmou vários resultados relatados na literatura e agregou novas informações que poderão ser utilizadas em futuras investigações sobre o potencial antimetastático de NAMI-A em 4T1.

Palavras-chaves: Carcinoma mamário; NAMI-A; citotoxicidade; fragmentação DNA.

SUMMARY

Cancer is an extremely aggressive disease. Among the types of cancers, breast cancer is the second most frequent in the world and what occurs more in females. Thus, it becomes imperative to study alternative measures to the effective treatment of this disease. It is known that the most widely used treatments have some limitations. One of the major obstacles faced in cancer chemotherapy, for example, is their lack of specificity for the tumor cells and chemoresistance. Thus, in order to improve the efficacy of chemotherapy, several proposals have been suggested and studied in order to offer improved life expectancy and higher survival rate of individuals. metal complexes have shown promising results as chemotherapeutic agents for cancer treatment. Among them, the complex ruthenium (Ru) are becoming increasingly attractive because besides having anticancer activity, they present: (1) ability to mimic iron ions (Fe), by binding to biomolecules responsible for carrying Fe, such as albumin and transferrin, and thus Ru ions are transported more specifically in tumor cells; (2) important role in redox reactions, allowing the existence of the most important oxidation states in biological fluids, and (3) mechanisms of action which can overcome resistance problems found in platinum drugs. In our study, we performed the synthesis and characterization of NAMI-A by nuclear magnetic resonance and infrared, as well as evaluate their cytotoxic effect and cytostatic in murine mammary carcinoma cells 4T1 lineage (lineage that has metastatic potential) and normal fibroblast NIH-3T3 line. Cisplatin was used as a positive control. To assess these effects initially held cell viability tests using the colorimetric MTT assay. Cells were treated with doses ranging from 1.25 to 4000 uM for periods of 24, 48 or 72 hours. It was noted that the Nami-A was cytotoxic at doses above 200 uM and after 48 h. Since cisplatin had to be more cytotoxic therefore inhibited cell viability from the dose of 50 uM for 24 h. Furthermore, treatment with 250 to 4,000 uM Nami-A cytotoxicity was proportional to dose increase and, in 72 hours of treatment, the cytotoxic effects were more pronounced in the tumor cells (4T1) than in healthy cells (NIH -3T3). In later analyzes, we adopted to evaluate only the 4T1 line and the dose that inhibited 50% of the cells (IC₅₀ - 1800 ± 0.7 uM) in 24 hour period. Therefore, we analyzed the effects Nami-A on the morphology, DNA fragmentation and cell cycle profile analysis by optical microscope and flow cytometry. After 24 hours of exposure of 4T1 cells with 1800 uM Nami-A were observed several morphological and structural changes such as cell rounding, chromatin condensation and increasing the amount of vesicles as compared to control. In addition, it was noted an increase in DNA fragmentation and cell accumulation in G2 subphase indicating the cytostatic effect Nami-A and, again, confirming its cytotoxic effect on the tumor. Therefore, we suggest that Nami-A induced cytotoxicity which was dose-dependent, time and cell lineage and also that this compound induced structural and morphological changes in the cell and its DNA and still in the cell cycle profile. This study confirmed several results reported in the literature and added new information that may be used in future research on the antimetastatic potential of NAMI-A in 4T1.

Keywords: breast cancer; Nami-A; cytotoxicity; DNA fragmentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estimativa de mortalidade causada por câncer devido a fatores ambientais	21
Figura 2: Estrutura de um tecido mamário normal	23
Figura 3: Carcinoma ductal in situ (DCIS)	24
Figura 4: Carcinoma lobular in situ (DLIS)	25
Figura 5: Porcentagem de casos de carcinoma mamário atendidos segundo faixa etária, nos anos de 2000 a 2006	26
Figura 6: Estrutura química do composto cisdiaminodicloroplatina(II)	34
Figura 7: Interação do átomo de Pt presente na cisplatina e o átomo de nitrogênio presente nas bases nitrogenadas adenina (a) e guanina (b)	35
Figura 8: Esquematização das interações intrafitas (em cima) e interfitas (em baixo)	36
Figura 9: Estruturas químicas de agentes quimioterapêuticos à base de platina .	38
Figura 10: Estrutura dos compostos nedaplatina, lobaplatina e heptaplatina da esquerda para direita, respectivamente	38
Figura 11: Estrutura do composto BBR3464	39
Figura 12: Estrutura química de carboxilatos de Ródio	40
Figura 13: Estrutura química do citrato de ródio (II)	40
Figura 14: Estrutura do complexo nitrosilo de rutênio $[Ru(NH.NH)(typ)NO]^{3+}$...	42
Figura 15: Estruturas do ICR e KP1019	43
Figura 16: Estrutura do NAMI e NAMI-A	44
Figura 17: Esquema do ciclo celular	49
Figura 18: Estrutura molecular de alguns exemplos de agentes antineoplásicos ...	52

Figura 19: Etapas de preparação das soluções do precursor do NAMI-A [trans-RuCl₄ (Me₂SO)₂] [(Me₂SO)₂H].	58
Figura 20: Etapas da síntese do complexo trans-imidazoldimetilsulfóxidotetraclororutenatoIII de imidazólio [trans-RuCl₄ (DMSO) (Im)] [ImH] a partir do seu precursor [trans-RuCl₄ (Me₂SO)₂] [(Me₂SO)₂H].	59
Figura 21: Espectro de absorção na região do infravermelho do composto NAMI-A	65
Figura 22: Espectro de ¹HRMN do complexo NAMI-A	66
Figura 23: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de NAMI-A e cisplatina e linhagem celular avaliada após 24 horas de tratamento.	67
Figura 24: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de NAMI-A e cisplatina, linhagem celular avaliada após 48 horas de tratamento	68
Figura 25: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de NAMI-A e cisplatina, linhagem celular avaliada após 72 horas de tratamento	69
Figura 26: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de NAMI-A e linhagem celular avaliada após 24 horas de tratamento	70
Figura 27: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de NAMI-A e linhagem celular avaliada após 48 horas de tratamento	71
Figura 28: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de NAMI-A e linhagem celular avaliada após 72 horas de tratamento.	72
Figura 29: Alterações morfológicas e estruturais induzidas por NAMI-A em células de carcinoma mamário (linhagem 4T1) após 24 h de tratamento	74
Figura 30: Representação gráfica dos dados adquiridos em citômetro de fluxo após marcação das células com tampão de lise contendo iodeto de propídio.	75
Figura 31: Comparação do percentual de células 4T1 nas fases do ciclo celular (sub-G1, G1, S e G2) tratadas em 20 μM de cisplatina e 1800 μM de NAMI-A.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

B16 – Linhagem de melanoma

B16F1 - Melanoma

CCS - Ciclo celular específico

CCNS – Ciclo celular não específico

CDIS - Carcinoma ductal *in situ*

Cdks - Quinases dependentes de ciclina

Cdk 1 – Quinase 1

CLIS - Carcinoma lobular *in situ*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMEM - Dulbecos's modified Eagle's medium

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético bipotássico

ECM – Exame clínico das mamas

GSH - Glutationa

HAT – Histonas acetiltransferases

HDAC – Histonas desacetilases

¹HRMN – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

IGROV-1 – Linhagem de carcinoma de ovário

INCA - Instituto Nacional do Câncer

KB – Linhagem de carcinoma oral

LL/2(LLC1) – Linhagem de carcinoma pulmonar

MCa – Linhagem de carcinoma mamário

MCF-7 – Linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano

MMG – Mamografia

MMPs - Metaloproteínas

MS/A – Linhagem de células de adenocarcinoma mamário

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

NAMI – New anti-tumour metastasis inhibitor

NIH-3T3 - Fibroblastos

OMS – Organização mundial de saúde

PBS - Solução tamponada de fosfato

RMN – Ressonância magnética nuclear

RNA – Ácido ribonucleico

SHSY-5Y – Linhagem de neuroblastomas

T47D – linhagem de células de carcinoma mamário

TGF- β_1 – Transformador de crescimento β_1

TS/A – Linhagem de adenocarcinoma

4T1 – Linhagem de carcinoma mamário

2008 – Linhagem de carcinoma de ovário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Câncer: definições e origem.....	17
1.1.1 Carcinomas mamários e incidências	22
1.1.2 Tipos de tratamentos e suas limitações.....	29
1.2 Complexos metálicos: conceitos químicos.....	30
1.2.1 Aplicações de complexos metálicos na medicina.....	32
1.2.2 Compostos de Rutênio.....	40
1.2.3 Atividade citotóxica do complexo NAMI-A.....	43
1.2.4 Mecanismos de atuação de quimioterápicos: abordagem ao ciclo celular	47
2 JUSTIFICATIVA.....	55
3 OBJETIVOS	56
3.1 Objetivos gerais.....	56
3.2 Objetivos específicos.....	56
4. MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1 Síntese do complexo precursor de rutênio [trans-RuCl ₄ (Me ₂ SO) ₂] [(Me ₂ SO) 2H]	57
4.2 Síntese do complexo trans-imidazoldimetilsulfóxidotetraclororutenatoIII de imidazólio [trans-RuCl ₄ (DMSO) (Im)] [ImH], conhecido como NAMI-A	58
4.3 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho	59
4.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	60
4.5 Cultura de células	60
4.6 Tratamento das células	61
4.7 Análise da citotoxicidade	62
4.7.1 Análise metabólica da desidrogenase mitocondrial: método colorimétrico do MTT	62
4.7.2 Alterações morfológicas e estruturais em células de carcinoma mamário 4T1 tratadas com NAMI-A	63
4.7.3 Análise do ciclo celular.....	63
4.7.4 Análise Estatística.....	64
5. RESULTADOS.....	65
5.1 Caracterização do complexo NAMI-A.....	65
5.2 Experimentos in vitro.....	66
5.2.1 Viabilidade celular: relação da citotoxicidade de NAMI-A.....	66
5.2.2 Alterações morfológicas e estruturais em células de carcinoma mamário 4T1 tratadas com NAMI-A	73
5.2.3 Análise da fragmentação e perfil do ciclo celular após o tratamento de NAMI-A....	74
6. DISCUSSÃO.....	77

6.1 Considerações sobre a caracterização do NAMI-A por infravermelho e RMN.....	77
6.2 Considerações sobre a citotoxicidade de NAMI-A em células de carcinoma mamário das linhagens 4T1 e de fibroblasto NIH-3T3	78
7 CONCLUSÃO	84
PERSPECTIVAS FUTUTURAS.....	85
REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: definições e origem

Oncologia é a ciência que se destina a estudar os tumores. Tumores são também denominados de neoplasmas, os quais sofrem o processo de neoplasia. Esse termo é utilizado para se referir a qualquer fenômeno em que se tenha o desenvolvimento de um crescimento anormal de células em um tecido, as quais se proliferam de forma desordenada podendo ou não ocasionar a invasão em outros tecidos. Os tumores se subdividem em malignos e benignos, o que os distingue é o fato de que tumores benignos não promovem a invasão em outros tecidos que ficam ao redor do tumor, já tumores malignos infiltram também em tecidos secundários, ou seja, em tecidos adjacentes ou distantes do tumor primário. Essa invasão/infiltração que ocorre em outros tecidos é denominada de “metástase”. Tumores malignos são reconhecidos como “cânceres” e ocasionam a metástase (OLIVEIRA & ALVES, 2002; KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2005; LONARDO, NASI & PULCIANI, 2015).

Diversas são as causas que originam o câncer, sendo elas advindas de fatores externos e internos ao organismo. Estes são fenômenos hereditários, os quais estão relacionados com as mutações que podem ocorrer em determinadas regiões do material genético, levando à formação de proteínas diferentes das que seriam decodificadas normalmente (ALMEIDA *et al.*, 2005; KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2005). Além disso, os fatores internos também estão relacionados com os mecanismos epigenéticos, os quais se referem às mudanças que ocorrem na expressão dos genes em decorrência da interação do indivíduo com o meio ambiente, resultando em mudanças fenotípicas, porém, não ocorre alteração nos nucleotídeos da molécula de DNA. Dessa forma, o fenótipo é resultado do genótipo com uma informação extra do epigenótipo (COSTA & PACHECO, 2013). Sabe-se que as células que compõem um organismo apresentam a mesma informação genética e o que possibilita a diferenciação de uma célula para outra é a ativação e desativação de determinados genes, sendo assim, o que garante a regulação dos genes são esses fatores epigenéticos (ALMENDRO, MARUSYK & POLYAK, 2013; MAO *et al.*, 2013; MENDONÇA, SANTOS & SILVA, 2013).

Os principais mecanismos de alterações epigenéticas são modificações nas histonas e no DNA. No caso das histonas as modificações que ocorrem são a metilação,

fosforilação e acetilação. Já no DNA ocorre a metilação (OLIVEIRA *et al.*, 2010; ALMENDRO, MARUSYK & POLYAK, 2013; MAO *et al.*, 2013; MENDONÇA, SANTOS & SILVA, 2013).

Histonas são proteínas que se ligam a molécula de DNA formando nucleossomas, que são as unidades fundamentais da cromatina. Tais proteínas são responsáveis por definir a intensidade da compactação da cromatina, o que é muito importante haja vista que os genes são transcritos quando a cromatina está descondensada, e já a ativação da expressão dos genes ocorre quando a cromatina está condensada (COSTA & PACHECO, 2013)

No que se refere a acetilação das histonas, histonas acetiladas apresentam grupos acetil adicionados (-COCH₃) pelas enzimas histonas acetiltransferases (HAT) e isso gera menos afinidade das histonas com a molécula de DNA deixando a cromatina menos compactada, ou seja, descondensada, e, portanto ativação da transcrição dos genes. Histonas deacetiladas apresentam grupos acetil removidos por enzimas histonas desacetilases (HDAC), o que ocasiona ao aumento da afinidade das histonas pelo DNA, levando a condensação da cromatina e conseqüentemente a desativação da transcrição dos genes. Assim sendo, as enzimas acetiltransferases e desacetilases exercem um papel de extrema importância na regulação gênica, portanto qualquer desequilíbrio na ação dessas enzimas pode acarretar no desregulamento da expressão dos genes, levando ao processo de carcinogênese (MENDITI & KANG, 2007; COSTA & PACHECO, 2013)

Dessa forma, nas células cancerígenas, a diminuição da acetilação leva a repressão de genes responsáveis por reduzir a probabilidade de uma célula normal se tornar maligna e, conseqüentemente aumentando a agressividade destas. (MULLER & PRADO, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010; ALMENDRO, MARUSYK & POLYAK, 2013; MAO *et al.*, 2013; MENDONÇA, SANTOS & SILVA, 2013).

A fosforilação corresponde à adição de grupos fosfatos aos resíduos de alguns aminoácidos realizado por quinases e a remoção de grupos fosfatos realizada por enzimas fosfatases. Dessa forma, a fosforilação de proteínas é responsável por atuarem como sinalizadores intracelulares, ativando e desativando proteínas que são responsáveis por pontos de regulação no ciclo celular, promovendo o prosseguimento ou não da divisão celular (MENDITI & KANG, 2007; COSTA & PACHECO, 2013)

A metilação do DNA consiste em uma modificação na ligação covalente presente na molécula de DNA, ocorrendo a adição de um grupo metila (-CH₃) ao carbono de citosina e este mecanismo é crucial para expressão gênica e por conseguinte,

desenvolvimento normal da célula. No entanto, em muitos tipos de cânceres ocorrem determinado descontrole na metilação do DNA (hipermetilação e hipometilação). A hipermetilação (adição de grupos metil) está relacionada com uma diminuição na expressão dos genes e já a hipometilação (remoção de grupos metil) promove um aumento na expressão dos genes. Tais processos são responsáveis por alterar a expressão dos genes e promover a divisão celular desregulada. Por exemplo, a hipermetilação pode levar a desativação de genes supressores de tumores e genes de reparação do DNA. No que diz respeito a metilação das histonas, assim como no DNA, a adição de grupos metil irá desativar genes e a remoção de grupos metil irá ativar genes. A metilação excessiva está relacionada com a transformação maligna das células, já que leva ao silenciamento de genes supressores tumorais (MULLER & PRADO, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010; ALMENDRO, MARUSYK & POLYAK, 2013; MAO *et al.*, 2013; MENDONÇA, SANTOS & SILVA, 2013).

Em relação aos fatores externos, ou seja, àqueles que dizem respeito ao meio ambiente, pode-se destacar o hábito alimentar, consumo de medicamentos, de álcool e de tabaco, exposição à radiação solar e fatores ocupacionais do indivíduo. Devido à estes fatores as neoplasias podem se desenvolver devido à alterações nos genes que codificam proteínas que regulam aspectos como crescimento celular. Estes genes são denominados de protooncogenes e quando sofrem mutação se transformam em oncogenes, o que estimula o crescimento celular desordenado característico de células tumorais (ALMEIDA *et al.*, 2005; KUMAR, ABBAS & FAUSTO, 2005).

Em relação ao consumo de álcool, estudos relatam que 3,6 % de todos os cânceres que acometem a população são advindos do consumo abusivo de bebidas alcóolicas. É conhecido que o álcool constitui um importante fator de risco para a ocorrência de cânceres de colo retal, mama, laringe, fígado, esôfago, cavidade oral e faringe. Tais riscos podem também sofrer influência por fatores genéticos, já que pode haver alteração nos genes responsáveis pela codificação de enzimas que participam da metabolização do álcool. Quando este é ingerido, o etanol é metabolizado em acetaldeído, o qual é um composto tóxico ao organismo metabolizado através da enzima desidrogenase em outros compostos que não são tóxicos ao organismo. Contudo, quando há um consumo excessivo de bebidas alcóolicas há possibilidade de não ocorrer a sua eficiente detoxificação o que pode induzir danos à molécula de DNA. Dessa forma, as modificações nos genes que codificam tais enzimas aumentarão os riscos de ocorrência de cânceres (BAGNARDI *et al.*, 2013).

Em relação ao câncer de mama, alguns estudos descrevem seus fatores de riscos e de proteção. Tais informações são relevantes haja vista que cerca de um terço de novos casos de câncer que incidem anualmente no mundo poderiam ser prevenidos. A prática de atividades físicas e a lactação são consideradas fatores de proteção para o câncer de mama. Pesquisas apontam que a amamentação promove uma certa esfoliação do tecido mamário, onde as células são eliminadas e renovadas, promovendo assim a apoptose de células que poderiam ter alguns danos no material genético. Por outro lado, as atividades físicas além de ajudarem no controle de peso corporal e equilíbrio hormonal, também melhoram a resposta do sistema imunológico, atuando como efeito protetor (INUMARU, SILVEIRA & NAVES, 2011).

Já o álcool, como foi mencionado representa um fator de risco, já que pode atuar inibindo a desintoxicação do mesmo pelo fígado, alterando o metabolismo nutricional, estresse oxidativo e produzindo também um composto que pode promover danos ao material genético, o acetaldeído (INUMARU, SILVEIRA & NAVES, 2011).

Dessa forma, adotar métodos como amamentar, praticar exercícios físicos, manter peso corporal apropriado, bem como consumo moderado ou ausente de álcool são boas estratégias que auxiliam na prevenção do câncer de mama (INUMARU, SILVEIRA & NAVES, 2011).

Pesquisas apontam que aproximadamente 80% dos casos de câncer são advindos de fatores ambientais e já os outros 20% são originados de fatores hereditários. Dessa forma, os hábitos de vida dos indivíduos podem influenciar em demasia o processo de formação de diferentes tipos de câncer. No entanto, é importante ressaltar que os fatores ambientais poderão apenas favorecer no processo de carcinogênese de determinados cânceres, isso porque cada tipo de câncer terá uma causa preponderante, além do mais a relação entre o ambiente e a doença pode ser uma mera associação e não uma causa. Na figura 1 é mostrada uma estimativa da influência dos principais fatores ambientais para a carcinogênese (GRAMINHA, 2010; HILL, 2015).

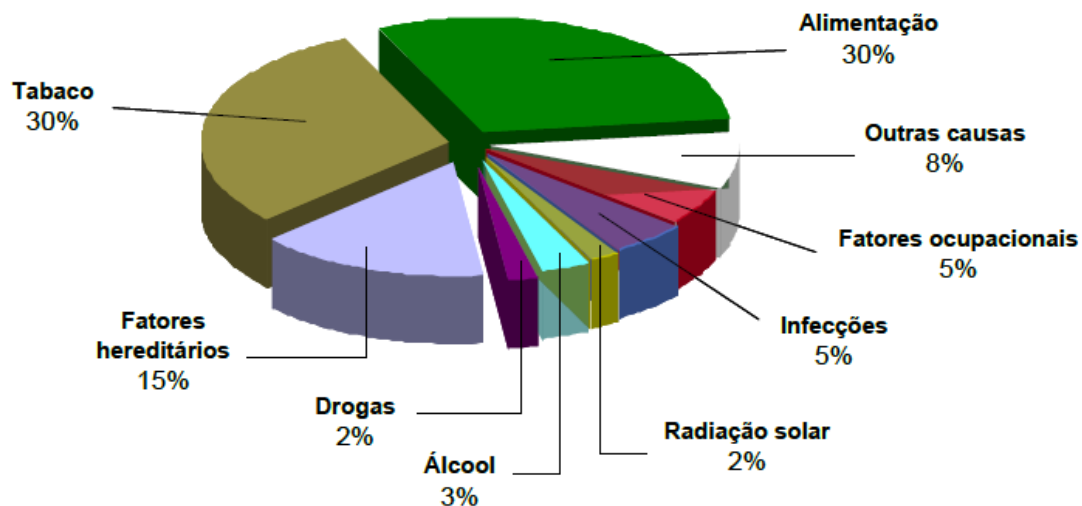


Figura 1 - Estimativa de mortalidade causada por câncer devido a fatores ambientais. As causas do câncer são variadas, e grande parte dos casos de formação de cânceres estão associados aos fatores ambientais, que engloba estilo e hábitos de vida, consumo de alimentos, medicamentos, dentre outros. Fonte: Graminha, 2010.

O processo de carcinogênese se refere ao processo de formação do câncer, o qual ocorre em três estágios, sendo eles: iniciação, promoção e progressão. No primeiro estágio um agente carcinógeno denominado *oncoiniciador* atua sobre as células, o que resultará em mudanças na proliferação e diferenciação celular. No segundo estágio, as células sofrem com os efeitos gerados pelos carcinógenos, agora denominados de *oncopromotores*. E no último estágio, na progressão, o câncer já está instalado, e as células proliferam de forma excessiva. Além disso, é razoável pensar que essa multiplicação descontrolada leva à uma perda de função do tecido, ou seja, as células tumorais não mais exercem a função daquele tecido (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Como já foi citado, tumores podem ser classificados em benignos e malignos. Esses últimos por apresentarem características agressivas, são capazes de se desprender do tecido que se desenvolveu primariamente (tumor primário) e invadir a circulação sanguínea ou vasos linfáticos levando à formação de novos tumores em outras regiões do organismo (tumor secundário) e, por sua vez, ocasionando a metástase (GRAMINHA, 2010).

Desse modo, o processo metastático está relacionado com a influência mútua entre as células cancerígenas e o ambiente dos tecidos ao redor do tumor. É importante ressaltar novamente que essas células devem ser capazes de se desprender do tecido de origem e invadir o tecido adjacente, além de induzir a formação de novos vasos sanguíneos através do processo de angiogênese. Haja vista que essas células estão em constante divisão

celular, elas necessitam de um aporte superior de nutrientes e oxigênio para continuarem se proliferando. Sendo assim, o surgimento desses novos vasos sanguíneos é muito importante para a manutenção do tumor (JAIN, 2003; GRAMINHA, 2010).

1.1.1 Carcinomas mamários e incidências

Existem vários tipos de câncer e sua classificação é feita de acordo com a célula que o originou. Desse modo, melanoma é um câncer originado de melanócitos; leucemia é um câncer originado de leucócitos e assim por diante. O modelo experimental a ser utilizado neste trabalho é carcinoma mamário, que é originado de células de revestimento dos ductos ou dos lóbulos mamários (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Com o objetivo de se compreender melhor como funciona o câncer de mama é fundamental a compreensão da estrutura normal da mama. A mama é basicamente composta de lóbulos, ductos e estroma (Figura 2). Os lóbulos correspondem as glândulas produtoras de leite, os dutos são pequenos canais responsáveis pelo transporte do leite advindo dos lóbulos aos mamilos, já o estroma consiste em tecido adiposo e tecido conjuntivo circundante aos ductos, lóbulos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos (ACS, 2016).

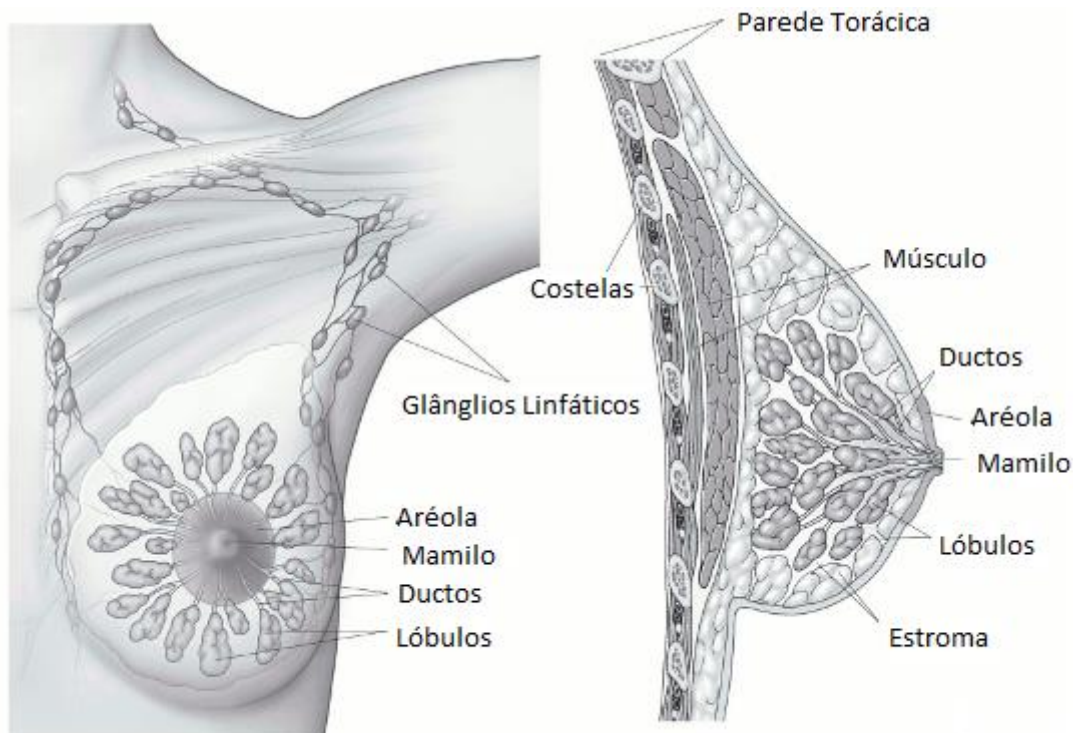


Figura 2: Estrutura de um tecido mamário normal. A glândula mamária é formada por ductos, lóbulos e estroma circundados por tecido adiposo e de suporte. Fonte: Adaptado de <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>

As células mamárias sofrem várias alterações no decorrer da vida da mulher. Dessa forma, é normal as glândulas mamárias passarem por alterações anatômicas e fisiológicas. Por exemplo, as células podem aumentar em número e tamanho, sendo que para essas alterações é utilizado o termo de hiperplasia. Esta ocorre à medida que as células sofrem senescência, podendo afetar mulheres em qualquer idade. Quando a hiperplasia ocorre nos ductos ela é denominada de hiperplasia ductal e caso aconteça nos lóbulos é chamada de hiperplasia lobular. Existem hiperplasias típicas e atípicas. As hiperplasias típicas abrangem alterações benignas das mamas enquanto que as atípicas, apesar de também serem benignas, indicam que as células estão se desenvolvendo de forma anormal e isto aumenta o risco do desenvolvimento de um carcinoma mamário. Na figura 3 e 4 são representados ductos e lóbulos normais e anormais (ACS, 2016).

