



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

MICHELLE CORRÊA DA ROCHA

**INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES CITOTÓXICAS E IMUNOLÓGICAS
DE COMPLEXOS DE PALÁDIO(II) *IN VITRO* UTILIZANDO O MODELO
EXPERIMENTAL DE EHRLICH**

ARARAQUARA

2007



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

MICHELLE CORRÊA DA ROCHA

**INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES CITOTÓXICAS E IMUNOLÓGICAS DE
COMPLEXOS DE PALÁDIO(II) *IN VITRO* UTILIZANDO O MODELO
EXPERIMENTAL DE EHRLICH**

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Farmacêuticas - Campus de
Araraquara – UNESP como requisito
para a obtenção do título de mestre do
Programa de Mestrado em Análises
Clínicas**

**Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos
Co-orientadora: Profa. Dra. Sandra Regina Ananias**

ARARAQUARA

2007

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

R672i Rocha, Michelle Corrêa da
Investigação das propriedades citotóxicas e imunológicas de complexos de paládio(II) *in vitro* utilizando o modelo experimental de Ehrlich. / Michelle Corrêa da Rocha . – Araraquara, 2007.
106 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Iracilda Zeppone Carlos

Co-orientador: Sandra Regina Ananias

1.Complexos de Pd(II). 2.Tumor de Ehrlich. 3.Macrófagos. 4.Citocinas.
I.Carlos, Iracilda Zeppone, orient.. II.Ananias, Sandra Regina. III. Título.

CDD: 615.37

CAPES:40300005

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha família e a meu namorado

Vocês que estiveram ao meu lado nas horas tristes ou alegres,
que me ampararam e incentivaram para eu seguir sempre em frente,
que acreditaram no meu potencial.

Gostaria de agradecê-los imensamente pelo apoio....

Sei que vocês sempre serão personagens presentes em toda a história de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus*,
por ter guiado meus caminhos,
por ter me dado fé e força pra seguir em frente,
pela serenidade que tive para aceitar as coisas e entender que tudo tem uma razão de ser.

Agradeço à minha orientadora **Prof. Dra. Iracilda Zeppone Carlos**,
Por acreditar no meu potencial, pelos ensinamentos,
oportunidades oferecidas e por respeitar minhas decisões.
Enfim, pelas inestimáveis contribuições ao meu aprendizado e crescimento.
Muito obrigada pela orientação desde a época da especialização.

Agradeço à minha co-orientadora **Prof. Dra. Sandra Regina Ananias**,
por sua disposição a co-orientar este trabalho, seu incentivo e prontidão.
Por ser acima de tudo uma amiga muito especial...
Muito obrigada pela ajuda, atenção, companheirismo, dedicação e amizade.
Defino nossa amizade como uma orquídea: bela e, se bem cultivada, eterna...

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."

(Charles Chaplin)

Agradeço aos meus amigos sinceros que conquistei ao longo da vida: **Alexandre, Camila, Elisa, Flávia, Fabiana, Gisleine, Jamile, João, Juliana, Milene, Mônica, Otaviano e Tatiana.**

“Preciso de alguém que me olhe nos olhos quando falo, que ouça as minhas tristezas e neuroses com paciência.

E, ainda que não compreenda, respeite os meus sentimentos.

Preciso de alguém, que venha brigar ao meu lado sem precisar ser convocado;

Alguém amigo o suficiente para dizer-me verdades que não quero ouvir, mesmo sabendo que posso odiá-lo por isso...

...Que teime em ser leal, simples e justo, que não vá embora se algum dia eu perder meu ouro e não for mais a sensação da festa.

Preciso de um amigo que receba com gratidão o meu auxílio,

A minha mão estendida, mesmo que isto seja muito pouco para as suas necessidades.

Preciso de um amigo que também seja companheiro, nas farras, nas guerras e alegrias, e que no meio da tempestade, grite em coro comigo:

“Nós ainda vamos rir muito disso tudo” e ria muito mesmo.

E nessa busca, empenho minha alma, pois com uma amizade verdadeira, a vida se torna mais simples, mais rica e bela....”

(Charles Chaplin)

Eu não procuro mais amigos, pois vocês estão presentes na minha vida.

Dizem que no decorrer da nossa vida somente poucos serão nossos verdadeiros amigos, mas acredito que tive sorte pois já conquistei o suficiente para sentir que não estou sozinha e tenho com quem contar.

Obrigado por ajudarem na minha caminhada.

Contem sempre comigo!

Aos nobres amigos do laboratório de Imunologia Clínica e do laboratório de Organometálicos:

Adelino, Alessandra, Alexandre, Ana Carolina, Ana Cláudia, Ana Elisa, Anderson, Ângela, Cleni, Camila, Daniela, Danielle, Djamile, Fernanda (Ber), Fernanda, Flávia, Francini, Juliana, Marisa, Micheli, Oedem, Paulinha, Sandra.

Saudade...

Um dia a maioria de nós irá se separar.

Sentiremos saudades de todas as conversas jogadas fora, das descobertas que fizemos, dos sonhos que tivemos, dos tantos risos e momentos que compartilhamos

Saudades até dos momentos de lágrimas, da angústia, das vésperas de finais de semana, de finais de ano, enfim! ... do companheirismo vivido.

Sempre pensei que as amizades continuassem para sempre.

Hoje não tenho mais tanta certeza disso.

Em breve cada um vai pra seu lado, seja pelo destino, ou por algum desentendimento, segue a sua vida, talvez continuemos a nos encontrar quem sabe ... nos e-mails trocados.

Podemos nos telefonar... conversar algumas bobagens....

Passam os dias, vão passar meses... anos... até este contato tornar-se cada vez mais raro

Vamos nos perder no tempo... Um dia nossos filhos verão aquelas fotografias e perguntarão?

Quem são aquelas pessoas?

Diremos... Que eram nossos amigos

.....E isso vai doer tanto.....

Foram meus amigos, foi com eles que vivi os melhores anos de minha vida!

A saudade vai apertar bem dentro do peito.

Vai dar uma vontade de ligar, ouvir aquelas vozes novamente...

Quando o nosso grupo estiver incompleto... nos reuniremos para um último adeus de um amigo.

E entre lágrimas nos abraçaremos. Faremos promessas de nos encontrar mais vezes daquele dia em diante

Por fim, cada um vai para o seu lado para continuar a viver a sua vidinha isolada do passado.

E! nos perderemos no tempo...

Por isso, fica aqui um pedido deste humilde amigo: não deixes que a vida passe em branco, e que pequenas adversidades seja a causa de grandes tempestades...

Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!"

(Autor desconhecido)

Em especial...

Fernanda (Ber)

Agradeço à minha amiga uma, duas, três, catorze vezes!(risos).

Essa seqüência numérica não muito didática representa bem a nossa amizade...

Esta amizade sempre será lembrada como uma vertigem (Vertigo!),

seja em estádios, festas, etc.

Sempre levarei comigo o bordão: “Que nerrrrrvo!!!!” e assim, nos momentos de estresse, que ainda serão muitos ao longo da vida, pronunciarei esta frase em sua homenagem.

Valeu por tudo amiga!

Dani (Ser)

Agradeço a essa garota de Bauru, sem qualquer alusão a Cazuzza (risos), por ter sido uma “amica” muito especial e sempre disposta a ajudar, uma das primeiras pessoas com quem tive contato no laboratório e uma das pessoas que mais colaboraram em minhas diversas etapas que vivenciei no mestrado.

Enfim, agradeço pela amizade, apoio e constante assessoria na execução deste trabalho.

Saiba que sempre que precisar pode contar comigo!

Flávia

Agradeço pelo companheirismo, colaboração, pela agradável companhia no laboratório e em passeios gastronômicos (risos). Pessoa calma e centrada, um exemplo de pesquisadora...

Sempre me lembrarei de você!

Micheli (Sassá)

Agradeço à minha quase xará pela ajuda e apoio durante minha permanência no laboratório.

Muito obrigada!

Carol (Polaka)

Agradeço por você ter participado desse período que passei no laboratório...

Sempre me lembrarei de você , seja quando observar algo rosa ou algum animal, especialmente um cachorro

Te considero uma pessoa de uma extrema sensibilidade,

Afinal, quem ama os animais não pode ser uma má pessoa.

Te adoro!

Marisa

Acima de tudo amiga, minha companheira de aniversários, de risadas, e de trabalho...

Enfim, uma pessoa que participou em todos meus momentos no laboratório e que me ensinou muito do que sei hoje.

Sou muito grata a você...

Não tenho palavras que possam expressar minha eterna gratidão!

“As pessoas entram em nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem.”

(Lilian Tonet)

Fabiana (cabeção)

Agradeço a você minha amiga de caminhadas, “bafões”, risadas, uma irmã de coração.

Afinal, amigos são a família que Deus nos permite escolher...

Foram tantos momentos bons que nem sei se existiram momentos ruins e,
se por acaso existiram já esqueci...

Saiba que você sempre estará em minhas orações e que torço muito pela sua felicidade.

“Vivemos esperando

Dias melhores

Dias de paz, dias a mais

Dias que não deixaremos para trás

Vivemos esperando

O dia em que seremos melhores

Melhores no amor, melhores na dor

Melhores em tudo

Vivemos esperando

O dia em que seremos para sempre

Vivemos esperando

Dias melhores para sempre (...)”

(Rogério Flausino)

“Tudo o que chega, chega sempre por alguma razão.”

(Fernando Pessoa)

À minha orientadora da iniciação científica Profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino que, por ter acreditado que tinha potencial, me iniciou na carreira científica e me ensinou muito do que sei hoje. Você sempre será sempre lembrada a cada conquista acadêmica que acontecer em minha vida. Afinal, a primeira orientadora a gente nunca esquece!

Ao Prof. Dr. Antonio Eduardo Mauro, sem cuja competência, amizade e disposição em ceder os compostos sem os quais este trabalho não teria sido concretizado.

À Profa. Dra. Denise Fecchio, pelo estímulo ao estudo do Tumor de Ehrlich, por ceder tal linhagem tumoral ao laboratório e pelas inestimáveis contribuições ao meu aprendizado e crescimento através da participação nas bancas de qualificação e defesa de meu trabalho.

À Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares por ter aceitado participar em banca de defesa e pela valiosa contribuição para meu trabalho.

À Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado pela colaboração e amizade.

À Laura, Cláudia e Sônia do departamento de pós-graduação em Análises Clínicas pela prestatividade, ajuda e eficiência ao longo do meu curso de pós-graduação.

Às porteiras Rita, Luzia e Márcia pelo “bom dia” alegre de todos os dias, pela amizade e pelo companheirismo.

Ao Marcos, técnico do laboratório de Bioquímica, e Rosângela e Elaine, técnicas do laboratório de Micologia Clínica pela colaboração.

À Ana Cristina e Sônia, bibliotecárias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, pela colaboração na correção das referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica.

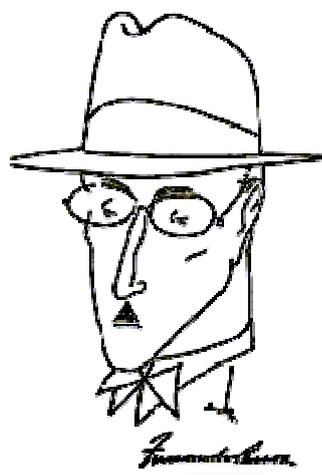
Aos colegas do NAC Milton, Keila, Fátima, Maria Amélia, Cida, Germano, Márcia, Flávia, Edson, Matilde e Anelisa pelo companheirismo, participando em meu dia a dia durante todos esses anos na Unesp.

Aos Senhores Irineu, “Bolão” e Mário pela ajuda quando precisei nos vários anos vividos na cidade de Araraquara.

Ao CNPq pela concessão de bolsa.

Eu amo tudo o que foi,
Tudo o que já não é,
A dor que já me não dói,
A antiga e errônea fé,
O ontem que dor deixou,
O que deixou alegria

Só porque foi, e voou
E hoje é já outro dia.
Fernando Pessoa, 1931.



SUMÁRIO

RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XV
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJETIVOS.....	15
2.1. Geral.....	15
2.2. Específico.....	15
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Delineamento experimental.....	16
3.1.1. Obtenção das células tumorais de Ehrlich para os ensaios <i>in vitro</i> e inoculação dos animais.....	16
3.1.2. Obtenção das células aderentes peritoneais e linfócitos de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich.....	17
3.2. Complexos organometálicos.....	18
3.2.1. Preparo das soluções-mãe dos complexos.....	18
3.3. Animais.....	19
3.4. Linhagem celular tumoral utilizada e manutenção do tumor <i>in vivo</i>	19
3.4.1. Inoculação das células tumorais.....	20
3.4.2. Determinação do volume dos tumores.....	20
3.5. Obtenção de células tumorais, peritoneais e linfócitos.....	20
3.5.1. Isolamento das células tumorais de Ehrlich para os ensaios <i>in vitro</i>	20
3.5.2. Obtenção de células peritoneais e dos sobrenadantes das culturas.....	21
3.5.3. Obtenção de linfócitos totais e dos sobrenadantes das culturas.....	22
3.6. Viabilidade celular pela técnica de MTT.....	23
3.6.1. Ajuste das concentrações das suspensões de células tumorais, peritoneais e de linfócitos.....	23
3.6.2. Ensaio de viabilidade celular de células tumorais e células aderentes.....	23
3.6.3. Ensaio de viabilidade celular de linfócitos totais obtidos a partir de linfonodos.....	24
3.7. Ensaios para verificação da ativação de células aderentes ou linfócitos <i>in vitro</i>	25
3.7.1. Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	25
3.7.2. Óxido Nítrico (NO).....	26
3.7.3. Determinação da atividade inibitória dos compostos em culturas de células aderentes quanto à produção de H ₂ O ₂ e NO.....	27
3.7.3.1. Quanto à produção de H ₂ O ₂	27
3.7.3.1. Quanto à produção de NO.....	27

3.7.3.3.	Cálculo da porcentagem de inibição.....	28
3.7.4.	Quantificação de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	28
3.7.5.	Medida da atividade citotóxica mediada pelas células aderentes.....	29
3.7.6.	Análise estatística.....	31
IV.	RESULTADOS.....	32
4.1.	Determinação da viabilidade celular das células tumorais, aderentes e linfócitos pela técnica de MTT.....	32
4.2.	Produção de H ₂ O ₂ por células aderentes de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich.....	35
4.3.	Produção de NO por células aderentes de camundongos portadores do tumor sólido Ehrlich.....	39
4.4.	Determinação da inibição de H ₂ O ₂ e NO.....	43
4.5.	Determinação da citocina TNF- α nos sobrenadantes das culturas de células aderentes.....	44
4.6.	Determinação da citocina IL-1 β nos sobrenadantes das culturas de células aderentes.....	47
4.7.	Determinação da citocina IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de linfócitos.....	50
4.8.	Quantificação da atividade citotóxica/citolítica das células aderentes frente às células tumorais de Ehrlich.....	53
V.	DISCUSSÃO.....	56
VI.	CONCLUSÕES.....	77
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

RESUMO

O câncer destaca-se pela alta incidência e mortalidade. O tratamento do câncer compreende cada vez mais a quimioterapia combinada, ou seja, substâncias antitumorais agindo conjuntamente com as células do sistema imune, potencializando-as ou apenas mantendo-as viáveis para exercerem sua função. Dentre os tipos celulares que constituem o sistema imunológico, os macrófagos são apontados como os principais elementos do organismo de combate aos tumores. Os macrófagos ativados agem liberando produtos tais como radicais de oxigênio (H_2O_2) e nitrogênio (NO), interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral (TNF- α), que são prejudiciais às células tumorais dependendo da concentração, além de sua ação indireta através da secreção de interferon-gama (IFN- γ). Complexos de paládio(II) são investigados há décadas, destacando-se por sua potencialidade como agente antitumoral. Neste trabalho avaliou-se a ação dos compostos $[Pd(dmmba)(X)(dppp)]$ ($X= SCN, NCO, N_3$ ou Cl) sobre as células tumorais de Ehrlich e macrófagos *in vitro*, utilizando como padrão a *cis*-platina (*cis*-Pt). Para tanto, foram realizados ensaios para determinação do índice de citotoxicidade mediano, o IC_{50} , para cada composto pelos períodos de 24 e 48h e com base em tais concentrações investigadas para os macrófagos verificou-se a produção e/ou inibição de NO e H_2O_2 , além das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-1 bem como a atividade citotóxica/citolítica. Os compostos demonstraram ser agentes promissores por seus efeitos sobre as células tumorais e imunes, muitas vezes de forma igual ou superior à *cis*-Pt, droga de uso corrente na quimioterapia do câncer.

ABSTRACT

The cancer is a disease with high incidence and mortality. The cancer treatment involves the combined chemotherapy with one involves antitumour substances acting along with the immune cells, stimulating or only keeping them able to act in the immune response. Between the cell types that belong to the immunological system, the macrophages are considered the main elements of the body that can act against tumours. The activated macrophages act releasing substances like oxygen (H_2O_2) and nitrogen (NO) radicals, interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor alpha ($\text{TNF-}\alpha$), which are not beneficial to the tumour cells in some concentrations, besides its indirect action towards interferon-gamma ($\text{IFN-}\gamma$) release. Palladium(II) complexes are employed in many studies to verify its antitumour properties. For example we can describe the four following compounds: $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{X})(\text{dppp})]$, X= **SCN**, **NCO**, **N₃** or **Cl**. This work had as goal the evaluation of the action of such compounds towards Ehrlich tumour cells, macrophages and lymphocytes *in vitro*, employing *cis*-platin (*cis*-Pt) as standard. The following parameters were evaluated: the cytotoxic index (IC_{50}) of each compound after 24 and 48h incubation for Ehrlich tumour cells, macrophages and lymphocytes; the immunological behaviour of the compounds in the concentrations previously determined such as NO and H_2O_2 production or inhibition, besides the cytokines $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ and IL-1 as well as the cytotoxic/cytolytic activity. The compounds presented a good behaviour, based on their effects towards tumour and immune cells, many times like or even better than *cis*-Pt, standard drug in cancer chemotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema de formação do anel ciclometalado.....	5
Figura 2	Efeito dos compostos na produção de peróxido de hidrogênio em culturas de células peritoneais.....	37
Figura 3	Produção de óxido nítrico em culturas de células peritoneais aderentes.....	41
Figura 4	Produção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de células aderentes.....	45
Figura 5	Produção de interleucina-1 β nos sobrenadantes das culturas de células aderentes.....	48
Figura 6	Produção de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de linfócitos extraídos de linfonodos.....	51
Figura 7	Medida da atividade citotóxica mediada pelas células aderentes.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito do solvente DMSO na viabilidade das células tumorais, aderentes e linfócitos.....	32
Tabela 2	Valores de IC ₅₀ dos compostos para as células tumorais de Ehrlich após 24 ou 48h de exposição.....	33
Tabela 3	Valores de IC ₅₀ dos compostos para as células aderentes peritoneais de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich após 24 ou 48h de exposição.....	34
Tabela 4	Valores de IC ₅₀ dos compostos para os linfócitos totais dos camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich após 24 ou 48h de exposição.....	34
Tabela 5	Efeitos dos compostos na produção de peróxido de hidrogênio em culturas de células peritoneais.....	38
Tabela 6	Efeitos dos compostos na produção de óxido nítrico em culturas de células aderentes.....	42
Tabela 7	Porcentagem de inibição dos compostos sobre a produção de H ₂ O ₂ em células peritoneais de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich após exposição ao IC ₅₀ de 24(B) ou 48(A) h.....	43
Tabela 8	Porcentagem de inibição dos compostos sobre a produção de NO em células aderentes de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich após exposição ao IC ₅₀ de 24(A) ou 48(B) h.....	43
Tabela 9	Efeito dos compostos na produção de TNF- α em culturas de células aderentes.....	46
Tabela 10	Efeito dos compostos na produção de IL-1 β em culturas de células aderentes	49
Tabela 11	Efeitos dos compostos na produção de IFN- γ em culturas de Infócitos	52
Tabela 12	Citotoxicidade de células aderentes após exposição aos compostos.....	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C: Graus Celsius
CO₂: Dióxido de Carbono
NaOH: Hidróxido de sódio
H₂SO₄: Ácido sulfúrico
NaCl: Cloreto de sódio
NH₄Cl: Cloreto de amônio
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
O₂⁻: ânion superóxido
ONOO⁻: Peroxinitrito
OH⁻: Íon hidroxila
NaNO₂: Nitrito de sódio
NO: Óxido nítrico
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio
Con A: Concanavalina A
ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay
LPS: Lipopolissacarídeo
BSA: Soro albumina bovina
PBS: Solução salina tamponada de fosfatos
PBS-T: Solução salina tamponada de fosfatos-Tween
SDS: Duodecil sulfato de sódio
PMA: Phorbol 1, 2 –myristate 13-acetate
ERNs: Espécies reativas de nitrogênio
EROs: Espécies reativas de oxigênio
ROIs: Resativos intermediários de oxigênio
RNIs: Reativos intermediários de nitrogênio
NOS: Óxido nítrico sintase
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo
TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa
IL: Interleucina
IFN-γ: Interferon-gama
N: Normalidade
nmols: Nanomols
pg: Picogramas
μmols: Micromols
mg: Miligramas
mL: Mililitros
μg: Microgramas
μL: Microlitros
μCi: Micro quirri
μmol.L⁻¹/μM: Micromolar
mM: Milimolar
g: Gramas
h: Hora
min.: Minutos
xg: Gravidade
v/v: Volume/volume

cm³: Centímetros cúbicos
L: Litro
IC₅₀: Índice de citotoxicidade mediano
UV: Ultravioleta
RPMI: Meio de cultura
DMSO: Dimetilsulfóxido
dmba: N, N- dimetilbenzilamina
dppp: 1,3-bis(difenilfosfina)propano
NK: *Natural Killer*
Timidina-H³: Timidina triciada
ANOVA: Análise de variância
C+: Controle positivo
C-: Controle negativo
DP: Desvio-padrão
AP-1: Proteína transcricional
NF- κβ: Fator nuclear kappa beta
RNA: Ácido ribonucléico
DNA: Ácido desoxirribonucléico
p-is.TSCN : Tiosemicarbazona p-isopropilbenzaldeído

Capítulo 1

I. INTRODUÇÃO

O câncer, nome genérico dado ao grupo de condições clínicas originadas pelo crescimento descontrolado de células em alguma parte do corpo, é uma doença que afeta milhões de indivíduos (PIVETTA, 2004).

Dentre os tipos de câncer, o de mama destaca-se como sendo o segundo mais freqüente no mundo e o primeiro entre as mulheres. O número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2006 foi de 48.930, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2006).

O câncer é tratado por cirurgia, radiação, hormônios, imunoterapia e quimioterapia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2006), sendo que a quimioterapia é geralmente o tratamento aplicado para mulheres com câncer de mama resistentes a hormônios, metástase ou doença de rápido desenvolvimento (DECATRIS et al., 2004). Uma das tentativas de inibir o crescimento desta doença é deter o fluxo de informação genética, sendo o DNA considerado o principal alvo de ação direta dos vários agentes anticancerígenos utilizados (BAKHTIAR e OCHIACHI, 1999), como é o caso da *cis*-platina (*cis*-Pt). A descoberta da atividade biológica da *cis*-diaminodichloroplatina(II) e da *cis*-diaminotetracloroplatina(IV), *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] e *cis*-[PtCl₄(NH₃)₂], respectivamente, na década de 1960 deu-se por Rosenberg (ROSENBERG et al., 1969).

Testes clínicos iniciais realizados por Hill e Speer no ano de 1971 mostraram que a *cis*-Pt é ativa contra certas malignidades (HILL e SPEER, 1982). Por mais de 25 anos a *cis*-Pt continuou desempenhando um importante papel dentre os agentes citotóxicos no tratamento de doenças epiteliais. A *cis*-Pt, geralmente em combinação com outras drogas, está sendo utilizada como quimioterápico de primeira linha contra cânceres de pulmão, cabeça e pescoço, ovários, esôfago, estômago, cólon, bexiga, testículos, cérvix, útero e como tratamento de segunda linha contra a maioria dos cânceres em estágio avançado como câncer

de pâncreas, fígado, rim, próstata bem como glioblastomas, melanomas metastáticos, e mesoteliomas peritoneais ou pleurais (STATHOPOULOS et al., 1999; BOULIKAS e VOUGIOUKA, 2004). A terapia com *cis*-Pt é considerada o tratamento de escolha na quimioterapia do câncer cervical, em combinação com a radioterapia. A eficiência da *cis*-Pt está relacionada ao seu principal mecanismo de atuação: sua capacidade de se coordenar ao DNA genômico, deformando, desenrolando ou distorcendo a dupla-hélice do DNA. Tal mecanismo se dá pela formação de adutos com o DNA, sendo que a maioria dos adutos formados pela *cis*-Pt e o DNA são bem conhecidos, nos quais os dois átomos de cloro da *cis*-Pt são substituídos por átomos de nitrogênio da posição N(7) das bases purínicas adjacentes, fato que está relacionado a seu efeito citotóxico (KOMEDA et al., 2003).

O principal mecanismo da citotoxicidade da *cis*-Pt provém de sua capacidade em reagir mono ou bi-funcionalmente com o DNA. A *cis*-Pt induz os ligações cruzadas intra-filamentos do 1,2- d(GpG) e d(ApG), comprometendo 90% dos adutos da *cis*-Pt (BELLON et al., 1991). Em menor proporção, a *cis*-Pt induz ligações cruzadas intra-filamentos do 1,3- d(GpTpG) (BURSTYN et al., 2000; LEE et al., 2002; JUNG e LIPPARD, 2003). Como exemplo, pode-se citar a ligação cruzada 1,2-intra-filamentos promovida pela *cis*-Pt em células de câncer testicular que, em conjunto com complexos do antígeno prostático específico, parece aumentar a sua citotoxicidade devido ao bloqueio do reparo de tais lesões, presumivelmente mais eficaz que em outros tecidos; isto poderia explicar a efetividade da *cis*-Pt contra o câncer testicular (ZAMBLE et al., 2002).

Entretanto, sua utilização clínica contínua não pode ocorrer devido às reações adversas severas decorrentes deste uso, as quais incluem toxicidade aguda como náusea e vômito, e efeitos adversos crônicos como nefrotoxicidade, ototoxicidade (BOULIKAS, 2004) e neurotoxicidade (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2006; DECATRIS et al., 2004). A neurotoxicidade da *cis*-Pt é um de seus principais fatores limitantes em decorrência da perda de senso de vibração, parestesia e ataxia sensorial resultante após vários ciclos de tratamento.

A ototoxicidade é também um efeito adverso limitante da administração da *cis*-Pt devido a sua propensão a induzir a destruição das células ciliadas e neurônios no sistema auditivo.

Ainda, a *cis*-Pt induz o estresse oxidativo nas células do túbulo renal levando à morte por apoptose (SCHAAF et al., 2002). Outros efeitos colaterais incluem a toxicidade gastrointestinal e astenia. (VERMORKEN et al., 1983; LAURELL e BAGGER-SJOBACK, 1991; Mc KEAGE, 1995; DEVARAJAN et al., 2002). A *cis*-Pt é a que mais provoca emese dentre as drogas antitumorais de uso comum; a emese aguda é mediada pela liberação de serotonina pelas células mucosas tipo enterocromafina encontradas na parede do estômago e estimulação de receptores 5-Ht3 para serotonina (McKEAGE, 1995). Além disso, o alto potencial mutagênico da *cis*-Pt aumenta a preocupação de que seu uso na quimioterapia do câncer possa ser responsável por malignidades secundárias, as quais têm sido observadas em animais e alguns pacientes tratados com tal droga (ALY et al., 2003).

Muitos dos efeitos adversos da *cis*-Pt são amenizados, na maioria dos casos, com a associação com outras drogas. Como exemplo pode-se citar a hidratação com salina para evitar o dano tubular renal severo que leva à redução da filtração glomerular causado pela *cis*-Pt (Mc KEAGE, 1995). Porém, um outro aspecto limitante do uso da *cis*-Pt e que não se pode evitar, é que alguns tumores apresentam resistência natural a esta, enquanto outros desenvolvem esta resistência após o início do tratamento. Tal resistência natural ou após tratamento contínuo ocorre devido a pelo menos três mecanismos básicos: (a) redução do transporte através da membrana celular (WAUD, 1987), (b) forte ligação para inativar ligantes tiolato dentro das células (MEIJER et al., 1990) e (c) existência de enzimas que promovem reparo das lesões no DNA causadas pela platina (EASTMAN e SCHULTE, 1988).

Estas e outras desvantagens associadas com a toxicidade da *cis*-Pt são as maiores motivações para o desenvolvimento de novas drogas antitumorais (WONG e GIANDOMENICO, 1999) contendo outros íons metálicos como o paládio(II) (COSTA, 2004; DE ALMEIDA et al., 2005; NAVARRO et al., 2006). Nas duas últimas décadas, o interesse

em compostos contendo platina(II) e paládio(II) tem aumentado a fim de se obter drogas constituídas por metais exibindo elevada atividade antitumoral além de reduzida citotoxicidade em comparação à *cis*-Pt e compostos análogos (ALVERDI et al., 2004). Assim, apesar da efetividade da *cis*-Pt ser alta, sua toxicidade justifica a demanda de melhores formulações desta droga. Após mais de 20 anos de pesquisa a fim de se melhorar a efetividade da *cis*-Pt, centenas de drogas de platina investigadas resultaram na introdução da carboplatina, largamente utilizada e da oxaliplatina, somente utilizada em poucos tipos de câncer. Vários compostos contendo platina, como por exemplo a nedaplatina, estão sob avaliação clínica (BOULIKAS e VOUGIOUKA, 2003).

Uma das estratégias básicas no desenvolvimento de novas drogas antitumorais a base de metais de transição consiste na síntese de complexos que, mesmo possuindo características estruturais similares a carboplatina ou a *cis*-Pt, sejam capazes de provocar lesões diferentes e irreversíveis na molécula de DNA. No que se refere aos complexos de paládio, observa-se que os mesmos, em geral, possuem uma atividade antitumoral muito pequena quando comparados aos complexos de platina, devendo-se isto a alta labilidade exibida pelos compostos de paládio(II) em meio biológico (NAVARRO – RANNINGER et al., 1993a). Neste sentido, a classe dos compostos *orto*-ciclopaladados tem despertado recentemente grande interesse na aplicação dos mesmos como agentes antineoplásicos por produzirem complexos estáveis o suficiente para permitirem uma eficaz ação da droga no organismo em concentrações muito baixas em relação aos compostos análogos de platina (NAVARRO-RANNINGER et al., 1993b; HIGGINS et al., 1993; CAIRES et al., 1999).

Os ciclometalados de paládio(II) são empregados por nosso grupo de pesquisa na obtenção de espécies com grande potencial antineoplásico, os quais têm apresentado resultados bastante promissores como aumento na expectativa de vida de camundongos tratados com os compostos contendo paládio(II) e na ativação de macrófagos (ROCHA et al., no prelo).

O termo ciclometalado é designado a compostos que possuem em sua estrutura um anel com uma ligação de coordenação entre um metal de transição **M** e um átomo doador de elétrons **Y** pertencente aos grupos 15 (N, P, As) ou 16 (O, S, Se) da tabela periódica, e uma ligação covalente metal-carbono (ANANIAS et al., 2003). A ligação **M-C** é formada pela ruptura intramolecular de uma ligação **C-H** de um complexo de coordenação **M→Y**, sendo **X** um halogênio ou um grupo alquil, como representado na figura 1.

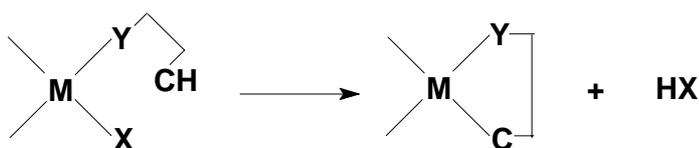


Figura 1 - Esquema de formação do anel ciclometalado.

A reatividade dos compostos *orto*-ciclometalados resulta numa ampla variedade de espécies aniônicas, catiônicas ou neutras, investigando-se suas interações frente a ligantes neutros tais como CO, piridinas e fosfinas; ligantes aniônicos como azida (N_3^-), cianato (NCO^-), tiocianato (SCN^-), cianeto (CN^-), haletos (Cl^- , F^- , Br^- , I^-), entre outros (CAIRES e MAURO, 1996).

Devido a sua reatividade, os *orto*-ciclometalados de paládio(II) são empregados na obtenção de espécies com potencialidade antitumoral (CAIRES et al., 1999; DE ALMEIDA et al., 2005; BINCOLETTO et al., 2005). Em estudo, o composto organometálico neutro $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{N}_3)(\text{dppp})]$ derivado da reação entre o *orto*-ciclopaladado de natureza dimérica $[\text{Pd}(\text{dmba})\text{N}_3]_2$ e a difosfina 1,3-bis (difenilfosfina) propano (dppp) apresentou uma grande eficácia no combate à células tumorais humanas da linhagem C6 de glioma cerebral (CAIRES et al., 1999).

A atividade antineoplásica destes complexos é largamente investigada devido à sua alta reatividade, aproximadamente 10^5 vezes maior que a da Pt(II) (FARREL, 1989; NAVARRO-RANNINGER et al., 1996). A natureza do metal, dos ligantes que podem ser cineticamente lábeis ou inertes, bem como as propriedades eletrônicas, cinéticas e estruturais

das moléculas podem ser minuciosamente moduladas para otimizar a atividade destes complexos. Ligantes mono ou bidentados, com diferentes geometrias, a capacidade de formar ou não ligações de hidrogênio e seus grupos funcionais potencialmente ativos são fatores que influenciam na sua reatividade (QUIROGA et al., 1998).

Devido aos problemas significativos apresentados pela *cis*-Pt e derivados, já citados anteriormente, a pesquisa por drogas antitumorais tem caminhado em direção ao desenvolvimento estruturalmente racionalizado de novos compostos, como os organopaladados mononucleares investigados recentemente, [Pd(dmba)(X)(dppp)], dmba = N,N-dimetilbenzilamina, dppp = 1,3-bis(difenilfosfina)propano, X = Cl, N₃, NCO, SCN, os quais promoveram a ativação de macrófagos (DE ALMEIDA et al., 2005). A coordenação de determinados ligantes ao paládio(II), tais como a N,N'-dimetilbenzilamina (dmba) e a 1,3-bis(difenilfosfina)propano (dppp), potencializou a atividade antitumoral de seus complexos. No que diz respeito à nuclearidade dos complexos, a reação de clivagem dos dímeros de fórmula geral [Pd(N,C-dmba)(μ-X)]₂, X = Cl, NCO, SCN ou Cl; empregando a difosfina dppp, forneceu complexos de organopaladados de fórmula geral [Pd(C-dmba)(X)(dppp)]. Estes, por sua vez, em trabalho realizado em nosso laboratório, tiveram suas citotoxicidades avaliadas frente a culturas de macrófagos peritoneais murinos e células de tumor mamário experimental *in vitro* da linhagem LMM3 apresentando potenciais citotóxicos similares ou superiores a *cis*-platina (COSTA, 2004).

Como em toda investigação clínica com compostos químicos, antes de se iniciar e realizar fases de farmacologia clínica impõe-se a execução de estudos pré-clínicos em laboratório, fazendo-se necessária a utilização de modelos experimentais em animais para testar novos compostos que possam se tornar fármacos. Um modelo muito empregado nesta vertente e que foi empregado no presente estudo, é o tumor de Ehrlich transplantado em camundongo (SAAD-HOSSNE et al., 2004). Tal modelo tumoral é empregado na pesquisa de variadas substâncias, como em ensaios para determinação das atividades citotóxicas de

alcalóides e flavonóides de duas espécies do gênero *Solanum* (ESTEVESS-SOUZA et al., 2002); na avaliação *in vivo* das atividades antitumorais do iodoacetato e do dimetilsulfóxido (FAHIM, et al., 2003); e na verificação da contribuição do óxido nítrico na citotoxicidade relacionada à doxorubicina (SAYED-AHMAD et al., 2002).

O tumor de Ehrlich é originalmente um tumor mamário, que foi isolado no final do século XIX e descrito em 1905 por Paul Ehrlich (EHRlich e APOLANT, 1905) e em 1932 foi transplantado com sucesso para a cavidade peritoneal de camundongos, sendo mantido mediante repiques sucessivos (LOEWENTHAL e JAHN, 1932). Acredita-se que apesar da adaptação das células tumorais de Ehrlich à cavidade peritoneal e ao tecido subcutâneo, estas ainda possam manter suas características primárias de célula tumoral mamária. Esse tumor apresenta a característica de se desenvolver em qualquer linhagem de camundongos, de não regredir espontaneamente (SIGIURA, 1965), e ter rápido crescimento (SILVA et al., 1997). O tumor de Ehrlich, em camundongos, apresenta crescimento tumoral definido pela dose de células implantadas, o que permite certo grau de controle (SAAD-HOSSNE, 2002).

O câncer, tratando-se de um processo patológico, pode provocar uma resposta imunológica (KILLION e FIDLER, 1994). As células do sistema imune do hospedeiro capazes de promover defesa contra os tumores são as células *natural killer* (NK) ativadas, células T, e macrófagos ativados (FILEP et al., 1996). Os macrófagos constituem-se em um dos principais componentes do sistema imunológico e são as primeiras células a serem ativadas para participar de uma resposta imunológica propriamente dita quando o organismo é exposto a fatores exógenos, em uma inflamação aguda ou crônica como traumas teciduais, infecções, desordens autoimunes e câncer através da secreção de quimiocinas e citocinas. Pelo menos há duas décadas, os macrófagos têm sido apontados como os principais elementos presentes no organismo de combate aos tumores. Nos tecidos tumorais, estas células formam um importante componente do estroma, mas seu papel na regulação do crescimento tumoral ainda não está claro. Os monócitos infiltrados no tumor bem como aqueles circulantes no

sangue demonstram níveis variados de citotoxicidade que podem estar relacionados com o microambiente em que se encontram (KLIMP et al., 2002; NATH et al., 2006).

Evidências indicam que macrófagos ativados são capazes de destruir células tumorais, incluindo aquelas que são resistentes a drogas citostáticas. Os macrófagos podem desempenhar um papel indireto nas atividades antimicrobianas e antitumorais mediante secreção de citocinas ou pelo processamento e apresentação de antígenos e assim ajustar o sistema imunológico ou ainda acompanhar este processo de maneira direta, através da liberação de produtos tais como radicais de oxigênio e nitrogênio e fator de necrose tumoral, que são prejudiciais aos microrganismos e células tumorais, dependendo da concentração liberada (EBERHARDET, 2001; JANEWAY, 2006).

Os macrófagos respondem a um grande espectro de estímulos endógenos e exógenos, sendo em particular o LPS (lipopolissacarídeo) muito utilizado para tal finalidade. Dentre os efeitos provocados pelo LPS, têm-se o aumento na produção de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF), interferon- γ (IFN- γ), interleucina-1 (IL-1), expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), secreção de óxido nítrico (NO), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além de regularem a expressão de moléculas de adesão na superfície dos macrófagos (EBERHARDET, 2001; KLIMP et al., 2002).

Atualmente, a terapia do câncer compreende o uso de substâncias que, além de exercerem efeitos sobre as células tumorais, atuem no sistema imunológico, auxiliando no combate aos tumores. Como exemplo, pode-se mencionar a ação imunomodulatória da *cis*-platina (KILLION e FIDLER, 1994). A *cis*-Pt é considerada um potente ativador de macrófagos, exercendo múltiplos efeitos sobre os mesmos, incluindo maior capacidade em lisar células tumorais *in vitro*, produzindo uma maior quantidade de interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), espécies reativas de oxigênio (EROs), de nitrogênio (ERNs), lisozimas e arginase (SHISHODIA et al., 1998).

Os fagócitos podem migrar até os sítios de inflamação direcionados por um processo denominado quimiotaxia. Receptores específicos são encontrados na membrana dessas células e a ligação fator quimiotático/receptor pode desencadear uma série de eventos celulares e bioquímicos, incluindo alterações no potencial de membrana e fluxo de íons, rearranjo do citoesqueleto, extravasamento do conteúdo citoplasmático, liberação de vários mediadores como as citocinas e a indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (HAMPTON et al., 1998; FORMAN e TORRES, 2001; LUM et al., 2002).

As espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o íon hidroxila (OH^-), são importantes na destruição de microrganismos invasores e células cancerígenas. Durante a fagocitose, há um aumento no consumo de oxigênio pelos neutrófilos. Neste fenômeno, conhecido como explosão respiratória, o O_2^- é produzido pela redução de 1 elétron do O_2 , promovida pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), o doador específico de elétrons. Uma porção significativa do O_2^- produzido é liberada para o meio extracelular, onde ocorre uma dismutação espontânea que resulta na formação do H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio ultrapassa facilmente as membranas biológicas, enquanto que o O_2^- depende de canais aniônicos (DAHLGREN e KARLSSON, 1999; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A geração de H_2O_2 é um processo natural, resultante de várias reações específicas essenciais à atividade celular. Entretanto, a liberação de quantidades significativas de H_2O_2 induz a quebra da fita de DNA e/ou perturbação no citoesqueleto da membrana, levando à morte celular (RAMASARMA, 1990).

As espécies reativas de oxigênio podem lesar o tecido do hospedeiro especialmente na vizinhança do sítio inflamatório. Têm-se relatado seu envolvimento em danos a tecidos associados com doenças inflamatórias incluindo a artrite reumatóide, aterosclerose, catarata, diabetes mellitus, câncer, dentre outras (BERGENDI et al., 1999; KARPUZOGLU e AHMED, 2006).

O óxido nítrico (NO) e seus metabólitos, os reativos intermediários de nitrogênio (RNIs), desempenham um papel importante em diversos eventos celulares, constituindo-se numa das moléculas que exerce ação citotóxica contra células tumorais (WINK e MITCHELL, 1998). Dentre as moléculas efetoras liberadas pelos macrófagos que podem causar dano nas células tumorais, o NO é essencial para a citotoxicidade dos macrófagos (LALA, 1998) e, em menor grau, para as células *natural killer* (NK) (FILEP et al., 1996). Entretanto, ao mesmo tempo, existe forte evidência sugerindo que o NO produzido pelos macrófagos inibe as respostas antitumorais dos linfócitos T citotóxicos *in vivo*, provavelmente através de seus efeitos citostáticos na proliferação das células T (MEDOT-PIRENNE et al., 1999).

O NO é formado nos macrófagos ativados como o produto da conversão da L-arginina em L-citrulina em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Esta reação, assim como a explosão respiratória, envolve o consumo de oxigênio. O excesso de NO causa estresse oxidativo, dano ao DNA, interrupção do metabolismo energético, homeostase do cálcio e função mitocondrial. Todos esses distúrbios podem levar à morte celular por apoptose ou necrose, dependendo da severidade do dano (MARCINKIEWICKZ, 1997; GALLI et al., 2003).

O NO possui atividade antitumoral, mostrando promover inibição da proliferação, promoção da diferenciação e redução da progressão metastática de alguns tipos de células tumorais (GALLI et al., 2003). Conjuntamente, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e NO são considerados os mediadores mais importantes envolvidos diretamente na morte de células tumorais (OBERLING, 1997).

O crescimento tumoral associado com a inflamação é dependente da ativação endotelial e da infiltração de leucócitos induzidos pelas citocinas geradas pelo endotélio ativado. Constatou-se que a inflamação influencia no desenvolvimento do câncer, visto que a enzima óxido nítrico sintase (NOS) é induzida por citocinas inflamatórias a produzir o óxido

nítrico, mediador essencial na resposta imune (HUSSAIN et al., 2004). Citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular que são sintetizadas e secretadas especialmente por fagócitos mononucleares e linfócitos T ativados após diversos estímulos tais como células tumorais, agentes infecciosos, etc. Elas agem em diferentes células-alvo adjacentes (pleiotropismo) geralmente de maneira aditiva, sinérgica ou antagônica. Em organismos pluricelulares, as citocinas são mediadores intracelulares que regulam a sobrevivência, crescimento, diferenciação e as funções efetoras das células (HEINRICH et al., 1998). Assim, não é surpresa que as citocinas afetem significativamente o crescimento dos tumores *in vivo*. Entretanto, elas também são produzidas por células cancerígenas e representam uma rede com ampla variedade de constituintes funcionais e moleculares que podem agir como fatores promotores ou inibidores do crescimento tumoral. Como elas afetam o crescimento e função das células imunocompetentes, podem ativar ou modular respostas antitumorais específicas ou inespecíficas (NICOLINI et al., 2006).

Dentre as citocinas envolvidas na resposta imunológica, a interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) são as primeiras a serem secretadas, determinando a adesão ao endotélio e a migração trans-endotelial dos leucócitos (NATH et al., 2006). Sugere-se que essas duas citocinas formam uma rede de fatores relacionados que podem afetar a progressão celular tumoral de uma maneira cooperativa (BEN-BARUCH, 2003).