Existem vários tipos de carcinomas mamários, os mais comuns se subdividem em carcinoma ductal *in situ* (CDIS) (Figura 3) e o carcinoma lobular *in situ* (CLIS) (Figura 4). O câncer que acomete as células dos ductos é o mais frequente entre as mulheres. Estudos relatam que a cada cinco novos casos de carcinoma mamário, um corresponde a

câncer do tipo carcinoma ductal (TAVASSOÉLI & DEVILEE, 2003; LEONARD & SWAIN, 2004; ASC, 2016).

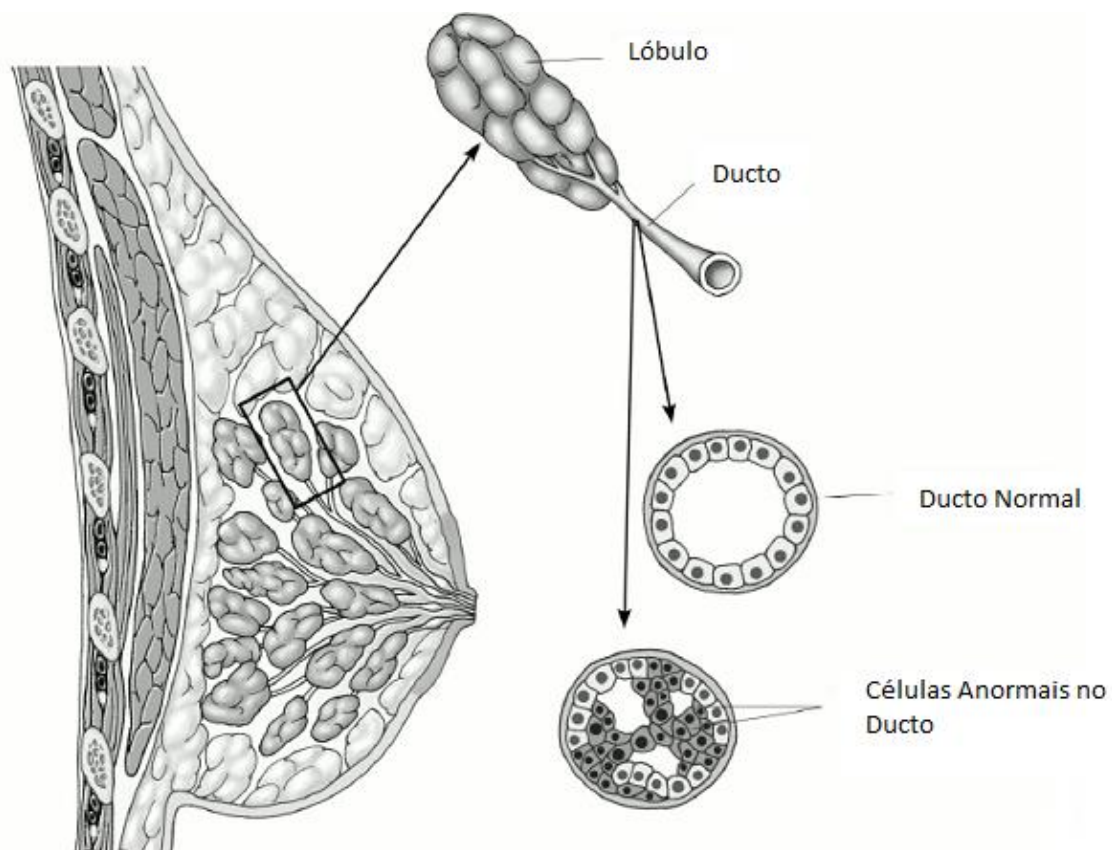


Figura 3: Carcinoma ductal in situ (DCIS). As células que revestem os ductos sofreram alguma alteração e se tornaram células cancerosas. Fonte: Adaptado de: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>

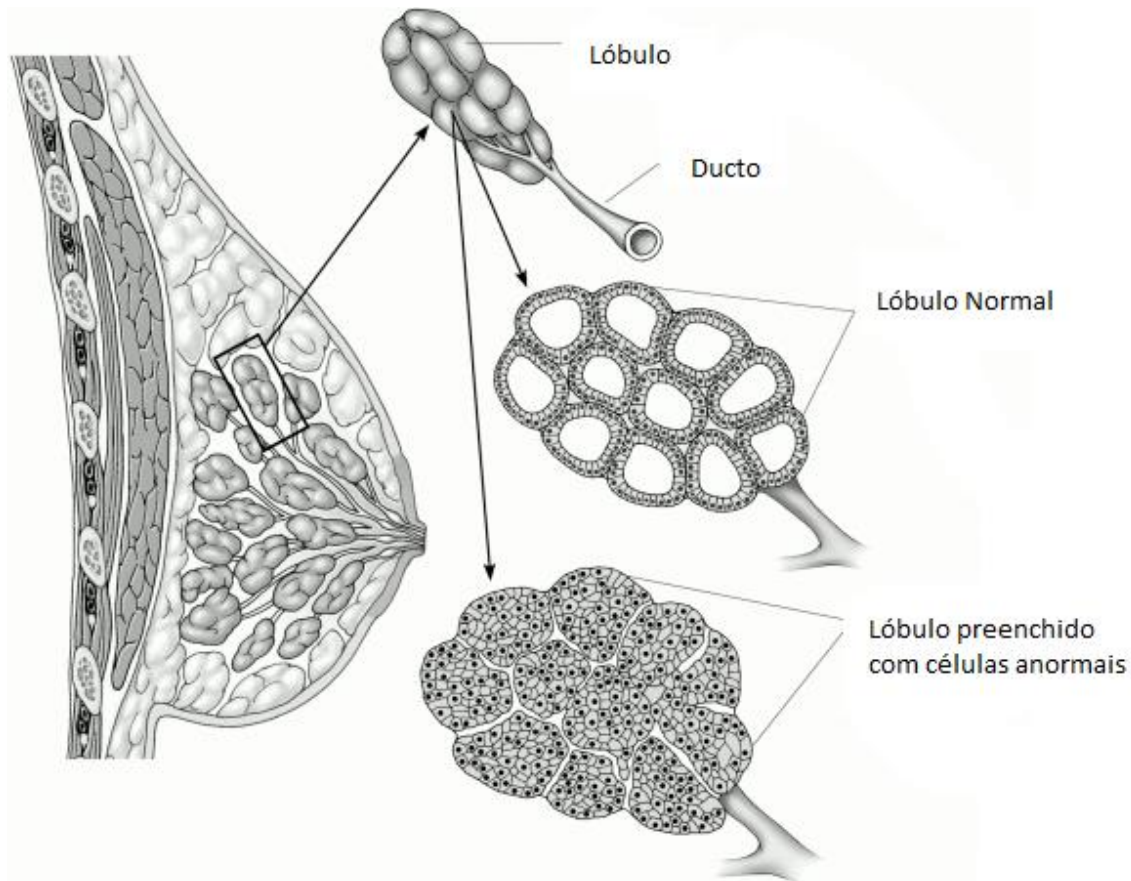


Figura 4: Carcinoma lobular in situ (DLIS). As células que revestem os lóbulos sofreram alguma alteração e se tornaram células cancerosas. Fonte: Adaptado de <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>.

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), dados estatísticos mostram que o carcinoma mamário é o segundo câncer mais frequente no mundo, representando 28,4% do total de cânceres que acometem as mulheres (é o que mais ocorre regularmente no sexo feminino). A taxa de mortalidade em decorrência do carcinoma mamário ainda é alta, sendo que após cinco anos a sobrevida média corresponde a 61% (INCA, 2014).

A incidência de câncer de mama é mais comum em mulheres com idades mais avançadas. A taxa de incidência desse tipo de câncer aumenta progressivamente após os 35 anos de idade. É representado na figura 5 a incidência do câncer de mama relacionada com a faixa etária. Pode-se destacar que 62,9% dos casos afetam mulheres entre 40 e 64 anos (Figura 5) (INCA, 2011; ROSA & RADUNZ, 2012).

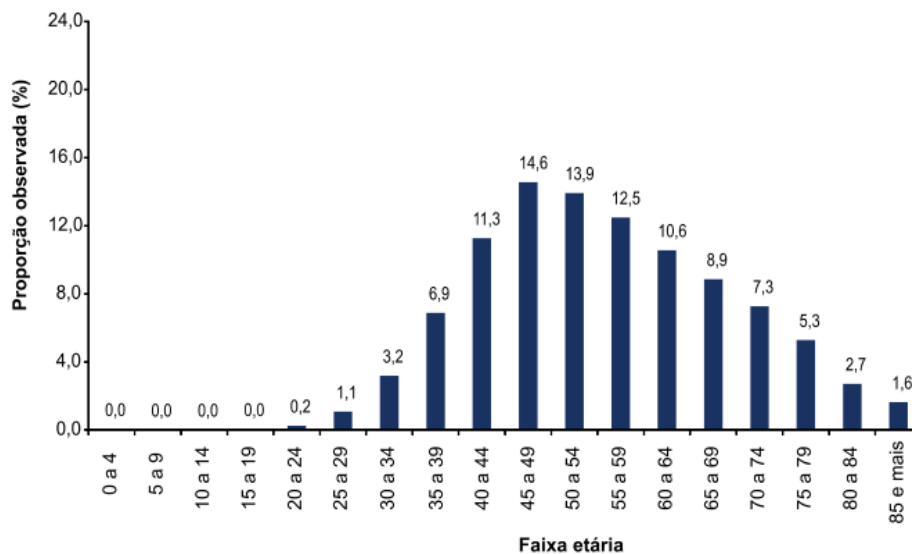


Figura 5: Porcentagem de casos de carcinoma mamário atendidos segundo faixa etária, nos anos de 2000 a 2006. O índice de casos de carcinoma mamário progride com a idade, sendo que entre a faixa etária de 45-49 tem-se uma maior proporção de casos observados. Fonte: Disponível em: < http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/boletim_vigilancia_1.pdf>. Acesso em: 26/01/2015.

Pesquisas relatam que o câncer de mama, junto com cânceres de pulmão e colorretal são os cânceres mais incidentes em países desenvolvidos. O aumento do carcinoma mamário em diversos países é devido, em parte, ao modo de vida adotado pela população no que se refere a fatores reprodutivos. Nos dias atuais é muito comum a mulher adiar a gravidez por motivos profissionais e financeiros. No entanto, a escolha por uma gravidez tardia e amamentação por período curto são fatores que favorecem em demasia a alta incidência de câncer de mama. Porém, apesar dos dados estatísticos indicarem maior incidência de câncer de mama nos países desenvolvidos, a taxa de mortalidade nesses países é menor, devido a eficácia na detecção do tumor e no aperfeiçoamento das técnicas terapêuticas. No Brasil, no entanto, as taxas de incidência e mortalidade são altas, haja vista as dificuldades de acesso a serviços de diagnóstico e tratamento de câncer (LEE *et al.*, 2012; PINHEIRO *et al.*, 2013; GIRIANELLI, GAMARRA & SILVA, 2014).

Estudos apontam que o aumento da taxa de sobrevivência está relacionado com o investimento em programas de rastreamento, elevação da escolaridade, do padrão socioeconômico, eficácia de estratégias terapêuticas. Todos esses são fatores que contribuem para uma melhor qualidade de vida da mulher com câncer de mama (LEE *et al.*, 2012; ROSA & RADUNZ, 2012).

O rastreamento consiste em diversos procedimentos realizados em pessoas que não apresentam sintomas no intuito de diagnosticar o câncer de mama em seus estágios iniciais e, por consequência, promover mudanças nos prognósticos. As técnicas mais usadas no rastreamento são os exames de imagem, o exame clínico das mamas (ECM) e o autoexame das mamas. Os exames de imagens são realizados através da mamografia (MMG), a qual apresenta alta sensibilidade e especificidade. Já o ECM é realizado por um profissional da saúde, através da verificação visual e palpação das mamas, sendo que esse método apresenta sensibilidade e especificidade menores do que MMG. No autoexame, a própria paciente faz a vistoria de suas mamas afim de identificar algum nódulo palpável. De acordo com a (OMS) Organização Mundial de Saúde, a detecção precoce e o tratamento apropriado são medidas que podem possibilitar a cura de cerca de um terço dos cânceres. Além disso, estudos apontam que mulheres que adotam os exames que compõem o rastreamento reduzem a taxa de mortalidade por câncer de mama em torno de 30 a 35% (BOYLE & LEVIN, 2008; SILVA & HORTALE, 2012).

Pesquisas relatam que mulheres com nível superior de escolaridade apresentam uma taxa de sobrevida muito maior que mulheres sem escolaridade. Estas representam sete vezes mais riscos de óbito do que àquelas com nível de escolaridade superior. Assim, é razoável pensar que o nível socioeconômico também tem grande influência na taxa de sobrevida já que mulheres com melhores condições financeiras tem possibilidade de obter melhores condições terapêuticas e um maior acesso ao diagnóstico precoce do câncer (SON *et al.*, 2006; ROSA & RADUNZ, 2012).

O tamanho no qual o tumor se encontra é um fator importante na taxa de sobrevida. Uma pessoa que tenha um tumor de até 2,0 cm apresenta uma taxa de sobrevida de 87,2% e em tumores maiores que 2,0 cm apresentaram uma taxa de 78,9%. Outro fator relevante é a presença de metástases, pois a sobrevivência cai em 40% quando comparada a sobrevivência em casos de carcinoma mamário não metastático (FLORES-LUNA *et al.*, 2008; ROSA & RADUNZ, 2012).

Desse modo, observa-se que o diagnóstico precoce, bem como a associação do rastreamento com a terapia eficaz são essenciais para possibilitar a cura do câncer de mama e consequentemente, aumentar os níveis das taxas de sobrevida das mulheres com carcinoma mamário (ROSA & RADUNZ, 2012).

Sabe-se que o carcinoma mamário não é comum em mulheres jovens e geralmente apresenta um quadro clínico mais grave e as chances de cura são menores quando detectado neste grupo de pessoas. Um dos fatores que influencia essa realidade é

justamente pelo fato da incidência ser menor em mulheres jovens e os sintomas e, assim, os sinais clínicos da doença podem passar despercebidos tanto pelas jovens acometidas pela doença como os profissionais na área da saúde. Além disso, outro fator diz respeito a baixa eficácia da mamografia devido à alta densidade mamária presente em mulheres jovens. Normalmente, quando o diagnóstico de câncer de mama é feito em mulheres dessa faixa etária já se encontra em uma fase sintomática e, portanto, estágio mais grave da doença. Dessa forma, a sobrevida em mulheres jovens é menor do que em mulheres com idades mais avançadas (PINHEIRO *et al.*, 2013; GIRIANELLI, GAMARRA & SILVA, 2014).

Assim como qualquer outro tipo de câncer, quanto mais rápido o câncer de mama é diagnosticado mais elevado será o seu percentual de cura. Desse modo, lançar mão de estratégias que visem o diagnóstico precoce é de extrema importância. Uma dessas estratégias baseia-se em campanhas educativas visando como público alvo a mulher que deve reconhecer os principais sinais que levam ao câncer de mama. Neste sentido, elas devem ser orientadas a terem o hábito de realizar o autoexame periodicamente. Pesquisas mostram que o autoexame tem relativa importância na identificação do tumor. No Brasil, como já foi mencionado, os métodos de rastreamento do tumor se baseiam na mamografia, no exame clínico das mamas (ECM) e autoexame. Cada vez mais se tem chamado a atenção das mulheres para fazer uso de tais estratégias. Assim, é recomendado que as mulheres entre 50 a 69 anos façam o ECM anualmente e mamografia a cada dois anos. Para as mulheres de 40 a 49 anos recomenda-se o ECM anualmente e a mamografia sempre que houver alterações no ECM. Ainda, para as mulheres com riscos de câncer é aconselhado que se inicie o rastreamento com a mamografia e ECM anualmente a partir dos 35 anos de idade (LEE *et al.*, 2012; ROSA & RADUNZ, 2012; INCA, 2015).

O câncer representa hoje um problema de saúde pública mundial. No Brasil, para o ano de 2015 foi estimado que ocorrerá cerca de 576 mil novos casos de câncer. Os casos com maior índice no sexo masculino serão cânceres de próstata, pulmão, cólon, reto, estômago e cavidade oral; já no sexo feminino, os casos mais incidentes serão cânceres de mama, cólon, reto, colo do útero, pulmão e glândula tireóide. Tendo em vista esse alto índice de incidência do câncer, se faz necessário programas de educação, orientação de prevenção, controle da doença, além de promover pesquisas científicas que visem a busca de tratamentos mais eficazes e que resultem em maior qualidade de vida e gere maior índice de sobrevivência aos pacientes (SILVA *et al.*, 2011; INCA, 2014).

1.1.2 Tipos de tratamentos e suas limitações

Entre os tratamentos de câncer mais comuns estão a cirurgia, radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia. Vários são os fatores que interferem na escolha de qual tratamento utilizar, entre eles, a idade da mulher, estágio da doença e/ou presença ou ausência de metástase. Dessa forma, primeiramente é feita uma avaliação da progressão da doença e o tratamento será selecionado de acordo com prognóstico. A cirurgia e a radioterapia são tratamentos utilizados quando o câncer se apresenta localizado em um determinado órgão, já a quimioterapia e hormonioterapia são tratamentos usados em caso de doença sistêmica (BARROS *et al.*, 2001).

A cirurgia é indicada em casos onde o câncer não está espalhado, em um câncer de mama por exemplo, dependendo do tamanho do tumor e sua localização é retirada uma parte da mama ou a mama inteira. No caso onde não ocorre perda da mama denomina-se de cirurgia conservadora e se houver perda da mama, refere-se à mastectomia e, portanto, neste caso trata-se de uma cirurgia não conservadora (BARROS, *et al.* 2001; BOYLE & LEVIN, 2008; GRAMINHA, 2010).

Dependendo da evolução da doença e de como ocorreu a cirurgia se faz necessário associar a cirurgia com outro tratamento, como a radioterapia. Desse modo, a radioterapia se torna necessária quando se tem alguns resquícios de células após a cirurgia e também quando o tumor está localizado em regiões que inviabilizam a cirurgia. A radioterapia é uma modalidade bastante empregada, pois aproximadamente de 70 a 83% de mulheres com câncer de mama passam por esse tipo de tratamento. Esse tratamento provoca alterações no material genético no intuito de impedir a proliferação celular, mas para isso, induz à ionização de substâncias em meio biológico por meio da remoção de elétrons, formando espécies instáveis (espécies reativas de oxigênio) que reagem com outras biomoléculas e ocasionam uma desordem celular. Tanto a cirurgia como a radioterapia são métodos utilizados em tumores localizados (BOYLE & LEVIN, 2008; GRAMINHA, 2010).

A hormonioterapia é um tratamento utilizado quando os tumores apresentam determinada expressão de receptores hormonais. O crescimento das células de organismo normal é influenciado por diversos hormônios produzidos pelo corpo, como estrógeno, o qual promove um crescimento celular organizado. Se por influência de algum fator esse crescimento celular ocorre de forma desorganizada pode surgir os cânceres. Sendo assim, uma das formas de impedir essa proliferação das células cancerosas seria a redução do

hormônio que influencia no crescimento celular, ou retirada do órgão que produz tal hormônio ou ainda impedir a ligação desse hormônio aos receptores hormonais (BARROS, *et al.* 2001).

Em casos onde se tem a formação de metástases o tratamento por quimioterapia é o mais utilizado. Tal tratamento consiste na administração intravenosa de medicamentos que atuam sobre as células, com finalidade de promover o controle e a inibição da proliferação e, por fim, a destruição das células. Porém, a quimioterapia se torna ineficaz devido ao não direcionamento específico de atuação do fármaco, pois este atua tanto em células normais como em células tumorais, sendo, assim, um tratamento bastante invasivo para o organismo. Ainda, as células tumorais apresentam mecanismos de resistência à quimioterápicos, os quais deixam de apresentar efeitos antineoplásicos e não mais provocam a morte de tais células (OLIVEIRA & ALVES, 2002).

Haja vista que o câncer é uma doença extremamente agressiva e que atinge um grande número de pessoas, torna-se imperativo o estudo de medidas alternativas que visem o tratamento da mesma. Sabe-se que os tratamentos mais utilizados apresentam algumas limitações. Sendo assim, o estudo de quimioterápicos mais eficazes e que consigam diminuir essas limitações é de extrema relevância para o tratamento quimioterápico.

1.2 Complexos metálicos: conceitos químicos

Compostos de coordenação são compostos que apresentam em sua estrutura química complexos metálicos. Estes são formados por um íon metálico central ligado a moléculas neutras ou íons. Tais moléculas e íons são denominadas de *ligantes*, esses ligantes devem possuir pelo menos um par de elétrons não compartilhado para se ligar ao íon central, através de ligações covalentes. Desse modo, os ligantes são comumente ânions, que são íons com carga negativa como o cloreto (Cl⁻) ou moléculas polares como a amônia (NH₃) e já o íon central é normalmente uma espécie deficiente de elétrons, como metais na forma de cátions, que são íons de carga positiva. Quando se forma um complexo fala-se que os ligantes estão coordenados ao íon central (BROWN *et al.*, 2005).

De acordo com a teoria ácido-base de Lewis, onde um ácido de Lewis corresponde a uma espécie receptora de elétrons e uma base de Lewis uma espécie doadora de elétrons pode-se dizer que a ligação presente entre um ligante e um íon metálico é resultado da interação entre uma base de Lewis e um ácido de Lewis. Como já foi mencionado, os

ligantes apresentam pares de elétrons não compartilhados, sendo assim, funcionam como uma base de Lewis, a qual irá doar elétrons para o íon metálico. Como o íon metálico apresenta orbitais de valência vazios tem a tendência em receber elétrons e portanto, funcionam como ácido de Lewis. Por conseguinte, tal ligação nada mais é do que o compartilhamento de elétrons entre os ligantes e o íon metálico central (SHRIVER & ATKINS, 2003).

Os ligantes podem ser classificados de acordo com a quantidade de átomos doadores de elétrons. Dessa forma, quando um ligante se coordena ao íon central através de apenas um átomo doador ele é denominado de monodentado e, caso ele apresente dois ou mais átomos doadores será denominado de polidentado. Ligantes polidentados envolvem o íon central de tal forma que oferece estabilidade ao composto, e essa estabilidade é conhecida como efeito quelato. Tal efeito é de grande importância para determinadas aplicações químicas desses compostos, como por exemplo, existem compostos quelantes usados na medicina para remover do organismo alguns metais que são prejudiciais à saúde como o chumbo (Pb), haja vista que o efeito quelato permite que o metal seja envolvido pelo composto (SHRIVER & ATKINS, 2003; BROWN *et al.*, 2005).

Alfred Werner foi um químico importante que colaborou no entendimento dos compostos de coordenação. Ele propôs uma teoria que ficou conhecida como *Teoria de Werner*, a qual descrevia que os íons metálicos apresentavam duas valências, primária e secundária. As valências primárias correspondem ao estado de oxidação do íon metálico e já as valências secundárias equivale ao número de átomos coordenados ao íon. Essa valência secundária é denominada de número de coordenação, em outras palavras, é o número de ligantes que o íon central pode acomodar. A região que compõe o íon metálico e seus ligantes é conhecida como esfera de coordenação. O número de coordenação é responsável por diversas propriedades químicas exibidas por esses compostos, sendo determinado por alguns fatores, como por exemplo, o tamanho do íon central e de seus ligantes bem como das interações eletrônicas que podem ocorrer na esfera de coordenação. É presumível pensar que quanto maior o íon metálico maior o número de ligantes que conseguem se coordenar ao metal, e quanto mais volumoso o ligante menor será o número de ligantes coordenados. Para descrever um complexo metálico presente em composto de coordenação, Werner propôs o uso de colchetes para se referir ao complexo presente na esfera de coordenação, no intuito de diferenciar os mesmos das outras partes do composto (SHRIVER & ATKINS, 2003; BROWN *et al.*, 2005).

A determinação da carga, do número de coordenação e da geometria de um complexo é de extrema importância para a compreensão da atuação desses compostos em diversas áreas. A carga do complexo é determinada através da soma das cargas do metal e dos seus respectivos ligantes. No complexo diaminodicloroplatina(II) $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, o qual apresenta atividade anticancerígena e será detalhado mais adiante, observa-se que a Platina (Pt) está coordenada a duas moléculas de amônia (NH_3) e a dois ânions cloretos (Cl^-). Nesse complexo o átomo de Pt se apresenta na forma catiônica com carga positiva $2+$ (Pt^{2+}), a molécula de amônia tem carga nula e cada cloreto carga de 1^- , como são dois ânions temos carga de 2^- , somando a carga da platina II, das moléculas de amônia e dos cloretos tem-se um total de zero, sendo assim a carga do complexo é zero e ele é classificado como um complexo neutro. Já o seu número de coordenação, que diz respeito a quantidade de ligantes, é quatro. O número de coordenação vai influenciar na geometria, no caso do complexo citado, tem-se uma geometria quadrática plana (BROWN *et al.*, 2005).