A IL-1 β é conhecida como um regulador-chave da resposta imune/inflamatória. Ela é produzida muito rapidamente durante a resposta inflamatória e é conhecida por induzir a expressão de uma grande variedade de citocinas (EMERY e SALMON, 1991).

Sua ativação leva a uma cascata de citocinas pró-tumorigênicas, cujos sinais secundários induzem a expressão de numerosas atividades pró-tumorigênicas como, por exemplo, a expressão de IL-8, a qual vai contribuir subseqüentemente com a angiogênese, proliferação e invasão tumoral (PANTSCHENKO et al., 2003). Estudo envolvendo IL-1 β e câncer de mama indicou que seus níveis foram significativamente maiores em carcinomas

invasivos do que em carcinomas *in situ* ou em lesões iniciais, implicando que elevados níveis de IL-1 são diretamente correlacionados com estágios mais avançados da doença (BEN-BARUCH, 2003). Entretanto, estudos vêm demonstrando o papel da IL-1 na modulação das células cancerígenas bem como de células teciduais normais no microambiente tumoral tanto *in vitro* quanto *in vivo*. (PANTSCHENKO et al., 2003).

O TNF- α estimula um amplo espectro de respostas celulares, incluindo a ativação e migração de linfócitos e leucócitos, febre, resposta de fase aguda, proliferação celular, diferenciação e apoptose (TRACEY e CERAMI, 1993).

A exposição das células ao TNF- α pode resultar na ativação da cascata da caspase causando apoptose (CHANG e YANG, 2000). Entretanto, mais comumente, a ligação do TNF- α a receptores específicos causa a ativação de dois importantes fatores de transcrição, AP-1 e NF- κ B, que por sua vez induzem genes envolvidos nas respostas inflamatórias agudas e crônicas (BARNES e KARIN, 1997; KARIN et al., 1997).

O TNF- α pode induzir necrose tumoral através de dois mecanismos: pelo efeito citotóxico direto em células tumorais e pela estimulação do sistema imune. Foi demonstrado que o TNF- α induz morte por necrose ou apoptose em algumas células tumorais humanas primárias e em linhagens celulares tumorais (CARSWELL et al., 1975; AGGARWAL e; NATARJAN, 1996), incluindo linhagens de câncer de mama (BEN-BARUCH, 2003), melanoma maligno e sarcoma de tecidos moles dos membros (LAKE et al., 2003).

A ativação dos macrófagos pode também ser induzida por outras citocinas, principalmente o interferon-gama (IFN- γ). O IFN- γ possui várias atividades biológicas que são consideradas grandes determinantes da efetividade do sistema de defesa inespecífica do hospedeiro (GRESSER, 1997).

O IFN- γ é responsável pelo aumento da liberação de IL-1, da atividade citotóxica, da explosão respiratória e da secreção de NO. Embora somente o IFN- γ possa ativar macrófagos

murinos (LIEW et al., 1991; VERDOT et al., 1996) bem como outras células, como fibroblastos (WERNER-FELMAYER et al., 1990) ou neutrófilos (YAMASHITA et al., 1997) a produzir níveis elevados de NO, a formação do NO pode ser potencializada pelo TNF- α ou IL-2 (COX et al., 1992; DENG et al., 1993; WEISZ et al., 1994). Em estudo verificou-se que o IFN- γ não induz a produção de NO sozinho, o TNF- α induzido em resposta ao estímulo do próprio IFN- γ é também um pré-requisito (FRANKOVÁ e ZIDEK, 1998).

Enfim, muitos mecanismos antitumorais têm sido atribuídos ao IFN- γ . Estudos demonstraram que os linfócitos e o IFN- γ colaboram na proteção contra o desenvolvimento de sarcomas induzidos e carcinomas epiteliais espontâneos e também na seleção por células tumorais com reduzida imunogenicidade (SHANKARAN et al., 2001); também verificou-se que esta citocina apresentou a capacidade de inibir o crescimento de células de câncer de mama (RUIZ-RUIZ et al., 2000). Essa propriedade vem ao encontro com dados experimentais nos quais camundongos deficientes em IFN- γ desenvolveram mais tumores em resposta a agentes químicos carcinogênicos do que em camundongos normais (DRANOFF, 2004).

A reação tumoricida *in vitro* de macrófagos representa um mecanismo de defesa do hospedeiro para o controle e erradicação de doença neoplásica (ADAMS e HAMILTON, 1984; KLOSTERGAARD et al., 1991). Atualmente reconhece-se que macrófagos podem ser ativados e tornarem-se citotóxicos para células tumorais fenotipicamente diferentes, incluindo células resistentes à morte por outros componentes do sistema de defesa do hospedeiro e drogas anti-câncer. A ativação de células das séries macrófago-histiócito aumenta a defesa do hospedeiro contra o câncer. Muito de nosso conhecimento sobre os mecanismos pelos quais os fagócitos mononucleares destroem essas células é obtido através de investigações tais como observações morfológicas, inibição do crescimento do tumor e liberação de radioatividade pela célula alvo entre outras (FIDLER e SCHROIT, 1988).

Com base no exposto anteriormente, neste trabalho buscou-se avaliar a citotoxicidade de complexos organometálicos de paládio(II) de fórmula geral [Pd(C-dmba)(X)(dppp)], sendo

X= SCN, NCO, N₃ ou Cl, e de seus ligantes N,N-dimetilbenzilamina (**dmba**) e 1,3-bis(difenilfosfina)propano (**dppp**) isoladamente, frente à células tumorais de Ehrlich *in vitro*. Verificou-se ainda a ação de tais classes de compostos sobre a ativação de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich a fim de constatar suas propriedades imunológicas. Nestes ensaios, empregou-se a *cis*-platina (*cis*-Pt) como padrão de comparação dada sua atividade antitumoral e imunomoduladora.

II. OBJETIVOS

2.1. Geral

Sabendo que compostos de paládio(II), de fórmula geral $[Pd(C-dmba)(X)(dppp)]$, X= haleto ou pseudo-haleto, dmba= N,N-dimetilbenzilamina e dppp= 1,3-bis(difenilfosfina)propano, apresentaram atividade citotóxica/citolítica *in vitro* frente a linhagem tumoral LMM3 (COSTA, 2004) e frente a células de glioma cerebral (CAIRES et al., 1999) e/ou imunológica (DE ALMEIDA et al., 2005; ROCHA et al., no prelo), o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação de compostos análogos e/ou idênticos aos compostos utilizados nos estudos relatados acima sobre células da linhagem tumoral de Ehrlich, macrófagos e linfócitos *in vitro*.

2.2. Específico

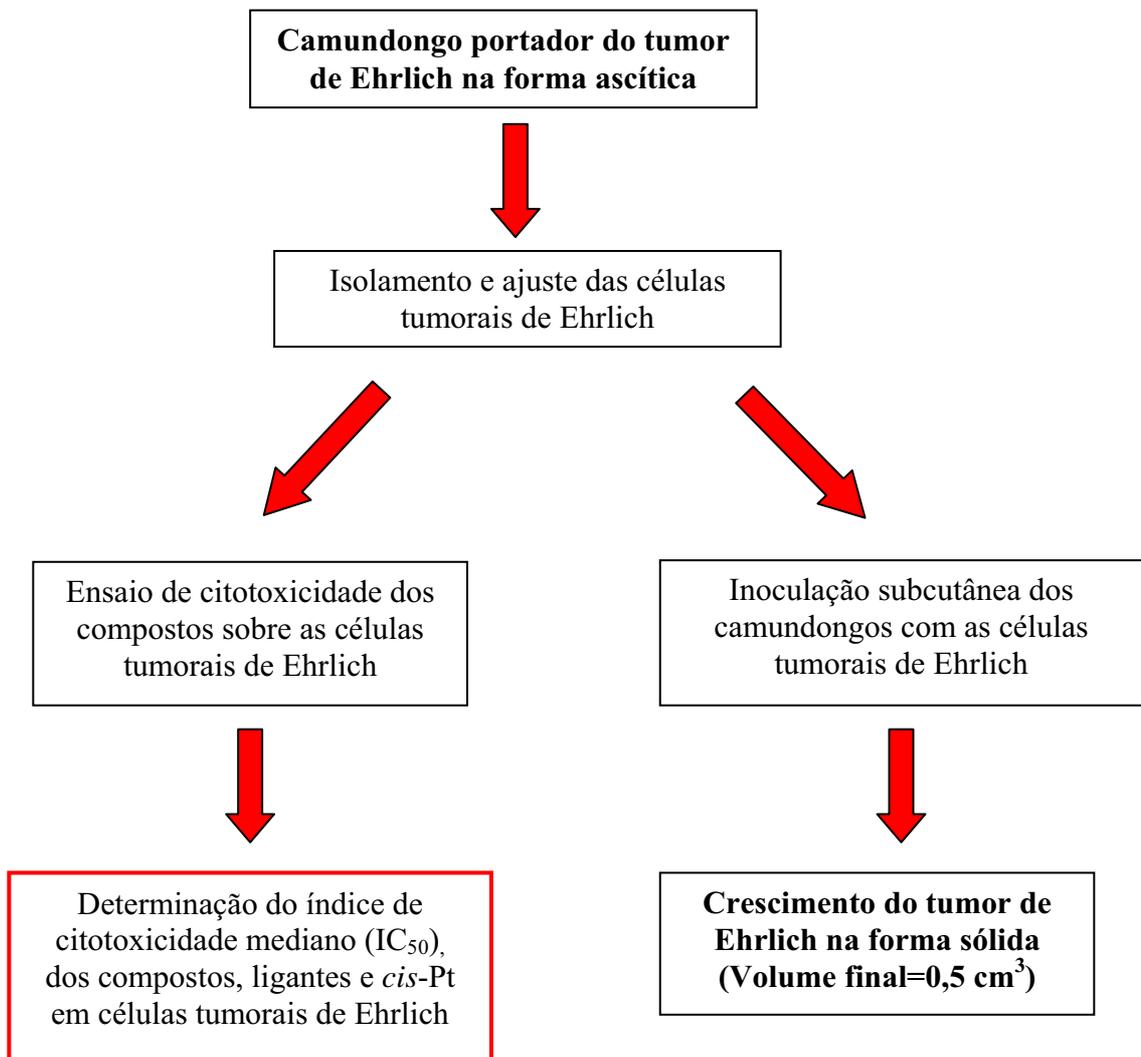
Utilizar os compostos de fórmula geral $[Pd(C-dmba)(X)(dppp)]$, X=Cl, SCN, NCO, N₃, além dos ligantes **dmba** e **dppp** isoladamente e a *cis*-platina (*cis*-Pt) sobre células tumorais, aderentes e linfócitos obtidos de animais portadores de tumor de Ehrlich. Para tanto se determinou:

- a) o índice de citotoxicidade mediano (o IC₅₀) sobre as células acima descritas;
- b) a produção e/ou inibição da produção de óxido nítrico (NO) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) utilizando células aderentes;
- c) a produção das citocinas: fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β) pelas células aderentes e interferon- γ (IFN- γ) pelos linfócitos;
- d) a atividade citotóxica/citolítica de células aderentes.

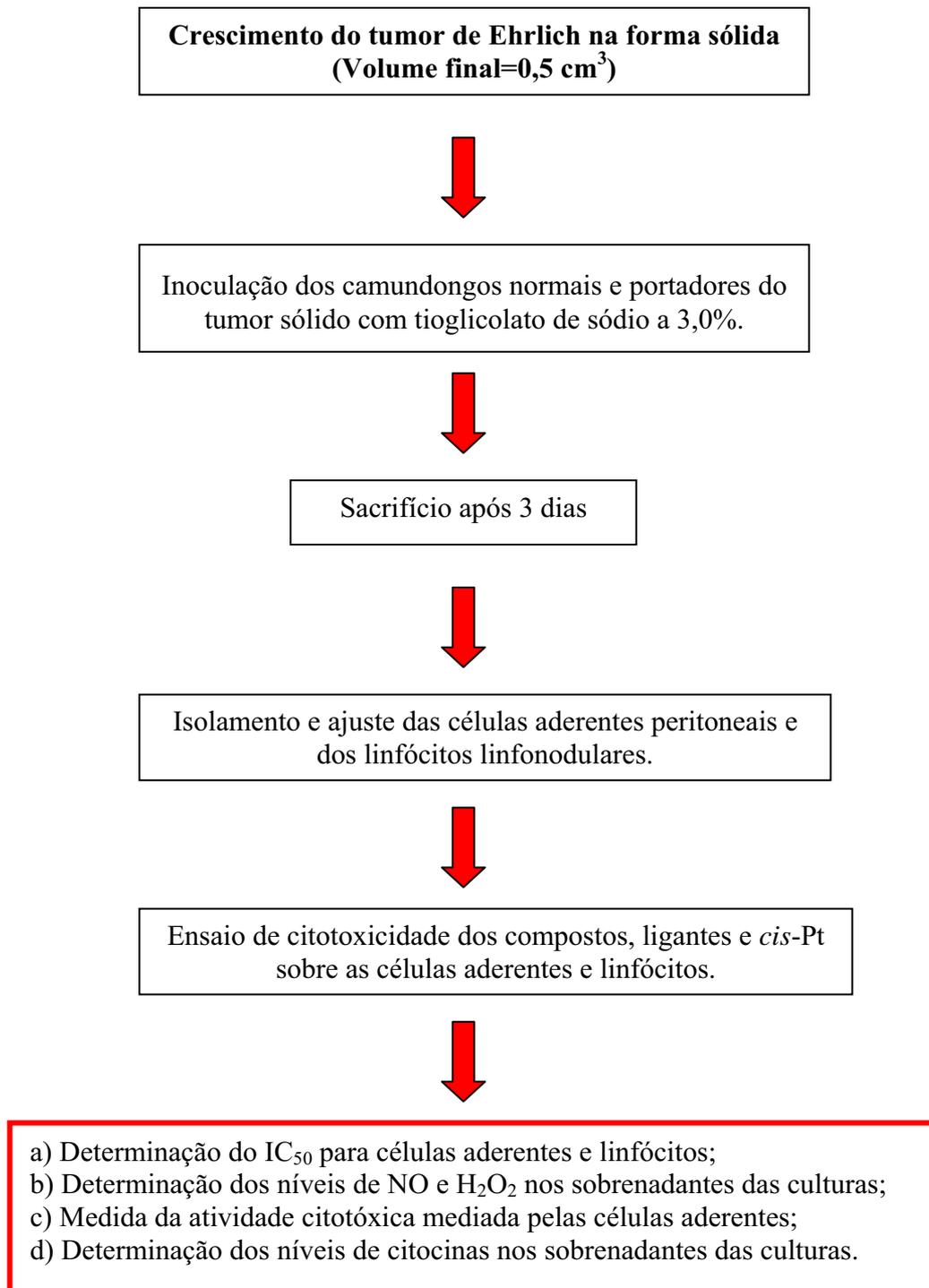
III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

3.1.1. Obtenção das células tumorais de Ehrlich para os ensaios *in vitro* e inoculação dos animais



3.1.2. Obtenção das células aderentes peritoneais e linfócitos de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich



3.2. Complexos organometálicos

Os complexos organometálicos utilizados neste trabalho foram sintetizados no Laboratório de Organometálicos e Química de Coordenação pelo Dr. Eduardo Tonon de Almeida (DE ALMEIDA, 2002), sob a supervisão do Prof. Dr. Antonio Eduardo Mauro, no Departamento de Química Geral e Inorgânica do Instituto de Química de Araraquara. Os métodos para obtenção dos complexos estão descritos na literatura (DE LUCCA NETO et al., 1999; CAIRES et al., 1999; DE ALMEIDA et al., 2005).

Os compostos utilizados foram: [Pd(C-dmba)(SCN)(dppp)], denominado **SCN**; [Pd(C-dmba)(NCO)(dppp)], denominado **NCO**; [Pd(C-dmba)(N₃)(dppp)], denominado **N₃**; [Pd(C-dmba)(Cl)(dppp)], denominado **Cl**. Deve-se mencionar que os ligantes **dmba** (N,N-dimetilbenzilamina) e **dppp** [1,3 – bis(difenilfosfina)propano] também foram investigados isoladamente.

Também se utilizou a *cis*-platina (*cis*-Pt), fabricada por F H Faulding & Companhia Ltda – Austrália; lote: M191881, gentilmente cedida pelo Centro Oncológico da Região de Araraquara (CORA).

3.2.1. Preparo das soluções-mãe dos complexos

As massas das amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido [(DMSO), Merck, Alemanha] tratado conforme métodos convencionais (PERRIN et al., 1993). As soluções-mãe foram preparadas numa concentração de DMSO (Merck, Alemanha) tal que, em cada concentração desejada dos compostos, a concentração final deste fosse de 0,3% v/v (DMSO/RPMI), tanto nos testes com células tumorais de Ehrlich como os macrófagos peritoneais e linfócitos obtidos de camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma sólida. As soluções-mãe foram diluídas em meio de cultura RPMI – 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino, 100µg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina e 5×10^{-2} m β - mercaptoetanol, designado como RPMI - Completo [(RPMI – 1640 – C), Sigma Chemical

Co., EUA] momentos antes de cada ensaio. Empregaram-se concentrações 1.10^{-3} mol.L⁻¹, 1.10^{-4} mol.L⁻¹, 1.10^{-5} mol.L⁻¹ e 1.10^{-6} mol.L⁻¹ nas investigações prévias. Posteriormente, foram empregadas concentrações variando de 1 a 100 μ mol.L⁻¹ para determinação da viabilidade celular frente a culturas de células tumorais, macrófagos e linfócitos. Dependendo dos resultados, os intervalos de concentração variaram para cada espécie organopaladada testada.

3.3. Animais

Utilizaram-se camundongos não isogênicos tipo Swiss, fêmeas de seis semanas, pesando entre 18 e 25g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Câmpus de Araraquara. Os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato, com água e ração (Purina) *ad libitum* em local climatizado, ($23 \pm 2^\circ\text{C}$, $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar), com controle de claro e escuro a cada período de 12h. Todos os procedimentos com animais foram conduzidos conforme parecer do Comitê de Ética local (parecer nº59/2004).

3.4. Linhagem celular tumoral utilizada e manutenção do tumor *in vivo*

O modelo tumoral empregado foi o tumor de Ehrlich na forma sólida. A manutenção das células tumorais no laboratório se deu na forma ascítica *in vivo* através de repiques semanais. Para manutenção do tumor *in vivo*, 1×10^7 células tumorais em um volume de 0,2 mL foram inoculadas intraperitonealmente em camundongos receptores, a cada 7 dias, segundo metodologia descrita na literatura (FECCHIO et al., 1990).

3.4.1. Inoculação das células tumorais

Os camundongos, após assepsia local com álcool iodado, foram inoculados subcutaneamente com 0,1 mL da suspensão tumoral ajustada na concentração de 1×10^7 células tumorais/mL em PBS.

3.4.2. Determinação do volume dos tumores

Uma vez iniciado o desenvolvimento dos tumores, foram realizadas medidas semanais dos diâmetros das massas tumorais da seguinte maneira: cada animal teve a pele esticada na região abdominal para facilitar a visualização do nódulo e também auxiliar na medida do comprimento do mesmo com o auxílio de paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda, Ind. Bras.). Quando o volume tumoral havia atingido $0,5 \text{ cm}^3$, os animais foram sacrificados e submetidos aos testes biológicos, sendo que para se determinar o volume tumoral utilizou-se a seguinte fórmula (ZHOU et al., 1995):

$$V (\text{cm}^3) = 0,523 \times \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{altura}$$

3.5. Obtenção de células tumorais, peritoneais e linfócitos:

3.5.1. Isolamento das células tumorais de Ehrlich para os ensaios *in vitro*

Após 5 dias de evolução do tumor, período no qual ainda não havia influxo significativo de células inflamatórias (FECCHIO et al., 1990), realizou-se o sacrifício dos camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma ascítica em câmara de CO_2 e estes tiveram o fluido ascítico retirado assepticamente em fluxo laminar Classe 100 (Veco, Ind. Bras.).

Para o preparo da suspensão celular, esta foi primeiramente centrifugada duas vezes com 5 volumes de cloreto de amônio (NH_4Cl , Labsynth Ind. Bras. Ltda) 0,17M (SLATER et al., 1982), caso o fluido ascítico estivesse hemorrágico, e depois duas vezes com solução

salina tamponada de fosfatos de pH 7,2, estéril (PBS) a 200xg durante 5 min.. Após esse procedimento, as células tumorais de Ehrlich sedimentadas foram ajustadas para os ensaios *in vitro* (SAAD-HOSSNE et al., 2004).

As células tumorais sedimentadas foram ressuspensas em 1,0 mL de meio RPMI – 1640 – C para os ensaios de citotoxicidade e/ou viabilidade celular *in vitro*, sendo ajustadas à concentração de 1×10^6 células/mL (ESTEVEZ-SOUZA et al., 2002). O número de células foi determinado por contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Alemanha) utilizando-se o corante azul de Tripán. Em todos os protocolos, empregaram-se somente as suspensões que apresentaram viabilidade superior a 95%.

3.5.2. Obtenção de células peritoneais e dos sobrenadantes das culturas

Os animais inoculados com as células tumorais (volume tumoral= $0,5 \text{cm}^3$) e animais normais (não portadores de tumor) foram estimulados previamente pela inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de tioglicolato de sódio a 3,0% (Difco Lab. Ltda, EUA) três dias antes do sacrifício. Após o sacrifício em câmara de CO_2 , os animais tiveram a pele da região abdominal retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar classe 100 (Veco, Ind. Bras.) e o peritônio exposto. Em seguida, inoculou-se intraperitonealmente 5,0 mL de PBS e, após massagem peritoneal para garantir a obtenção das células peritoneais, o líquido peritoneal resultante foi coletado com seringa e agulha e transferido para um tubo cônico estéril (Corning, Inc., EUA) e centrifugado (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.) a 200xg durante 5 min., o sedimento celular obtido foi lavado três vezes com 3,0 mL de PBS. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em RPMI-1640-C para a contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Alemanha) e ajustadas às concentrações exigidas para a realização de cada teste imunológico (item 3.6).

Para a obtenção dos sobrenadantes das culturas, 1,0 mL das suspensões de células peritoneais ajustadas à 5×10^6 células/mL em meio RPMI-1640-C foram distribuídas em placas

de culturas de tecidos de 24 cavidades (Corning Inc., EUA) e acrescentado o mesmo volume das soluções dos diferentes compostos nas concentrações de IC₅₀ obtidas no período de 24 ou 48h de incubação, LPS (Sigma Chemical Co., EUA) (controle positivo) na concentração de 10 µg/mL ou somente meio de cultura RPMI-1640-C (controle negativo) e as placas foram incubadas a 37° C em estufa (Forma Scientific, EUA) com tensão constante de 7,5% de CO₂ por 24 ou 48h. Os sobrenadantes das culturas foram então coletados, centrifugados em centrífuga refrigerada (Hettich, Alemanha), aliquotados em *ependorfs* e estocados a -80°C para posterior dosagem das citocinas TNF-α e IL-1.