A nomenclatura dos íons complexos segue a seguinte regra: primeiro vem o nome dos ligantes em ordem alfabética independente da carga e depois o nome do íon central é mencionado. A quantidade de ligantes tem que ser informada bem como a carga do íon central. Desse modo, o composto $[\text{CoCl}_3(\text{NH}_3)_3]$ recebe o nome, triaminotriclorocobalto (III), o composto $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ diaminodicloroplatina (II) Percebe-se que a quantidade de ligantes foi informada, assim como o nome dos ligantes, o íon central e sua respectiva carga. Os compostos de coordenação podem formar sais complexos, que são espécies químicas que apresentam pelo menos um íon complexo, sendo assim a nomenclatura desses sais o nome do ânion vem antes do nome do cátion, Assim, no composto $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$, dá-se o nome do íon Cl^- e do íon $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$ resultando em cloreto de pentaminoclorocobalto(III). Da mesma forma, $\text{Na}_2[\text{MoOCl}_4]$ é tetracloroxomolibdato(IV) de sódio, $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]\text{Br}_2$ é brometo de hexaminíquel(II) (BROWN *et al.*, 2005).

1.2.1 Aplicações de complexos metálicos na medicina

Cada vez mais a ciência se depara com a descoberta da grande aplicabilidade de complexos metálicos na medicina. Esses compostos têm mostrado resultados promissores tanto como agentes quimioterápicos como no tratamento de outras doenças. Dessa forma,

se faz necessário um estudo sobre a toxicidade destes e também a respeito dos mecanismos de ação de tais compostos, tornando possível investigações de drogas mais potentes e eficazes no tratamento de câncer (BERALDO, FONTES & CÉSAR, 2005).

Complexos metálicos se tornaram atrativos no tratamento de câncer devido a sua capacidade de interação com moléculas ricas em elétrons, como o ácido desoxirribonucleico (DNA), o ácido ribonucleico (RNA) e proteínas. Isto ocorre porque íons metálicos são eletrofílicos, em outras palavras, precisam de elétrons para se estabilizar. A coordenação de íons metálicos com determinados ligantes irá originar diferentes compostos, com diferentes geometrias e diferentes números de oxidação. Tal fato explica a grande utilização desses compostos em diversas áreas. O mecanismo de ação desses compostos vai depender muito do tipo de íon metálico, bem como de seus ligantes, esses ligantes devem ser capazes de se soltar do íon metálico e assim permitir que o metal possa interagir com moléculas biológicas, promovendo atividades antitumorais. Dessa forma, muitos compostos com diferentes metais e ligantes são estudados, e muitos já são utilizados como quimioterápicos (BERALDO, FONTES & CÉSAR, 2005; BRUIJNINCX & SADLER, 2008; KOMOR & BARTON, 2013).

Um grande marco dos complexos metálicos como agentes antineoplásicos na medicina foi a descoberta do composto que ficou conhecido como cisplatina, o qual apresenta fórmula química $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ e nomenclatura cisdiaminodichloroplatina (II) (Figura 6). A descoberta da sua atividade citotóxica foi realizada pelo cientista Barnet Rosenberg no final na década de sessenta do século XX em um estudo que ele fazia sobre a influência do campo elétrico em bactérias *Escherichia coli*. Para isso, ele utilizou eletrodos de platina (Pt) inseridos em soluções de cloreto de alumínio. Apesar de sua intencionalidade não ser pesquisar sobre a atividade citotóxica, ele percebeu que depois de um tempo as células da cultura de bactérias não mais sofriam divisão celular, com isso, ele começou a pesquisar o que teria ocasionado de fato tal inibição. Os estudos mostraram que isso ocorria devido a dissolução do eletrodo de platina na solução mencionada que formava, assim, complexos do metal de Pt (BERALDO, FONTES & CÉSAR, 2005).

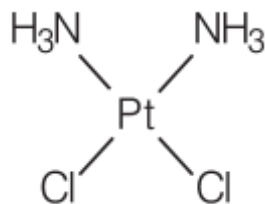


Figura 6: Estrutura química do composto cisdiaminodichloroplatina (II). Esse composto é conhecido como cisplatina. Fonte: Beraldo & Fontes & César, 2005.

Após a descoberta da citotoxicidade dos compostos de Pt, inúmeros experimentos com diversos complexos de Pt foram realizados. Sendo que os compostos com isomeria *cis* eram os mais promissores, o composto com maior atividade terapêutica foi o cisdiaminodichloroplatina (II). No início da década de 70 foram realizados testes clínicos e, em 1979, a cisplatina foi inserida no mercado americano, sendo eficaz em diversos tratamentos de câncer. O carcinoma testicular teve um grande destaque no tratamento com a cisplatina, onde obteve cerca de 80% de cura após a utilização do composto. Além disso, em outros tipos de câncer como o de pulmão, cabeça e ovário a cisplatina também foi promissora como agente terapêutico (BERALDO, FONTES & CÉSAR, 2005).

O mecanismo de ação da cisplatina é explicado devido a interação da Pt com moléculas nucleofílicas, ou seja, moléculas ricas em elétrons como o DNA, RNA e proteínas. Como se sabe, o DNA apresenta duas fitas, onde cada uma é formada por nucleotídeos e, estes apresentam em sua estrutura um açúcar, um grupo fosfato e uma base nitrogenada. A Pt interage com o nitrogênio presente nas bases nitrogenadas, mais comumente a base guanina e a adenina. Na figura 7 é mostrado como ocorre essa interação (BERALDO, FONTES & CÉSAR, 2005; HORIBE *et al.*, 2015).

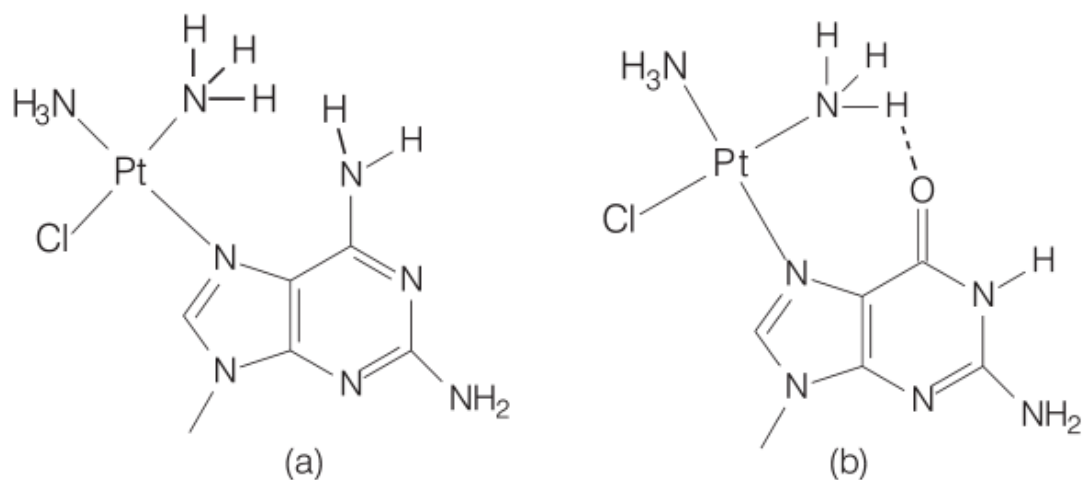


Figura 7: Interação do átomo de Pt presente na cisplatina e o átomo de nitrogênio presente nas bases nitrogenadas adenina (a) e guanina (b). A Platina interage em uma posição na base nitrogenada adenina e em duas posições na base nitrogenada guanina. Devido a essa interação da Pt com a guanina tem-se uma maior estabilidade e essa interação é consequentemente a maior responsável pelos efeitos citotóxicos da cisplatina. Fonte: Beraldo, Fontes & César, 2005.

Como pode ser visto a cisplatina interage em duas regiões quando se trata da base guanina, isto é, o átomo de Pt se coordena ao átomo de nitrogênio da guanina e o átomo de hidrogênio da amônia (NH₃) presente na cisplatina se liga ao oxigênio da guanina. Tal fato oferece maior estabilidade em relação a interação do composto com a guanina do que com a interação com a adenina. As principais interações da Pt com o DNA são conhecidas como monofuncionais, onde cada Pt se liga apenas uma vez na molécula de DNA e diz-se bifuncionais quando a Pt faz duas ligações com o DNA. Essas últimas se subdividem em intrafita, quando tais interações ocorrem na mesma fita de DNA e em interfita, em que as ligações ocorrem em cada fita de DNA (Figura 8) e, ainda, em intermolecular, quando as interações ocorrem em uma fita de DNA e em uma proteína ou aminoácido (BERALDO, FONTES & CÉSAR, 2005).

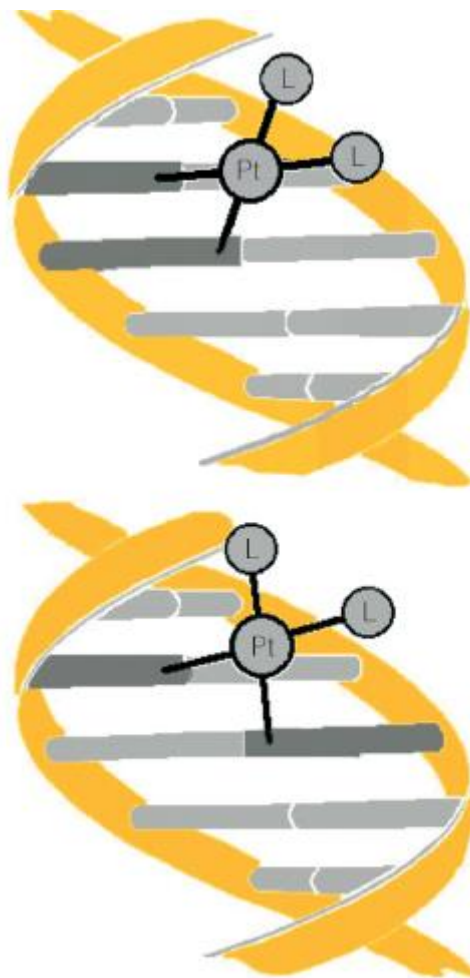


Figura 8: Esquematização das interações intrafitas (em cima) e interfitas (em baixo). Esquematização das interações intrafitas (em cima) e interfitas (em baixo). Nas interações intrafitas a Pt interage em um mesmo filamento do DNA e já na interfita, a interação ocorre em filamentos diferentes do DNA formando as ligações cruzadas, as quais são fornecem maior citotoxicidade as células. Fonte: Beraldo & Fontes & César, 2005.

Quando se trata do composto cisplatina a interação intrafita é a que é mais observada com guaninas adjacentes. Estudos relatam que tais interações são responsáveis pela atividade antineoplásica da cisplatina, isso porque ocasionam danos na molécula de DNA que são mais complexos de reparar. Essas ligações da Pt com o DNA interferem nos mecanismos de divisão celular, haja vista que os processos de duplicação e transcrição ficam comprometidos (BERALDO, FONTES & CÉSAR, 2005).

Apesar de sua ação terapêutica, a cisplatina apresenta algumas limitações, esse medicamento como a maioria dos quimioterápicos gera efeitos adversos para o organismo. Dentre esses efeitos, os mais comumente observados são náuseas, vômitos, queda da imunidade, danos aos rins, neurônios, perda auditiva e diminuição de leucócitos e plaquetas na medula óssea (FLOREA & BUSSELBERG, 2011).

Além disso, estudos apontam que em casos de câncer de pulmão avançado, o tratamento com a cisplatina é eficaz nos primeiros anos, porém, após cinco anos, o câncer reincide e as células cancerígenas se mostram resistentes ao medicamento. Dessa forma, quando as células adquirem resistência ao fármaco uma alternativa seria aumentar a dosagem do medicamento, no entanto, um grande aumento pode ocasionar uma elevada toxicidade para o organismo, tornando esta estratégia inviável (BERALDO, FONTES & CÉSAR, 2005; HUBER, ALMEIDA & FATIMA, 2008; HORIBE *et al.*, 2015).

A quimioresistência das células ocorre por mecanismos multifatoriais. Os principais mecanismos envolvidos na resistência e relatados na literatura são diminuição do acúmulo do fármaco, aumento do fluxo das drogas nas células, aumento dos mecanismos de reparo da molécula de DNA bem como o aumento da atividade da glutathione, a qual é um tripeptídeo com atividade antioxidante. Dentre tais mecanismos, estudos relatam que a diminuição do acúmulo de cisplatina parece ser a principal responsável pela resistência adquirida pelas células, porém, como tal mecanismo ocorre não é muito bem compreendido (HUBER, ALMEIDA & FATIMA, 2008; FLOREA & BUSSELBERG, 2011; GALLUZZI, *et al.*, 2012; HORIBE *et al.*, 2015).

Levando em consideração estas limitações, novos compostos de Pt foram estudados e outros ainda são investigados no propósito de encontrar outros complexos mais eficazes do que a cisplatina. O composto 1,1-ciclobutanodicarboxilatoplatina(II), conhecido popularmente como carboplatina foi aprovado para o comércio em 1987. Esse composto apresenta menos efeitos adversos que a cisplatina, contudo, apresenta efeitos terapêuticos reduzidos e também podem levar as células tumorais a adquirirem resistência (BERALDO, FONTES & CÉSAR, 2005)

Outro composto muito estudado é o *trans*-1,2-diaminocicloexanooxalatoplatina (II), denominado de oxaloplatina, que além de apresentar citotoxicidade, estudos mostraram que algumas linhagens celulares são sensíveis à este complexo (HORIBE *et al.*, 2015). Os três compostos de platina citados são aprovados para uso clínico e muitos outros ainda estão sendo testados para alcançar uma melhor eficácia na quimioterapia (Figura 9) (BERALDO, FONTES & CÉSAR, 2005)

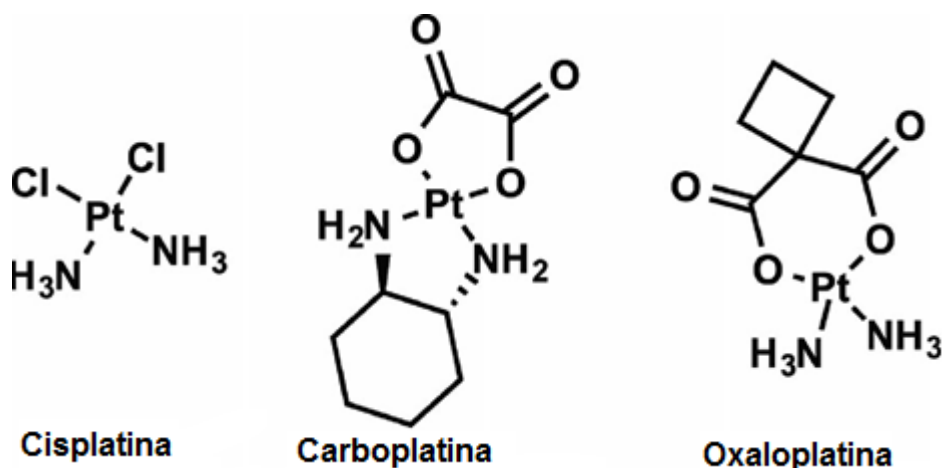


Figura 9: Estruturas químicas de agentes quimioterapêuticos à base de platina. A cisplatina foi um dos primeiros complexos de platina a serem investigados e utilizados como quimioterápicos. A fim de superar os limites oferecidos pela cisplatina novos compostos análogos foram sintetizados, como a oxaloplatina e carboplatina. Fonte: Weidmann, Komor & Barton, 2014.

Compostos como a nedaplatina (cis-diamina-glicolatoplatina (II)), heptaplatina (cis-malonato{(4R, 5R)-4,5-bis(aminometil)-2-isopropil-1,3-dioxolano} platina (II)) e lobaplatina (1,2 – diaminometilciclobutano-platina (II)) (Figura 10) apresentam atividade anticancerígena, cuja comercialização ocorre apenas no Japão, Coreia do Sul e China, respectivamente (figura 10) (GOLFETO, 2008; NEVES & VARGAS, 2011).

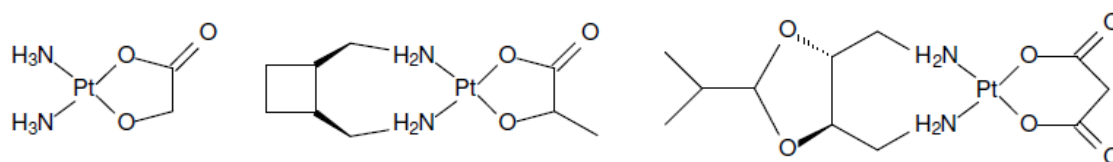


Figura 10: Estrutura dos compostos nedaplatina, lobaplatina e heptaplatina da esquerda para direita, respectivamente. A nedaplatina, lobaplatina e heptaplatina foram compostos à base de platina que foram sintetizados. Fonte: Adaptado de Golfeto, 2008.

Complexos que apresentam mais de um átomo de platina também vêm sendo investigados e têm mostrado bons resultados, haja vista que esses complexos apresentam mais de um centro metálico que irá interagir com a molécula de DNA de forma mais rápida e eficaz. Estudos relatam que tais compostos podem ser uma opção para os tumores resistentes à cisplatina. Um complexo trinuclear de Pt, denominado de BBR3464 (Figura 11) demonstrou atividade citotóxica em diversas linhagens de câncer, como o câncer de mama, pulmão, pâncreas e ovário. Observou-se que em casos de cânceres de ovário o

efeito de tal composto se mostrou 20 vezes mais ativo que a cisplatina (NEVES & VARGAS, 2011).

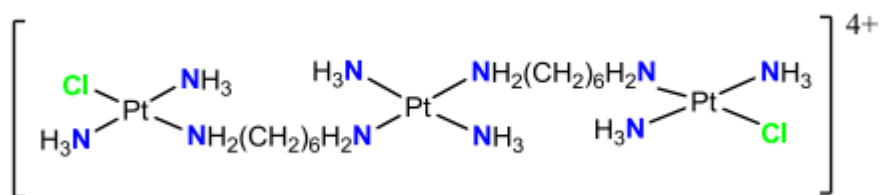


Figura 11: Estrutura do composto BBR3464. Fonte: Neves & Vargas, 2011.

Outros complexos metálicos baseados em ródio (Rh) também têm mostrado bons avanços como agentes antitumorais. Carboxilatos de ródio (II) (Figura 12), cuja fórmula molecular é $[(Rh)_2(O_2CR)_4]$ são capazes de interagir com as fitas de DNA, interferindo nos mecanismos de divisão celular. Uma das explicações referente a citotoxicidade desse composto pode ser devido à grande afinidade do ródio por átomos de enxofre (S), nitrogênio (N), oxigênio (O) e fósforo (P), sendo extremamente interessante haja vista que esses átomos estão presentes nas estruturas de proteínas e enzimas que participam da síntese e transcrição do DNA.

Estudos mostraram que a atividade antineoplásica desses compostos é mais evidente em carboxilatos de ródio (II) (Figura 12) com ligantes lipofílicos, que são estruturas químicas com grande afinidade por moléculas apolares, como por exemplo, os lipídios. Tais compostos apresentam baixa solubilidade em meios hidrofílicos, que apresentam afinidade por moléculas polares, como a água, sendo menos eficazes nesses meios (REIBSHECHER *et al.*, 1994).

Todavia, esses compostos ainda apresentam toxicidade, e assim, outros compostos ainda têm sido investigados no intuito de minimizar os efeitos tóxicos e, ao mesmo tempo, mantendo sua ação antitumoral. O citrato de ródio (II) (Figura 13) apresenta em sua estrutura química dois átomos de ródio ligados a moléculas de água e quatro grupos citrato, onde cada citrato corresponde a três carboxilas ($-COOH$), dessa forma, essa estrutura do complexo oferece alta solubilidade em meio hidrofílico e têm apresentado efeitos citotóxicos e ação antitumoral em células de câncer de mama tanto *in vitro* como *in vivo*. Porém, devido sua alta solubilidade em água, ele deve ser administrado em alta dosagem para conseguir ficar retido no organismo e assim atuar nas células tumorais

(CARNEIRO *et al.*, 2011; PEIXOTO, 2012; CARNEIRO *et al.*, 2013; PEIXOTO *et al.*, 2014; LEMOS *et al.*, 2015).

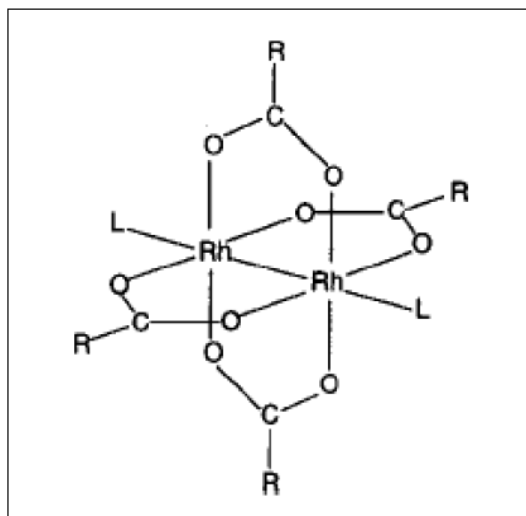


Figura 12: Estrutura química de carboxilatos de Ródio. Fonte: Carneiro *et al.* 2011.

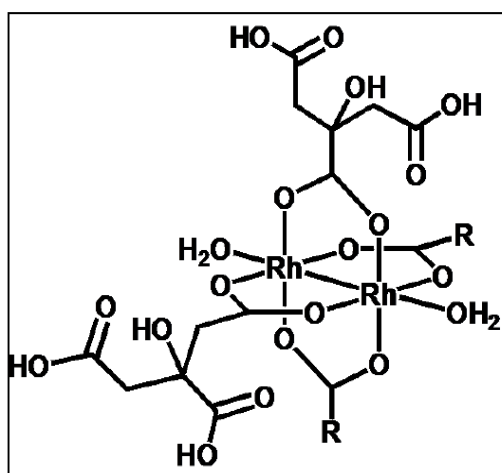


Figura 13: Estrutura química do citrato de ródio (II). Fonte: Carneiro *et al.* 2011.

1.2.2 Compostos de Rutênio

O estudo de compostos de rutênio (Ru) vem se tornando cada vez mais atrativo, isso porque além de apresentarem atividade anticancerígena, pesquisas apontam que estes compostos apresentam características promissoras em meio biológico, tais como baixa toxicidade, diversidade de moléculas que podem transportar a estrutura do composto, importante papel em reações de oxirredução (permitindo a existência dos mais importantes estados de oxidação em fluidos biológicos) e, sobretudo, mecanismos de ação sobre as células tumorais semelhante ao mecanismo de ação atribuído a cisplatina,

podendo superar os problemas de resistência encontrados nas drogas de platina (BERGAMO *et al.*, 2012)

Dessa forma, o rutênio pode apresentar diferentes estados de oxidação como Ru^{2+} , Ru^{3+} e Ru^{4+} em condições fisiológicas; proporcionando a construção de complexos com um maior número de coordenação e com certa facilidade na troca de ligantes (JAKUPEC *et al.*, 2008; RIBEIRO, 2008; GRAMINHA, 2010).

O Ru com estado de oxidação 3+ não apresenta toxicidade para as células e é considerado a forma inativa do metal, porém pode ser ativado em massas tumorais onde apresenta uma menor concentração de oxigênio, denominadas áreas em hipóxia. Esse baixo teor de oxigênio gera um ambiente de redução, sendo assim, o Ru^{3+} sofre reações de oxirredução, que são reações de transferência de elétrons, reduzindo a Ru^{2+} , que é a forma ativa. O Ru com estado de oxidação 2+ é extremamente reativo, e pode interagir de forma rápida com a molécula de DNA, ou seja, o Ru^{2+} apresenta-se tóxico para as células. Esse tipo de atuação do Ru no organismo é conhecido como ativação por redução, onde a droga irá circular no organismo de forma inerte e ao chegar no tumor, a droga será ativada por redução, resultando em uma entidade química que será agressiva para as células (HARTINGER *et al.*, 2006). Estudos mostram que o Ru se liga ao DNA de uma forma que suas fitas não se separam e os processos de duplicação e transcrição ficam comprometidos, tal fenômeno é denominado de ligação cruzada. Esse tipo de interação pode ter relação com a geometria octaédrica formada por compostos de rutênio (JAKUPEC *et al.*, 2008; BERGAMO & SAVA, 2011; BERGAMO *et al.*, 2012)

Uma das explicações para baixa toxicidade de compostos de Ru está relacionada com a capacidade desse metal mimetizar íons de ferro (Fe), se ligando a biomoléculas responsáveis por transportar o Fe, como a transferrina e a albumina e, dessa forma, íons de Ru são transportados pelas células (JAKUPEC *et al.*, 2008). Essa mimetização tem relação com a semelhança da configuração eletrônica do átomo de Ru e do Fe, haja vista que o Ru e o Fe são metais de transição que estão localizados no mesmo grupo da tabela periódica. Além disso, o fato do Ru apresentar facilmente diferentes estados de oxidação também colabora com sua baixa toxicidade, já que os estados de oxidação são responsáveis pelos efeitos tóxicos de cada íon (HAN ANG & DYSON, 2006; RIBEIRO, 2008; BERGAMO *et al.*, 2012).

Estudos relatam que alguns compostos de rutênio são capazes de interagir com a molécula de DNA tão fortemente quanto a cisplatina, podendo ainda ser melhor pois as

interações formadas com o DNA apresentam mais resistência quanto aos mecanismos de reparo realizados pelas células (BERGAMO & SAVA, 2011).

Existem complexos de Ru utilizados como carregadores de óxido nítrico (NO), tal molécula possui característica radicalar, ou seja, é capaz de reagir com outras moléculas e formar radicais reativos como o íon nitrosônio (NO^+) e o íon nitróxido (NO^-). Tais espécies reativas podem reagir facilmente com lipídeos, proteínas e DNA de forma nociva, sendo assim, uma fonte de citotoxicidade (MARANHO, 2008).

Devido à instabilidade de NO em meios biológicos, é interessante lançar mão de estruturas químicas que possam ser doadoras dessas moléculas, como os complexos de Ru. Um dos compostos de Ru estudados é o complexo nitrosilo de rutênio, de fórmula molecular $[\text{Ru}(\text{NH.NH})(\text{typ})\text{NO}]^{3+}$, denominado como Ru-tpy. Esse complexo se torna atraente justamente por controlar, de certa forma, a liberação de (NO) no meio fisiológico (Figura 14) (MARANHO, 2008).

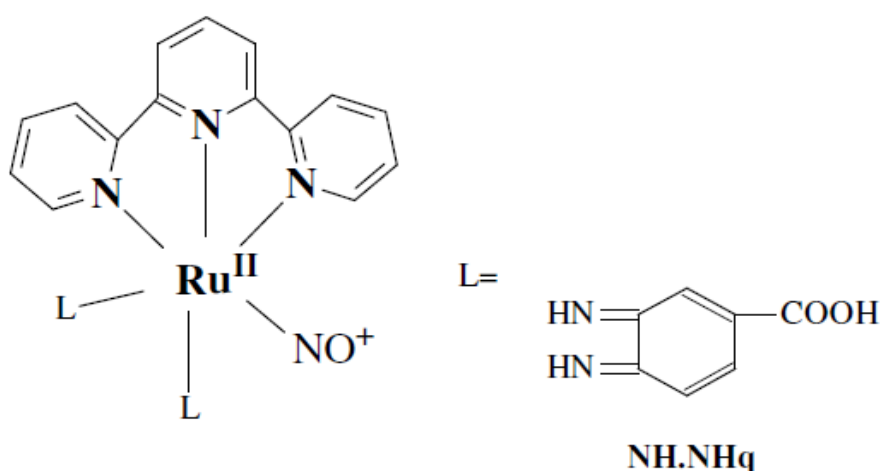


Figura 14: Estrutura do complexo nitrosilo de rutênio $[\text{Ru}(\text{NH.NH})(\text{typ})\text{NO}]^{3+}$. Fonte: Maranhão, 2008.

Em 1987, foi sintetizado o composto $[\text{ImH}] [\text{trans-RuCl}_4(\text{Im})_2]$, (Im=imidazol), denominado de ICR. Sua atividade antitumoral foi testada em animais e os resultados foram bastante promissores, o que levou à inspiração de outros compostos como o $[\text{IndH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{Ind})_2]$, (Ind=indazol) conhecido como KP1019. Este complexo se mostrou citotóxico em células cancerígenas de pulmão e rins e atualmente encontra-se em fase de triagem clínica (Figura 15). O KP1019 (GOLFETO, 2008; SANTOS, 2012).

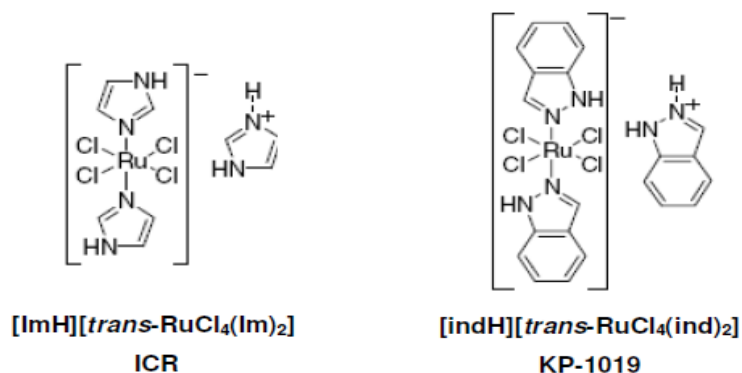


Figura 15: Estruturas do ICR e KP1019. Fonte: Golfeto, 2008.

Logo em seguida, o composto denominado como NAMI (New Anti-tumour Metastasis Inhibitor), de fórmula molecular $(\text{Na})[\text{trans-RuCl}_4(\text{Im})(\text{dmsO})]$ (Im=imidazol, dmsO= dimetilsulfóxido) (Figura 16) foi desenvolvido. No início dos anos 90, foi relatado que o composto NAMI possui características antimetastáticas (BRATSOS *et al.*, 2007). Este composto apresenta atividade antitumoral em cânceres de pulmão e carcinoma mamário. A ação quimioterápica ocorre de forma diferente ao da cisplatina (GOLFETO, 2008).

1.2.3 Atividade citotóxica do complexo NAMI-A

Entre os compostos de Ru, o que tem se mostrado mais promissor é o trans-imidazoldimetilsulfóxidotetraclororutenatoIII de imidazólio, conhecido como NAMI-A e este complexo será o foco desse estudo. Tal composto se originou do composto NAMI modificado, com a substituição do Na^+ por ImH^+ (Figura 16). Como já foi mencionado, NAMI significa *New Anti-tumour Metastasis Inhibitor* e o sufixo “A” informa a primeira espécie de uma diversidade de compostos de rutênio que apresentam propriedades antitumorais. Sua fórmula química é $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{Cl}_4\text{N}_4\text{ORuS}$ e sua massa molar é igual a 458,18 g/mol. Experimentos realizados com esse composto mostraram que ele tem a capacidade de impedir a formação de metástase bem como de inibir o crescimento de tumores já em fase metastática (GOLFETO, 2008; SANTOS, 2009).

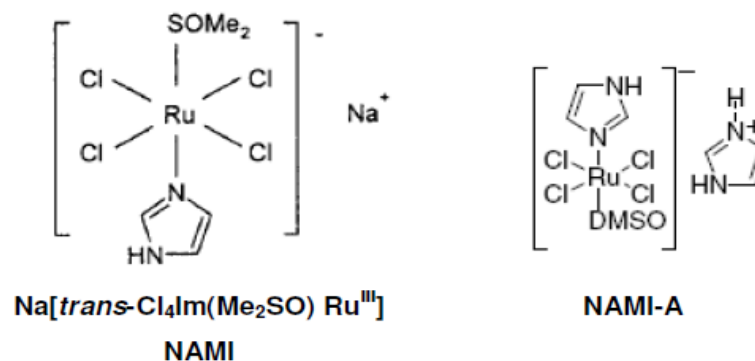


Figura 16: Estrutura do NAMI e NAMI-A. Fonte: Golfeto, 2008.

O complexo NAMI-A veio substituindo o complexo NAMI. A literatura descreve que o NAMI-A apresenta as mesmas propriedades antimetastáticas exibidas pelo NAMI, porém é bem mais estável e reprodutível, sendo mais adequado para o estudo dos seus mecanismos de atuação nas células tumorais (BRATSOS *et al.*, 2007). NAMI-A não é higroscópico, ou seja, não absorve umidade do ar, tendo boa solubilidade em água e é muito estável no estado sólido (PLUIM *et al.*, 2004).

Sabe-se que a formação de metástase é um dos grandes problemas encontrados no tratamento de tumores, pois quando o tumor é local a cura é muito mais provável. Porém, quando as células tumorais se espalham, a cura fica bem mais difícil de ser alcançada e o tratamento acaba sendo mais paliativo do que curativo. Dessa forma, interromper a metástase é um dos maiores alvo para a quimioterapia e, por isso, o NAMI-A torna-se muito interessante, haja vista que, atualmente, entre os compostos de rutênio o NAMI-A é um dos poucos com propriedades que inibem a formação de metástase (BERGAMO & SAVA, 2011).

Pesquisas apontaram grande eficácia do NAMI-A em metástases pulmonares, sendo capaz de inibir o crescimento e o desenvolvimentos de células metastáticas em todos os modelos experimentais de tumores sólidos testados *in vivo*. Porém, a sua atuação em tumores primários bem como os efeitos citotóxicos em células *in vitro* acaba sendo deixado de lado quando comparado com a cisplatina, por exemplo, a qual inibe fortemente o crescimento de tumores primários (MURA *et al.*, 2004; BRATSOS *et al.*, 2007). Por outro lado, o NAMI-A mostrou maior atividade em metástases originadas de tumores de pulmão de células humanas transplantadas em camundongos SDCI quando comparado com a cisplatina (BERGAMO *et al.*, 2012)

Investigações dos efeitos farmacológicos do NAMI-A comparados com a cisplatina *in vitro* com linhagens celulares de carcinoma de ovário (IGROV-1 e 2008) e carcinoma mamário (MCF-7 e T47D) ilustraram diferenças na ligação desses compostos com a molécula de DNA e proteínas celulares, indicando citotoxicidade diferentes entre estes dois compostos nas linhagens empregadas no estudo. A acumulação de NAMI-A nas células foi cerca de 2,5 a 10 vezes menor do que a cisplatina, variando de acordo com essas linhagens celulares utilizadas. Ainda, a ligação do NAMI-A com a molécula de DNA foi de 15 a 85 vezes menor que a cisplatina. Dessa forma, concluiu-se que o NAMI-A é muito menos tóxico que a cisplatina. O NAMI-A apresenta maior afinidade para outros componentes celulares como proteínas do que com a molécula de DNA (PLUIM *et al.*, 2004).

A glutathione (GSH) e Metalotioneínas (MTs) são proteínas de desintoxicação que o NAMI-A apresenta grande afinidade de ligação. A redução dessas proteínas em algumas linhagens tumorais pode estar relacionada com as propriedades quimioterápicas do NAMI-A (PLUIM *et al.*, 2004).

Adicionalmente, estudos relatam que o NAMI-A interfere na interação das células tumorais com a matriz extracelular, inibindo a degradação da matriz por enzimas denominadas de metaloproteinases da matriz (MMPs) e, dessa forma, impede a invasão e migração de células malignas para outros tecidos (JACUPEK *et al.*, 2008). Essas enzimas apresentam papéis fundamentais na formação de metástases por permitirem a entrada de células tumorais aos sistemas linfático e vascular. Esse ingresso das células tumorais é conseguido através da degradação da membrana basal e da matriz extracelular, levando a nutrição das células, bem como seu crescimento e disseminação para outros tecidos. Dentre as metaloproteinases, as enzimas denominadas de MMP-2 e MMP-9 apresentam grande expressão na massa tumoral, a qual é proporcional à sua atividade agressiva das células (SEMOLIN *et al.*, 2015). Outra característica sugerida do NAMI-A diz respeito a seus efeitos antiangiogênicos que, por sua vez, favorece sua atividade antimetástática, já que atua inibindo a formação de novos vasos sanguíneos que fornecem nutrição para as células tumorais. Dessa forma, em relação a esses compostos, seus efeitos contra o processo de metástase são muito relatados, ao passo que seus efeitos inibitórios sobre as células tumorais não são muito pronunciados, indicando uma citotoxicidade não muito significativa (JACUPEK *et al.*, 2008). Uma das características do NAMI-A é o fato deste composto não apresentar efeitos citotóxicos em várias linhagens de cultura de

células tumorais quando administrado em concentrações de até 100 μ M (BERGAMO *et al.*, 2012).

Estudos mostram que o NAMI-A induz a modificação na estrutura de tumores em estágios avançados de crescimento do tumor. TGF- β_1 (transformador de crescimento β_1) é uma proteína da matriz extracelular responsável por controlar a proliferação e a diferenciação celular. Porém, em células cancerosas, a TGF- β_1 atua inibindo o sistema imune, estimulando o processo de angiogênese e, assim, ocasionando um ambiente favorável para formação de metástases. Células cancerosas apresentam um aumento deste tipo de proteínas (KIMURA, MATSUO & RICARTE-FILHO, 2007). Relatos apontam que dependendo da dose de NAMI-A ele atua modulando a expressão de TGF- β_1 . Estudos indicam que a baixa expressão dessa proteína em células de adenocarcinoma TS/A pode estar relacionada com a inibição das metaloproteinases MMP-2 E MMP-9 (CASARSA, MISCHIS & SAVA, 2004)

Testes em modelos experimentais de tumores sólidos frente aos efeitos de NAMI-A mostraram resultados promissores. Células de carcinoma pulmonar, adenocarcinoma mamário TS/A, carcinoma mamário MCA e melanoma B16 apresentaram até 100% de redução de metástase (BERGAMO *et al.*, 2012).

Além disso, experimentos realizados com a combinação de mais de um quimioterápico também têm mostrado resultados promissores. A combinação de NAMI-A e cisplatina em experimentos *in vivo* com ratinhos CBA com carcinoma MCA mostraram que essa combinação tem grande eficácia ao provocar a inibição de metástases e o crescimento do tumor primário quando comparado com os tratamentos de ambos os fármacos isoladamente (HAN ANG & DYSON, 2006).

Há indícios de que a molécula de DNA não é o principal alvo do NAMI-A. Muitos estudos descrevem uma forte ligação do NAMI-A à proteínas do soro como a albumina e transferrina e, dessa forma, o complexo pode agir de forma seletiva nas células cancerígenas sendo transportado por essas proteínas (HAN ANG & DYSON, 2006). Essa atividade antimetastática do NAMI-A pode estar relacionada com a presença de um dos ligantes na esfera de coordenação do rutênio, o ligante DMSO (BRATSOS *et al.*, 2007)

Alguns artigos propõem que o NAMI-A atua também no bloqueio do ciclo celular no ponto de transição G2/M, provavelmente ocorrendo devido ao acúmulo de proteínas Cdk1 inativas, a qual é responsável por informar danos na molécula de DNA (HAN ANG & DYSON, 2006; BERGAMO *et al.*, 2012).

Além de atuar inibindo proteínas Cdks, outros estudos relatam que o NAMI-A também provoca inibição de proteínas topoisomerasas, enzimas importantes nos processos de replicação e empacotamento do DNA (QIAN *et al.*, 2013).

Diante de todo este potencial, o NAMI-A está em fase clínica de investigação. Sabe-se que antes dos medicamentos serem introduzidos no mercado eles passam por um intenso estudo que é dividido em fase não clínica e em fase clínica. Na fase não clínica, os cientistas pesquisam os medicamentos através de experimentos em laboratórios e em animais, tendo como objetivo avaliar o efeito do medicamento no organismo. O medicamento após ser aprovado na fase não clínica, inicia uma nova fase, fase clínica. Esta fase possui quatro etapas e se caracteriza por realizar experimentos do medicamento em seres humanos. A fase I, por exemplo, o medicamento é testado em um pequeno número de pessoas e a medida que vai sendo aprovado nas etapas, os medicamentos vão sendo testados em um grupo maior de pessoas. Após serem concluídas as quatro etapas, o medicamento torna-se disponível para o uso.

O NAMI-A foi o primeiro composto de rutênio a entrar na primeira fase clínica de estudos no Instituto de Câncer de Amsterdã na Holanda, em 1999. Nesta primeira fase o composto foi testado em 24 pacientes em uma variedade de tumores, mostrando boa tolerância em uma ampla faixa de doses utilizadas (BRATSOS *et al.*, 2007). Estes fatos nos motivaram a estudar os efeitos citotóxicos destes compostos em linhagens celulares utilizadas pelo nosso grupo com o objetivo futuro de agregar um sistema nanoestruturado (micelas lipídicas, por exemplo) para favorecer sua atuação específica em células tumorais.

1.2.4 Mecanismos de atuação de quimioterápicos: abordagem ao ciclo celular

As células são originadas a partir de células preexistentes através do processo de divisão celular. O ciclo celular é de extrema importância para o desenvolvimento normal e para reposição de células no organismo. Dessa forma, o ciclo celular pode ser dividido em duas etapas: 1) a intérfase, que é o período entre duas divisões consecutivas e onde há um preparo para o crescimento da célula para uma nova divisão e 2) o período de divisão celular, que pode ocorrer através da mitose ou meiose. Enquanto a meiose é uma divisão com função de reduzir à metade o número de cromossomos formando os gametas que

irão se recombinar, permitindo a variabilidade genética; a mitose está relacionada com a necessidade de reposição ou renovação de células nos tecidos, dando origem às células filhas idênticas à célula mãe (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

Na intérfase, embora a célula não esteja se dividindo, ocorre o período de maior atividade metabólica e compreende três períodos: G1, S e G2. Células em fase G0 se encontram em repouso, não exercendo divisão celular, ao receber sinais externos as células avançam da fase G0 para fase G1. O período G1 se caracteriza pela síntese de proteínas e RNA (ácido ribonucleico), dessa forma, as células estão se preparando para a duplicação do DNA. Para o prosseguimento da célula no ciclo celular, as células são reguladas por alguns pontos de restrição conhecidos como pontos de checagem (“check points”) que ocorrem durante a transição das fases G1/S, em que são identificadas lesões como mutação no material genético, afim de verificar se a célula está pronta para progredir na divisão celular. Caso tenha tido algum erro, a divisão é interrompida, iniciando assim o processo de morte celular por apoptose (WARD, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

Na fase S ocorre de fato a síntese de DNA para que cada uma das células-filhas fique com a mesma quantidade de material genético da célula parental. Na fase G2 a célula continua a crescer e sintetizar proteínas, nessa etapa ocorre uma nova checagem para averiguar se as células estão definitivamente aptas para o processo de divisão. Desse modo, nessa fase, existem proteínas quinases e fosfatases que são responsáveis por ativar ou desativar proteínas chaves que controlam o funcionamento do ciclo celular. As quinases são inativas quando formadas e necessitam de um outro grupo de proteínas para ativá-las, tais proteínas são as ciclinas, essas receberam essa denominação por apresentarem variação periódica da sua concentração no ciclo celular. Dessa forma, as ciclinas se ligam as quinases e formam complexos denominados de quinases dependentes de ciclina ou Cdks (cyclin dependente kinases), quinases dependentes de ciclina. Esses complexos são considerados reguladores gerais do ponto de transição G2/M, sendo de extrema importância para o prosseguimento controlado das divisões celulares (WARD, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

Estudos relatam que em células animais existem em torno de 10 ciclinas caracterizadas, sendo denominadas por A, B, C, D, E de tal modo em diante. E já as Cdks existem em torno de 8, classificadas em Cdk1 até Cdk8. Essas proteínas exercem suas funções em pontos determinados no ciclo celular, promovendo respostas a estímulos que indicam que o DNA teve algum dano e assim transmitem informações para outras

moléculas que irão bloquear a progressão no ciclo celular, garantindo um controle de qualidade da replicação do DNA e conseqüentemente da divisão celular (WARD, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

Portanto, como o câncer é caracterizado pela proliferação celular descontrolada, as ciclinas e Cdks não atuam de forma regulada, indicando que os pontos de checagem já não funcionam adequadamente, em outras palavras ocorre perda dos mecanismos controladores do ciclo celular normal (WARD, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

Após a duplicação do material genético ocorrido na intérfase, a célula está pronta para se dividir, repartindo de forma igual o seu conteúdo. Essa fase denominada de M, onde ocorre a mitose é subdividida em quatro etapas: prófase, metáfase, anáfase e telófase. Em resumo, na prófase ocorre a condensação dos cromossomos, a membrana nuclear é dividida, acontece a desintegração do nucléolo e formação do fuso mitótico, que são microtúbulos proteicos. Na metáfase, os cromossomos permanecem alinhados na região equatorial da célula e se ligam ao fuso mitótico. Na anáfase acontece o encurtamento do fuso mitótico e os cromossomos migram para os polos. Por fim, na telófase ocorre a descondensação dos cromossomos, surgimento do nucléolo e inicia-se a divisão do citoplasma, iniciando assim a citocinese e dessa forma tem-se células idênticas a célula-mãe como pode ser visto na figura 17 (WARD, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

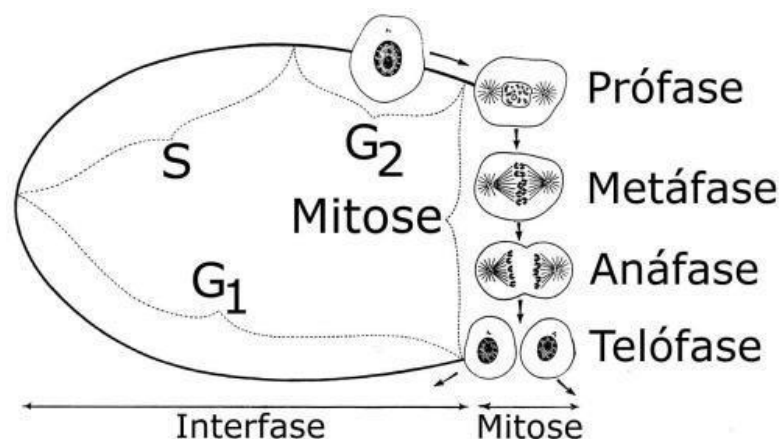


Figura 17: Esquema do ciclo celular. A intérfase consiste no preparo para uma nova divisão celular, onde ocorre o crescimento da célula e a duplicação do material genético, é formada pelas fases G₁, S e G₂, sendo o período mais longo do ciclo celular. A mitose é a etapa onde ocorre a divisão celular de fato, acontece a divisão do núcleo e do citoplasma. Fonte: JUNQUEIRA, L. C. CARNEIRO, J. **Biologia celular de molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2005.

No intuito de promover a manutenção do equilíbrio celular, sabe-se que é muito importante a eliminação de células para o próprio desenvolvimento celular, renovação das células, regressão de tumores dentre outros. Dessa forma, a morte celular pode ocorrer por três mecanismos necrose, autofagia e apoptose (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007).

A necrose está relacionada com a morte celular desordenada, também conhecida como morte acidental, sendo provocada por uma agressão intensa às células, podendo ser ocasionada por agentes físicos, agentes infecciosos, agentes químicos, fenômenos imunológicos, agentes biológicos e outros. Tais fenômenos levam a perda da integridade da membrana plasmática, desorganização do citoplasma, aumento do volume das células, por conseguinte ruptura celular e liberação do conteúdo extracelular que espalha pelas células vizinhas e ocasiona uma resposta inflamatória, ampliando a lesão no tecido (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007).

A autofagia é um processo de morte celular programada. Esse mecanismo se caracteriza como sendo uma autodestruição da célula, ou em outras palavras “suicídio celular”. Nesse processo determinadas organelas realizam a digestão dos elementos da própria células, caracterizando assim uma autodigestão dos próprios componentes celulares. A autofagia ocorre quando a célula passa por um estresse metabólico, levando a degradação e reciclagem de componentes celulares. Outros fatores também desencadeiam esse processo, sendo até mais frequente para a reciclagem de componentes citoplasmáticos e organelas alteradas, envelhecidas e que já não são mais utilizadas pela célula (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007; BERTOLLO,2010).

A morte celular por apoptose é um mecanismo também programado, rápido e extremamente controlado por expressão gênica. Em contrapartida com a necrose, a apoptose ocorre individualmente não levando a morte de outras células, haja vista que ocorre encolhimento da célula, perda da aderência com células vizinhas e matriz extracelular, condensação e fragmentação do núcleo sem ocorrer ruptura da membrana plasmática. Dessa forma, ocorre a formação de vesículas apoptóticas que são reconhecidas e fagocitadas por macrófagos, evitando assim respostas a um processo inflamatório no tecido sendo, portanto, considerada uma morte celular “silenciosa” (ANAZETTI & MELO,2007; GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007).

Dessa forma, o processo apoptótico é extremamente regulado e sua atuação requer a interação de muitos fatores. Vários são os genes que trabalham em conjunto para promover a morte celular programada. Bcl-2 é uma família de proteínas que atuam na indução e repressão do processo de apoptose. Sendo assim, Bcl-2 e Bcl-XL são proteínas consideradas reguladores antiapoptóticos, já que inibem a apoptose. Já as proteínas Bax, Bid e Bak são consideradas pró-apoptóticas por induzirem a apoptose. O equilíbrio dos eventos de sobrevivência e morte celular no organismo é mantido com o controle da expressão de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Entre as proteínas que compõem essa família de proteínas, as mais conhecidas são as Bcl-2 e Bax (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007)

Como já foi mencionado, o ciclo celular apresenta pontos de checagem para dar continuidade na divisão celular. A proteína p53 participa justamente da regulação desse ponto sendo de extrema relevância, haja vista que permite os mecanismos de reparo à possíveis danos a molécula de DNA, bem como a morte por apoptose de células danificadas. Quando se tem algum dano na molécula de DNA a proteína p53 é ativada e o ciclo celular é interrompido. Após concretizados os reparos do DNA, uma proteína denominada de mdm-2 que age inibindo a atuação da proteína p53, se associa a ela e o ciclo celular avança para a próxima fase. Mutações na proteína p53 acarretam em uma desregulação no ponto de checagem e, assim, a célula prossegue no ciclo celular sem ter reparo ou entrar no processo apoptótico (ANAZETTI & MELO, 2007; GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007).

Portanto, são diversos os genes que atuam na regulação da morte celular. Genes que codificam as proteínas p53 e Bcl-2 por exemplo são responsáveis pela normalidade da morte celular por apoptose e os seus níveis nas células são regulados de acordo com a necessidade da atuação dos mesmos. As células mutadas que sofreram alterações nos genes dessas proteínas se esquivam do processo apoptótico, vão acumulando mais mutações e se proliferando sem controle, ocasionando assim a formação de tumores (ANAZETTI & MELO, 2007; GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007).

Muitos fármacos utilizados na quimioterapia atuam no ciclo celular, eles exercem suas funções em pontos específicos do ciclo e, assim, interrompem a proliferação celular, esses fármacos são denominados de fármacos ciclo-celular específicos (CCS). Outros quimioterápicos são empregados para atuarem em células independentes de estarem ou

não em divisão celular, tais medicamentos são denominados de fármacos ciclo-celular não específicos (CCNS) (ALMEIDA *et al.*, 2005)

Alguns dos fármacos CCS que apresentam uso clínico no tratamento de câncer são Mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-tioguanina;TG), Metotrexato (MXT); Fluorouracil (5-Fluorouracil; 5-FU), Metotrexato (MXT), Citarabina (citosina arabinosídeo, ara-C), 5-azacitidina. Esses medicamentos são considerados agentes antimetabólicos por bloquearem a biossíntese de compostos necessários para o DNA e RNA e atuam na fase S do ciclo celular (Figura 18) (ALMEIDA *et al.*, 2005).