3.5.3. Obtenção de linfócitos totais e dos sobrenadantes das culturas

Os animais, após sacrifício em câmara de CO₂, tiveram os linfonodos inguinais, mesentéricos e periaórticos extraídos assepticamente em câmara de fluxo laminar classe 100 (Veco, Ind. Bras.) e transportados para uma placa de Petri estéril, na qual havia uma malha estéril imersa em 3,0 mL RPMI-C, os linfonodos foram cuidadosamente macerados sobre tal malha com o auxílio de pinças também estéreis para liberação das células. O conteúdo da placa foi aspirado várias vezes com auxílio de um pipetador automático para obtenção de uma suspensão celular homogênea. Após este procedimento, as células foram transferidas para um tubo cônico estéril (Corning Inc., EUA) de 15 mL e centrifugadas em RPMI-C a 200xg por 5 min. Às células sedimentadas foi acrescentado 1 mL de meio de RPMI 1640-C para contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Alemanha) através da técnica de exclusão com Azul de Tripán a 0,04%. Após a contagem, as suspensões celulares foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL para determinação da citocina IFN-γ.

Das suspensões de células linfonodulares ajustadas à essa concentração, foi distribuído 1,0 mL em placas de culturas de tecidos de 24 cavidades (Corning Inc., EUA) e acrescentadas soluções dos diferentes compostos nas concentrações de IC₅₀ de 24 ou 48 h e Concanavalina A [(Con A), Sigma Chemical Co., EUA] como controle positivo na

concentração de 0,5 µg/mL ou somente meio de cultura RPMI-1640-C (controle negativo) e as placas foram incubadas a 37° C em estufa (Forma Scientific, EUA) com tensão constante de 7,5% CO₂ por 24 ou 48 h. Os sobrenadantes das culturas foram coletados, centrifugados em centrífuga refrigerada (Hettich, Alemanha), aliqüotados em *ependorfs* e estocados a -80°C para posterior dosagem da citocina IFN-γ.

3.6. Viabilidade celular pela técnica de MTT (MOSSMAN, 1983)

3.6.1 Ajuste das concentrações das suspensões de células tumorais, peritoneais e de linfócitos

Todas as suspensões celulares empregadas nos ensaios de viabilidade celular foram ajustadas em meio RPMI-1640-C, sendo que as suspensões de células tumorais foram ajustadas à concentração de 1x10⁶ células/mL; as suspensões de células peritoneais e de linfócitos foram ajustadas à concentração de 5x10⁶ células/mL.

3.6.2. Ensaio de viabilidade celular de células tumorais e de células aderentes.

Alíquotas de 100 µL das suspensões celulares obtidas conforme item 3.5.2. ajustadas às concentrações previamente descritas no item 3.6.1., foram adicionadas em placas de 96 cavidades para cultivo de tecidos (Corning, Inc., EUA). Sendo que para as células peritoneais, as placas foram incubadas em estufa (Forma Scientific, EUA) a 37° C, com tensão constante de 7,5% de CO₂ por 1h para a formação do tapete celular. O sobrenadante foi descartado e tanto sobre as células aderidas quanto sobre as células tumorais sedimentadas, adicionou-se em triplicata, 100µL dos compostos: **SCN**, **NCO**, **N₃** e **Cl** e dos ligantes **dmba** e **dppp**, além da *cis*-Pt (padrão) nas diferentes concentrações (µM) a serem testadas e 100 µL de DMSO (Merck, Alemanha) diluído em RPMI-1640-C a 0,3% ou ainda, o mesmo volume de RPMI - 1640-C como controle de células. A incubação das placas foi feita durante 24 ou 48h em estufa (Forma Scientific, EUA) a 37° C, com tensão constante de 7,5% de CO₂. Após esse

período os sobrenadantes das culturas foram descartados e 100µL de uma solução de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, (Usb, EUA)] diluído em tampão PBS a 5mg/mL e posteriormente em meio RPMI-1640-C na proporção 1:5, foram adicionados à placa, a qual foi incubada por 3 h a 37° C, tensão de 7,5 % de CO₂ (Forma Scientific, EUA). O sal de tetrazólio, nessas condições, sofre metabolização pelas proteinases mitocondriais das células vivas formando cristais de formazana. Após a incubação desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 100µL de isopropanol (Mallinckrodt, México) para solubilizar os cristais. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível (Multiskan Ascent, Labsystems, Finlândia) a 540 nm com filtro de referência a 620 nm.

A determinação de 50% da concentração inibitória do composto (IC₅₀), concentração do agente que reduz em 50% a viabilidade celular, foi quantificada com auxílio gráfico (concentração x viabilidade celular) por regressão linear com limite de confiança de 95% e o IC₅₀ definido através de equação da reta gerada (Microcal Software OriginTM versão 5.0).

3.6.3. Ensaio de viabilidade celular de linfócitos totais obtidos a partir de linfonodos.

Alíquotas de 100 µL das suspensões de linfócitos obtidas conforme item 3.5.3. na concentração descrita no item 3.6.1., foram adicionadas em placas de 96 cavidades para cultivo de tecidos (Corning, Inc., EUA). Aos linfócitos foram adicionados 100 µL dos compostos em concentrações próximas (uma concentração maior e outra menor) às do IC₅₀ de 24 ou 48 h previamente determinadas para as culturas de células aderentes.

A incubação foi feita em estufa a 37°C, com tensão constante de 7,5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA) por 24 ou 48 h. A seguir, foram adicionados 20 µL de uma solução concentrada de MTT (5mg/mL e meio RPMI 1640)/cavidade e incubou-se por mais 3 h em estufa a 37°C, com tensão de 7,5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). Após esse procedimento, as placas foram centrifugadas a 800g durante 10 minutos a 10°C em centrífuga refrigerada (Hettich, Alemanha), os sobrenadantes foram retirados por aspiração com auxílio

de uma micropipeta, transferidos para outra placa e adicionados 100 μ L de álcool isopropílico (Mallinckrodt, México) em cada cavidade. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro UV/Visível (Multiskan Ascent, Labsystems, Finlândia) em comprimento de onda de 570nm (BAUTISTA et al., 2000).

A determinação de 50% da concentração inibitória do composto (IC_{50}), concentração do agente que reduz em 50% a viabilidade celular, foi quantificada com auxílio gráfico (concentração x viabilidade celular) por regressão linear com limite de confiança de 95% e o IC_{50} definido através de equação da reta gerada (Microcal Software OriginTM versão 5.0).

3.7. Ensaios para verificação da ativação de células aderentes ou linfócitos *in vitro*.

3.7.1. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A produção de H_2O_2 foi determinada conforme procedimento descrito na literatura (PICK e KEISARI, 1980; PICK e MIZEL, 1981). A concentração celular do exsudato peritoneal obtido conforme item 3.5.2. foi ajustada à 2×10^6 células/mL em solução completa de vermelho de fenol, contendo 140mM de NaCl (Merck, Brasil); 10mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0; 5,5 mM de dextrose (Merck, Alemanha); 0,56 mM de vermelho de fenol (Berse, Brasil) e peroxidase de raiz forte, tipo II a 0,01 mg/mL (Sigma, EUA).

A cada poço da placa de 96 cavidades (Corning Inc., EUA), foram acrescentados 100 μ L da suspensão celular juntamente com 50 μ L dos compostos e da *cis*-Pt na concentração do IC_{50} de 24 ou 48h por 1h a 37^o C em estufa (Forma Scientific, EUA) com tensão constante de 7,5% de CO_2 . Como controles negativo foram utilizados somente células em solução completa de vermelho de fenol adicionadas de 50 μ L de tampão fosfato de potássio pH 7,0 e como controle positivo foram utilizadas somente células em solução completa de vermelho de fenol adicionadas de 50 μ L de uma solução de PMA a 0,2 μ M (Sigma Chemical. Co, EUA). Decorrido o tempo de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de hidróxido

de sódio (NaOH, Sigma Chemical. Co., EUA) 5M, e a seguir foram feitas leituras em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas (Multiskan Ascent Labsystems, Finlândia) a 620nm. As amostras foram analisadas em triplicata. Os resultados foram expressos em nanomols de $\text{H}_2\text{O}_2/2 \times 10^5$ células peritoneais, a partir de curva padrão previamente estabelecida, constituída de concentrações molares conhecidas de H_2O_2 em tampão vermelho de fenol.

3.7.2. Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico foi quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura e medido espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess, contendo NaNO_2 como padrão, de acordo com literatura (GREEN et al., 1982). A concentração celular do exsudato peritoneal obtido conforme item 3.5.2. foi ajustada a 5×10^6 células/ mL em meio de RPMI-1640-C para a detecção do NO nos sobrenadantes das culturas. Às placas de 96 cavidades (Corning Inc., EUA), foram acrescentados 100 μL da suspensão celular e então incubadas em estufa (Forma Scientific, EUA) a 37° C, com tensão constante de 7,5% de CO_2 por 1h para a formação do tapete celular. O sobrenadante foi descartado e, sobre esses tapetes de células aderidas, adicionou-se em triplicata, 100 μL dos compostos: **SCN**, **NCO**, **N₃** e **Cl** e dos ligantes **dmbs** e **dppp**, além da *cis*-Pt (padrão) na concentração do IC_{50} de 24 ou 48 h. Em algumas cavidades da placa, adicionou-se 100 μL da solução de LPS a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4, Sigma Chemical. Co, EUA) como agente estimulante (controle positivo). Em outras cavidades, adicionou-se 100 μL de meio RPMI-1640-C à suspensão celular, como controle de células (controle negativo). A placa assim constituída foi incubada em estufa (Forma Scientific, EUA) por 24 ou 48h a 37° C com tensão constante de 7,5% CO_2 . Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 50 μL dos sobrenadantes de cada amostra, transferidas para outra placa e adicionados 50 $\mu\text{L}/\text{cavidade}$ de reagente de Griess, constituído de 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina, 1% de sulfanilamida em solução de ácido

fosfórico a 2,5%. Após 10 min. à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as placas foram lidas em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas com filtro de 540 nm. A concentração de NO foi calculada a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares de nitrito de sódio em meio de RPMI-1640. Os testes foram realizados em triplicata e os valores expressos em μmol de NO/ 5×10^5 células.

3.7.3. Determinação da atividade inibitória dos compostos em culturas de células aderentes quanto à produção de H_2O_2 e NO (LOPES et al., 2005)

3.7.3.1. Quanto à produção de H_2O_2

Os células peritoneais (2×10^6 células/mL) foram incubadas com 50 μL de acetato de forbol miristato (PMA) a 0,2 μM e 50 μL dos compostos na concentração do IC_{50} de 24 ou 48 h durante 1h em estufa (Forma Scientific, EUA) a 37°C com tensão constante de 7,5% de CO_2 . A produção de H_2O_2 foi medida espectrofotometricamente conforme descrito no item 3.7.1..

3.7.3.2. Quanto à produção de NO

As células peritoneais (5×10^6 células/mL) foram incubadas por 1h para formação do tapete celular composto pelas células aderentes conforme descrito no item 3.7.2.. Os sobrenadantes foram descartados e, sobre esses tapetes de células aderidas, adicionou-se em triplicata, 100 μL dos compostos na concentração do IC_{50} de 24 ou 48h juntamente com 100 μL de solução de LPS a 10 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma Chemical Co., EUA). A incubação foi feita por 24 ou 48 h em estufa (Forma Scientific, EUA) a 37°C com tensão constante de 7,5% de CO_2 . A produção de NO foi medida espectrofotometricamente através do acúmulo de nitrito no meio de cultura com a utilização do reagente de Griess de acordo com o item 3.7.2..

3.7.3.3. Cálculo da porcentagem de inibição

Foram calculadas as porcentagens de inibição mediante comparação com os controles negativos. Nos experimentos em que os compostos apresentaram efeitos inibitórios sobre a produção de H₂O₂ e NO, a seguinte equação foi utilizada para o cálculo:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

Sendo,

A= LPS (+), composto (-)

B= LPS (+), composto (+)

C= LPS (-), composto (-)

Nos testes de NO.

A= PMA (+), composto (-)

B= PMA (+), composto (-)

C= PMA (-), composto (-)

Nos testes de H₂O₂.

3.7.4. Quantificação de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ por teste imunoenzimático (ELISA)

As citocinas TNF- α e IL-1 β foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de células aderentes, enquanto que o IFN- γ foi quantificado nos sobrenadantes das culturas de células totais de linfócitos, ambos sobrenadantes obtidos conforme descrito nos itens 3.5.2 e 3.5.3., respectivamente. Foi utilizado o teste imunoenzimático ELISA de captura para cada citocina, utilizando o Kit DuoSet[®], BD Pharmingen, de acordo com as instruções do fabricante.

As placas de 96 orifícios (Corning Inc., EUA) foram adsorvidas com anticorpo de captura, monoclonal, obtidos de rato, anti-citocina de camundongo, na concentração adequada para cada citocina em solução salina tamponada de fosfatos, pH 7,2 (PBS) (100 μ L por cavidade) e incubadas por aproximadamente 18h à temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2, contendo 0,05% de Tween-20 [(PBS-T), Merck, Alemanha] e bloqueadas com 300 μ L/cavidade de BSA (Sigma Chemical Co., EUA) a 1% em PBS (PBS/BSA, com 5% de

sacarose e 0,5% de azida sódica) à temperatura ambiente por 60 min. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. Após a última lavagem adicionou-se a cada cavidade 100 µL do padrão de citocinas ou o mesmo volume dos sobrenadantes das culturas de células a serem testados. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 min., e lavadas três vezes com PBS/T. Em seguida, foram adicionados 100 µL/ cavidade de anticorpo monoclonal de cabra (anticorpo anti-citocina de camundongo) marcado com biotina, diluído à concentração adequada de cada citocina em diluente de reagente (1% BSA, 0,05% de Tween 20 em PBS, pH 7,2-7,4). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 min e lavadas três vezes com PBS-T. A seguir foram adicionados 100 µL/ cavidade da placa do conjugado peroxidase-estreptavidina diluído 1/200 em diluente de reagente, as placas foram incubadas novamente à temperatura ambiente por 20 min. Após este período de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e em seguida adicionadas de 100 µL do substrato (10mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina e 1,2 mM de H₂O₂) em cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de H₂SO₄ 2N a cada cavidade. A absorbância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/Visível para microplacas (Multiskan Ascent Labsystems, Finlândia), e as concentrações foram quantificadas utilizando-se uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas dos padrões de cada citocina. Os resultados foram expressos em pg/ mL.

3.7.5. Medida da atividade citotóxica mediada pelas células aderentes (LAVNIKOVA et al., 1993)

O teste foi realizado consecutivamente, mas descrito em etapas para facilitar o entendimento.

1ª etapa: Marcação das células tumorais com timidina triciada (timidina-H³)

As células tumorais de Ehrlich foram ajustadas à concentração de 4×10^5 células/mL, conforme item 3.5.1. e marcadas com timidina- H³ na concentração de 0,5 $\mu\text{Ci/mL}$ v/v (Amersham Biosciences, Reino Unido) e incubadas em estufa (Forma Scientific, EUA) por 24 h a 37°C com tensão constante de 7,5% CO₂.

2ª etapa: Cultura de células peritoneais

Paralelamente à marcação das células tumorais, foram obtidas as células peritoneais (como descrito no item 3.5.2.) dos camundongos portadores de tumor e ajustados à concentração de 5×10^6 células/mL. Após a incubação de 2 h a 37° C em estufa incubadora (Forma Scientific, EUA) com tensão constante de 7,5% de CO₂ foi observada a formação do tapete celular. Sobre o tapete celular de células aderidas foram adicionados os compostos e a *cis*-Pt (IC₅₀ de 24 ou 48 h), em triplicata, e incubados por 24 ou 48 h em estufa incubadora (Forma Scientific, EUA) com tensão constante de 7,5% de CO₂. Os sobrenadantes das culturas das células aderentes foram descartados e as cavidades da microplaca foram lavadas 2 vezes com 200 μL de PBS. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3ª. etapa: Co- cultura de células aderentes e células tumorais marcadas com timidina-H³

As células tumorais de Ehrlich marcadas com timidina-H³ foram re-ajustadas à concentração de 2×10^5 células/mL em meio RPMI-1640-C. A seguir, foram adicionados 100 μL desta suspensão celular ao tapete celular previamente formado (descrito na segunda etapa). A co-cultura foi incubada por 24h em estufa incubadora com tensão constante de 7,5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA).

Após a incubação, 50 μL do sobrenadante foi transferido em triplicata para uma placa de microtitulação opaca própria para contagem da radiação em cintilador (Top Count, Packard, EUA) e em cada poço foi adicionado 50 μL de líquido de cintilação. Quanto maior a lise das

células tumorais pela ação das células aderentes, maior a liberação de timidina- H^3 e assim a citotoxicidade das células aderentes foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Liberação experimental} - \text{liberação espontânea} \times 100}{\text{Liberação total} - \text{liberação espontânea}}$$

Ainda, as células aderentes que restaram na placa foram lisadas a fim de verificar alguma atividade fagocítica destas sobre as células tumorais, para isto 50 μL do lisado total [(células tratadas com duodecil sulfato de sódio (SDS) a 1% (Sigma Chemical Co., EUA)] foi transferido em triplicata para uma placa de microtitulação opaca própria para contagem da radiação em cintilador (Top Count, Packard, EUA) e em cada poço foi adicionado 50 μL de líquido de cintilação. Tal atividade foi também determinada pela fórmula descrita acima.

3.7.6. Análise Estatística

A interpretação dos resultados obtidos para os diferentes grupos testados (inter-grupos) foi realizada via análise de variância (ANOVA), sendo 5% o nível de significância adotado. Sendo que, os resultados significativos foram analisados pelo teste de Tukey através do programa Graph Pad Instat. (MAIA et al., 2006). O teste “t” de student (paramétrico) foi empregado na análise intra-grupo. Para ambos os testes considerou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (PIHL et al., 1975).

IV. RESULTADOS

4.1. Determinação da viabilidade celular das células tumorais, aderentes e linfócitos utilizando o sal de tetrazólio MTT (MOSSMAN, 1983)

Como os compostos não se dissolvem em meio aquoso (RPMI-1640), e sendo o DMSO um solvente mais polar, foi empregado neste trabalho visto que foi o que melhor diluiu os compostos dentre outros testados. Inicialmente foram testadas as diferentes concentrações de DMSO tanto nas soluções-mãe quanto nas diluições finais utilizadas. Foram também testadas essas concentrações nas incubações de 24 e 48h. Verificou-se que as concentrações de DMSO nas espécies testadas não foram citotóxicas em relação às células incubadas somente com RPMI-1640-C (Controle Negativo) ($p > 0,05$). A Tabela 1 representa os valores médios de viabilidade celular nos períodos de 24 e 48h de incubação.

Tabela 1 –Efeito do solvente DMSO na viabilidade das células tumorais, aderentes e linfócitos

Concentração (%)	Viabilidade (%)		
	células tumorais	células aderentes	linfócitos
0,3	100,00±0,45	100,00±0,52	100,00±0,76
0,5	99,15±0,20	99,85±0,70	99,64±0,55
0,8	98,97±0,59	99,25±0,77	99,16±0,23
1,0	98,75±0,44	98,96±0,85	98,53±0,70

Nos ensaios para determinação da citotoxicidade, verificou-se que as células tumorais de Ehrlich, bem como as células aderentes e linfócitos obtidos de camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma sólida, são sensíveis ao potencial tóxico dos compostos $[Pd(C-dmba)(X)(dppp)]$, X= Cl, SCN, NCO ou N_3 , e dos ligantes investigados isoladamente, **dmba**

(N,N-dimetilbenzilamina) e **dppp** [1,3 – bis(difenilfosfina)propano], além da droga padrão, a *cis*-platina (*cis*-Pt). Os valores médios dos IC₅₀ tanto para células tumorais quanto para células aderentes e linfócitos por 24 ou 48h de exposição, estão apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente.

Observou-se que a citotoxicidade para as células tumorais, aderentes e linfócitos mostrou-se, na maioria dos casos, inversamente proporcional, pois, a medida que o tempo de exposição aumentou, a concentração necessária do composto para promover a morte de 50% das células diminuiu, conforme Tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2 - Valores de IC₅₀ dos compostos para as células tumorais de Ehrlich após 24 ou 48 h de exposição

IC ₅₀ ^{1,2}	24h	48h
CI	22,64 ± 1,52	11,94 ± 1,90
SCN	26,06 ± 1,21	7,06 ± 4,32
NCO	16,37 ± 2,19	14,11 ± 1,36
N ₃	15,45 ± 2,63	11,38 ± 1,82
dmba	7,59 ± 1,35	5,59 ± 3,91
dppp	92,30 ± 1,68	71,16 ± 2,63
Cis-Pt	33,22 ± 2,97	27,50 ± 2,36

¹- 5x10⁶ células / cavidade.

²- Os valores acima são dados como média ± DP de cinco animais em triplicata, valores determinados por uma curva dose-resposta, expressos em µmol.L⁻¹.

Tabela 3 - Valores de IC₅₀ dos compostos para as células aderentes peritoneais de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich após 24 ou 48 h de exposição

IC₅₀^{1,2}	24h	48h
Cl	9,29 ± 2,35	10,53 ± 2,98
SCN	43,59 ± 0,86	28,09 ± 3,12
NCO	13,22 ± 4,02	13,60 ± 3,01
N3	15,93 ± 1,84	18,28 ± 1,60
dmba	10,42 ± 2,15	12,96 ± 1,58
dppp	67,95 ± 2,26	32,28 ± 1,61
Cis-Pt	46,78 ± 1,68	17,62 ± 3,60

¹⁻ 5x10⁶ células / cavidade.

²⁻ Os valores acima são dados como média ± DP de cinco animais em triplicata, valores determinados por uma curva dose-resposta, expressos em µmol.L⁻¹.

Tabela 4 - Valores de IC₅₀ dos compostos para os linfócitos totais dos camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich após 24 ou 48 h de exposição

IC₅₀^{1,2}	24h	48h
Cl	13,09 ± 0,73	10,60 ± 1,51
SCN	44,83 ± 3,19	26,84 ± 3,46
NCO	16,49 ± 1,39	15,69 ± 2,20
N3	16,56 ± 0,65	22,09 ± 0,19
dmba	5,38 ± 2,27	8,74 ± 4,01
dppp	64,45 ± 3,35	32,65 ± 0,33
Cis-Pt	47,75 ± 1,49	15,15 ± 3,06

¹⁻ 5x10⁶ células / cavidade.