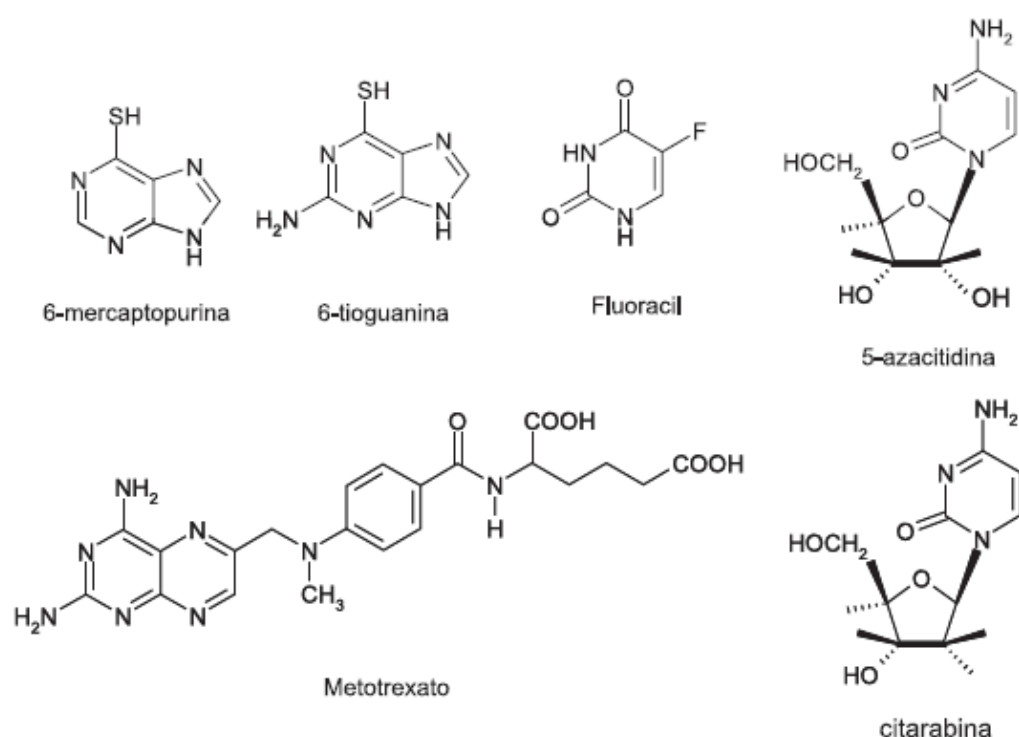


Figura 18: Estrutura molecular de alguns exemplos de agentes antineoplásicos. Esses fármacos são denominados de CCS por atuarem no ciclo celular, impedindo a duplicação de DNA. Fonte: ALMEIDA *et al.*, 2005.

Medicamentos como a vimblastina, vincristina e o taxol, conhecido comercialmente como paclitaxel, são utilizados no tratamento de carcinoma mamário e atuam na inibição do fuso mitótico. Essa inibição ocasiona a interrupção do ciclo celular no período M da fase metáfase. Os fármacos etoposida (VP-16) e teniposida (VM-26) são também utilizados para o tratamento de carcinoma mamário e agem bloqueando as células nas fases S e G₂ e na inibição da enzima topoisomerase II, enzima responsável pela reparação de possíveis danos ao DNA (ALMEIDA *et al.*, 2005)

Os fármacos CCNS mais pesquisados e utilizados são quimioterápicos que agem como eletrófilos, ou seja, estruturas químicas que apresentam afinidade por elétrons, e desse modo, por moléculas nucleofílicas, especialmente o DNA. Esses medicamentos formam ligações cruzadas com a molécula de DNA. Tais ligações são responsáveis por ocasionar danos ao material genético e, portanto, o comprometimento da duplicação do DNA e a citotoxicidade da célula. Vale ressaltar que as ligações cruzadas do tipo intrafita são mais difíceis de reparar e conseqüentemente mais citotóxicas (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Os medicamentos mecloretamina (mustargen®), clorambucil (leukeran®), ciclofosfamida (cytoxan®), a isofosfamida® e o melfalam^{7,9} (alkeran®) são agentes alquilantes, ou seja, compostos que substituem um átomo de hidrogênio por um grupo alquil (radical orgânico). Tais medicamentos interagem com a molécula de DNA, podem formar ligações interfitas e o principal sitio de interação com o DNA é o nitrogênio na posição 7 (N7) da guanina. Dessa forma, esses agentes agem impedindo a separação dos filamentos de DNA e, assim, prejudicando a replicação do material genético (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Carmustina (BCNU), Lomustina (CCNU) e Semustina (metil-CCNU) também são agentes alquilantes capazes de formar adutos com a molécula de DNA e RNA. Ressaltando que adutos são produtos advindos da interação de duas ou mais moléculas diferentes, tendo como resultado um novo produto. Esses compostos também são responsáveis por inibir as reparações realizadas no material genético. As interações desses compostos que fornecem seus efeitos citotóxicos ocorrem entre N1 do nucleosídeo deoxiguanosina e N3 deoxitocitosina, formando uma interação cruzada interfita (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Alguns compostos de Platina como a cisplatina (cis-DDP, comercialmente Platinil®, ou Platinol®) apresenta grande efetividade em cânceres testicular, ovariano e vesical. Esse quimioterápico interage com DNA através da interação com bases nitrogenadas, sendo que o principal sitio de interação com DNA é na posição N7 de uma guanosina (nucleosídeo que apresenta uma guanina ligada a uma ribose). Esse composto é capaz de fazer interações no mesmo filamento de DNA, em cada filamento de DNA ou ainda entre um filamento de DNA e uma proteína. As interações em cada filamento, ligações cruzadas são as mais responsáveis pela sua citotoxicidade (BERALDO, FONTES & CÉSAR, 2005; HORIBE *et al.*, 2015).

A carboplatina (CBDCA, Paraplatin®) também é um composto de platina utilizado em diversos casos de cânceres. Sua atuação é bem parecida com o fármaco

cisplatina. Apesar de seus efeitos colaterais serem menores que os da cisplatina, apresenta menos eficácia como quimioterápico (BERALDO, FONTES & CÉSAR, 2005; HORIBE *et al.*, 2015).

Tendo isso em visto, percebe-se a existência de uma ampla utilização de quimioterápicos no tratamento de diversos tumores, os quais realizam interações com DNA e promove a interrupção da proliferação celular. Como esses fármacos apresentam determinadas limitações faz-se necessário o estudo de novos fármacos capazes de superar tais limitações e oferecer uma melhor qualidade e expectativa de vida para a população portadora da doença.

2 JUSTIFICATIVA

O carcinoma mamário ainda é um tipo de câncer de alta incidência e mortalidade. Dessa forma, levando-se também em consideração as limitações enfrentadas pelos tratamentos desta doença, se faz necessário a busca de alternativas mais eficazes que possam oferecer uma melhor qualidade e expectativa de vida e maior taxa de sobrevivência aos indivíduos portadores da doença. O composto NAMI-A vem sendo investigado e tem se mostrado bastante promissor, haja vista que apresenta um potencial antimetastático. No entanto, ainda não há estudos sobre sua ação em células de carcinoma mamário da linhagem 4T1, que é uma linhagem com potencial metastático e, portanto, agressiva. Assim, neste estudo a intenção foi corroborar o efeito citotóxico de NAMI-A, já elucidado em outras linhagens, colaborando favoravelmente para o uso seguro na clínica. Além disso, a partir deste estudo, nosso grupo poderá refletir sobre a proposição de novas formulações baseadas em NAMI-A e nanopartículas lipídicas para melhorar seu efeito antitumoral e reduzir sua toxicidade sistêmica. Ainda, o entendimento sobre a atuação deste complexo nestas linhagens, bem como o da sua toxicidade e eficiência é de extrema importância para o avanço da aplicação desse agente terapêutico no tratamento do câncer.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Investigar a atividade citotóxica do NAMI-A em cultura de células de carcinoma mamário das linhagens 4T1 e de fibroblastos da linhagem NIH-3T3, ambas de origem murina.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar a formulação *trans*-imidazoldimetilsulfóxidotetraclororutenato (III) de imidazólio (NAMI-A).
- Caracterizar NAMI-A por meio de ressonância magnética nuclear (RMN) e infravermelho (IV).
- Avaliar a citotoxicidade de NAMI-A em células de carcinoma mamário da linhagem 4T1 e fibroblastos da linhagem NIH-3T3 por meio do método colorimétrico do MTT.
- Avaliar os efeitos citotóxicos de NAMI-A sob a morfologia das células 4T1 por meio de análise em microscópio óptico.
- Avaliar o efeito de NAMI-A na progressão do ciclo celular e na fragmentação de DNA por meio de análise em citômetro de fluxo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Síntese do complexo precursor de rutênio [$\text{trans-RuCl}_4(\text{Me}_2\text{SO})_2$][$(\text{Me}_2\text{SO})_2\text{H}$]

Em um balão de fundo redondo com capacidade de 50 mL foram dissolvidos 200 mg de cloreto de rutênio III hidratado ($\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich) em 6 mL de etanol (Nuclear), o que levou à formação de uma solução escura com uma coloração marrom alaranjada (Figura 19 A). Em seguida esta solução foi submetida a um aquecimento em banho de silicone e foi submetida sob refluxo e agitação durante três horas e após este período obteve-se uma solução verde escura (Figura 19 B). Após o tempo decorrido, a solução foi filtrada em papel filtro para remover todos os vestígios possíveis de sólido não dissolvido, utilizando-se para isso um funil e um balão volumétrico. Logo após, a solução foi colocada em um rotaevaporador até atingir aproximadamente 1/3 do volume inicial, tornando, assim, a solução mais concentrada.

No balão volumétrico contendo esta solução foi acrescentada uma gota de ácido clorídrico (HCl) sob 37% em 0,4 mL de DMSO (dimetil sulfóxido, Nuclear). Esta mistura foi colocada novamente em banho de silicone, ou seja, foi submetida ao aquecimento com refluxo, mantendo-se uma temperatura de 80° C durante cerca de 15 minutos. Após estes procedimentos, verificou-se uma solução de cor alaranjada (Figura 19 C).

A mistura foi levemente resfriada até atingir a temperatura ambiente e logo depois foi adicionado 4 mL de acetona a 99,5% (CH_3COCH_3) (Nuclear). A mistura foi colocada no congelador por duas horas, onde ocorreu a cristalização do produto. Ao ser retirada do congelador, foi possível observar a formação de cristais na solução, os quais foram filtrados à vácuo e, logo após, estes foram retirados do papel filtro, lavados com 10 mL de acetona e colocados em um almofariz de ágata. Os cristais formados apresentaram coloração vermelho-laranja e foram macerados e armazenados. (Figura 19 D). Ao final, foram obtidos 180 mg do produto $[\text{DMSOH}][\text{Ru}(\text{DMSO})_2\text{Cl}_4]$.

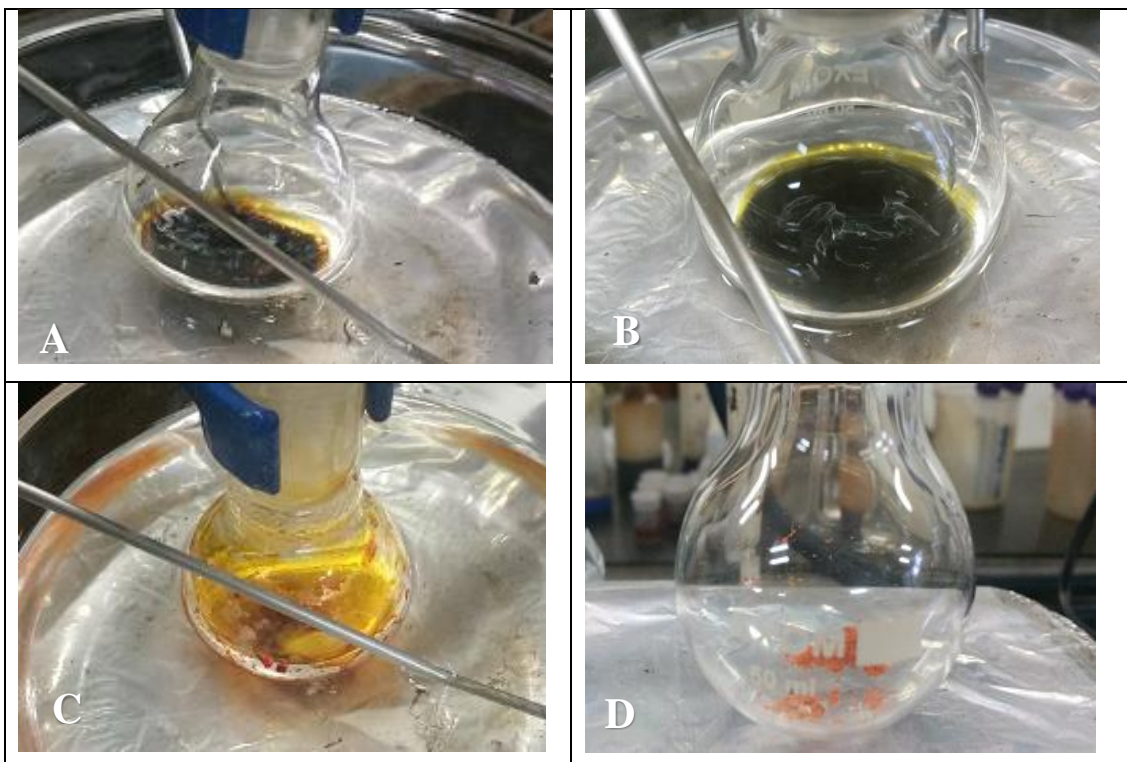


Figura 19: Etapas de preparação das soluções do precursor do NAMI-A [$\text{trans-RuCl}_4(\text{Me}_2\text{SO})_2$] [$(\text{Me}_2\text{SO})_2\text{H}$].

4.2 Síntese do complexo trans -imidazoldimetilsulfóxidotetraclororutenatoIII de imidazólio [$\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})$] [ImH], conhecido como NAMI-A

Em um béquer pesou-se 180 mg do precursor preparado, descrito no item 4.1 e este foi suspenso em 5 mL de acetona à temperatura ambiente. Logo após foi adicionado 88,2 mg de imidazol (Sigma-Aldrich), formando uma mistura alaranjada (Figura 20 A). Essa mistura foi mantida sob agitação no agitador magnético durante 4 horas. Tal agitação foi realizada para que ocorresse a troca de ligantes, ou seja, os ligantes de imidazol. Durante este tempo, a cor do precipitado gradualmente mudou de laranja para um tom alaranjado mais escuro, semelhante a cor vermelho tijolo (Figura 20 B). Em seguida, a mistura foi filtrada à vácuo, recolhida num filtro e lavada com 2 mL acetona e depois com 2 mL de éter etílico. O produto foi seco à temperatura ambiente durante cerca de uma hora. Foram obtidos 127,2 mg de produto final com um rendimento de 86,6%.

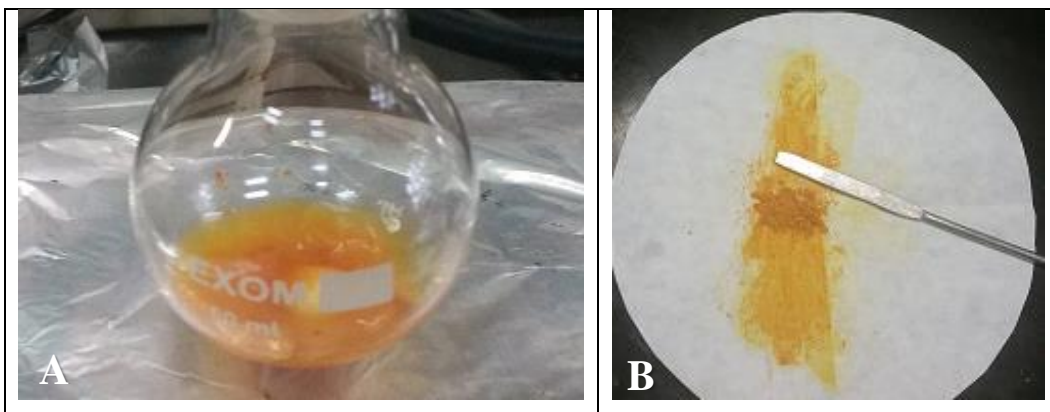


Figura 20: Etapas da síntese do complexo trans-imidazoldimetilsulfóxidotetraclororutenatoIII de imidazólio [trans-RuCl₄ (DMSO) (Im)] [ImH] a partir do seu precursor [trans-RuCl₄ (Me₂SO)₂] [(Me₂SO)₂H]

4.3 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

A técnica de espectroscopia no infravermelho está relacionada com a interação de átomos e moléculas com a radiação eletromagnética na região do infravermelho. Dessa forma, para identificar uma amostra, o método se baseia no fato que as ligações químicas apresentam vibrações específicas, as quais equivalem a determinados níveis de energia da molécula. Sendo assim, quando a molécula recebe radiação equivalente a um desses níveis de energia, a luz é absorvida. A frequência dessas vibrações depende de alguns fatores, como a massa das moléculas e a força da ligação. Assim, átomos mais leves e unidos com ligações mais rígidas vibram com maior frequência que átomos mais pesados e com ligações mais fracas (SOLOMONS & FRYHLE, 2001).

Como cada frequência de absorção num espectro no infravermelho corresponde a uma frequência de vibração de uma parte da molécula da amostra, quando a radiação infravermelha passa por esta molécula, parte dessa radiação é absorvida e parte é transmitida. Desse modo, o espectro é construído através da determinação da quantidade de energia incidente que é absorvida em cada frequência. A representação gráfica disso apresenta no eixo horizontal energia que pode ser dada em números de onda (cm⁻¹) e o eixo vertical corresponde a transmitância em porcentagem, que é a quantidade que foi transmitida, ou seja, não absorvida pela amostra (SOLOMONS & FRYHLE, 2001).

Os espectros vibracionais na região do infravermelho (4000 a 400 cm⁻¹) foram registrados em espectrômetro Perkin-Elmer modelo 400. A amostra foi macerada e

misturada com brometo de potássio (KBr) em almofariz de ágata e depois introduzidas em pastilhas para realização da leitura.

4.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Essa técnica também é conhecida como espectroscopia por RMN e se baseia na absorção de radiação eletromagnética de frequência específica por um núcleo na presença de um campo magnético para identificar moléculas. Assim como os elétrons, alguns núcleos apresentam spin, que é o momento angular, em outras palavras, o movimento de rotação da partícula em torno de um eixo, apresentando assim propriedades magnéticas. Dessa forma, quando um composto é submetido a um forte campo magnético e, ao mesmo tempo, se irradia com energia eletromagnética, os núcleos podem absorver a energia a qual é quantizada e gera um espectro característico para o composto (SOLOMONS & FRYHLE, 2001).

Dessa forma, alguns núcleos também possuem estados de spin $+1/2$ e $-1/2$, sendo essa propriedade que permite que eles sejam estudados por RMN. Exemplos desses núcleos são ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F e ^{31}P . Os núcleos de átomos de hidrogênio foram um dos primeiros a serem estudados por RMN, sendo assim, $^1\text{HRMN}$ significa ressonância magnética nuclear de hidrogênio e é o mais comumente utilizado por RMN (BROWN *et al.*, 2005).

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Varian Gemini 2000BB e espectrômetro Bruker, Avance III 500. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como padrão de referência interna o tetrametilsilano (TMS) ($\delta = 0,0$ ppm). O composto NAMI-A foi diluído em água para a realização do procedimento de RMN.

4.5 Cultura de células

Foram utilizados dois tipos de linhagens celulares, células tumorais de carcinoma mamário (4T1), e células não tumorais de fibroblasto (NIH-3T3), ambas fornecidas pelo departamento de Biologia celular no laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília. As duas linhagens celulares são de origem murina. Antes de iniciar os experimentos, essas linhagens celulares eram estocadas em nitrogênio líquido e, quando necessário, eram descongeladas e transferidas para frascos de 25 cm^2 (TPP,

EUA), sendo mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma, St. Louis, MO), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma). As linhagens celulares foram mantidas em incubadora umidificada sob 5% de CO₂ a 37°C.

Após as células atingirem uma quantidade ideal de confluência para os experimentos (cerca de 1.000.000), elas eram removidas dos frascos e semeadas em placas de cultura. Inicialmente, o meio DMEM era descartado e as células lavadas com uma solução tampão de fosfato-salina (PBS). Logo após, as células eram incubadas com solução de tripsina-EDTA (Gibco, USA) por 4 minutos a 37° C. A seguir, adicionava-se às células meio DMEM para neutralizar a ação da tripsina e esta solução era centrifugada por 3 minutos a 300 g. Uma alíquota desta era usada para contagem de células em câmara de Neubauer utilizando-se o método de exclusão por azul de Tripán (Sigma) para distinção de células viáveis e não viáveis.

4.6 Tratamento das células

As soluções estoques dos fármacos NAMI-A e cisplatina foram armazenadas em tubos eppendorf de 1,5 mL. Utilizou-se a solução estoque de NAMI-A na concentração de 0,1 M, sendo que o DMSO (Sigma) foi empregado como solvente. Inicialmente realizou-se cálculos do soluto para definir a massa necessária de NAMI-A a ser dissolvida. Assim, pesou-se 2,3 mg de NAMI-A em balança digital (marco AY220) e esta massa foi dissolvida em 50 µL de DMSO. Assim, a solução foi agitada, armazenada em tubo falcon em temperatura ambiente e rotulada adequadamente. Esta solução estoque foi repetida conforme a necessidade do uso deste fármaco nos experimentos.

A partir da solução estoque foram realizadas diluições seriadas para obtenção das concentrações selecionadas para o tratamento das células em um primeiro experimento (2,5, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µM) e em um segundo experimento (250, 500, 1000, 2000 e 4000 µM). A solução estoque de cisplatina utilizada foi de 0,001 M a partir de uma ampola de 10 mL que foi doada pelo Hospital Universitário de Brasília (HUB). Esta ampola estava em uma concentração de 1g/L (Accord). Foi utilizado 4,54 mL do volume que constava na ampola e este foi misturado em água destilada para uma solução final contendo 15 mL. A solução foi homogeneizada, armazenada em falcon, rotulada e armazenada na geladeira. A partir dessa solução estoque foram realizadas diluições

seriadas para obtenção das concentrações escolhidas para o tratamento das células (2,5, 12,5, 25, 50, 100 e 200 μM).

Nos ensaios para avaliação de citotoxicidade foram semeadas inicialmente 1×10^3 células em placas de poliestireno (TPP) de 96 poços. As células foram mantidas sob condições de cultura celular conforme item 4.5 e, transcorridas 24 horas, as células foram tratadas com NAMI-A [trans-RuCl₄ (DMSO) (1m)] [ImH] e cisplatina. Em uma primeira etapa as células foram incubadas com 2,5; 12,5; 25; 50; 100 e 200 μM por 24, 48 e 72 horas.

Posteriormente, em outros experimentos posteriores que consideramos a segunda etapa dos ensaios, as células foram mantidas sob as mesmas condições de cultura celular conforme item 4.5 e, transcorridas 24 horas, as células foram tratadas com NAMI-A [trans-RuCl₄ (DMSO) (1m)] [ImH] nas concentrações de 250; 500; 1000; 2000 e 4000 μM por 24, 48 e 72 horas a fim de identificar doses mais citotóxicas.

4.7 Análise da citotoxicidade

4.7.1 Análise metabólica da desidrogenase mitocondrial: método colorimétrico do MTT

No intuito de analisar a viabilidade celular foi utilizado um método que se baseia na ação de enzimas desidrogenases mitocondriais, sendo a presença dessas enzimas ativas um sinal de viabilidade celular. Este consiste em um método colorimétrico do MTT (brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio) (Invitrogen), o qual é fundamentado na análise da redução do reagente MTT em formazan, pela atuação das enzimas já mencionadas. Na redução do MTT são formados cristais do corante roxo formazan, os quais são quantificados por métodos de espectrofotometria, realizados no espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices).

Logo após ao tratamento das células, o meio de cultura foi retirado de cada poço e, em seguida foi adicionada uma solução de meio contendo 0,5 mg/mL de MTT (estoque de 5 mg/mL em 0,15 M de PBS). Em seguida, as células foram mantidas na incubadora úmida por 2,5 horas. Posteriormente, o meio formado por MTT foi retirado e a seguir foi adicionado 200 μL de DMSO em cada poço, com a finalidade de promover a solubilização dos cristais de formazan formados. Em seguida, tais cristais foram quantificados em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

Os dados foram normalizados com dados da absorbância de poços com DMSO (branco) afim de eliminar uma possível interferência deste reagente na análise. Os experimentos foram conduzidos realizando triplicatas para cada grupo experimental e repetido por três vezes.

4.7.2 Alterações morfológicas e estruturais em células de carcinoma mamário 4T1 tratadas com NAMI-A

As linhagens celulares, em cultura, após 24 horas de tratamento com NAMI-A foram visualizadas e fotografadas em microscópio Axiovert 100 (Zeiss), operado em contraste de fase, para observação das alterações morfológicas induzidas por este tratamento.

4.7.3 Análise do ciclo celular

No intuito de avaliar a fragmentação do DNA em células tratadas com NAMI-A, bem como acompanhar a distribuição dessas células nas diferentes fases do ciclo celular O princípio básico dessa técnica de citometria de fluxo consiste em submeter as células em um feixe de luz com comprimento de onda adequado, dessa forma, esses feixes ao interceptar as células emitem fluorescência, a qual equivale proporcionalmente ao tamanho do DNA da célula (CARNEIRO, 2007; CAMPAGNARO, 2012).

Após o período de tratamento, as células foram removidas das placas e centrifugadas por 3 minutos (300 g) e, em seguida, fixadas em um mililitro de etanol gelado (70%) e mantidas a 0°C por 2 h. Em seguida, as células foram ressuspensas em um volume de 300 µL de PBS. Após, a suspensão celular foi novamente centrifugada, ressuspensa em 300 µL de tampão de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1% Triton X-100 e 20 µg/mL de iodeto de propídio diluído em PBS, pH 7,4) e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida, essa suspensão celular foi avaliada em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA-USA) no canal FL2-H (sensível a detecções na faixa de 560 e 580 nm) para avaliação da fragmentação de DNA e identificação das fases do ciclo celular. Os dados obtidos foram analisados com o programa CellQuest 3.0.1 (Becton & Dickinson, EUA).