²⁻ Os valores acima são dados como média ± DP de cinco animais em triplicata, valores determinados por uma curva dose-resposta, expressos em µmol.L⁻¹.

4.2. Produção de H₂O₂ por células peritoneais aderentes de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich

As células peritoneais dos camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma sólida foram incubadas em triplicata com os compostos **Cl**, **SCN**, **NCO**, **N₃**, ligantes **dm_{ba}**, **dp_{pp}** e a droga padrão, *cis*-Pt nas concentrações do IC₅₀ de 24 ou 48h, além do PMA (controle positivo) e tampão completo de vermelho de fenol (controle negativo).

Os IC₅₀ definidos após 24 h de incubação para os compostos **Cl**, **SCN**, **N₃** e para o ligante **dp_{pp}** demonstraram produzir níveis de H₂O₂ estatisticamente significativos ($p < 0,001$) em relação ao controle negativo do animal portador de tumor, tal como o padrão *cis*-Pt. Por outro lado, o composto **NCO** e o ligante **dm_{ba}** não induziram produção significativa ($p > 0,05$) de H₂O₂ em relação ao controle negativo do animal portador de tumor, conforme se observa na Fig.2A.

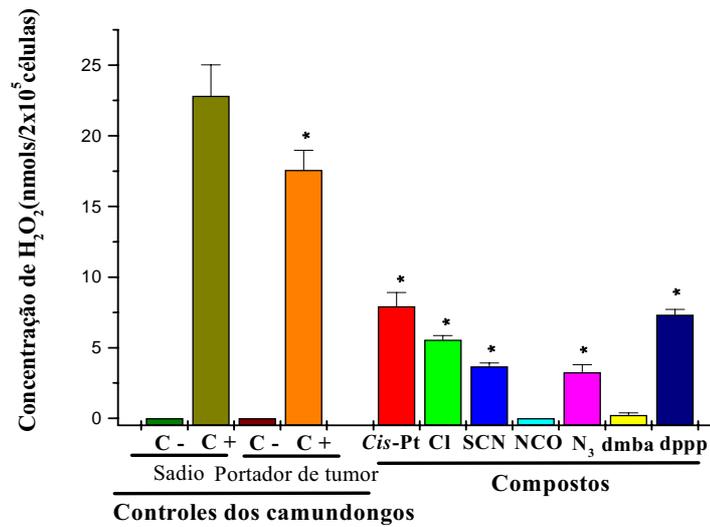
Os IC₅₀ definidos após 48h de incubação para os compostos **Cl**, **SCN**, **N₃** demonstraram produzir níveis de H₂O₂ estatisticamente significativos ($p < 0,01$ para o **N₃** e $p < 0,001$ para o **Cl** e o **SCN**) em relação ao controle negativo do animal portador de tumor. Já o padrão *cis*-Pt, o composto **NCO** e os ligantes **dm_{ba}** e **dp_{pp}** não induziram produção estatisticamente significativa ($p > 0,05$) de H₂O₂ em relação ao controle negativo do animal portador de tumor, conforme pode-se observar na Fig.2B.

Para 24h, não foi significativa a diferença de produção de H₂O₂ em relação ao padrão; já para 48h, os compostos **Cl**, **SCN** e **N₃** produziram níveis de H₂O₂ estatisticamente superiores ($p < 0,001$) ao liberado pela *cis*-Pt.

Como parâmetro de comparação, as células aderentes de camundongos sadios (não portadores do tumor) também foram testadas quanto aos controles negativo e positivo, uma vez que o animal portador de tumor pode apresentar níveis alterados em decorrência da condição patológica. Comparando-se os controles, observou-se que o controle negativo do

camundongo portador do tumor não produziu níveis estatisticamente significativos em relação ao controle negativo do animal sadio quanto à liberação de H_2O_2 ($p>0,05$).

A



B

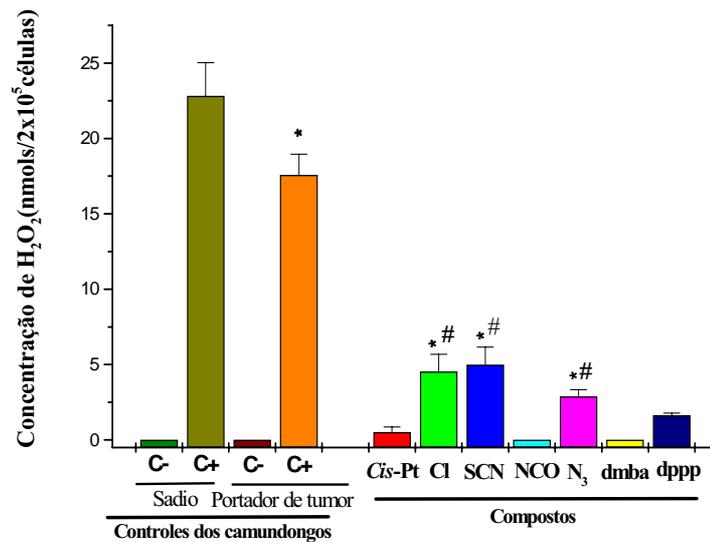


Fig. 2. Efeito dos compostos na produção de peróxido de hidrogênio em culturas de células peritoneais. As células peritoneais de animais normais e portadores do tumor sólido de Ehrlich foram cultivadas em vermelho de fenol completo (controle negativo, C-) e com o PMA (controle positivo, C+). As células peritoneais dos camundongos portadores do tumor foram incubadas com os compostos, ligantes e a *cis*-Pt por 24h (A) ou 48h (B) (IC₅₀ de 24 ou 48h, respectivamente). A reação foi interrompida, e a seguir foram lidas em espectrofotômetro a 620nm. Os resultados foram expressos em nanomols de H₂O₂/2x10⁵ células, como a média ± desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

*** p<0,001, significativo em relação ao controle negativo do animal portador de tumor.

** p<0,01 significativo em relação ao controle negativo do animal portador do tumor.

p<0,001, significativo em relação à *cis*-Pt.

Tabela 5 – Efeitos dos compostos na produção de peróxido de hidrogênio em culturas de células peritoneais.

$IC_{50}^{1,2}$ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	$24h^1$	$48h^2$
Cis-Pt	7,94 ± 0,97	0,53 ± 0,04
Cl	5,55 ± 0,31	4,53 ± 1,16
SCN	3,66 ± 0,26	4,99 ± 1,17
NCO	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
N₃	3,26 ± 0,54	2,88 ± 0,45
dmba	0,23 ± 0,016	0,00 ± 0,00
dppp	7,34 ± 0,37	1,65 ± 0,13
C- (tumor)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C+ (tumor)	17,57 ± 1,40	17,56 ± 1,39
C- (sadio)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C+ (sadio)	22,82 ± 2,20	22,82 ± 2,20

^{1, 2} Valores de IC_{50} de 24 e 48 h, respectivamente; **Cis-Pt** = *Cis*-platina; **Cl** = [Pd(dmba)(Cl)(dppp)]; **SCN** = [Pd(dmba)(SCN)(dppp)]; **NCO** = [Pd(dmba)(NCO)(dppp)]; **N₃** = [Pd(dmba)(N₃)(dppp)]; **dmba** = N,N-dimetilbenzilamina; **dppp** = [1,3 - bis(difenilfosfina)propano] ; **C-** = controle negativo de camundongo portador de tumor ou sadio; **C+** = controle positivo de camundongo portador de tumor ou sadio. Os valores são expressos em nanomols de H₂O₂ /2x10⁵ células ± desvio-padrão.

4.3. Produção de NO por células aderentes de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich

As células peritoneais dos camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma sólida foram incubadas em triplicata por 24 ou 48h com os compostos **Cl**, **SCN**, **NCO**, **N₃**, ligantes **dm_{ba}**, **dp_{pp}** e a droga padrão, *cis*-Pt, nas concentrações do IC₅₀ de 24 ou 48h, além do LPS (controle positivo) e meio RPMI-1640-C (controle negativo).

Após incubação por 24 h, o composto **NCO** e os ligantes **dm_{ba}** e **dp_{pp}** demonstraram produzir níveis de NO estatisticamente significativos ($p < 0,001$) em relação ao controle negativo do animal portador de tumor, tal como o padrão *cis*-Pt. Por outro lado, os compostos **Cl**, **SCN** e **N₃** não induziram produção estatisticamente significativa ($p > 0,05$) de NO em relação ao controle negativo do animal portador de tumor após 24 h de incubação.

Os compostos **Cl** e **SCN**, tanto para 24 quanto para 48h de exposição, além de não produzirem NO, promoveram diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos níveis de NO produzidos no controle negativo do animal portador do tumor, conforme Fig. 3A.

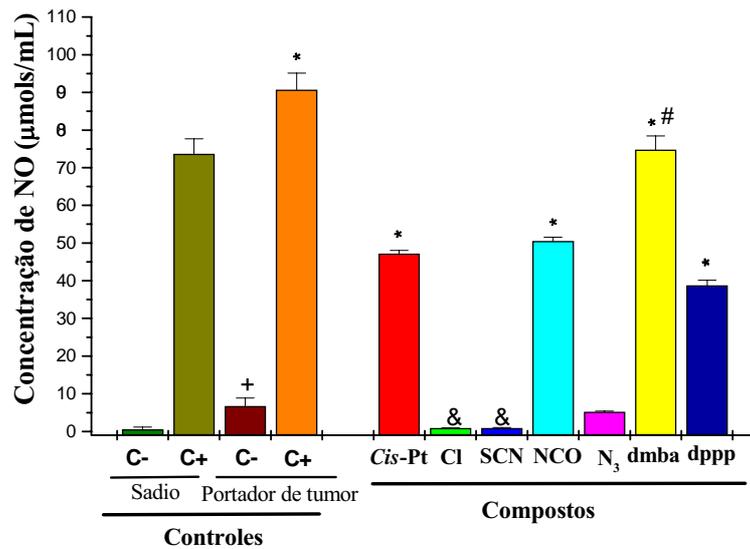
Ao serem incubados por 48h, o composto **NCO** e os ligantes **dm_{ba}** e **dp_{pp}** demonstraram produzir níveis de NO estatisticamente significativos ($p < 0,01$) em relação ao controle negativo do animal portador de tumor, tal como o padrão *cis*-Pt. Já os compostos **Cl**, **SCN** e **N₃** não induziram produção estatisticamente significativa ($p > 0,05$) de NO em relação ao controle negativo do animal portador de tumor (Fig. 3B).

Para 24h de exposição, somente o ligante **dm_{ba}** produziu níveis significativamente maiores ($p < 0,001$) de NO quando comparado à *cis*-Pt. Para 48h, nenhum dos compostos investigados produziram níveis estatisticamente superiores ao produzido pela *cis*-Pt.

As células aderentes de camundongos sadios demonstraram produzir nível de NO diferente do produzido no controle negativo do animal portador de tumor. Observou-se que o

controle negativo do camundongo portador do tumor produziu níveis estatisticamente maiores ($p < 0,05$) de NO em relação ao controle negativo do animal sadio, tanto no período de 24 quanto de 48h.

A



B

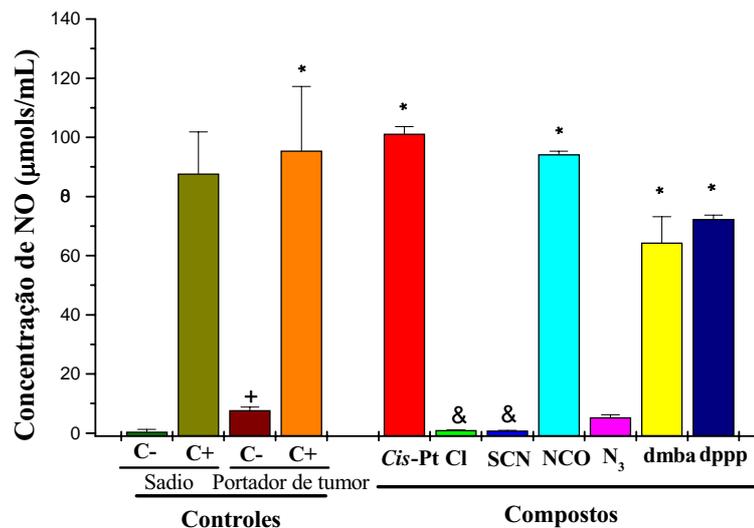


Fig. 3. Produção de óxido nítrico em culturas de células peritoneais aderentes. As células aderentes de animais normais e portadores do tumor sólido de Ehrlich foram cultivadas em meio RPMI-1640-C (controle negativo, C-) e com o LPS (controle positivo, C+). As células aderentes dos animais portadores de tumor foram incubados com os compostos e a *cis*-Pt por 24 (A) ou 48h (B) (IC₅₀ de 24 ou 48h, respectivamente). Aos sobrenadantes das culturas, adicionou-se o reagente de Griess, e após 10 min. a placa foi lida em espectrofotômetro a 540nm. A concentração de nitrito foi obtida de uma reta padrão com quantidades conhecidas de NaNO₂. Os resultados foram expressos como a média ± desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

*** p<0,001, significativo em relação ao controle negativo do animal portador do tumor.

p<0,001, significativo em relação à *cis*-Pt.

+ p<0,05, significativo em relação ao controle negativo do animal sadio.

& p<0,05, significativo em relação ao controle negativo do animal portador de tumor pela diminuição dos níveis de NO.

Tabela 6 – Efeitos dos compostos na produção de óxido nítrico em culturas de células aderentes.

$IC_{50}^{1,2} (\mu\text{mol.L}^{-1})$	$24h^1$	$48h^2$
Cis-Pt	47,20 ± 0,88	101,26 ± 2,38
Cl	0,88 ± 0,09	1,01 ± 0,12
SCN	0,90 ± 0,08	0,83 ± 0,15
NCO	50,53 ± 1,02	94,24 ± 1,07
N₃	5,18 ± 0,21	5,38 ± 0,82
dmba	74,79 ± 3,64	64,38 ± 8,76
dppp	38,79 ± 1,35	72,40 ± 1,33
C- (tumor)	6,73 ± 2,16	7,72 ± 1,06
C+ (tumor)	90,67 ± 4,45	95,48 ± 21,78
C- (sadio)	0,53 ± 0,064	0,54 ± 0,071
C+ (sadio)	73,63 ± 4,05	87,69 ± 14,17

^{1,2} Valores de IC_{50} de 24 e 48 h, respectivamente; **Cis-Pt** = *Cis*-platina; **Cl** = [Pd(dmba)(Cl)(dppp)]; **SCN** = [Pd(dmba)(SCN)(dppp)]; **NCO** = [Pd(dmba)(NCO)(dppp)]; **N₃** = [Pd(dmba)(N₃)(dppp)]; **dmba** = N,N-dimetilbenzilamina; **dppp** = [1,3 – bis(difenilfosfina)propano] ; **C-** = controle negativo de camundongo portador de tumor ou sadio; **C+** = controle positivo de camundongo portador de tumor ou sadio. Os valores são expressos em μmols de NO ± desvio-padrão.

4.4. Determinação da inibição de H₂O₂ e NO

O composto NCO e o ligante **dmba** inibiram a produção de H₂O₂ após 24 ou 48h de incubação com os IC₅₀ de 24 ou 48h, respectivamente, justificando a não produção de H₂O₂ (Fig.2A e 2B). As porcentagens de inibição dos compostos sobre a produção de H₂O₂ estão ilustradas na Tabela 4.

Tabela 7 – Porcentagem de inibição dos compostos sobre a produção de H₂O₂ em células peritoneais de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich após exposição ao IC₅₀ de 24(A) ou 48(B) h

<i>Inibição (%)</i>							
	<i>Cis-Pt</i>	Cl	SCN	NCO	N₃	dmba	dppp
H₂O₂(A)	-----	-----	-----	100,00 ± 2,51	-----	78,39 ± 1,02	-----
H₂O₂(B)	-----	-----	-----	100,00 ± 6,89	-----	100,00 ± 2,63	-----

Os compostos **Cl**, **SCN** e **N₃** inibiram a produção de NO após 24 ou 48h de incubação com os respectivos IC₅₀ de 24 ou 48h, novamente justificando a não produção de NO (Fig.3A E 3B). As porcentagens de inibição dos compostos sobre a produção de NO estão ilustradas na Tabela 5.

Tabela 8 – Porcentagem de inibição dos compostos sobre a produção de NO em células aderentes de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich após exposição ao IC₅₀ de 24(A) ou 48(B) h

<i>Inibição (%)</i>							
	<i>Cis-Pt</i>	Cl	SCN	NCO	N₃	dmba	dppp
NO(A)	-----	96,55 ± 0,62	96,93 ± 1,92	-----	74,70 ± 2,08	-----	-----
NO(B)	-----	85,81 ± 1,94	91,83 ± 0,13	-----	76,15 ± 0,67	-----	-----

4.5. Determinação da citocina TNF- α nos sobrenadantes das culturas de células aderentes

As células aderentes dos camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma sólida foram incubadas em triplicata com os compostos **Cl**, **SCN**, **NCO**, **N₃**, ligantes **dm_ba**, **dp_{pp}** e a droga padrão, *cis*-Pt nas concentrações do IC₅₀ de 24 ou 48h, além do LPS (controle positivo) e meio RPMI-1640-C (controle negativo).

Quando incubados por 24h, os ligantes **dm_ba** e **dp_{pp}** demonstraram produzir níveis estatisticamente significativos ($p < 0,001$) da citocina TNF- α em relação ao controle negativo do animal portador de tumor, tal como o padrão *cis*-Pt. Já os compostos não induziram produção estatisticamente significativa ($p > 0,05$) de tal citocina quando comparados ao controle negativo do animal portador de tumor, conforme observado na Fig.4A.

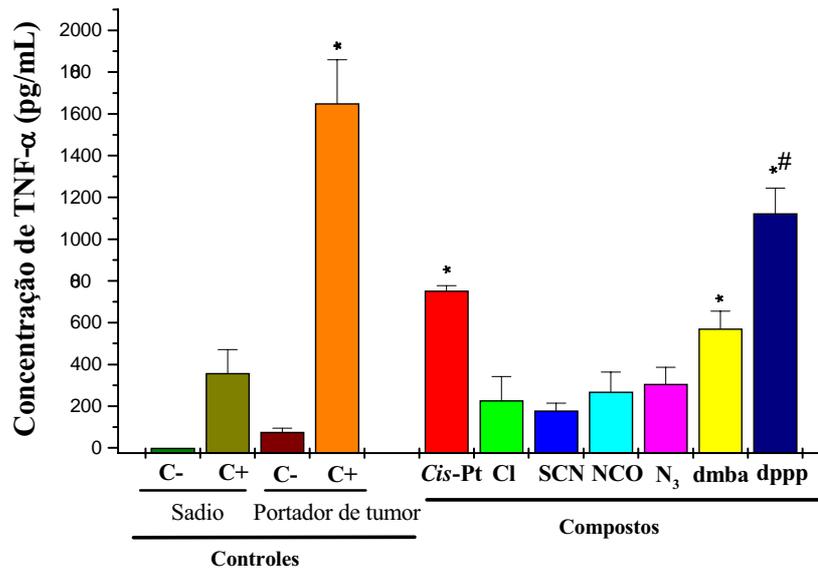
Com exceção do composto **Cl**, quando incubados por 48h, todas as outras espécies (compostos, ligantes e *cis*-Pt) promoveram a liberação de TNF- α a níveis estatisticamente significativos ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$) em relação ao controle negativo dos camundongos portadores de tumor, conforme ilustrado na Fig.4B.

De todos os compostos investigados, somente o ligante **dp_{pp}** produziu nível de TNF- α significativamente maior ($p < 0,001$) que o padrão *cis*-Pt após 24h de exposição.

Nenhum dos compostos e ligantes produziram níveis estatisticamente relevantes em relação ao padrão *cis*-Pt após 48h de exposição.

Comparando-se o controle negativo das células aderentes de camundongos saudáveis ao controle do animal portador de tumor verificou-se que o controle negativo do camundongo portador do tumor, tanto para 24 ou 48h de exposição, não apresentou níveis estatisticamente significativos ($p > 0,05$) em relação ao controle negativo do animal sadio quanto à liberação da citocina TNF- α .

A



B

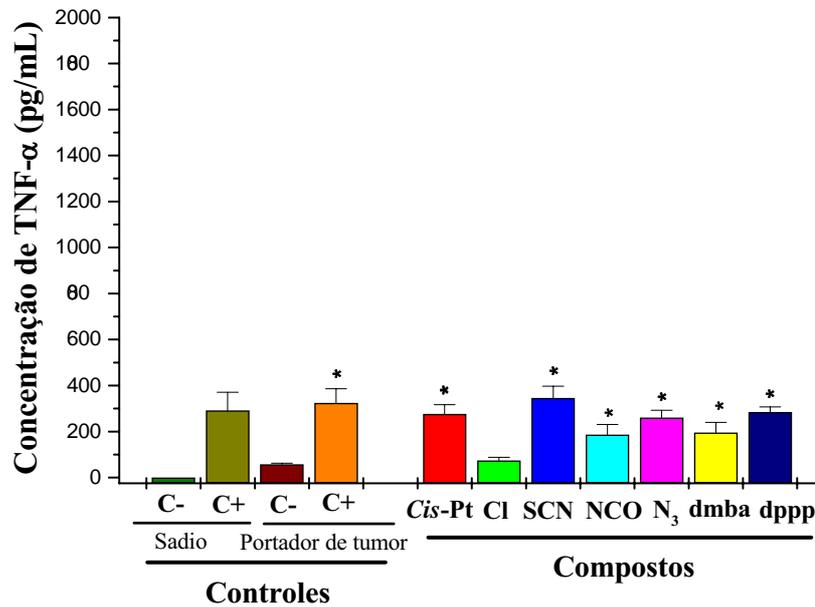


Fig. 4. Produção de TNF- α nos sobrenadantes das culturas de células aderentes. As células aderentes (5×10^6 /mL) foram incubadas com os compostos (IC_{50} de 24h ou 48h) por 24 (A) ou 48h (B), respectivamente. As células somente com meio de cultura correspondem ao controle negativo (C-) e as com LPS, ao controle positivo (C+). A determinação do TNF- α foi realizada pelo teste imunoenzimático (ELISA), conforme as instruções do fabricante.

*** $p < 0,001$, significativo em relação ao controle negativo do animal portador do tumor.

** $p < 0,01$, significativo em relação ao controle negativo do animal portador do tumor.

$p < 0,001$, significativo em relação à *cis*-Pt.

Tabela 9 – Efeitos dos compostos na produção de TNF- α em culturas de células aderentes.

$IC_{50}^{1,2}$ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	24h ¹	48h ²
Cis-Pt	752,90 \pm 24,46	276,28 \pm 40,98
Cl	163,45 \pm 45,41	73,72 \pm 14,89
SCN	179,03 \pm 35,80	345,54 \pm 52,11
NCO	219,99 \pm 44,09	186,37 \pm 44,74
N₃	267,76 \pm 35,33	260,70 \pm 32,19
dmba	612,42 \pm 37,89	195,34 \pm 44,54
dppp	1181,31 \pm 43,86	284,71 \pm 22,35
C- (tumor)	76,01 \pm 18,66	57,25 \pm 5,19
C+ (tumor)	1761,81 \pm 39,19	324,26 \pm 61,91
C- (sadio)	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
C+ (sadio)	427,11 \pm 75,50	291,28 \pm 79,63

^{1, 2} Valores de IC_{50} de 24 e 48 h, respectivamente; **Cis-Pt** = *Cis*-platina; **Cl** = [Pd(dmba)(Cl)(dppp)]; **SCN** = [Pd(dmba)(SCN)(dppp)]; **NCO** = [Pd(dmba)(NCO)(dppp)]; **N₃** = [Pd(dmba)(N₃)(dppp)]; **dmba** = N,N-dimetilbenzilamina; **dppp** = [1,3 - bis(difenilfosfina)propano] ; **C-** = controle negativo de camundongo portador de tumor ou sadio; **C+** = controle positivo de camundongo portador de tumor ou sadio. Os valores são expressos em picogramas/mL \pm desvio-padrão.

4.6. Determinação da citocina IL-1 β nos sobrenadantes das culturas de células aderentes

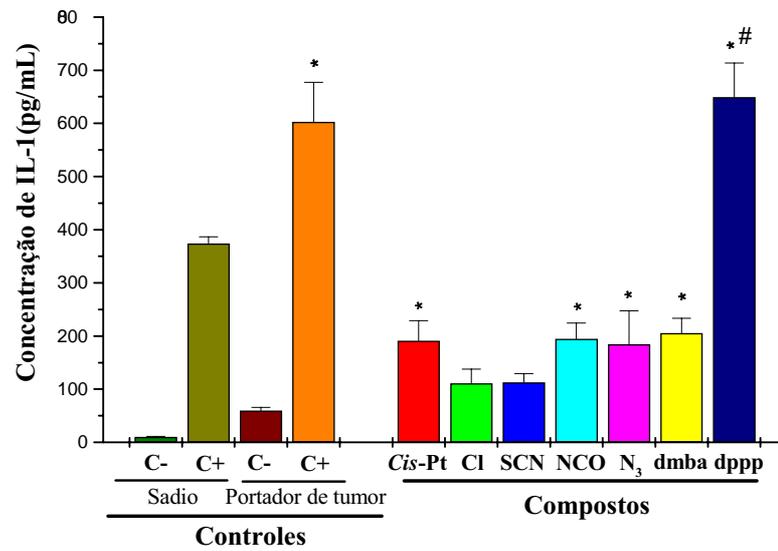
As células aderentes dos camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma sólida foram incubados em triplicata com os compostos **Cl**, **SCN**, **NCO**, **N₃**, ligantes **dm_{ba}**, **dppp** e a droga padrão, *cis*-Pt nas concentrações do IC₅₀ de 24 ou 48h, além do LPS (controle positivo) e meio RPMI-1640-C (controle negativo).

Na incubação de 24h dos compostos **NCO**, **N₃** e dos ligantes **dm_{ba}** e **dppp** observou-se a produção de níveis estatisticamente significativos ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$) da citocina IL-1 β em relação ao controle negativo do animal portador de tumor, tal como o padrão *cis*-Pt. Os compostos **Cl** e **SCN** não induziram produção estatisticamente significativa ($p > 0,05$) da citocina IL-1 β quando comparados ao controle negativo do animal portador de tumor, conforme mostrado na Fig.5A. Por sua vez, quando incubadas por 48h, todas as espécies (compostos, ligantes e *cis*-Pt), com exceção do **Cl**, levaram a maior liberação de IL-1 β ($p < 0,05$, $p < 0,01$ ou $p < 0,001$) em relação ao controle negativo dos camundongos portadores de tumor, conforme observado na Fig.5B.

Dos compostos investigados, somente o ligante **dppp** produziu nível de IL-1 β significativamente maior ($p < 0,001$) que o padrão *cis*-Pt após 24 h de exposição. Os compostos **SCN** e o ligante **dppp** produziram níveis estatisticamente relevantes ($p < 0,001$) da citocina em relação ao padrão *cis*-Pt assim como o **N₃** ($p < 0,05$) após 48h de exposição.

Comparando-se os níveis de IL-1 β produzidos no controle negativo de células aderentes de animais sadios com os animais portadores de tumor, verificou-se que o controle negativo do camundongo com tumor não produziu níveis estatisticamente significativos ($p > 0,05$) em relação ao controle negativo do animal sadio quanto à liberação da citocina IL-1 β tanto para 24 quanto para 48h.

A



B

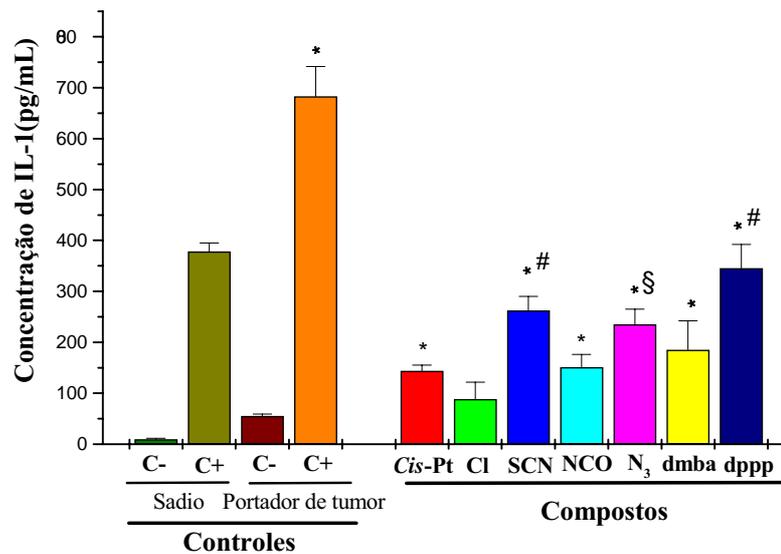


Fig. 5. Produção de interleucina-1 β nos sobrenadantes das culturas de células aderentes. As células aderentes foram incubadas com os compostos, ligantes ou *cis*-Pt (IC₅₀ de 24 ou 48h) por 24 (A) ou 48h (B), respectivamente. As células no meio de cultura correspondem ao controle negativo (C-) e as com LPS, ao controle positivo (C+). A determinação da IL-1 β foi realizada pelo teste imunoenzimático (ELISA), conforme as instruções do fabricante.

*** p<0,001, significativo em relação ao controle negativo do animal portador de tumor.

** p<0,01, significativo em relação ao controle negativo do animal portador de tumor.

* p<0,05, significativo em relação ao controle negativo do animal portador de tumor.

p<0,001, significativo em relação à *cis*-Pt.

§ p<0,05, significativo em relação à *cis*-Pt.

Tabela 10 – Efeitos dos compostos na produção de IL-1 β em culturas de células aderentes.

$IC_{50}^{1,2}$ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	24h ¹	48h ²
Cis-Pt	191,07 \pm 37,87	143,71 \pm 11,81
Cl	110,62 \pm 27,31	88,44 \pm 33,35
SCN	112,88 \pm 16,61	262,49 \pm 27,43
NCO	194,44 \pm 29,89	151,33 \pm 24,80
N₃	184,12 \pm 63,53	235,22 \pm 29,58
dmba	205,47 \pm 28,06	185,28 \pm 56,95
dppp	649,39 \pm 63,96	345,50 \pm 46,67
C- (tumor)	59,51 \pm 6,25	55,50 \pm 3,42
C+ (tumor)	602,77 \pm 74,28	678,00 \pm 58,11
C- (sadio)	9,89 \pm 1,32	9,72 \pm 2,49
C+ (sadio)	373,88 \pm 12,84	513,05 \pm 85,97

^{1, 2} Valores de IC_{50} de 24 e 48 h, respectivamente; **Cis-Pt** = *Cis*-platina; **Cl** = [Pd(dmba)(Cl)(dppp)]; **SCN** = [Pd(dmba)(SCN)(dppp)]; **NCO** = [Pd(dmba)(NCO)(dppp)]; **N₃** = [Pd(dmba)(N₃)(dppp)]; **dmba** = N,N-dimetilbenzilamina; **dppp** = [1,3 - bis(difenilfosfina)propano] ; **C-** = controle negativo de camundongo portador de tumor ou sadio; **C+** = controle positivo de camundongo portador de tumor ou sadio. Os valores são expressos em picogramas/mL \pm desvio-padrão.

4.7. Determinação da citocina IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de linfócitos

Os linfócitos dos camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma sólida foram incubados em triplicata com os compostos **Cl**, **SCN**, **NCO**, **N₃**, ligantes **dm_{ba}**, **dppp** e a droga padrão, *cis*-Pt nas concentrações do IC₅₀ de 24 ou 48h, além da Concanavalina A (controle positivo) e meio RPMI-1640-C (controle negativo).

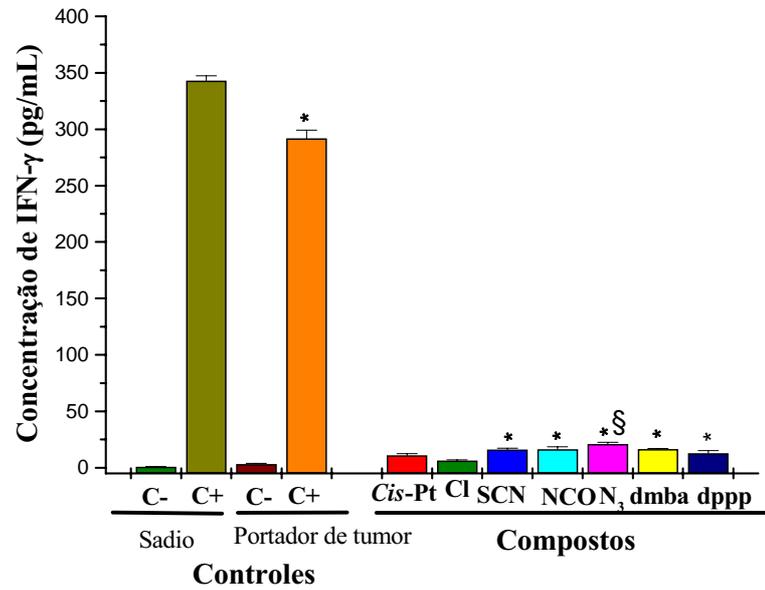
Na incubação de 24h, os compostos **SCN**, **NCO**, **N₃** e o ligante **dm_{ba}** demonstraram produzir níveis estatisticamente significativos ($p < 0,001$) da citocina IFN- γ em relação ao controle negativo do animal portador de tumor tal como o ligante **dppp**, porém em menor grau ($p < 0,05$). Já a *cis*-Pt e o composto **Cl** não induziram produção estatisticamente significativa ($p > 0,05$) da citocina IFN- γ quando comparados ao controle negativo do animal portador de tumor, conforme mostrado na Fig.6A.

De todos os compostos investigados, somente o **N₃** produziu nível de interferon- γ significativamente maior ($p < 0,05$) que o padrão *cis*-Pt após 24h de exposição.

Por sua vez, na incubação de 48h todas as espécies (compostos, ligantes e *cis*-Pt) não promoveram liberação estatisticamente significativa de IFN- γ após 48h ($p > 0,05$) em relação ao controle negativo dos camundongos portadores de tumor, conforme observado na Fig.6B. Nenhum dos compostos produziu níveis estatisticamente relevantes em relação ao padrão *cis*-Pt após 48h de exposição.

Os linfócitos de camundongos sadios foram investigados quanto aos controles negativo e positivo. Comparando-se o controle negativo do animal sadio ao controle negativo do camundongo portador do tumor não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quanto à liberação da citocina IFN- γ tanto para 24 quanto para 48h.

A



B

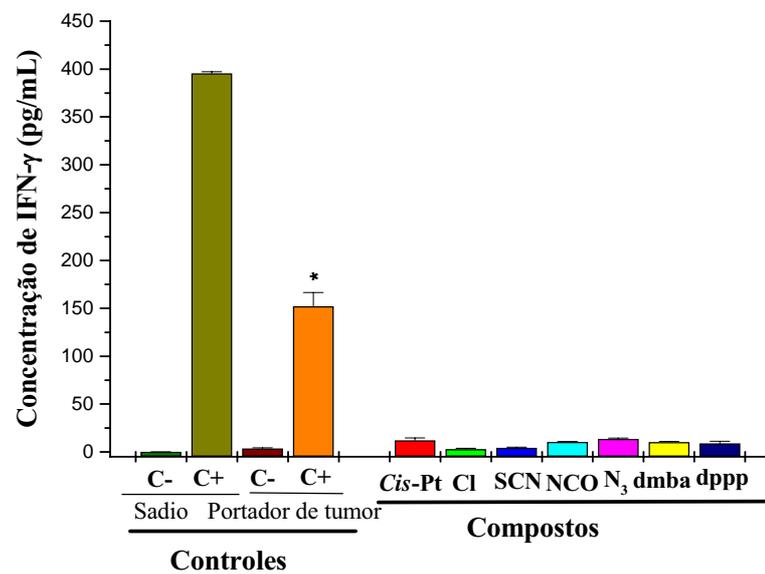


Fig. 6. Produção de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de linfócitos extraídos de linfonodos Os linfócitos foram incubados com os compostos, ligantes ou *cis*-Pt (IC_{50} de 24 ou 48h) por 24 (A) ou 48h (B), respectivamente. As células no meio de cultura correspondem ao controle negativo (C-) e as com Con A, ao controle positivo (C+). A determinação do IFN- γ foi realizada pelo teste imunoenzimático (ELISA), conforme as instruções do fabricante.

*** $p < 0,001$, significativo em relação ao controle negativo do animal portador do tumor.

* $p < 0,05$, significativo em relação ao controle negativo do animal portador do tumor.

§ $p < 0,05$, significativo em relação à *cis*-Pt.

Tabela 11 – Efeitos dos compostos na produção de IFN- γ em culturas de linfócitos

$IC_{50}^{1,2}$ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	$24h^1$	$48h^2$
Cis-Pt	10,91 \pm 1,68	12,03 \pm 2,52
Cl	6,35 \pm 0,82	2,96 \pm 0,83
SCN	16,06 \pm 1,10	4,31 \pm 0,69
NCO	16,12 \pm 2,54	10,51 \pm 0,42
N₃	20,90 \pm 1,62	13,50 \pm 0,96
dmba	16,52 \pm 0,50	10,14 \pm 0,76
dppp	12,84 \pm 2,35	8,80 \pm 2,35
C- (tumor)	3,16 \pm 0,74	3,53 \pm 0,71
C+ (tumor)	291,87 \pm 7,40	152,20 \pm 14,30
C- (sadio)	0,74 \pm 0,17	0,13 \pm 0,02
C+ (sadio)	342,81 \pm 4,59	395,49 \pm 1,78

^{1, 2} Valores de IC_{50} de 24 e 48 h, respectivamente; **Cis-Pt** = *Cis*-platina; **Cl** = [Pd(dmba)(Cl)(dppp)]; **SCN** = [Pd(dmba)(SCN)(dppp)]; **NCO** = [Pd(dmba)(NCO)(dppp)]; **N₃** = [Pd(dmba)(N₃)(dppp)]; **dmba** = N,N-dimetilbenzilamina; **dppp** = [1,3 - bis(difenilfosfina)propano] ; **C-** = controle negativo de camundongo portador de tumor ou sadio; **C+** = controle positivo de camundongo portador de tumor ou sadio. Os valores são expressos em picogramas/mL \pm desvio-padrão.

4.8. Quantificação da atividade citotóxica/citolítica das células aderentes frente às células tumorais de Ehrlich

As células peritoneais aderentes dos camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma sólida foram incubadas em triplicata por 24 ou 48h com os compostos **Cl**, **SCN**, **NCO**, **N₃**, ligantes **dm_{ba}**, **dppp** e a droga padrão, *cis*-Pt, nas concentrações do IC₅₀ de 24 ou 48h e meio RPMI-1640-C (controle negativo).

Os valores de IC₅₀ de 24h determinados para as células aderentes expostas aos compostos **SCN**, **NCO**, **N₃**, ao ligante **dm_{ba}** e à *cis*-Pt por 24h demonstraram promover aumento da citotoxicidade das células aderentes a níveis estatisticamente significativos (variando entre $p < 0,05$ e $p < 0,001$), já as espécies **Cl** e **dppp** não promoveram aumento da citotoxicidade, conforme Fig.7A.

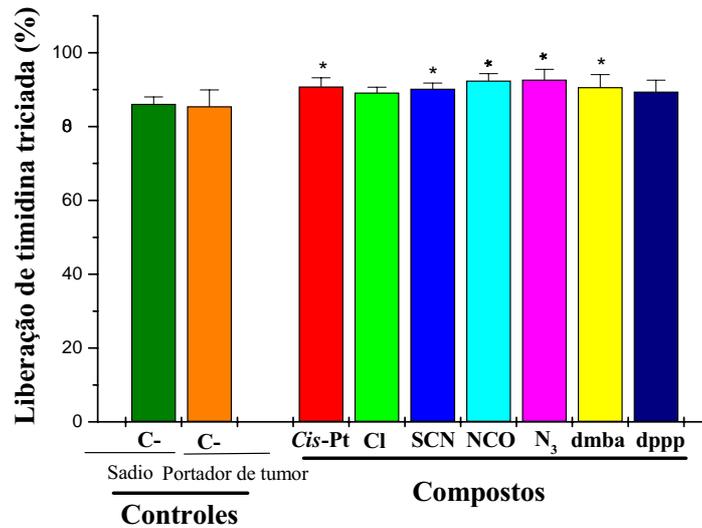
Incubando-se as células aderentes expostas aos compostos, aos ligantes e à *cis*-Pt por 48h, verificou-se que as diferenças entre a liberação de timidina-H³ pelas células tumorais na co-cultura com células aderentes expostas às espécies testadas e a liberação pela co-cultura de células tumorais com células aderentes não expostas às espécies testadas (controle negativo do animal portador de tumor) não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$), conforme Fig.7B.

Os compostos testados não foram estatisticamente significativos quanto à citotoxicidade em relação ao padrão *cis*-Pt em 24 ou para 48h de exposição.

Testando-se as células aderentes de camundongos sadios observou-se que tanto o controle negativo do camundongo sadio quanto o do portador de tumor não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ($p > 0,05$) tanto para 24 quanto pra 48h de exposição.

A porcentagem de liberação de timidina, a qual é diretamente proporcional ao grau de citotoxicidade das células aderentes, para 24 e 48h está ilustrada nas Fig. 4A e 4B.

A



B

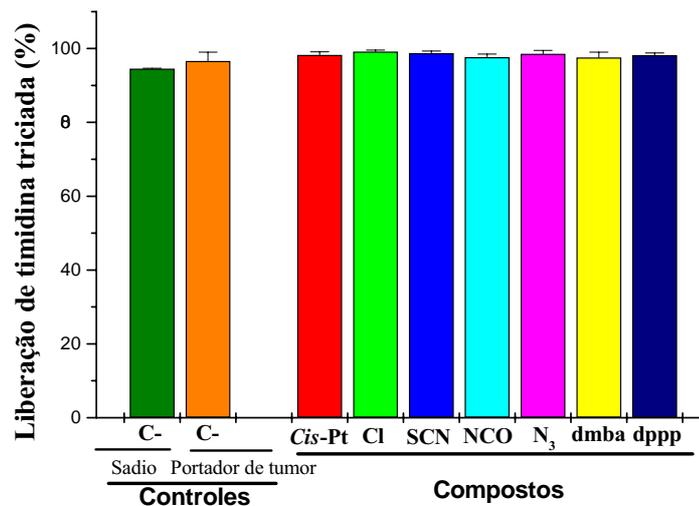


Fig. 7- Medida da atividade citotóxica mediada pelas células aderentes. As células tumorais foram marcadas com timidina- H^3 . Paralelamente, as células peritoneais aderidas de animais portadores do tumor sólido de Ehrlich foram incubadas com os compostos, ligantes ou a *cis*-Pt ou somente meio RPMI-1640-C (controle negativo) por 24 ou 48 h (IC_{50} de 24 ou 48h, respectivamente). As células tumorais marcadas foram reajustadas e adicionadas à placa contendo as células aderidas e lavadas. Tal co-cultura foi incubada por 24 (A) ou 48h (B) e então os sobrenadantes foram transferidos e adicionados líquido de cintilação. As células aderidas foram também lisadas com SDS, transferidas e adicionadas líquido de cintilação para leitura da radiação em cintilador. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

*** $p < 0,001$, significativo em relação ao controle negativo do camundongo portador de tumor.

* $p < 0,05$, significativo em relação ao controle negativo do camundongo portador de tumor.

Tabela 12 – Citotoxicidade de células aderentes após exposição aos compostos.

$IC_{50}^{1,2}$ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	$24h^1$	$48h^2$
Cis-Pt	90,84 \pm 2,38	98,27 \pm 0,86
Cl	89,17 \pm 1,51	99,13 \pm 0,44
SCN	90,24 \pm 1,55	98,71 \pm 0,60
NCO	92,40 \pm 1,93	97,66 \pm 0,85
N₃	92,70 \pm 2,81	98,53 \pm 0,97
dmba	90,67 \pm 3,39	97,56 \pm 1,45
dppp	89,45 \pm 3,10	98,24 \pm 0,54
C- (tumor)	85,49 \pm 4,46	96,63 \pm 2,37
C- (sadio)	86,11 \pm 1,92	94,54 \pm 0,13

^{1,2} Valores de IC_{50} de 24 e 48 h, respectivamente; **Cis-Pt** = *Cis*-platina; **Cl** = [Pd(dmba)(Cl)(dppp)]; **SCN** = [Pd(dmba)(SCN)(dppp)]; **NCO** = [Pd(dmba)(NCO)(dppp)]; **N₃** = [Pd(dmba)(N₃)(dppp)]; **dmba** = N,N-dimetilbenzilamina; **dppp** = [1,3 - bis(difenilfosfina)propano] ; **C-** = controle negativo de camundongo portador de tumor ou sadio; **C+** = controle positivo de camundongo portador de tumor ou sadio. Os valores são expressos em % de liberação de timidina- H^3 \pm desvio-padrão.