O tampão de lise atua rompendo as membranas das células e, portanto, expondo seus núcleos. Assim, o iodeto de propídio se liga ao DNA e as células contendo núcleos íntegros emitem alta fluorescência. Por outro lado, a condensação da cromatina e fragmentação de DNA pode ser observada pela ocorrência de eventos com baixa fluorescência. Além disso, fragmentos menores de DNA captam menos iodeto de propídio, emitindo menor fluorescência. A determinação da fragmentação do DNA e a identificação de fase do ciclo celular foram realizadas de acordo com protocolo descrito por Peres (2005) e o cálculo da proporção de células em cada uma das fases do ciclo celular foi realizado considerando-se apenas as células com DNA não fragmentado.

4.7.4 Análise Estatística

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

Os valores da concentração inibitória (IC₅₀) e seus intervalos de confiança de 95% foram derivados de um modelo de regressão linear, baseado em uma curva dose resposta e os cálculos foram realizados utilizando o *Software GraphPad Prism*.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização do complexo NAMI-A

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram caracterizados por três bandas. Uma dessas bandas teve uma absorção forte em torno de 3152 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação N-H. Este estiramento confirma a presença do grupo imidazol ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$) na estrutura do composto NAMI-A. Outra banda foi observada na região de 1065 cm^{-1} , a qual se refere a deformação da ligação de S=O, consistente com o ligante DMSO (CH_3)₂SO. Ainda, a outra banda na região de 427 cm^{-1} se refere a vibração da ligação de Ru-S, indicando a presença de rutênio ligado ao átomo de enxofre presente no ligante DMSO (Figura 21).

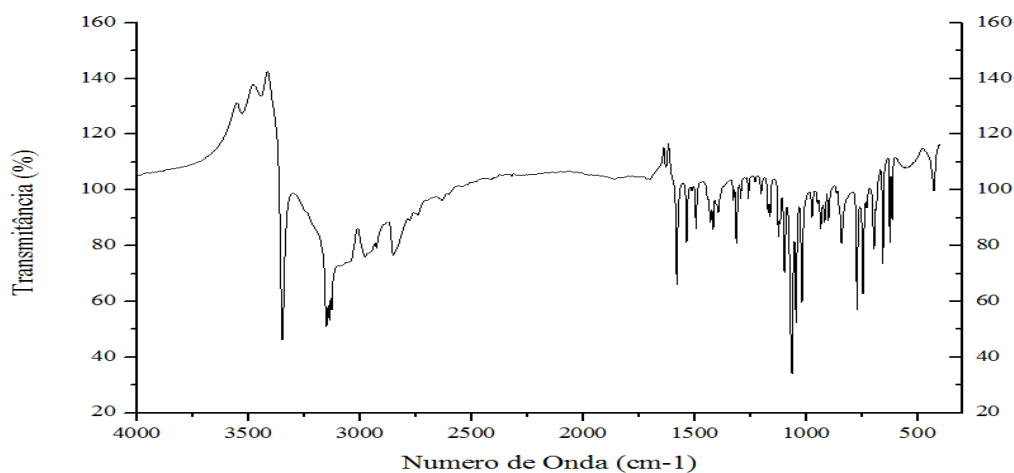


Figura 21: Espectro de absorção na região do infravermelho do composto NAMI-A. A partir do espectro três bandas foram identificadas, uma referente a ligação N-H em 3152 cm^{-1} , outra da ligação S=O em 1065 cm^{-1} e por fim Ru-S em 427 cm^{-1} .

Adicionalmente (Figura 22), os espectros de RMN também foram realizados e os sinais foram identificados. Os espectros de RMN foram analisados por ^1H ($^1\text{HRMN}$). O sinal referente aos hidrogênios metílicos (CH_3) é observado em 2,75 ppm. Um outro sinal observado de deslocamento maior foi de 7,52 ppm presente no ligante imidazólico referente ao carbono ligado ao hidrogênio. Outro sinal com um deslocamento maior de 8,75 ppm evidencia presença de hidrogênios ligados a átomos de nitrogênio, que estão presentes no ligante imidazólico.

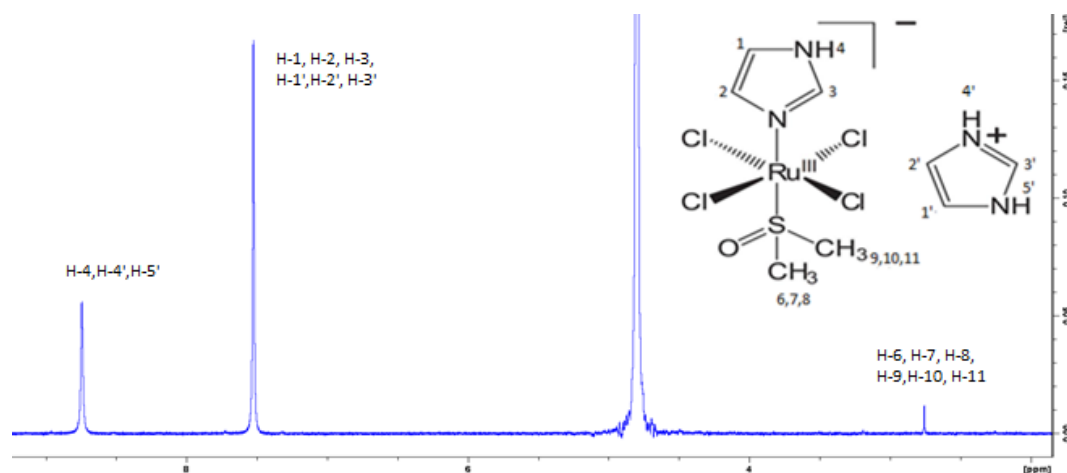


Figura 22: Espectro de $^1\text{HRMN}$ do complexo NAMI-A. Os principais sinais encontrados foram: 2,75ppm (C-H), 7,52 ppm (C-H no composto aromático) e 8,75 ppm (N-H).

5.2 Experimentos in vitro

5.2.1 Viabilidade celular: relação da citotoxicidade de NAMI-A

5.1.1.1 Análise de atividade metabólica: ensaio de MTT

Através do método MTT, a citotoxicidade do NAMI-A foi avaliada nas linhagens celulares de carcinoma mamário e fibroblastos (4T1 e NIH-3T3, respectivamente) no período de 24, 48 e 72 h. A cisplatina, um quimioterápico largamente empregado para tratamento de câncer, foi usada como controle positivo no intuito de avaliar a sensibilidade das linhagens celulares mencionadas ao NAMI-A (Pluim *et al.*, 2004).

Em geral, observou-se pouca diferença na viabilidade celular entre os grupos de células controle (sem tratamento) e grupos de células tratadas com NAMI-A nas linhagens e tempos testados (Figuras 23, 24 e 25). A seguir, serão pautados os resultados de forma mais detalhada.

No período de 24 horas, não se observou diferença significativa na viabilidade celular entre os grupos de células controle (sem tratamento) e os grupos de células tratadas com NAMI-A em quaisquer linhagens celulares e doses avaliadas (Figura 23). Em relação à cisplatina, verificou-se maior efeito citotóxico em comparação com o NAMI-A em ambas as linhagens celulares. Ademais, notou-se que a citotoxicidade da cisplatina foi maior na linhagem 4T1 na dose 12,5 μM .

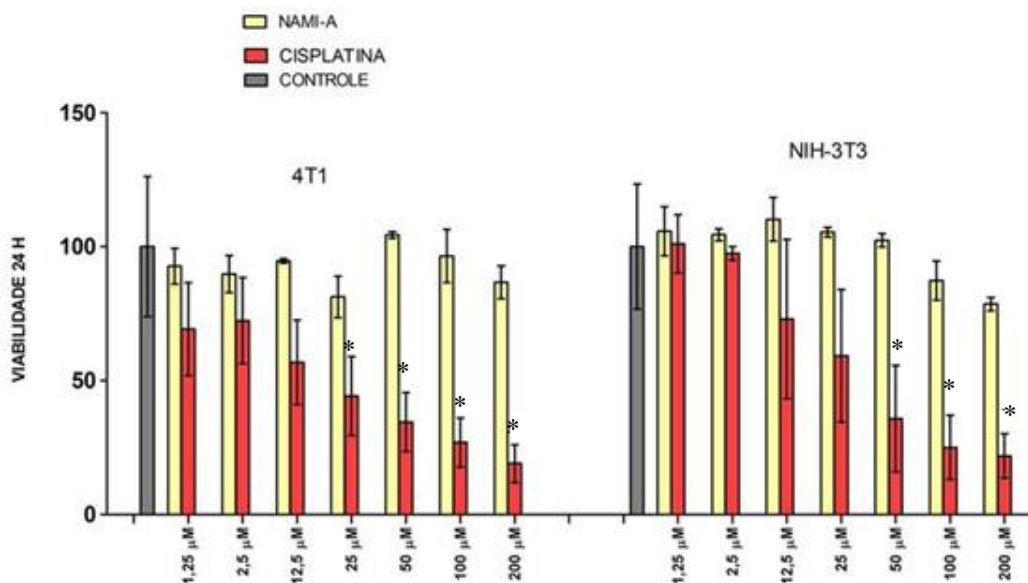


Figura 23: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de NAMI-A e cisplatina e linhagem celular avaliada após 24 horas de tratamento. As células NIH-3T3 e 4T1 foram incubadas com doses de 1,25, 2,5, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µM por 24 horas. Todos os dados foram normalizados com o controle negativo (células sem nenhum tratamento) e expressos como média \pm erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas. Não se observou diferença significativa entre os grupos controle e tratados com NAMI-A nas duas linhagens. Todavia, notou-se que houve diferenças entre o grupo controle e cisplatina em ambas linhagens celulares. Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre o grupo controle e tratamentos ($p < 0.05$).

Após o período de 48 horas de tratamento verificou-se que o NAMI-A foi citotóxico na 200 µM em relação ao controle para ambas linhagens. Ainda, comparando-se o grupo controle e os tratamentos com cisplatina, percebeu-se esta foi mais citotóxica a partir da dose de 12,5 µM em ambas as linhagens. A partir da concentração de 12,5 µM, este complexo induziu uma redução média da viabilidade celular superior à 50% em ambas linhagens (Figura 24).

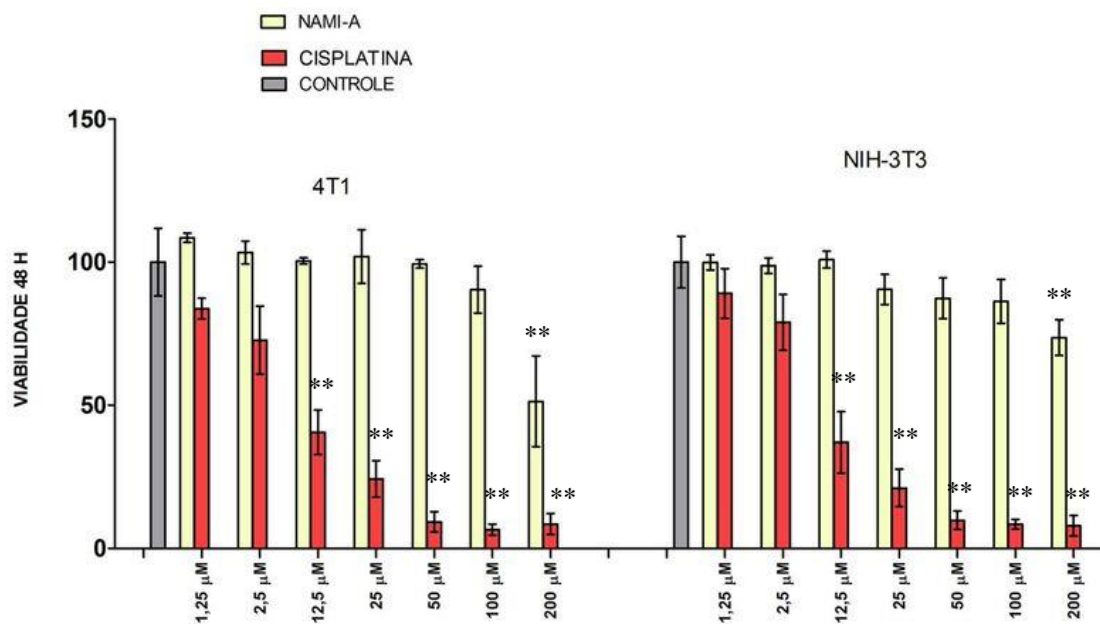


Figura 24: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de NAMI-A e cisplatina, linhagem celular avaliada após 48 horas de tratamento. As células NIH-3T3 e 4T1 foram incubadas com doses de 1,25, 2,5, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µM por 48 horas. Todos os dados foram normalizados com o controle negativo (células sem nenhum tratamento) e expressos como média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre o grupo controle e tratamentos ($p < 0.01$).

Após 72 horas de tratamento com doses de até 100 µM de NAMI-A não foram observadas diferenças na viabilidade entre o controle e entre as duas linhagens estudadas. Nesse período, a dosagem de 200 µM foi a que apresentou maior citotoxicidade para ambas as linhagens celulares sendo que em 4T1 verificou-se 82,0% ($\pm 2,6$) de células viáveis, enquanto que para NIH-3T3 observou-se 66,5% ($\pm 10,7$) de viabilidade celular (Figura 25).

Ainda neste período, no tratamento com a cisplatina observou-se uma citotoxicidade superior à verificada no tratamento com NAMI-A nas doses acima de 2,5 µM em ambas as linhagens. Houve queda de 90,7% ($\pm 0,9$) para as células 4T1 e 69,5% ($\pm 3,4$) para NIH-3T3 na dose de 200 µM (Figura 25).

A partir destes dados, sugere-se que o NAMI-A e cisplatina tem efeito citotóxico dependente da dose, do tipo celular e do tempo de exposição analisado. Em suma, conclui-se que: (1°) a cisplatina foi mais citotóxica do que o NAMI-A em todas as doses e tempos de tratamento em ambas as linhagens; (2°) NAMI-A induziu citotoxicidade semelhante em ambas as linhagens; (3°) Percebeu-se maior efeito citotóxico a partir de 48 horas em ambas linhagens e compostos investigados.

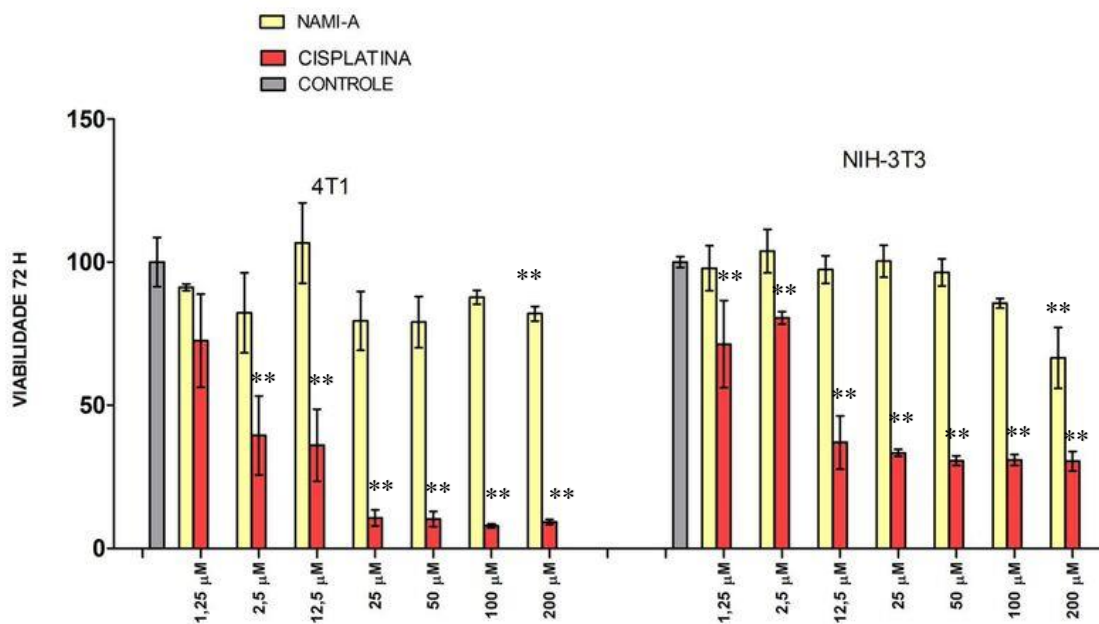


Figura 25: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de NAMI-A e cisplatina, linhagem celular avaliada após 72 horas de tratamento. As células NIH-3T3 e 4T1 foram incubadas com doses de 1,25, 2,5, 12,5, 25, 50, 100 e 200 μM por 72 horas. Todos os dados foram normalizados com o controle negativo (células sem nenhum tratamento) e expressos como média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre o grupo controle e tratamentos ($p < 0.01$).

Nos ensaios supracitados, as doses empregadas neste estudo foram escolhidas após a análise de alguns artigos, os quais investigaram doses até 100 μM de NAMI-A em linhagens celulares KB, B16F1 e B16 (Bergamo *et al.*, 1999; Sava *et al.*, 2002; Bergamo *et al.*, 2003; Gava *et al.*, 2006; Bicek *et al.*, 2007), ou seja, linhagens diferentes das estudadas neste trabalho.

Em nosso estudo, nós empregamos a cisplatina como controle positivo para validar a sensibilidade das linhagens celulares à quimioterápicos. Pluim e colaboradores (2004) relatam que a cisplatina pode ser em média 1053 vezes mais citotóxica do que NAMI-A e que esta citotoxicidade varia dependendo do tipo de linhagem celular. Além disso, estes autores ressaltaram que a concentração inibitória de 50% (IC_{50}) para o NAMI-A foi acima de 500 μM para as linhagens celulares de carcinoma de ovário (IGROV-1 e 2008) e carcinoma mamário (MCF-7 e T47D). Desta forma, decidimos em segunda etapa realizar novos ensaios afim de identificar o IC_{50} para as linhagens 4T1 e NIH-3T3, informação que poderia direcionar o delineamento experimental das próximas etapas de investigação dos efeitos biológicos induzidos por NAMI-A.

Assim, nessa segunda etapa, foi observado que a citotoxicidade em 24 horas foi proporcionalmente maior com o aumento da dose de NAMI-A. Ainda, comparando-se as

duas linhagens percebeu-se que nas concentrações de 250 a 2000 μM o efeito citotóxico foi maior na linhagem NIH-3T3. Por exemplo, na dose de 250 μM a viabilidade das células foi de 45,2% ($\pm 9,4$) em NIH-3T3 versus 91,3% ($\pm 12,6$) em 4T1. Em contrapartida, na dose de 4000 μM a citotoxicidade foi similar em ambas as linhagens (em torno de 81,3% $\pm 4,1$ para 4T1 e 78% $\pm 6,4$ para NIH-3T3), conforme representado na figura 26.

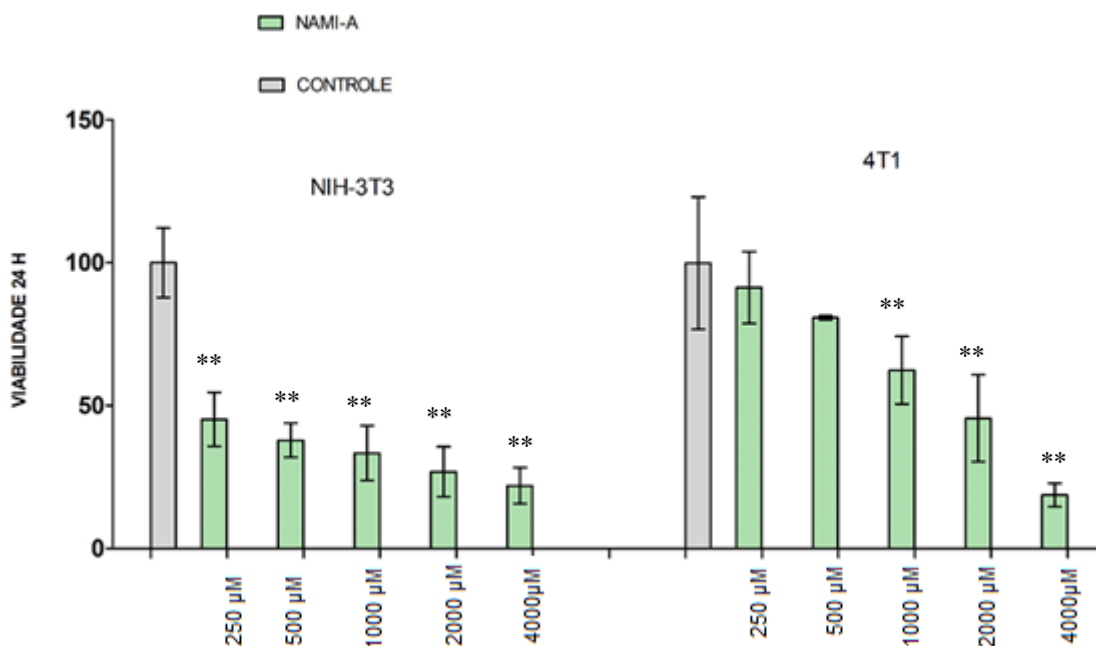


Figura 26: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de NAMI-A e linhagem celular avaliada após 24 horas de tratamento. As células NIH-3T3 e 4T1 foram incubadas com doses de 250, 500, 1000, 2000 e 4000 μM por 24 horas. Todos os dados foram normalizados com o controle negativo (células sem nenhum tratamento) e expressos como média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre o grupo controle e tratamentos ($p < 0,01$).

Com relação ao período de 48 horas de tratamento, o perfil citotóxico de NAMI-A foi semelhante apenas nas doses de 250 e 500 μM para ambas as células em relação ao controle. Percebeu-se também que houve efeito citotóxico em ambas as linhagens nas doses a partir de 1000 μM (Figura 27).

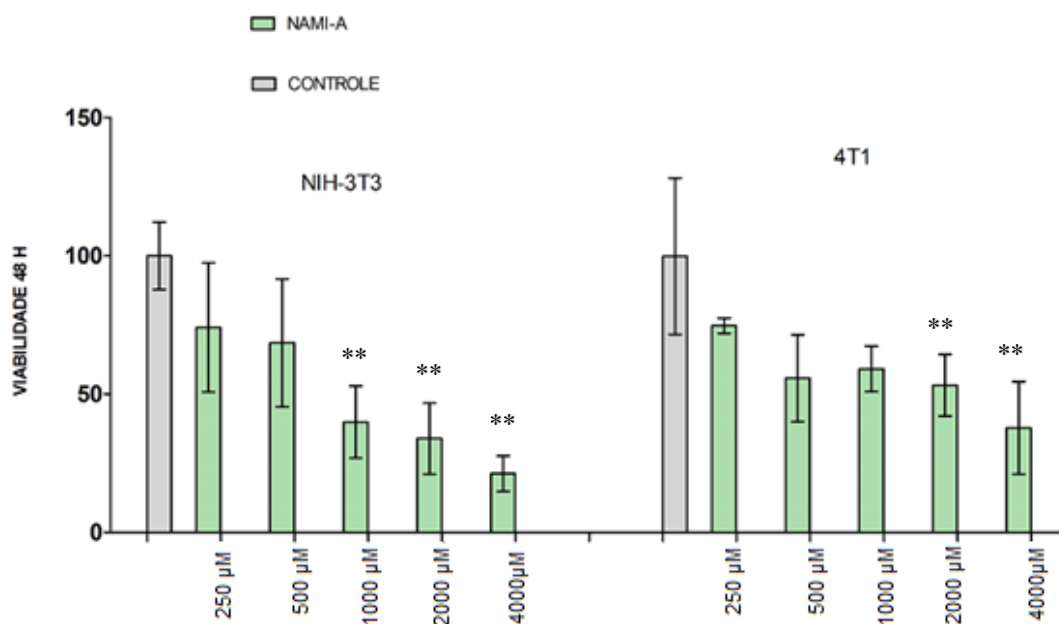


Figura 27: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de NAMI-A e linhagem celular avaliada após 48 horas de tratamento. As células NIH-3T3 e 4T1 foram incubadas com doses de 250, 500, 1000, 2000 e 4000 µM por 48 horas. Todos os dados foram normalizados com o controle negativo (células sem nenhum tratamento) e expressos como média ± erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre o grupo controle e tratamentos ($p < 0.01$).

Após 72 horas de tratamento com NAMI-A, foi observada relevante diferença nos efeitos citotóxicos entre as duas linhagens utilizadas. Em todas as doses o efeito citotóxico foi maior nas células tumorais da linhagem 4T1 do que em células normais da linhagem NIH-3T3. Ainda, neste período de tratamento, observou-se maior efeito especialmente na linhagem 4T1 que teve uma queda de viabilidade maior que 25% em todas as concentrações comparado com as células NIH-3T3 (Figura 28).

Analisando as diferenças entre a viabilidade celular de ambas as linhagens no período de 24, 48 e 72 h (considerando-se as mesmas doses) percebeu-se que as células 4T1 foram mais sensíveis ao tratamento com NAMI-A no período de 72 horas. A partir dos dados supracitados, calculou-se os valores de IC_{50} do NAMI-A para a linhagem celular 4T1 que foi de 1800 µM no período de 24 horas e para a linhagem NIH-3T3 foi de 2200 µM.