V. DISCUSSÃO

Uma das principais causas de morte no mundo todo é o câncer, sendo a segunda maior causa de morte nos países industrializados depois de doenças cardiovasculares, destacando-se o câncer de mama pela alta incidência e elevada taxa de mortalidade entre as mulheres (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2006).

Sabe-se que atualmente a quimioterapia do câncer dispõe tanto de compostos inorgânicos, como por exemplo, o taxol, a vimblastina e a doxorrubicina, quanto de compostos inorgânicos contendo metais, por exemplo, a carboplatina e a cis-platina (*cis*-Pt).

A *cis*-Pt demonstra uma extensa utilidade no tratamento de vários tipos de cânceres, tais como os de testículos e de ovário, além de participar na quimioterapia combinada para o tratamento do câncer de mama (FARRELL et al., 2004).

A inibição do crescimento tumoral pelo emprego da *cis*-Pt foi atribuída a várias propriedades, incluindo a penetração na membrana celular por difusão passiva (JAMIESON; LIPPARD, 1999) ou por transporte ativo (SHERMAM e LIPPARD, 1987; ISHIDA et al., 2002; LIN et al., 2002) acúmulo no núcleo da célula tumoral e interação com o DNA, sendo essa última, a chave que leva à inibição do crescimento tumoral (JAMIESON e LIPPARD, 1999; KOMEDA, 2003). Porém, os pacientes tratados sofrem com seus efeitos tóxicos, além de que vários tipos de câncer tratados com a *cis*-Pt adquirem resistência no decorrer de seu uso na quimioterapia (DECATRIS et al., 2004).

Em função das desvantagens associadas à *cis*-Pt, existe uma crescente busca por novas drogas citotóxicas e citostáticas, com ações antitumorais, porém mais seletivas, com menor incidência de toxicidade sistêmica. Dessa forma, novos agentes quimioterápicos a base de metais de transição, especialmente de metais pertencentes ao grupo da platina, que sejam menos tóxicos e, ou que possuam um espectro de atividade antitumoral mais amplo são pesquisados (McKEAGE et al., 1991).

Estudos utilizando complexos de paládio(II) permitiram observar que os mesmos apresentam ligações cruzadas com o DNA levando à morte celular por apoptose (QUIROGA et al., 1998a). Esse resultado reflete uma resposta do organismo semelhante àquela observada pela presença da *cis*-Pt e isso indica que organometálicos derivados de paládio(II) são fármacos com grande potencial antitumoral.

Segundo McAULIFFE e colaboradores (1991) e Navarro-Ranninger e colaboradores (1993), os compostos organometálicos de paládio(II) apresentam uma atividade antitumoral pequena quando comparados aos compostos contendo platina, devido a sua alta labilidade exibida em meio biológico. Nesse sentido, os compostos ciclopaladados surgem como uma alternativa despertando um recente e grande interesse na aplicação como agentes antineoplásicos, não somente por produzirem complexos estáveis o suficiente para permitir uma ação eficaz da droga no organismo, mas também por possuírem uma citotoxicidade consideravelmente menor que os análogos da platina.

No tocante aos ligantes difosfínicos, os mesmos são bases moles de Lewis, dando origem à formação de complexos muito estáveis com o paládio(II), o que permite o seu emprego como agentes antitumorais, pois impede a decomposição dos organometálicos por vias metabólicas até a sua ação sobre a molécula do DNA. (CAIRES et al., 1999).

Sabe-se que o tumor de Ehrlich (EHRlich e APOLANT, 1905), um tumor transplantável originado de um adenocarcinoma mamário de rápido crescimento e comportamento agressivo (SEGURA et al., 2000), é capaz de crescer em quase todas as linhagens de camundongos, sugerindo que o reconhecimento e a resposta imune a este tipo de tumor são independentes do MHC (CHEN; WAITIKINS, 1970). Tal característica sugere que o controle do tumor de Ehrlich está relacionado com a imunidade inata, especialmente no que diz respeito à resposta inflamatória do que com resposta mediada por células T (NASCIMENTO et al., 2006).

Em 1983, Mosmann desenvolveu a técnica colorimétrica utilizando o 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-brometo de difeniltetrazólio (MTT). Essa técnica tem sido muito empregada atualmente para avaliar a viabilidade celular, inclusive de macrófagos colocados em contato com compostos inorgânicos (QUIROGA et al., 1998b; CAIRES et al., 1999).

No presente estudo, empregou-se diferentes concentrações de soluções de complexos organometálicos de paládio(II) de fórmula geral: $[Pd(C-dmba)(X)(dppp)]$, X= haleto (Cl) ou pseudo-haleto (SCN, NCO, N₃), dmba= N,N-dimetilbenzilamina e dppp= 1,3-bis(difenilfosfina)propano, frente a células aderentes e linfócitos de camundongos normais ou portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida e também somente sobre células tumorais de Ehrlich visando-se determinar a viabilidade celular (MOSMANN, 1983), comparando-os com o padrão *cis*-Pt.

Observando nossos resultados, pode-se observar que o potencial citotóxico dos compostos de paládio(II) e da *cis*-Pt, determinado experimentalmente para células aderentes e linfócitos de camundongos normais ou portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida, e para a linhagem tumoral de Ehrlich, é dependente da concentração, ou seja, é dose-dependente (Tabelas 2, 3 e 4).

Os resultados apresentados na Tabela 2, com relação ao índice de citotoxicidade mediano (IC₅₀) após 24 e 48h de exposição dos compostos sobre as células tumorais de Ehrlich, demonstraram que todos os compostos e o ligante **dmba** exibiram maior citotoxicidade (menores concentrações) tanto para 24 quanto para 48h, quando comparados à droga padrão *cis*-Pt (33,22±2,97 e 27,50±2,36, respectivamente). A *cis*-Pt apresentou menor citotoxicidade (maior concentração foi necessária) para as células tumorais de Ehrlich, comparada aos compostos, sendo este um bom prognóstico para esses, comprovando seu elevado potencial citotóxico. Em relação à sensibilidade das células tumorais de Ehrlich, esta mostrou-se tão sensível quanto outras linhagens celulares citadas na literatura ao potencial

tóxico dos compostos (NAVARRO-RANNINGER et al., 1996; QUIROGA et al., 1998a; QUIROGA et al., 1999).

Apenas o ligante **dppp** apresentou IC_{50} elevado tanto em relação à *cis*-Pt quanto em relação aos compostos, sendo assim, tal ligante isolado exerceu menor efeito citotóxico sobre as células tumorais. Analisando-se esses resultados, observou-se a importância da coordenação da fosfina aos compostos testados, uma vez que ela isolada não é citotóxica para as células tumorais. Em estudo anterior verificou-se que a coordenação da fosfina aumenta a toxicidade dos compostos, comprovando sua citotoxicidade *in vitro* e uma grande atividade antitumoral *in vivo* (ROCHA, artigo submetido). Da mesma forma, a coordenação de ligantes bifosfínicos em compostos azido-ciclopaladados mostrou índices de citotoxicidade (concentrações que acarretam queda de 50 % na viabilidade celular) sobre células de colon de útero, orofaringe e glioma cerebral, variando de 0,5 a 30 μ m, indicando elevado potencial citotóxico dos compostos contendo paládio(II) coordenado à fosfina em sua estrutura (CAIRES et al., 1999).

Uma variedade de compostos ciclometalados foi utilizada com sucesso, como compostos apresentando atividade citotóxica, especialmente sobre linhagens de células tumorais sensíveis e resistentes à *cis*-Pt. Navarro-Ranninger e colaboradores (1996) e Quiroga e colaboradores (1998a e 1999), verificaram atividade antitumoral de ciclometalados de platina e paládio tendo como ligante a tiosemicarbazona p-isopropilbenzaldeído (p-is.TSCN).

Em outros estudos, relatou-se a citotoxicidade de compostos derivados do paládio em duas linhagens leucêmicas (HL60 e K562) avaliados pelo teste de redução utilizando o sal de tetrazólio (MTT) e ainda pelo método de exclusão pelo Azul de Tripán, sugerindo que os compostos apresentam potenciais tóxicos que seguem uma curva dose-dependente (ROCHA et al., 2003).

Ghosh e colaboradores (1998) demonstraram que o aumento do número de macrófagos após tratamento com boro pode prolongar o tempo de sobrevivência do

camundongo; tal efeito foi parcialmente atribuído à morte das células tumorais induzida pelos macrófagos.

Considerando esses resultados, é importante lembrar que os macrófagos são elementos fundamentais no combate às células tumorais e devem ter, no mínimo, sua viabilidade preservada e, se possível, terem sua atividade aumentada a fim de combater o tumor. Neste trabalho foi investigado o efeito dos compostos organometálicos de paládio(II) na viabilidade e na ativação de macrófagos obtidos de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich.

A Tabela 3 ilustra os valores de IC_{50} após 24 e 48h de exposição aos compostos para células aderentes, dentre as quais se encontram os macrófagos, obtidas de camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma sólida. Os compostos **Cl**, **NCO** e o ligante **dmba**, apresentaram maior potencial citotóxico que a *cis*-Pt em ambos períodos de exposição (24 e 48h), fato que não corresponde ao esperado, uma vez que o ideal seria que compostos não fossem tóxicos para as células aderentes tanto quanto para as células tumorais. Por outro lado, os compostos **SCN** e **N₃** e o ligante **dppp** apresentaram menor citotoxicidade para células aderentes assim como a *cis*-Pt apenas para 24 e 48h.

A Tabela 4 mostra os valores de citotoxicidade observada pelos compostos sobre os linfócitos. Os valores médios de IC_{50} obtidos para linfócitos após 24 ou 48h de exposição demonstraram ser muito próximos aos valores encontrados para as células aderentes. Portanto, observou-se um perfil de citotoxicidade similar ao relatado para as células aderentes. Vale a pena ressaltar que a citotoxicidade dos compostos e da *cis*-Pt avaliada nas culturas das células imunológicas (aderentes e linfócitos) mostrou-se aumentada em aproximadamente 40% após 48h de exposição, outra vantagem dos compostos em relação à *cis*-Pt.

Analisando-se os resultados obtidos quanto à citotoxicidade (Tabelas 2, 3 e 4) observou-se que todos os tipos celulares testados (células tumorais, aderentes e linfócitos) são

sensíveis aos efeitos tóxicos dos compostos de paládio(II), ligantes e o padrão testados apresentando, na maioria dos casos, maior citotoxicidade para as células tumorais após 48h de exposição, tendo se destacado o composto N₃ como sendo o composto capaz de exercer maior efeito citotóxico sobre as células tumorais que sobre as aderentes e linfócitos, ou seja, promove a morte das células tumorais com uma concentração menor que a necessária para matar as células imunes. O NCO, também apresentou potencial citotóxico em relação às células tumorais aumentado após 48h, mantendo sua toxicidade para as células aderentes e linfócitos após 24 e 48h de exposição. Já o CI mostrou-se mais citotóxico para as células tumorais e menos para as aderentes após 48h de exposição, porém mostrou-se mais citotóxico para os linfócitos, uma célula que deveria ter sua viabilidade preservada por participar na defesa imunológica contra os tumores (SHANKARAN et al., 2001).

Toda vez que se encontram estimulados, os macrófagos sofrem um processo de ativação, caracterizado por um rápido aumento no metabolismo, motilidade e atividade fagocítica. Os macrófagos ativados não funcionam apenas como fagócitos, essas células também secretam mais de cem produtos, dentre eles, enzimas, componentes do complemento, fatores de coagulação, espécies reativas de oxigênio, citocinas, etc (STITES et al., 2000).

Os macrófagos são capazes de responder a diferentes estímulos de membrana através da produção de espécies reativas de oxigênio [ânion superóxido(O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila(OH⁻)] e nitrogênio [óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO⁻)], os quais apresentam atividades citotóxicas e microbicidas (NEUMANN e BELOSEVIC, 1996; WINK e MITCHELL, 1998; KIM et al., 2000). Vários estudos demonstraram que H₂O₂ e NO também são importantes moléculas sinalizadoras intra e intercelular, participando de muitos processos fisiológicos (RAMASARMA, 1990; KELM et al., 1997; ROBBINS e GRISHAM, 1997; KIM et al., 2000; LUM et al., 2002).

Após estimulação, os fagócitos mono e polimorfonucleares sofrem mudanças em seu metabolismo, aumentando o consumo de O₂ a níveis até 50 vezes superiores aos observados

nas células não estimuladas. Concomitantemente, ocorre um aumento da oxidação com produção de adenina-difosfato-nicotinamida oxidase (NADPH) que leva a redução do O_2 à O_2^- , o qual por dismutação espontânea ou pela superóxido dismutase, leva à formação do H_2O_2 . (DAHLGREN e KARLSSON, 1999; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; FORMAN e TORRES, 2001).

Os macrófagos são células que produzem e liberam EROs em resposta à fagocitose ou à estimulação com vários agentes, como por exemplo o PMA. O PMA é um estimulante químico hidrofóbico que pode atravessar a membrana citoplasmática do fagócito independentemente de receptor e é capaz de se ligar e também ativar a proteína quinase C, causando uma grande variedade de efeitos nas células (BENDER et al., 1983).

As figuras 2A e 2B mostram a produção de H_2O_2 em cultura de células peritoneais de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich, quando em contato com os compostos **Cl**, **SCN**, **NCO**, **N₃** e os ligantes **dmba** e **dppp**. Observou-se que utilizando o IC_{50} de 24h os compostos e ligantes investigados, com exceção do **NCO** e **dmba**, estimularam a produção de H_2O_2 (Fig. 2A) bem como a *cis*-Pt. Os compostos **Cl**, **SCN** e **N₃** mantiveram níveis moderados da produção de H_2O_2 em ambas as concentrações testadas.

Verificou-se que o IC_{50} de 48h (Fig. 2B) da *cis*-Pt e da **dppp** diminuíram a produção de H_2O_2 . O composto **NCO** e o ligante **dmba** mantiveram o perfil de ação observado para ambos IC_{50} utilizados (24 e 48h), não estimulando a produção de H_2O_2 em nenhuma das concentrações testadas.

Dependendo de suas concentrações relativas e também do acesso aos sítios celulares, espécies reativas do oxigênio (EROs) podem ter papéis diferentes na célula (RAMASARMA, 1990). Um estresse oxidativo severo está associado a disfunções celulares, resultando na ativação de mecanismos de reparo, apoptose e até necrose das células (FORMAN e TORRES, 2001).

As EROs desempenham duplo papel nos sistemas biológicos, visto que podem ser tanto benéficas ou maléficas para o organismo. Dentre seus efeitos benéficos destacam-se pela defesa contra agentes infecciosos e na sinalização de sistemas celulares. Em contraste, em altas concentrações, as EROs podem ser importantes mediadores no dano a estruturas celulares, incluindo lipídeos e membranas, proteínas, e ácidos nucleicos, sendo que tal dano oxidativo tem sido relatado como um fator importante no desenvolvimento de doenças como câncer, arteriosclerose, artrite, desordens neurdegenerativas e outras doenças (VALKO et al., 2006).

Os efeitos maléficos das EROs são balanceados pela ação antioxidante de antioxidantes não-enzimáticos em conjunto com enzimas antioxidantes (VALKO et al., 2006). Mais especificamente, a modulação dos níveis de H_2O_2 baseia-se no intercâmbio de dois sistemas antagônicos: 1) as selenoenzimas de ação antioxidante, promovendo o decréscimo dos níveis de H_2O_2 ; 2) a geração inibidores da peroxidase, cujos efeitos acarretam no aumento da concentração do H_2O_2 . O equilíbrio entre ambos os sistemas pode prevenir conseqüências anormais no metabolismo celular (THOMASZ et al., 2007).

Uma vez que o composto **NCO** e o ligante **dmba** não produziram H_2O_2 nas concentrações do IC_{50} de 24 ou 48h (Fig. 2A e 2B), pesquisou-se a presença de inibição da produção desse mediador. As porcentagens de inibição dos compostos sobre a produção de H_2O_2 estão ilustradas na Tabela 7. Analisando-se os resultados, o composto **NCO** mostrou inibir totalmente (100%) a produção de H_2O_2 pelas células aderentes estimuladas pelo PMA tanto para o IC_{50} de 24 quanto para o de 48h; o ligante **dmba** mostrou inibir a produção de tal reativo em $78,39 \pm 1,02\%$ para 24 h e totalmente (100%) para 48h de exposição.

Uma provável explicação para essa inibição, de acordo com a literatura, é que o crescimento do tumor de Ehrlich induz uma inibição das enzimas superóxido dismutase e catalase (SUN et al., 1989), fundamentais na eliminação dos radicais livres como o ânion superóxido e H_2O_2 (RUSHMORE e PICKET, 1993), levando então a um aumento dos níveis

de H₂O₂ produzidos. Assim, a inibição da produção do H₂O₂ pode ser devida a uma possível capacidade do composto **NCO** e do ligante **dmba** reverterem a inibição das enzimas superóxido dismutase e catalase, levando à diminuição ou inexistência da produção de H₂O₂.

Em pesquisa mais recente (GUPTA et al., 2004) observou-se que nos camundongos portadores do tumor de Ehrlich a planta *Bauhinia racemosa* apresentou efeitos antioxidantes agindo por um mecanismo que envolve a modulação da peroxidação lipídica e o aumento do sistema de defesa antioxidante, sendo essa potencialização do sistema de defesa antioxidante uma outra explicação provável para a inibição do H₂O₂ pelo composto **NCO** e o ligante **dmba**.

Os intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio são importantes produtos secretados pelos macrófagos (ZWILLING e EISENSTEIN, 1994). Dentre as várias moléculas efetoras produzidas pelas células *natural killer* (NK), células T e macrófagos ativados no combate às células tumorais, destaca-se o óxido nítrico (NO) produzido pelos macrófagos citotóxicos (LALA, 1998) e em menor proporção pelas células NK (FILEP et al., 1996).

Estudos envolvendo o papel do NO no combate a tumores têm demonstrado papéis citostáticos e citotóxicos. O NO estimula o acúmulo da proteína p53 em muitas células porque ele inibe a degradação proteossomal da mesma (GLOCKZIN et al., 1999). A p53 causa a ativação transcricional de muitos genes que conduzem à interrupção do ciclo celular (efeito citostático) e apoptose (AMBS et al., 1997). Além disso, o NO pode causar também a morte celular por necrose (SHIMAOKA et al., 1995). A escolha entre as vias apoptótica e necrótica pode ser determinada pela quantidade de ferro intracelular não-heme, o qual pode proteger da morte por necrose (KIM et al., 2000). O efeito citostático mediado pelo NO e a apoptose são considerados como parte dos mecanismos que conduzem à citotoxicidade dos macrófagos contra células tumorais (LALA, 1998).

No presente estudo, utilizando-se as concentrações ideais de cada composto (IC₅₀) tanto para 24 quanto para 48h de exposição, procedeu-se à dosagem de NO. Utilizando-se a

técnica de detecção de nitrito nos sobrenadantes das culturas pelo reagente de Griess, foi possível detectar a liberação de NO para 24 e 48h de exposição aos compostos organopaladados. Observou-se que em ambos os períodos de incubação, somente o composto **NCO**, os ligantes **dmba** e **dppp** e a *cis*-Pt produziram níveis significativos de NO em relação ao controle negativo do animal portador de tumor. Comparando-se as concentrações de NO produzidas em 24 com 48h, observou-se que o composto **NCO**, o ligante **dppp** tal como a *cis*-Pt, após 48h de exposição, promoveram aumento da produção do mediador NO ($p < 0,001$). Apenas o ligante **dmba** diminuiu os níveis de produção de NO ($p < 0,05$) com o aumento do tempo de incubação.

A presença do tumor no camundongo influenciou a produção de NO pelas células aderentes tanto após 24 como 48h de incubação, indicando que a própria condição patológica pode de alguma forma, estimular os macrófagos a produzirem NO. Esse dado pode ser observado quando se compara os controles negativos (sem estímulo) entre animais sadios e portadores de tumor ($p < 0,001$).

O NO possui duplo papel no processo inflamatório. Em concentrações moderadas a baixas auxilia contra invasão de células estranhas ao organismo, promovendo uma ativação do sistema imune na defesa contra vírus, bactérias, fungos e células tumorais (MACMICKING et al., 1997). Porém numa concentração elevada, este mediador torna-se citotóxico, não seletivo e, com efeito deletério (MONCADA et al., 1991; MONCADA e HIGGS, 1995; LALA, 1998), podendo agir contra as células tumorais. Nossos resultados de 48h demonstraram elevada produção desse mediador para o composto **NCO**, ligante **dppp** e a *cis*-Pt, sendo que o composto **NCO** estimulou a produção de NO a um nível equivalente a do controle positivo, porém em relação à *cis*-Pt não foi significativo.

Foi demonstrado primeiramente que o NO produzido pelos macrófagos participa da morte das células tumorais. Entretanto, estudos revelam que o NO não é consideravelmente tóxico para uma variedade de tipos celulares. Comparado ao peróxido de hidrogênio em

concentrações similares, as quais resultam em 99% ou mais de morte celular, o NO não é um potente agente tóxico (WINK e MITCHELL, 1998).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem desempenhar diferentes papéis nas células dependendo das concentrações relativas de cada um e dos sítios celulares acessíveis a tais espécies. O NO não é um potente oxidante; entretanto, ele reage com o ânion superóxido (O_2^-) formando um potente oxidante, o peroxinitrito ($ONOO^-$). O peroxinitrito é formado pelas células inflamatórias ativadas e células endoteliais, tendo demonstrado oxidar diversas moléculas biológicas e nitrosilar proteínas livres ou resíduos de tirosina das proteínas, além de outros fenóis (ISCHIROPOULOS et al., 1996; LINARES et al., 2001). Nenhum dos compostos em nosso estudo promoveu a liberação concomitante de H_2O_2 e NO, porém tal efeito somente foi observado para o ligante **dppp**.

Os testes de inibição foram realizados para os compostos **Cl**, **SCN** e **N₃** que não promoveram a produção de NO após 24 ou 48h de incubação (Fig. 3A e 3B). Na Tabela 8, observa-se as porcentagens de inibição de tais compostos que variaram de $74,7 \pm 2,08$ a $96,93 \pm 1,92$.