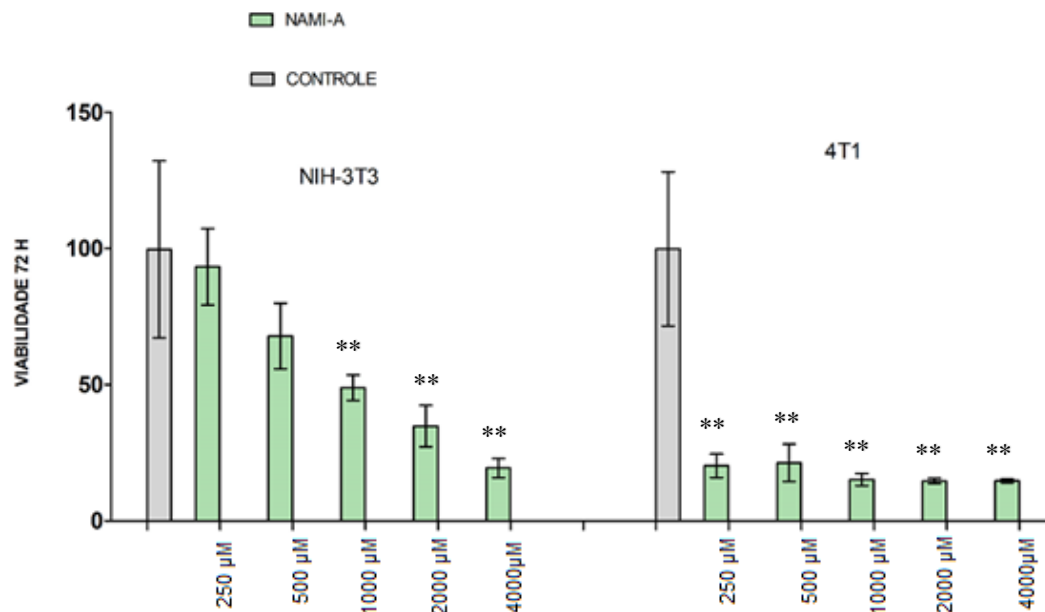


Figura 28: Distribuição da viabilidade celular segundo a concentração de NAMI-A e linhagem celular avaliada após 72 horas de tratamento. As células NIH-3T3 e 4T1 foram incubadas com doses de 250, 500, 1000, 2000 e 4000 µM por 48 horas. Todos os dados foram normalizados com o controle negativo (células sem nenhum tratamento) e expressos como média \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicatas. Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre o grupo controle e tratamentos ($p < 0.01$).

Em suma, observou-se que em células NIH-3T3, o período de 24 horas foi o que apresentou maior citotoxicidade. Já para as células 4T1, o período de maior citotoxicidade foi de 72 horas e este efeito foi gradativamente aumentando com o decorrer do período de tratamento, em praticamente todas as doses.

5.2.2 Alterações morfológicas e estruturais em células de carcinoma mamário 4T1 tratadas com NAMI-A

Observamos nas imagens, obtidas por microscopia de contraste de fase, que células do grupo controle (sem tratamento) apresentaram morfologia peculiar desta linhagem (4T1) contendo características como presença de várias projeções da membrana citoplasmática e formato fusiforme. Ainda, observou-se que as projeções da membrana entre as células, no campo observado, representam pontos de adesão focal, ou seja, pontos em que há interações entre elas e estes aspectos demonstram que o citoesqueleto de actina está íntegro (Figura 29 A).

Em relação ao controle positivo, que se refere às células tratadas com cisplatina (Figura 29 B) observou-se menor confluência celular em relação ao controle. Além disso, observou-se vários aspectos diferentes do grupo controle como ausência de projeções citoplasmáticas e formato arredondada, o que demonstra que as células perderam a aderência ao substrato (neste caso, a placa), processo que antecede células em processo de morte celular. Estas características são peculiares de células com alterações no citoesqueleto de actina. Outra característica precedente de toxicidade celular foi a presença de maior granulosidade em algumas células e isto pode estar relacionado com o aumento do número de vesículas dentro da célula, característica que pode indicar alterações que podem induzir a morte celular.

Após o tratamento das células da linhagem 4T1 com 1800 μ M de NAMI-A (Figura 29 C) também foram observados efeitos citotóxicos semelhantes aos observados no tratamento com cisplatina. Verificou-se menor confluência celular, perda das projeções citoplasmáticas, o que gerou o formato arredondado e maior granulosidade das células. Notou-se também a redução do tamanho de algumas células, bem como o aumento de outras, indicando alterações morfológicas e estruturais induzidas por NAMI-A.

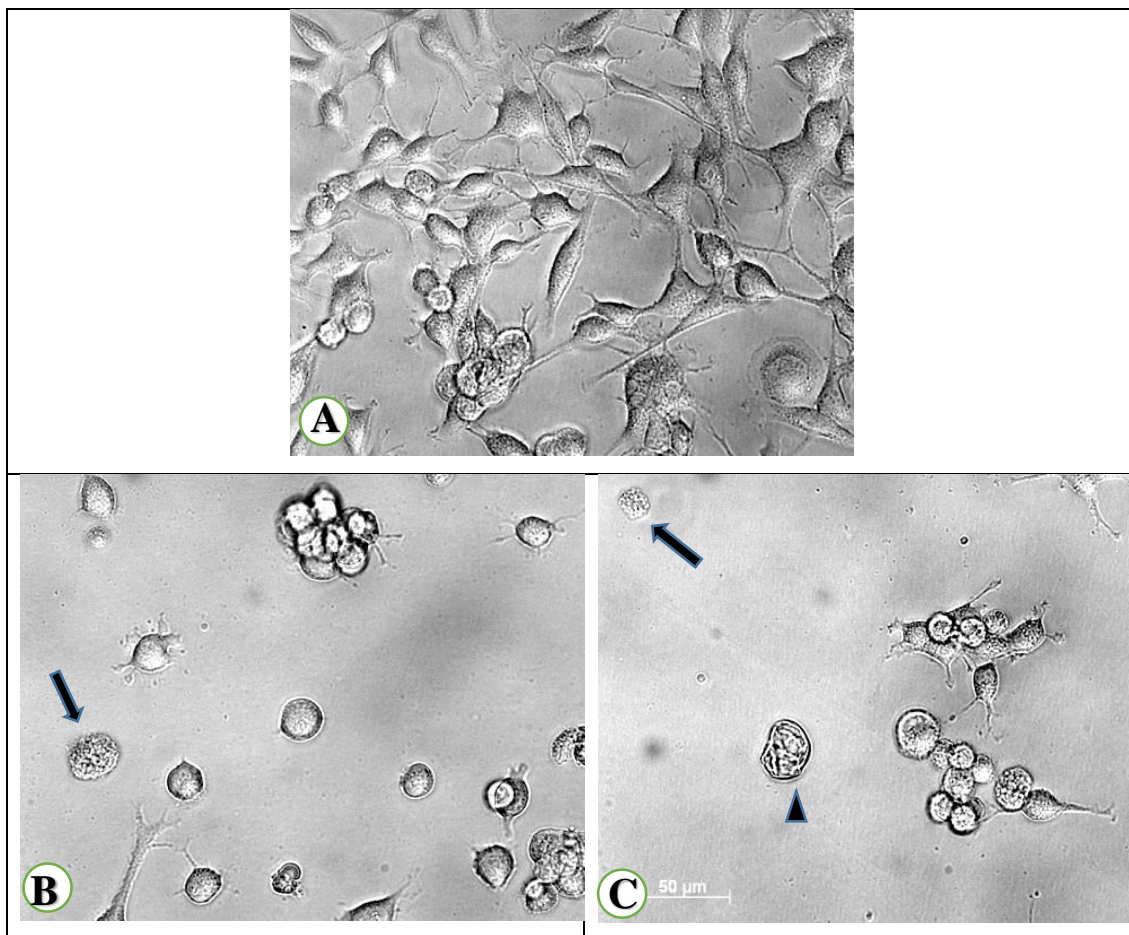


Figura 29: Alterações morfológicas e estruturais induzidas por NAMI-A em células de carcinoma mamário (linhagem 4T1) após 24 h de tratamento. As células foram incubadas com 1800 μM de NAMI-A e 20 μM de cisplatina e examinadas por microscopia de contraste de fase. (A) Controle (células sem tratamento); (B) células tratadas com 20 μM de cisplatina e (C) células tratadas com 1800 μM de NAMI-A. Nas micrografias B e C são mostradas células com características de células em processo de morte celular como arredondamento e maior granulosidade celular (setas), algumas células diminuíram e outras aumentaram (cabeça de seta).

5.2.3 Análise da fragmentação e perfil do ciclo celular após o tratamento de NAMI-A

A análise da fragmentação do DNA e do ciclo celular, avaliada através de incorporação de iodeto de propídio, em citômetro de fluxo, foi baseada na quantidade de DNA para cada fase do ciclo celular conforme representado na figura 30. Em geral, notou-se diferenças entre a proporção de células da linhagem 4T1 após os tratamentos (cisplatina e NAMI-A) em cada subfase do ciclo celular (sub-G1, G1, S e G2, Figura 30).

Foi observado, por exemplo, um maior número de células em sub-G1 nas células tratadas com cisplatina e NAMI-A, indicando que houve uma maior quantidade de fragmentação do DNA em relação ao controle. Em contrapartida, em G1 percebeu-se uma redução na quantidade de células que foram expostas aos tratamentos ($35,8\% \pm 3,0$ para

a cisplatina e $42,4\% \pm 8,2$ versus $70,1\%$ em células sem tratamento). Ainda, ocorreu um aumento do número de células nos grupos tratados em G2 (Figura 31, o que indica um efeito citostático, ou seja, interrupção da divisão celular).

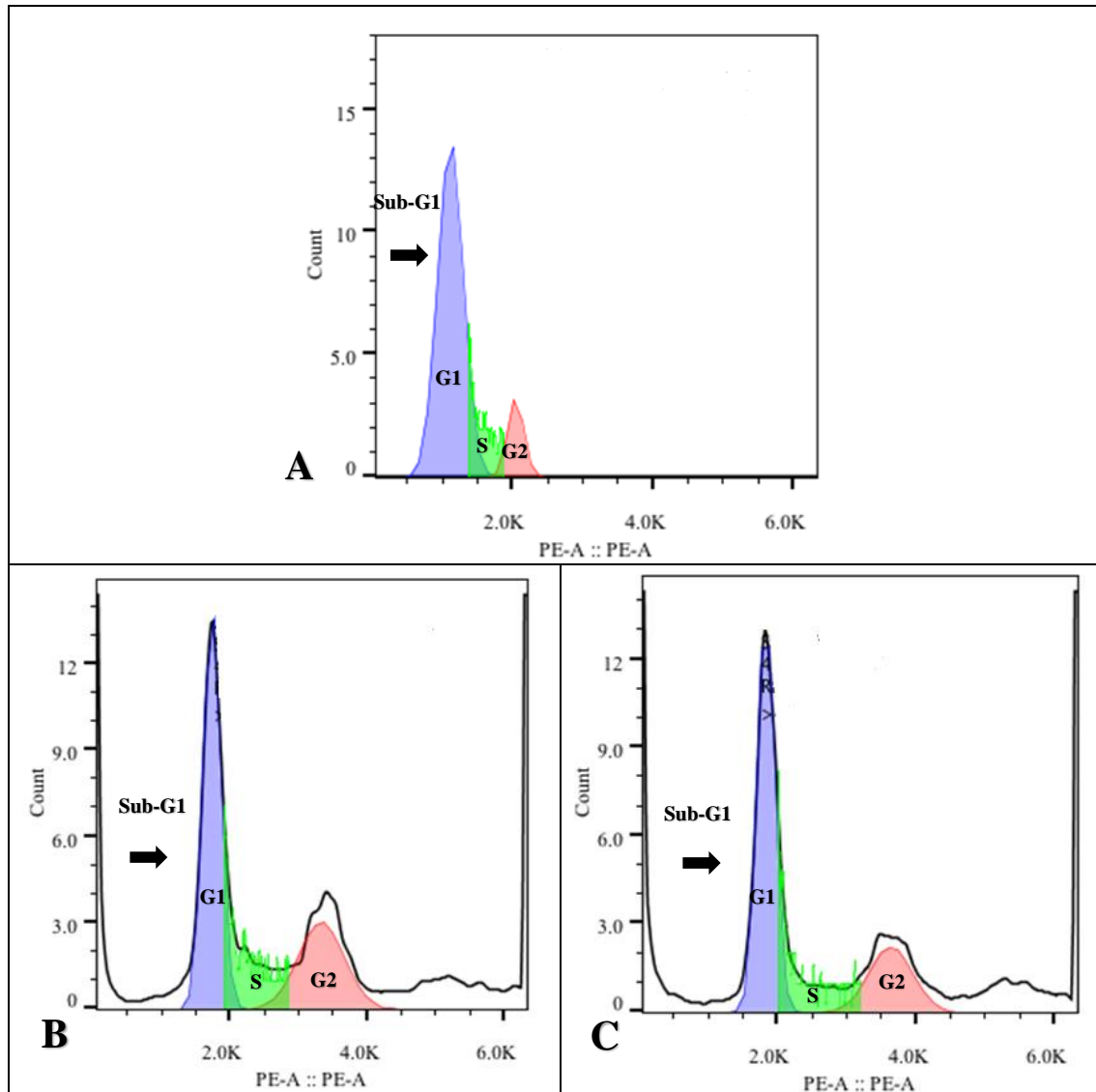


Figura 30: Representação gráfica dos dados adquiridos em citômetro de fluxo após marcação das células com tampão de lise contendo iodeto de propídio. Os dados correspondem a tratamentos no período de 24 h. (A) Controle. (B) Cisplatina na dose de $20 \mu\text{M}$. (C) NAMI-A na dose de $1800 \mu\text{M}$.

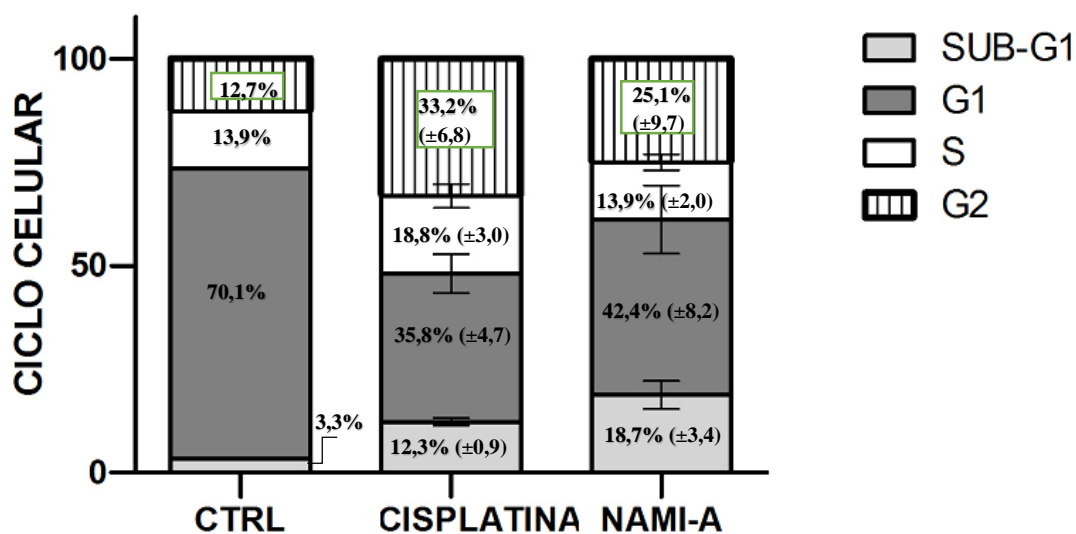


Figura 31: Comparação do percentual de células 4T1 nas fases do ciclo celular (sub-G1, G1, S e G2) tratadas em 20 μM de cisplatina e 1800 μM de NAMI-A. As fases do ciclo celular foram analisadas após incubação foram marcadas com o tampão de lise com iodeto de propídio por meio de citometria de fluxo. Os gráficos foram expressos como porcentagens de células nas subfases da interfase sub-G1, G1, S, e G2. Os dados representam a média \pm erro padrão da média. Notou-se que no grupo controle há pouca quantidade de DNA fragmentado enquanto que nas células tratadas com cisplatina e NAMI-A percebeu-se uma maior quantidade de fragmentação do DNA. Também houve uma redução do número de células em G1 e aumento em G2 nas células tratadas com cisplatina e NAMI-A.

6. DISCUSSÃO

6.1 Considerações sobre a caracterização do NAMI-A por infravermelho e RMN

O estudo em questão teve como foco a realização da síntese do composto NAMI-A, bem como sua caracterização para confirmação da sua síntese e, por último, avaliação da sua citotoxicidade em linhagens celulares de carcinoma mamário e de fibroblastos. A síntese desse composto de rutênio foi bem sucedida e está de acordo com a síntese realizada por outros autores (Mestroni, Alessio & Sava 1998).

O composto NAMI-A, utilizado em nosso estudo, foi caracterizado por infravermelho e apresentou três bandas, sendo uma banda na região de 3152 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação N-H, o qual se refere ao grupo imidazol ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$); outra banda na região de 1065 cm^{-1} , indicativo da vibração da ligação de S=O, observado no ligante DMSO (CH_3)₂SO e, por último, uma banda na região de 427 cm^{-1} correspondente a vibração da ligação de Ru-S, indicando a presença de rutênio ligado ao átomo de enxofre presente no ligante DMSO. Ambas atribuições dos valores de estiramentos estão condizentes com os dados das literaturas e confirmam a presença do complexo NAMI-A. Comparando com os dados da literatura, Mestroni e colaboradores (1998) em seus estudos encontraram uma banda de 3150 cm^{-1} referente ao estiramento N-H, uma banda na região de 1159 cm^{-1} , correspondente a ligação S=O, e uma outra em 421 cm^{-1} , referente a ligação Ru-S.

A análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear também permitiu determinar a composição química do NAMI-A. Os espectros obtidos apresentaram deslocamentos químicos conforme previstos na literatura. Os espectros da ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹HRMN) apresentaram um sinal em 2,75 ppm, referente aos hidrogênios metílicos (CH_3). Ainda, observou-se um outro sinal observado em 7,52 ppm referente ao hidrogênio ligado ao carbono presente no ligante imidazólico e um outro sinal com um deslocamento maior de 8,75 ppm, que evidencia presença de hidrogênios ligados a átomos de nitrogênio, que estão presentes no ligante imidazólico.

Existem alguns fatores que afetam o deslocamento químico, entre eles a eletronegatividade. O aumento do deslocamento observado no último sinal descrito está relacionado com o aumento da eletronegatividade dos átomos ligados ao hidrogênio, quanto maior a eletronegatividade, maior será o deslocamento. Tais valores estão em

concordância com a estrutura sugerida pelo composto NAMI-A em estudos realizados por Mestroni e colaboradores (1998), os quais descrevem que hidrogênios metílicos apresentam sinal em torno de 3,53 ppm, hidrogênio e carbono no anel aromático apresentaram um sinal de 7,48 ppm e hidrogênio e nitrogênio no sinal de 8,7 ppm.

6.2 Considerações sobre a citotoxicidade de NAMI-A em células de carcinoma mamário das linhagens 4T1 e de fibroblasto NIH-3T3

No presente trabalho, foi demonstrado que o composto NAMI-A induziu a citotoxicidade das linhagens 4T1 e NIH-3T3, e este efeito variou de acordo com o tempo e, principalmente, com a dose e linhagem utilizada. Nos experimentos iniciais NAMI-A induziu citotoxicidade significativa nas doses acima de 100 μM . Tais resultados estão de acordo com o estudo realizado por Plum *et al* (2004), o qual utilizou concentrações de 0, 75, 150, 300 e 600 μM em células de carcinoma de ovário (IGROV-1 e 2008) e carcinoma mamário (MCF-7 E T47D) e comprovou que os efeitos citotóxicos foram relevantes acima de 500 μM . Em nosso estudo, em um período de 24 e 72 horas não se observou diferença significativa entre as linhagens 4T1 e NIH-3T3 quanto a atuação do NAMI-A, já em 48 horas houve maior citotoxicidade das células NIH-3T3 em 200 μM . Já em doses maiores de 250 a 4000 μM em um período de 72 horas foi observada relevante diferença nos efeitos citotóxicos entre as linhagens, em todas as doses a citotoxicidade foi maior que 25% nas células 4T1 em comparação as células NIH-3T3. Dessa forma, também foi observado em nossos estudos efeitos citotóxicos dependentes dos tipos de linhagem e período de exposição.

Ademais, em nosso trabalho, foi observado maior efeito citotóxico da cisplatina em relação ao NAMI-A em todas as linhagens, tempos e doses investigados. Em outras palavras, a dose da cisplatina foi bem menor do que a necessária para causar o mesmo efeito que o NAMI-A. Por exemplo, no período de 24 horas, em uma dose de 50 μM a cisplatina já havia provocado uma queda de $65,5\% \pm 11$ na linhagem 4T1 e $64,2\% \pm 19,9$ para NIH-3T3, enquanto que para o NAMI-A observou-se queda de $13,4\% \pm 6,2$ para 4T1 e $21,5\% \pm 2,5$ para NIH-3T3, dessa forma, Obteve-se uma citotoxicidade menor que a metade do efeito da cisplatina em uma dose quatro vezes maiores (200 μM) e isto ocorreu para as duas linhagens celulares avaliadas. Essas informações também estão de

acordo com os achados por Pluim *et al* (2004). Estes autores realizaram a comparação da atividade citotóxica provocada pela cisplatina e por NAMI-A em outras linhagens celulares de carcinoma de ovário e de mama e o IC₅₀ encontrado para a cisplatina, em um período de exposição de 96 horas, foi de 1 µM na linhagem IGROV-1; 0,37 µM para 2008; 3,5 µM para MCF-7 e 4 µM para T47D. Já para o NAMI-A o IC₅₀ foi de 2000 µM para IGROV-1, 510 µM para 2008, 800 µM para MCF-7 e 900 µM para T47D. Percebe-se que os valores de IC₅₀ foram elevados e que, dependendo do tipo de linhagem celular utilizada a dosagem do composto foi bem diferenciada demonstrando que este composto apresenta citotoxicidade dependente da linhagem.

Em seus estudos sobre compostos de rutênio, Bergamo & Sava (2011) relatam sobre a baixa citotoxicidade de NAMI-A *in vitro* e que muitos compostos de rutênio apresentam IC₅₀ maior que a cisplatina, em destaque para o NAMI-A. Em nossos estudos, também confirmamos isso, pois o IC₅₀ da cisplatina para as células 4T1 foi de 20 µM e a IC₅₀ do NAMI-A foi de 1800 µM, resultando em um valor 90 vezes maior do NAMI-A. Ainda, Pluim *et al* (2004) ressalta que dependendo do tipo de linhagem celular utilizada, o IC₅₀ para o NAMI-A e cisplatina podem variar, nas linhagens utilizadas e os valores deste podem estar na ordem de 225-2000 vezes maior que o IC₅₀ da cisplatina. Porém, em nosso estudo, o IC₅₀ encontrado para o NAMI-A em células 4T1 foi 90 vezes maior que o da cisplatina. Essa divergência de ordem de valores de IC₅₀ em nossos achados e por estes autores pode estar relacionada ao tempo de exposição do composto, visto que calculamos o IC₅₀ para um período de 24 horas e já esses autores usaram um tempo de 96 horas e também devido a linhagem celular diferente.

Em nossos ensaios, apesar de termos utilizados outro período de tratamento (24 h), também identificamos que os valores de IC₅₀ da cisplatina foram bem inferiores aos de NAMI-A; considerando, assim, a cisplatina mais tóxica. Em nossos achados, a IC₅₀ de cisplatina foi de 20 µM em células da linhagem 4T1 e este valor foi superior aos encontrados em todas as linhagens estudadas por Pluim *et al* (2004), comparando-se o mesmo fármaco de referência (cisplatina). Isto pode indicar menor sensibilidade da linhagem celular 4T1 em relação às linhagens investigadas (IGROV-1, 2008, MCF-7 e T47D) por esses autores. Este comportamento pode ser atribuído a maior agressividade das células 4T1, que apresentam elevado potencial metastático. Todavia, há uma outra variável envolvida: Pluim *et al* (2004) analisou os efeitos citotóxicos de cisplatina em um período de 96 horas, ou seja, as células ficaram incubadas com cisplatina por 72 h a mais do que usamos em nossos experimentos. Dessa forma, as diferenças de valores entre

nossos achados e destes autores poderiam ser referidas à adoção de distintas investigações de linhagem e tempo de tratamento.

Em nosso estudo, o NAMI-A só foi citotóxico em doses elevadas (acima de 200 μM). Esta observação também foi relatada por Bratsos *et al* (2007) e caracterizada na literatura como “baixa citotoxicidade” *in vitro*. Talvez isto seja em decorrência de que moléculas de DNA não sejam o alvo principal desse composto, como ocorre com a cisplatina (Jakupec *et al*, 2008). Bergamo *et al* (2003) relatam sobre a afinidade do NAMI-A por proteínas plasmáticas e descrevem que 85% do total de NAMI-A, presente no sangue, é encontrado no plasma. Bergamo *et al* (2012) realizaram um estudo de revisão da literatura e atestaram que o NAMI-A apresentou citotoxicidade *in vitro* na ordem acima de 100 μM para a maioria das linhagens celulares com capacidade metastática. Dessa forma, nossos resultados são corroborados com os da literatura. Ainda, Bergamo *et al* (2003) também confirmaram que as interações do NAMI-A com a molécula de DNA são menores e mais fracas que a cisplatina, revelando uma evidência de uma possível razão do NAMI-A ser menos tóxico do que a cisplatina.

Em outros estudos com células de carcinoma oral (KB) Bergamo *et al* (1999) avaliou a citotoxicidade de NAMI-A e cisplatina nas concentrações de 1, 10 e 100 μM por períodos de 24, 48 e 72 horas e verificaram que o NAMI-A é praticamente desprovido de citotoxicidade em doses de até 100 μM . Sobretudo, nessas mesmas condições, a cisplatina mostrou significativa citotoxicidade, tendo seus efeitos citotóxicos aumentados com o aumento do seu tempo de exposição nas células. Ainda, esses autores também realizaram estudos com modelo *in vivo* utilizando ratos implantados com metástases de carcinoma de pulmão (LL/2 (LLC1), adenocarcinoma (TS/A) e carcinoma mamário (MCA). Segundo este estudo, o NAMI-A levou à redução das metástases nestes modelos e foi revelado que o efeito deste composto foi ainda mais eficaz quando ele foi administrado após a cirurgia de tumores primários. Este estudo corroborou que NAMI-A apresenta, de fato, efeito antimetastático e grande potencial para tratamento de câncer metastático. Por este motivo, nosso grupo elegeu estudar os efeitos de NAMI-A sobre a linhagem 4T1, uma linhagem bastante apropriada para investigar seu efeito antimetastático haja vista que células desta linhagem induzem metástases poucos dias após o implante em camundongos Balb/c. Em estudos sobre a citotoxicidade do citrato de ródio em células 4T1 Carneiro (2011) observou que houve a formação de metástases em apenas 18 dias após o implante de células de carcinoma mamário em camundongos Balb/c.

Os efeitos do NAMI-A sobre linhagem celulares de melanoma de camundongos foram investigados *in vitro* utilizando-se a linhagem B16F10 e *in vivo* para a linhagem B16 por Gava *et al* (2005). Esses autores trataram as células com concentrações de 1 a 100 μM e o NAMI-A foi praticamente inativo nas células B16F10 até a maior concentração usada (100 μM) em um período de 96 horas de exposição. Por outro lado, nessas mesmas condições experimentais, em ensaios de “quimioinvasão”, o NAMI-A apresentou efeito antimetastático em células B16F10. Apesar da baixa citotoxicidade do NAMI-A *in vitro*, sua atuação *in vivo* foi bastante eficaz no controle de metástase, visto que foi relatada expressiva redução no peso dos órgãos que continham metástases. Diante de tais resultados, podemos inferir que nossos achados a respeito da baixa citotoxicidade do NAMI-A em concentrações abaixo de 200 μM estão de acordo com o estudo de Gava *et al* (2005). Além disso, esta observação traz uma perspectiva para novas investigações *in vivo* do NAMI-A utilizando o modelo da linhagem 4T1.

No intuito de detectar a quantidade de rutênio intracelular em células de neuroblastoma humana (SHSY-5Y) tratadas com 200 μM de NAMI-A, Aitken *et al* (2012) realizaram técnicas de micrografia óptica para detectar imagens de fluorescência de raios X. Após quatro horas de exposição do composto não foi detectada quantidade significativa de NAMI-A dentro das células. Esses autores relacionaram esta observação à já relatada baixa toxicidade direta do NAMI-A. E de fato, em nossos resultados são suportados por esta descrição, visto que observamos citotoxicidade em doses acima de 200 μM . Esses mesmos autores ressaltam a significância do NAMI-A ser utilizado *in vivo*, já que interage com proteínas, levando uma diminuição da adesão celular, propriedades antiangiogênicas, proporcionando a redução de formação de metástases.

Hostetter *et al* (2011) avaliaram a atividade citotóxica de NAMI-A em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem BY4741), utilizando concentrações de 0, 150 e 450 μM . Após seis horas de tratamento foi observada uma redução gradual na densidade celular com o aumento da dose. Por exemplo, em 150 μM houve viabilidade de 80% (± 8), já em 450 μM caiu para 59% (± 4) a viabilidade celular. Em nossos experimentos na concentração de 500 μM de NAMI-A a viabilidade foi de 80,7% ($\pm 0,7$) para a linhagem 4T1 no período de 24 horas, a dose e o período de exposição foram maiores que os utilizados por Hostetter *et al* (2011), isso pode estar relacionado com o tipo de linhagem celular, já que usamos linhagem celular de carcinoma mamário metastático e já esses autores utilizaram células de fungos.

Com objetivo de buscar maiores esclarecimentos do efeito de NAMI-A sobre proteínas TGF- β_1 no processo metastático, Brescacin *et al* (2015) utilizaram células de carcinoma mamário humana (MCF-7 e MDA-MB-231) e células epiteliais humanas não cancerígenas (HBL-100) e trataram com 1,10 e 100 μ M de NAMI-A por 24 horas. Para as células de MDA-MB-231, o NAMI-A provocou redução da proteína TGF- β_1 em doses baixas (10 μ M); em contrapartida, em MCF-7 ocorreu redução dessa proteína em doses mais elevadas (100 μ M) e já nas células HBL-100 os efeitos do NAMI-A sobre os efeitos na secreção de TGF- β_1 foram mínimos. Como essa proteína apresenta-se em alta concentração em células tumorais e atua facilitando o processo metastático, esses dados fornecem uma grande perspectiva de experimentos futuros com os nossos achados a respeito da citotoxicidade *in vitro* de NAMI-A em doses maiores, haja vista que reforça os efeitos antimetastáticos do NAMI-A.

Atualmente, sabe-se que a compreensão dos mecanismos de regulação do ciclo celular é essencial para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos que visem tornar às células susceptíveis à apoptose, como ocorre em regimes quimioterápicos. Neste estudo, observou-se que na concentração de 1800 μ M o composto NAMI-A induziu um aumento no acúmulo de células em G2 e redução proporcional em G1 em um período de 24 horas, o que evidencia que este composto altera o perfil do ciclo celular, provavelmente, bloqueando a progressão das células na fase de transição G2/M (Figura 31). Tais achados estão de acordo com estudo de revisão da literatura realizado por Bergamo *et al* (2012) que sugerem que esse bloqueio da transição de fase G2/M ocorre devido ao acúmulo de proteínas Cdk1 inativas. Em nossos experimentos, percebemos um efeito no ciclo em uma dose maior (1800 μ M) porém, em um período menor de exposição (24 h). Além disso, nós utilizamos a linhagem de carcinoma mamário 4T1 enquanto estes autores analisaram a linhagem KB, oriunda de carcinoma oral.

Alterações morfológicas e estruturais nas células são eventos comuns após a exposição a agentes tóxicos e a análise morfológica das células por microscopia é uma ferramenta preditiva de toxicidade. Em nossos resultados, foi demonstrado que o NAMI-A induz alterações morfológicas e estruturais tais como perda das projeções citoplasmáticas, formato arredondado e maior granulosidade das células (Figura 31). Tais características evidenciam indícios da ocorrência de um processo de morte celular. Também foi notada menor confluência celular no tratamento com NAMI-A, o que é indicativo de toxicidade já que esta observação está relacionada ao menor número de células viáveis. Gava *et al* (2005) também observaram alterações morfológicas em células

B16F10 tratadas com 10 e 100 μM de NAMI-A em um período de 48 horas. Após o tratamento com 100 μM , as células apresentaram um aspecto achatado e arredondado e livre de projeções citoplasmáticas, assim como identificamos em nossa análise.

A literatura descreve que o NAMI-A apresenta baixa citotoxicidade *in vitro*. Nos nossos estudos, realizamos experimentos com doses maiores e que ainda não tinham sido relatadas (doses de até 4000 μM) e comprovamos acentuada citotoxicidade *in vitro* do NAMI-A. Assim, investigações futuras sobre os efeitos deste composto em doses elevadas poderão agregar novos conhecimentos acerca deste composto, bem como guiar novos estudos complementares *in vitro* e *in vivo* para tornar possível seu uso clínico.

7 CONCLUSÃO

Portanto, neste trabalho, foi demonstrado que a síntese do composto foi bem sucedida e é reprodutível. Os resultados obtidos mostraram que a atuação do NAMI-A foi dependente da dose, tempo e tipo celular e o efeito citotóxico foi mais intenso com doses elevadas (acima de 200 μM), com o decorrer do tempo e em células de carcinoma mamário (linhagem 4T1). Ainda, NAMI-A induziu alterações morfológicas e estruturais como perda de projeções citoplasmáticas, formato arredondado e maior granulosidade em células 4T1 após 24 horas de tratamento, alterações indicativas de toxicidade celular. Ademais, foi observado que o NAMI-A interfere na progressão das células 4T1 no ciclo celular. Em uma dose de 1800 μM houve um maior número de células em sub-G1, o que indica uma maior quantidade de fragmentação do DNA. Sobretudo, observou-se também um acúmulo de células na subfase G2, sugerindo um efeito citostático para o NAMI-A. Sendo assim, estas propriedades, citotóxica e citostática, indicam que esse composto apresenta potencial aplicação para tratamento de câncer metastático.

PERSPECTIVAS FUTUTURAS

Em nosso estudo, NAMI-A apresentou maior efeito citotóxico em células tumorais da linhagem 4T1 do que em fibroblastos da linhagem NIH-3T3. Muitos autores relatam o elevado potencial antimetastático *in vivo* deste composto e é comprovado que o NAMI-A interfere na interação das células tumorais com matriz extracelular, inibindo a degradação da matriz extracelular por meio de metaproteinases, que, por sua vez, ocasiona também uma baixa expressão de proteínas como a TGF b1 desencadeando, portanto, efeito antiangiogênicos. Considerando estes estudos, o NAMI-A poderia impedir a invasão e migração de células malignas para tecidos saudáveis. Dessa forma, é interessante que os efeitos do NAMI-A sejam estudados em modelos animais *in vivo*.

Além disso, para tornar esse composto mais seletivo ainda para células tumorais e metastáticas, poderia ser proposto estudos sobre a agregação de nanopartículas ao NAMI-A, possivelmente baseadas em micelas lipídicas. Outrossim, ensaios sobre a atuação do NAMI-A em estruturas celulares como o citoesqueleto de actina poderia ampliar o conhecimento sobre a ação deste composto tornando possíveis novas ferramentas que explorem alvos celulares de forma dirigida.

REFERÊNCIAS

AITKEN, J. B., ANTONY, S., WEEKLEY, C. M., LAI, B., SPICCIA, L., HARRIS, H. H. Distinct cellular fates for KP1019 and NAMI-A determined by X-ray fluorescence imaging of single cells. **Metallomics**, v. 4, n. 10, p. 1051-1056, 2012.

ALMEIDA, V. L. de; LEITÃO, A.; REINA, L D.C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, n.1, p.118-129, 2005.

ALMENDRO, V.; MARUSYK, A.; POLYAK, K. Cellular Heterogeneity and Molecular Evolution in Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 8, p. 277-302, 2013.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). Breast Cancer. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>. Acesso em 17 de fevereiro de 2016.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007

BAGNARD, V; ROTA, M.; BOTTERI, E.; TRAMACERE, I.; ISLAMI, F.; FEDIRKO, V.; SCOTTI, L.; JENAB, M.; TURATI, F.; PASQUALI, E.; PELUCCHI, C.; BELLOCCO, R.; NEGRI, E.; CORRAO, G.; REHM, J.; BOFFETTA, P.; LA VECCHIA, C. Light alcohol drinki,3ng and cancer: a meta-analysis. **Annals of oncology**, v. 24, n. 2, p. 301-308, 2013.

BARROS, A. C. S. D.; BARBOSA, E. M.; GEBRIM, L. H.; PELIZON, C.; MARTELLA, E.; MOTTA, E.; ARAÚJO, M. B. Diagnóstico e tratamento do câncer de mama. **AMB/CFM-Projeto Diretrizes**, p. 1-15, 2001.

BERALDO, H.; FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T. A Química Inorgânica na Terapia do Câncer. **Química Nova na Escola**, v.1, n. 6, p. 13-18, 2005.

BERGAMO, A.; GAGLIARDI, R.; SCARCIA, V.; FURLANI, A.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; SAVA, G. In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors, and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, n. 1, p. 559-564, 1999.

BERGAMO, A.; MESSORI, L.; PICCIOLI, F.; COCCHIETTO, M.; SAVA, G. Biological role of adduct formation of the ruthenium (III) complex NAMI-A with serum albumin and serum transferrin. **Investigational new drugs**, v. 21, n. 4, p. 401-411, 2003.

BERGAMO, A.; GAIDDON, C.; SCHELLENS, J.H.M.;BEIJNEN, J.H.; SAVA, G. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.106, p.90-99, 2012.

BERGAMO, A.; SAVA, G. Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 31, p. 7817-7823, 2011.

BERTOLLO, C. M. **Mecanismos de morte celular induzida pela radiação γ e expressão de proteínas nas novas linhagens de câncer de mama humano MACL-1 e MGSO-3.** 2010. Tese de doutorado – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BICEK, A.; TUREL, I.; KANDUSER, M.; MIKLAVCIC, D. Combined therapy of the antimetastatic compound NAMI-A and electroporation on B16F1 tumour cells in vitro. **Bioelectrochemistry**, v. 71, n. 2, p. 113-117, 2007.

BOYLE, P.; LEVIN, B. **World cancer report 2008.** IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2008.

BRATSOS, I., JEDNER, S., GIANFERRARA, T., & ALESSIO, E. Ruthenium anticancer compounds: challenges and expectations. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 692-697, 2007.

BRESCACIN, L., MASI, A., SAVA, G., & BERGAMO, A. Effects of the ruthenium-based drug NAMI-A on the roles played by TGF- β 1 in the metastatic process. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 1163-1173, 2015.

BROWN, T. L.; LEMAY, H. E.; BURSTEN, B. E.; BURDGE, J. R. **Química a ciência central.** 9.ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2005.

BRUIJNINCX, P. C. A. SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **ScienceDirect**, v.12, p.197-206, 2008.

CAMPAGNARO, B. P. **Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão renovascular 2r1c sobre células sanguíneas, endoteliais e da medula óssea de camundongos.** 2012. 169 f. Tese de doutorado - Universidade federal do espírito santo, Vitória.

CARNEIRO, M. **Efeitos biológicos de citrato de ródio II livre e de sua associação a nanopartículas magnéticas e a magnetolipossomas em células de carcinoma mamário: estudos in vitro e in vivo.** 2011. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília, Brasília.

CARNEIRO, M. B.; NUNES, E. S.; PEIXOTO, R. C. A.; OLIVEIRA, R. G. S.; LOURENCO, L. H. M.; DA SILVA, I. C. R.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; DE SOUZA, A. R.; LACAVAL, Z. G. M.; BAO, S. N. Free rhodium (II) citrate and rhodium (II)citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 11, 2011.

CARNEIRO, M. L. B; PEIXOTO, R. C. A.; JOANITTI, G. A.; OLIVEIRA, R. G. S; TELLES, L. A.M.; MIRANDA-VILELA, A. L.; BOCCA, A. L.; VIANNA, L. M. S.; DA SILVA, I. C.R. ; DE SOUZA, A. R. ; LACAVAL, Z. G.M ; BÃO, S. N . Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 11, n. 4, 2013.

CARNEIRO, M. L. B. **Alterações morfológicas e estruturais induzidas por um componente do açafrão (*Curcuma longa* L.) em células de melanoma humano em cultura.**2007. 76f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

CASARSA, C.; MISCHIS, M. T.; SAVA, G.. TGF β 1 regulation and collagen-release-independent connective tissue re-modelling by the ruthenium complex NAMI-A in solid tumours. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 98, n. 10, p. 1648-1654, 2004.

COSTA, E. B. O; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 125-136, 2013.

FLOREA, A.M.; BUSSELBERG, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. **Cancers**, v.3, p. 1351-1371, 2011.

FLORES-LUNA, L.; SALAZAR-MARTÍNEZ, E.; DUARTE-TORRES, R.M; TORRES-MEJÍA, G.; ALONSO-RUIZ, P.; LAZCANO-PONCE, E. Factores pronósticos relacionados con la supervivencia del cáncer de mama. **Salud pública de México**, v. 50, n. 2, p.119-125, 2008.

GALLUZZI, L.; SENOVILLA, L.;VITALE,I.; MICHELS, J.; MARTINS, I.; KEPP, O.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncongene**, v.31, p.1869–1883, 2012.

GAVA, B.; ZORZET, S.; SPESSOTTO, P.; COCCHIETTO, M.; SAVA, G. Inhibition of B16 melanoma metastases with the ruthenium complex imidazolium trans-imidazoledimethylsulfoxide-tetrachlororuthenate and down-regulation of tumor cell invasion. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 317, n. 1, p. 284-291, 2006.

GIRIANELLI, V. R.; GAMARRA, C. J.; SILVA, G. A. Os grandes contrastes na mortalidade por câncer do colo uterino e de mama no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 48, n.3, p.459-467, 2014.

GOLFETO, C. C. **Nitrosilo complexos de rutênio: síntese, caracterização e avaliação de suas potencialidades citotóxicas**. 2008. 122f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

GRAMINHA, A. E. **Complexos de Ru e Pd com bases de Schiff de ditiocarbazatos com interesse bioinorgânico e quimioterápico**. 2010.115f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HAN ANG, W.; DYSON, P. J. Classical and Non-Classical Ruthenium-Based Anticancer Drugs: Towards Targeted Chemotherapy. **European journal of inorganic chemistry**, v. 2006, n. 20, p. 4003-4018, 2006.

HARTINGER, C. G.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; JAKUPEC, M. A.; KYNAST, B.; ZORBAS, H.; KEPPLER, B. K. From bench to bedside—preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis (1H-indazole) ruthenate (III)] (KP1019 or FFC14A). **Journal of inorganic biochemistry**, v. 100, n. 5, p. 891-904, 2006.

HILL, A. B. The environment and disease: association or causation? **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.108, n.1, p. 32-37, 2015.

HORIBE, S.; MASTUDA, A.; TANAHASHI, T.; INOUE, J.; KAWAUCHI, S.; MIZUNO, S.; UENO, M.; TAKAHASHI, K.; MAEDA, Y.; MAEGOUCHI, T.; MURAKAMI, Y.; YUMOTO, R.; NAGAI, J.; TAKANO, M. Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dysregulation of cell cycle associated proteins. **Life sciences**, v. 124, p. 31-40, 2015.

HOSTETTER, A. A.; MIRANDA, M. L.; DEROSE, V. J.; HOLMAN, K. L. M. Ru binding to RNA following treatment with the antimetastatic prodrug NAMI-A in *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 16, n. 8, p. 1177-1185, 2011.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n.5, p. 1170-1179, 2008.

INUMARU, L. E.; DA SILVEIRA, E. A.; NAVES, M.M.V. Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. **Cad. Saúde Pública**, v.27, n.7, p. 1259-1270, 2011.

INCA. Instituto Nacional de Câncer Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/boletim_vigilancia_1.pdf>. Acesso em: 26/01/2015.

INCA. Instituto Nacional de Câncer Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 26/01/2015.

INCA. Instituto Nacional de Câncer Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/deteccao_precoce>. Acesso em: 26/01/2015.

INCA. Instituto Nacional de Câncer Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=2>>. Acesso em: 10/02/2015.

JAKUPEC, M. A.; GALANSKI, M., ARION, V. B.; HARTINGER, C. G.; KEPPLER, B. K. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. **Dalton transactions**, n. 2, p. 183-194, 2008.

JAIN, R. K. Domar vasos, técnica para o combate o câncer. **Scientific American Brasil**, n.30, p.66-73, 2003.

JUNQUEIRA, L. C. CARNEIRO, J. **Biologia celular de molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2005.

KIMURA, E. T.; MATSUO, S. E.; RICARTE-FILHO, J. C. TGFbeta, activin and SMAD signalling in thyroid cancer. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 5, p. 683-689, 2007.

KOMOR, A. C.; BARTON, J. K. The path for metal complexes to a DNA target. **Chem. Commun.**, v.49, n.35, p. 3617-3630, 2013.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, Nelson. **Patologia – Bases patológicas das Doenças**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LEE, B.L.; LIEDKE, P. E. R.; BARRIOS, C. H.; SIMON, S. D.; FINKELSTEIN, D. M.; GOSS, P. E. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. **Lancet Oncol.**, v.13, p.95-102, 2012.

LEONARD, G. D.; SWAIN, S. M. Ductal carcinoma in situ, complexities and challenges. **J Natl Cancer Inst**, v. 96, n. 12, p. 906-920, 2004.

LEMOS C. N.; PINHO LOPES, C. A.; CARNEIRO, M. L. B. Rhodium Citrate Associated with Maghemite Nanoparticles Causes DNA Fragmentation Independently of Caspases 3 and Mediated by Reactive Oxygen Species. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 06, p. 1, 2015.

LONARDO, A. D; NASI, S.; PULCIANI, S. Cancer: We Should Not Forget The Past. **Journal of cancer**, v.6, n.1, p.29-39, 2015

MAO, Y.; KELLER, E. T.; GARFIELD, D. H.; SHEN, K.; WANG, J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast câncer. **Cancer Metastasis Ver**, v.32, p. 303-315, 2013.

MARANHO, D. S. **Estudo da associação de complexos nitrosilos de rutênio liberadores de NO com o agente fotossensibilizador zinco ftalocianina ZnPC em sistemas de liberação utilizados na terapia fotodinâmica**. 2008. 110f. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MENDITI, K. B.C.; KANG, H. C. O papel das proteínas histonas nas neoplasias hematológicas. **Rev. bras. cancerol**, v. 53, n. 4, p. 453-460, 2007.

MENDONÇA, B. B.; DOS SANTOS, M. K. F.; SILVA, I. C. R. da. Os eventos biológicos, especialmente os mecanismos epigenéticos, são alterados pela exposição do indivíduo a radiação ionizante. **Acta de Ciências e Saúde**, v.1, n.2, p.50-67, 2013.

MESTRONI, G.; ALESSIO, E.; SAVA, G. New salts of anionic complexes of Ru (III), as antimetastatic and antineoplastic agents. **International Patent PCT C F**, v. 7, p. 15, 1998.

MULLER, H.R.; PRADO, K. B. Epigenética: Um Novo Campo da Genética. **RUBS**, v.1, n.3, p.61-69, 2008.

MURA, P.; CAMALLI, M.; MESSORI, L.; PICCIOLI, F.; ZANELLO, P.; CORSINI, M. Synthesis, Structural Characterization, Solution Chemistry, and Preliminary Biological Studies of the Ruthenium (III) Complexes [TzH][trans-RuCl₄ (Tz) 2] and [TzH][trans-RuCl₄ (DMSO)(Tz)][⊖](DMSO), the Thiazole Analogues of Antitumor ICR and NAMI-A. **Inorganic chemistry**, v. 43, n. 13, p. 3863-3870, 2004.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de Platina(II) na Terapia do Câncer. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p.196-209, 2011.

OLIVEIRA, N. F. P.; PLANELLO, A. C.; ANDIA, D. C.; PARDO, A. S. Metilação de DNA e Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 4, p. 493-499, 2010.

OLIVEIRA, R. B. de; ALVES, R. J. Agentes Antineoplásicos Biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, n.6, 2002.

PEIXOTO, R. C. A. **Avaliação toxicológica e antitumoral do tratamento sistêmico com citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas de maghemita em modelo**

experimental de câncer de mama. 2012. 106f. Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília, Brasília.

PEIXOTO, R. C. A.; MIRANDA-VILELA, A. L.; FILHO, J. S.; CARNEIRO, M. L. B.; OLIVEIRA, R. G. S.; DA SILVA, M. O. DE SOUZA, A. R. ; BÁO, S. N. Antitumor effect of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles on mice bearing breast cancer: a systemic toxicity assay. **Tumor Biology**, v. 14, p. 2966, 2014.

PERES, C. M. R. C. **Como cultivar células.** Guanabara Koogan (Grupo GEN), 2005.

PINHEIRO, A.B.; LAUTER, D.S.; MEDEIROS, G. C.; CARDOZO, I.R.; MENEZES, L. M.; SOUZA, R. S.B.; ABRAHÃO, K.; CASADO, L.; BERGMANN, A.; SANTOS THULER, L. C. S. Câncer de Mama em Mulheres Jovens: Análise de 12.689 Casos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.59, n.3, p. 351-359, 2013.

PLUIM, D.; VAN WAARDENBURG, R. C.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. Cytotoxicity of the organic ruthenium anticancer drug Nami-A is correlated with DNA binding in four different human tumor cell lines. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 54, n. 1, p. 71-78, 2004.

QIAN, C.; WANG, J. Q.; SONG, C. L.; WANG, L. L.; JI, L. N.; CHAO, H. The induction of mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells by ruthenium (ii) asymmetric complexes. **Metallomics**, v. 5, n. 7, p. 844-854, 2013.

RIBEIRO, A. de S. B. B. **Avaliação da Atividade Genotóxica do Composto Cloreto de cis-tetraaminodiclororutênio (III) sobre Cultura de Linfócitos do Sangue Periférico.** 2008. 93f. Dissertação de Mestrado – Universidade de Goiânia, Goiânia.

REIBSCHEID, E. M.; ZYNGIER, S.; MARIA, D. A.; MISTRONE, R. J.; SINISTERRA, R. D.; COUTO, L. G.; NAJJAR, R. Antitumor effects of rhodium (II) complexes on mice bearing Ehrlich tumors. Brazilian journal of medical and biological research. **Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica**, v. 27, n. 1, p. 91-94, 1994.

ROSA, L. M.; RADUNZ, V. Taxa de sobrevivência na mulher com câncer de mama: estudo de revisão. **Texto Contexto – Enferm**, v.21, n.4, p. 980-989, 2012.

SANTOS, R. L. S. R. **Metalofármacos de dirutênio (II,III): síntese, caracterização e interações com biomoléculas e ciclodextrina.** 2012. 204f. Tese de doutorado – Universidade de São Paulo, São Paulo.

SANTOS, R. R. P. dos. **Metalofármacos de rutênio: síntese, caracterização, atividade frente a linhagem celular K562 e estudos de interação com a albumina de soro humana (HSA).** 2009. 37f. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, São Paulo.

SAVA, G.; BERGAMO, A.; ZORZET, S.; GAVA, B.; CASARSA, C.; COCCHIETTO, M.; ALESSIO, E. Influence of chemical stability on the activity of the antimetastasis ruthenium compound NAMI-A. **European Journal of Cancer**, v. 38, n. 3, p. 427-435, 2002.

SEMOLIN, L. M. S.; ANAI, L. A.; MUNHOZ, T. D.; VIEIRA, M. C.; VARALLO, G. R.; PADUA, I. R. M.; SANTANA, A. E. Associação entre as metaloproteinases de matriz e a expansão tumoral. **Revista Investigação**, v. 14, n. 6, 2015.

SHRIVER, D.F.; ATKINS, P.W. **Química Inorgânica**, 3.ed.Porto Alegre: Bookman, 2003.

SILVA, R. C. F.; HORTALE, V. A. Rastreamento do Câncer de Mama no Brasil: Quem, Como e Por quê?. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n.1, p.67-71, 2012.

SILVA, A.P.S.; OLIVEIRA, M.S.; SOUSA, F.S.; FERNANDES, A.F.C.; BEZERRA, A.K.P. Promoção da saúde nas políticas públicas direcionadas ao câncer de mama. **Cienc Cuid Saude**, v.10, n.2, p. 389-394, 2011.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**, vol. 1, 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.

SON B.H.; KWAK B.S.; KIM J.K.; KIM, H.J.; HONG, S.J.; LEE, J.S.; HWANG, U.K.; YOON, H.S.; AHN, S.H. Changing patterns in the clinical characteristics of Korean patients with breast cancer during the last 15 years. **Arch Surg**, v.141, n.2, p.155-160, 2006.

TAVASSOÉLI, F. A.; DEVILEE, P. World health organization classification of tumors. In: (Ed.). **Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs**, v.4, 2003.

WARD, L. S. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 4, agosto, 2002.

WEIDMANN, A. G.; KOMOR, A. C.; BARTON, J. K. Targeted Chemotherapy with Metal Complexes. **Comments on Inorganic Chemistry: A Journal of Critical Discussion of the Current Literature**, v.34, p.114-123, 2014.