O fato de promover a inibição da produção de NO pode ser benéfica, visto que tais compostos podem ser empregados como agentes anti-inflamatórios, dado que a produção exagerada de NO parece mediar seus efeitos pró-inflamatórios estando relacionados a várias doenças como o choque séptico, doenças auto-imunes, arteriosclerose. Ainda, as condições inflamatórias crônicas podem induzir o desenvolvimento do câncer (MONCADA et al., 1991; CIRINO et al., 2002).

Outro efeito prejudicial do NO relatado na literatura é o fato de que este mediador pode promover também a progressão tumoral pelo estímulo da COX-2, enzima envolvida na produção de prostaglandinas. Tanto as concentrações de NO quanto de prostaglandinas têm sido associadas positivamente com a inflamação e progressão tumoral. Elevada produção de prostaglandinas pelos tumores resulta da COX-2, a qual tem sido encontrada em muitos tipos

de cânceres humanos, incluindo os de colon, estômago, mama, cabeça e pescoço, e pâncreas. Assim, drogas quimioterapêuticas ou quimiopreventivas capazes de inibir tanto a COX-2 quanto a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela formação do NO, podem se tornar importantes adjuvantes para a inclusão em protocolos terapêuticos (LALA e CHAKRABORTY, 2001). Pode-se também considerar a hipótese de que os compostos Cl, SCN e N₃ inibam a indução da iNOS em macrófagos murinos a nível transcricional, já que a produção de NO induzida pelo LPS foi inibida pelos compostos. Experimentos futuros investigando a ativação da NF-κB podem ser realizados a fim de se verificar essa inibição, uma vez que a NF-κB é um dos mais importantes fatores de transcrição no controle de genes pró-inflamatórios como TNF-α e iNOS (LOPES et al., 2005). Assim, os compostos que promoveram a inibição do NO podem ser inibidores em potencial da iNOS e/ou da COX-2, propondo-se a realização de testes futuros com os compostos Cl, SCN e N₃.

Uma outra possível explicação para a citotoxicidade dos compostos Cl, SCN e N₃ seria a capacidade de tais promoverem a morte das células tumorais por ações diretas no DNA das células, independentemente da produção de NO. Em estudo mostrou-se que os compostos *orto*-ciclometalados de Pd(II) e Pt(II) paladados formam ligações cruzadas inter-hélice com o DNA. (QUIROGA et al., 1998b). Ainda, apesar de não produzirem NO, produzem H₂O₂, um reativo que pode estar colaborando na resposta imune citotóxica contra as células tumorais (RAMASARMA, 1990).

Desta maneira, neste estudo, tanto os compostos que produziram quanto os que inibiram o NO, podem contribuir para a contenção do tumor, seja de forma direta (ação citotóxica sobre as células tumorais) ou indireta (na contenção da resposta inflamatória circunscrevendo o tumor), resultados também observados na literatura (LAVNIKOVA et al., 1993; SIMEONE et al., 2002).

Analisando-se conjuntamente os resultados apresentados até o momento, pode-se notar que compostos como o Cl, SCN e N₃ demonstraram inibir a produção de NO, porém

produziram H_2O_2 . De forma contrária, o composto **NCO** inibiu a produção de H_2O_2 , porém produziu NO.

Existem relatos na literatura de que o NO pode inibir o consumo de H_2O_2 ; enquanto que a catalase e o H_2O_2 , por sua vez, podem consumir o NO, diminuindo sua biodisponibilidade (WINK e MITCHELL, 1998). Assim, esse mecanismo de regulação que ocorre entre tais reativos pode ser uma explicação para os compostos que produziram o H_2O_2 (**SCN**, **NCO**, **N₃**) e que diminuíram em até 100% a biodisponibilidade do NO.

É de conhecimento da comunidade científica que a produção de NO é influenciada pela presença de mediadores imunológicos, as citocinas. Essas citocinas são os primeiros sinais que comunicam a presença da infecção e inflamação, ativando o sistema imune de forma coordenada. Os macrófagos são as primeiras células a reconhecerem o agente invasor e produzir uma variedade de citocinas, incluindo TNF- α (fator de necrose tumoral- α), IL-1 (interleucina-1), IL-6 (interleucina-6) entre outras (SORIMACHI, 1999).

Estudo demonstrou que a estimulação de células A549 de epitélio pulmonar e de células primárias de vias aéreas humanas pelas citocinas TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , resultou em uma expressão aumentada do RNA mensageiro (mRNA) para a iNOS tal como uma aumentada produção de NO (BERKMAN et al., 1996).

Sabe-se que as interações entre as células tumorais com seu microambiente podem afetar o crescimento tumoral e a formação de metástase. O microambiente tumoral pode variar entre os tipos de tumores e os estágios da doença, fato que é complexo e consiste de muitos fatores e tipos celulares. Dentre os componentes do microambiente tumoral, as células inflamatórias e as citocinas têm demonstrado desempenhar um papel-chave no câncer de mama (BEN-BARUCH, 2003).

A ação da citocina TNF- α no câncer é paradoxal, variando de acordo com as condições fisiológicas e de forma dependente do tipo celular envolvido, fato que contribui para um senso de ambigüidade em relação a seus efeitos antitumorais. O TNF- α endógeno,

produzido cronicamente no microambiente do tumor pode aumentar seu desenvolvimento e a metástase, induzindo outras citocinas, contribuindo para o dano ao DNA e aumentando o crescimento/sobrevivência das células tumorais. Por outro lado, o TNF- α também é uma molécula efetora crucial na morte mediada por células T CD8 e células *natural killer* na destruição de células tumorais induzindo apoptose e necrose dessas células (FIDLER e SCHROIT, 1998; BALKWILL e MATOVANI, 2001; BALKWILL, 2002).

Estudos confirmam a citotoxicidade atribuída ao TNF- α sobre células tumorais pela capacidade de provocar a morte de células de câncer de mama humano. (WEITSMAN et al., 2004). Porém, as células sanguíneas dos pacientes com câncer de mama têm a capacidade de produzir o TNF- α reduzida, sendo assim, a produção de TNF- α tem um papel relevante no desenvolvimento do câncer de mama (ZIELINSKI et al., 2003).

Investigações recentes sugerem fortemente que a expressão crônica do TNF- α no câncer de mama está envolvida no crescimento tumoral. A quantidade de células expressando TNF- α no carcinoma de mama demonstrou estar correlacionada com aumento do tumor, sendo que a expressão do TNF- α em macrófagos associados a tumores pode desempenhar um importante papel no comportamento metastático dos carcinomas de mama (LEEK et al., 1998; MILES et al., 1994). Além do mais, pacientes com fenótipos de maior progressão tumoral demonstraram ter concentrações séricas de TNF- α significativamente elevadas (SHEEN-CHEN, 1997).

Nos experimentos inerentes ao TNF- α (Fig. 4A e 4B) verificou-se que todos os compostos foram capazes de estimular significativamente a produção desta citocina em relação ao controle negativo do animal portador do tumor. Porém, o tempo em que as células ficaram expostas aos organometálicos interferiu nos níveis de produção da citocina TNF- α . Após 48h, as células aderentes em contato com a *cis*-Pt, **Cl**, **NCO**, **dmba** e **dppp** apresentaram produção diminuída desse mediador. Apenas o composto **SCN** promoveu aumento significativo da produção do TNF- α após 48h de exposição ($p < 0,05$), tal aumento

correspondeu a aproximadamente o dobro (Fig. 4B) daquele observado em 24h. O N₃ manteve o nível de liberação de TNF- α , independentemente dos períodos em que as células foram submetidas à exposição a tal composto.

Comparando-se os compostos e ligantes com a *cis*-Pt, apenas o ligante **dppp** promoveu uma produção significativamente maior de TNF- α após 24h de exposição. Já para 48h, nenhuma das espécies testadas superaram os níveis da referida citocina produzidas em função da exposição à *cis*-Pt. Considerando-se que após 48h os níveis da citocina diminuíram e se equipararam ao nível de TNF- α produzido pela *cis*-Pt, pode-se dizer que o tempo de 48h de exposição das células aos compostos promoveu um controle da produção de TNF- α .

Ainda, verificou-se produção significativamente maior de TNF- α no controle negativo do animal portador de tumor ($76,01 \pm 18,66$ e $57,25 \pm 5,19$ após 24 e 48h de exposição, respectivamente) em comparação ao controle do animal sadio, que não produziu tal citocina em ambos períodos de exposição. Tal observação leva a crer que a presença do tumor no camundongo estimulou, de alguma forma, os macrófagos dos camundongos a produzirem tal citocina em função da presença do tumor.

Inter-relacionadas com a citocina TNF- α estão as citocinas IL-6 e IL-1, sendo que estas podem agir juntas de maneira cooperativa, sugerindo-se que estas três citocinas formam uma rede de fatores relacionados que podem afetar a progressão celular tumoral de maneira cooperativa. Atualmente, muitos estudos *in vitro* e *in vivo* têm avançado na compreensão do envolvimento das citocinas na oncologia. Algumas citocinas (IL-1, IL-6, IL-11, TGF- β) estimulam enquanto outras (IL-12, IL-18, IFNs) inibem a proliferação e/ou invasão do câncer de mama (NICOLINI et al., 2006).

A citocina interleucina-1 β (IL-1 β) é conhecida como um regulador-chave na inflamação e resposta imune. Recentemente, a IL-1 β tem sido considerada uma citocina multifuncional capaz de afetar todos os tipos celulares, induzindo a expressão de um vasto

número de citocinas (EMERY; SALMON, 1991; DINARELLO; WOLFF, 1993; DINARELLO, 1998).

Estudos demonstraram a expressão de membros da família da IL-1 no câncer de mama humano além do câncer de cabeça e pescoço (VON BIBERSTEIN et al., 1996; KURTZMAN et al., 1999; MILLER et al., 2000) e a correlação da sua expressão com a severidade da doença, já que a IL-1 aumenta a expressão da citocina IL-8 que exerce função pro-angiogênica/pro-tumorigênica. Entretanto, vários estudos demonstram o papel da família da IL-1 na modulação de células cancerígenas bem como células teciduais normais dentro do microambiente tumoral tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Outros estudos sugerem o papel da família da IL-1 na progressão do câncer de mama baseado na sua correlação com indicadores de prognóstico da doença (PATSCHENKO et al., 2003).

Em nosso estudo com os compostos organopaladados observou-se que os mesmos foram capazes de promover a produção de IL-1 β pelas células aderentes, tanto para o período de 24 quanto para o de 48h. Os compostos **NCO** e **N₃**, além do ligante **dm β** mantiveram aproximadamente os mesmos níveis ($p > 0,05$) de produção da citocina IL-1 β independente do tempo de exposição (24 ou 48h), conforme se pode observar nas Figuras 6A e 6B. A *cis*-Pt também manteve o estímulo à produção da citocina tanto para 24 quanto para 48h de exposição ($p > 0,05$). Já o composto **SCN** aumentou significativamente a produção de IL-1 β após 48h ($p < 0,005$), enquanto que o composto **Cl** e o ligante **dppp** diminuíram a liberação da citocina ($p < 0,005$ e $p < 0,006$, respectivamente), indicando que o tempo de exposição a tais espécies influencia, ora aumentando, ora diminuindo a liberação de tal citocina.

Enquanto que as células aderentes do controle negativo do animal com tumor apresentaram níveis elevados da IL-1 β tanto após 24 ou 48h de exposição ($59,51 \pm 6,25$ e $55,50 \pm 3,42$, respectivamente), as células do controle negativo do animal sadio produziram níveis significativamente menores em ambos períodos de exposição ($9,89 \pm 1,32$ e $9,72 \pm 2,49$, respectivamente).

O IFN- γ , secretado pelas células T, é requisitado para a produção do NO e para a expressão da iNOS. Os macrófagos são células alvo para o IFN- γ . Tal citocina tem demonstrado ativar macrófagos, aumentar a atividade da iNOS (MACMICKING et al., 1997), e conferir imunidade contra patógenos intracelulares (BOEHM et al., 1997).

O IFN- γ tem demonstrado potencializar a inibição do crescimento de células de câncer de mama *in vitro* (CORADINI et al., 1997; LINDNER e BORDEN, 1997). Estudo demonstrou que os linfócitos e IFN- γ colaboram para a proteção contra o desenvolvimento de sarcomas carcinógeno-induzidos, carcinomas epiteliais espontâneos e também para a seleção por células tumorais com imunogenicidade reduzida (SHANKARAN et al., 2001).

Porém, sabe-se que o tumor de Ehrlich causa efeitos sistêmicos imediatos no hospedeiro por meio de fatores solúveis secretados pelas células tumorais. Estudos relatam que na imunidade contra células tumorais o efeito do IFN- γ não é tão pronunciado. Isto foi verificado em pesquisas onde as células tumorais demonstraram inibir as respostas pelas células T mediadas pelo IFN- γ (TADA, et al., 1991; GOSH et al., 1995; HANDEL-FERNANDEZ et al., 1997; ELEXPURU et al., 1997). Da mesma forma constatou-se que em camundongos portadores do tumor de Ehrlich o número de células Th esplênicas mostrou-se diminuído 2 dias após o crescimento tumoral, além da redução do IFN- γ produzido, sendo que tal decréscimo é acompanhado pela redução do número de células CD4, sugerindo uma modulação da resposta imune do tipo Th1 (SEGURA et al., 1997).

Sendo assim, essa pode ser uma possível explicação para a baixa produção de tal citocina em nosso estudo, conforme se observa nas Figuras 7A e 7B.

Pode-se notar que mesmo os níveis dos controles positivos de 24 e 48h, ou seja, os linfócitos de camundongos portadores de tumor estimulados com um indutor de IFN- γ , a Concanavalina A (Con A), mostraram-se consideravelmente menores em relação ao controle positivo de camundongos saudáveis, confirmando a influência das células tumorais de Ehrlich sobre a diminuição da liberação de IFN- γ pelos linfócitos T.

Uma outra explicação plausível para a baixa produção de IFN- γ (no caso do composto **NCO**) seria devido ao NO, pois este quando produzido em altas quantidades age por mecanismo de feedback negativo da regulação de citocinas. Por exemplo, o IFN- γ é um potente indutor de altos níveis de NO. Altos níveis de NO, por sua vez, diminuem os níveis de IFN- γ . Tal capacidade do NO regular o IFN- γ pode ser um mecanismo eficaz de homeostase na geração da citocina IFN- γ pró-inflamatória. (TAYLOR-ROBINSON, 1997).

Embora a produção desse mediador tenha sido baixa, os compostos **SCN**, **NCO**, **N₃** e os ligantes **dmba** e **dppp** produziram níveis de IFN- γ significativamente superiores ao nível produzido pelo controle negativo do camundongo portador de tumor após 24h de exposição; já a *cis*-Pt não foi capaz de estimular significativamente a produção do IFN- γ . Dentre os compostos, destacou-se o **N₃** pois este produziu um nível de IFN- γ significativo até mesmo em relação ao padrão, *cis*-Pt.

Após 48h de exposição, nenhuma das espécies testadas, da mesma forma que a *cis*-Pt, não produziram níveis consideráveis da citocina IFN- γ em relação ao controle negativo do animal portador de tumor.

Observou-se que os compostos **SCN** e **N₃**, além do ligante **dmba** diminuíram significativamente a produção de IFN- γ pelos linfócitos após 48h de exposição. Sendo assim, tal diferença de comportamento entre os períodos de exposição de 24 e 48h nos leva a crer que as referidas espécies diminuíram a citocina IFN- γ com o passar do tempo.

Ainda, comparando-se o controle negativo do animal sadio com o portador de tumor, verificou-se que a presença do tumor influenciou na liberação do IFN- γ tanto após 24 ou 48h de exposição visto que o animal portador de tumor apresentou níveis superiores de tal citocina em relação ao sadio.

Correlacionando-se os resultados obtidos para as citocinas testadas neste estudo, observou-se que os compostos **Cl** e **SCN**, após incubação de 24h, não somente inibiram o

NO, conforme relatado anteriormente, mas também as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , podendo ter ocorrido uma inibição da indução da iNOS a nível transcrricional (LOPES et al., 1995). Ainda, o **CI** destacou-se em relação ao **SCN** como agente anti-inflamatório, pois mesmo após 48h de incubação, manteve-se inibindo o NO, não produzindo níveis significativos de IL-1 β e TNF- α , além do fato de não produzir IFN- γ em nenhum dos períodos de incubação.

Combinações específicas de citocinas como IFN- γ com o TNF- α ou IL-1 β promovem a ativação intracelular de fatores de transcrição como a NF- $\kappa\beta$ a produzir a óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela produção do NO (VLADUTIU, 1995).

Observou-se tal correlação para o composto **NCO** que mostrou-se capaz de promover a produção de IFN- γ e IL-1 β após 24 e de TNF- α e IL-1 β após 48h de incubação; ambas combinações de fato resultaram no aumento da produção de NO. Já o composto **N₃**, apesar de produzir IFN- γ e IL-1 β após 24 e TNF- α e IL-1 após 48h de incubação, não produziu níveis significativos de NO, pelo contrário, demonstrou inibir em média 75% da produção de tal reativo. Isto pode ser explicado devido a uma ação diferenciada da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A iNOS é uma das três enzimas responsáveis pela produção de NO, sendo que as principais citocinas envolvidas na estimulação da iNOS são o TNF- α , IL-1 β e IFN- γ . Por sua vez, a expressão da iNOS é regulada por diversos fatores de transcrição incluindo o NF- $\kappa\beta$. Assim, conforme já comentado anteriormente, pode estar ocorrendo uma inibição da transcrição do NF- $\kappa\beta$ e conseqüentemente da iNOS, sendo uma possível explicação para as células aderentes murinas tratadas com o **N₃** não produzirem o NO mesmo que este composto produza as citocinas necessárias para sua síntese.

Estudos morfológicos da interação de macrófagos murinos com células alvo sugerem que o contato do macrófago com o alvo envolvendo a transferência de enzimas lisossomais é o fator responsável pela desestabilização da membrana e lise da célula alvo. Os macrófagos

ativados podem distinguir células normais de células com mitose estimulada ou células tumorais, e lisar apenas as tumorais. Esse reconhecimento seletivo pode ocorrer pela ligação de macrófagos ativados a sítios específicos na superfície da membrana celular (FILDER e SCHROIT, 1988; LASKIN e LASKIN, 2001).

Nesse estudo procurou-se avaliar se a citotoxicidade das células aderentes poderiam estar alteradas quando incubadas *in vitro* com tais compostos. Verificou-se que após 24h de exposição (Fig. 7A), a *cis*-Pt promoveu aumento da citotoxicidade das células aderentes ($p < 0,05$); da mesma forma, os compostos SCN, NCO, N₃ e o ligante **dm**ba aumentaram a citotoxicidade das células em relação ao controle negativo do animal portador de tumor, sendo que o NCO e o N₃ foram os que promoveram aumento da citotoxicidade mais pronunciado ($p < 0,001$). Porém, após 48h de exposição (Fig. 7B), nenhum dos compostos testados e nem a *cis*-Pt promoveram aumento significativo da citotoxicidade em relação ao controle negativo do animal portador de tumor.

A citotoxicidade de macrófagos pode ser induzida de várias maneiras *in vitro* e *in vivo*. Tal citotoxicidade pode ser dividida em citostática e citolítica. Apesar da citotoxicidade dos macrófagos estarem relacionadas com fatores solúveis produzidos pelos mesmos, para ambos os tipos de citotoxicidade ocorrerem necessita-se do contato direto dos macrófagos com as células-alvo a fim de se iniciar a liberação de tais fatores. Uma grande variedade de mecanismos têm sido propostos para as interações citotóxicas entre os macrófagos ativados e células tumorais *in vitro*. Os macrófagos ativados são, em parte, caracterizados funcionalmente por sua capacidade de exercer efeitos citotóxicos *in vitro*, exercendo seletividade sobre as células tumorais (KLOSTERGAARD et al., 1987). A resposta citolítica em função do co-cultivo com os macrófagos ativados é mais característica para células tumorais que outros tipos celulares (KELLER, 1976).

Sugere-se que a *cis*-Pt possa ser utilizada como um modificador da resposta biológica na modulação da resposta imune celular contra a neoplasia, sendo que os macrófagos murinos

tratados com a *cis*-Pt adquirem uma capacidade aumentada de lisar as células tumorais *in vitro* (SHRIVASTAVA et al., 1997). Da mesma forma que em experimento de citotoxicidade mediado por macrófagos tratados com *cis*-Pt sobre células de linhagem tumoral de mastócitos P815 marcadas com timidina triciada, observou-se que os macrófagos tratados com a *cis*-Pt apresentaram maior citotoxicidade em relação aos não-tratados após 24h de incubação (SHISHODIA et al.,1998). Nesse particular, os compostos **NCO** e **N₃** destacam-se no presente estudo por terem apresentado capacidade citotóxica/citolítica superior àquela apresentada pela *cis*-Pt.

Baseando-se nos resultados discutidos, os compostos são promissores agentes por seus efeitos sobre as células tumorais e imunes, muitas vezes de forma igual ou superior à *cis*-Pt, droga de uso corrente na quimioterapia do câncer. Deve-se ressaltar que muitos outros estudos serão necessários e que testes sobre culturas celulares *in vitro* nem sempre correspondem aos observados em situações *in vivo*. Testes *in vitro* auxiliam e direcionam a realização de novas pesquisas farmacológicas de maior complexidade (BABICH e TIPTORB, 2002). Resultados de testes *in vitro* devem ser analisados como parte dos ensaios necessários para aplicação terapêutica dos compostos e para posteriores testes *in vivo*.

VI. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- 1- As células tumorais de Ehrlich, bem como as células aderentes e linfócitos obtidos de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich são sensíveis ao potencial tóxico dos compostos;
- 2- Os compostos **Cl**, **SCN**, **N₃** e o ligante **dppp** estimularam a produção de H₂O₂, assim como o padrão *cis*-Pt; por outro lado, o composto **NCO** e o ligante **dmba** inibiram a produção do H₂O₂ após 24 e 48h;
- 3- O composto **NCO** e os ligantes **dmba** e **dppp**, assim como a *cis*-Pt, estimularam a produção de NO; os compostos **Cl**, **SCN** e **N₃**, por sua vez, inibiram a produção do NO tanto no período de 24 ou de 48h;
- 4- Somente os ligantes **dmba**, **dppp** e o padrão *cis*-Pt induziram a produção da citocina TNF- α no período de 24 h; já para 48h, com exceção do **Cl**, todas as outras espécies aumentaram a liberação da citocina TNF- α em relação ao controle negativo dos camundongos portadores de tumor;
- 5- Os compostos **NCO**, **N₃** e os ligantes **dmba** e **dppp** e a *cis*-Pt induziram a produção da citocina IL-1 β em níveis significativos em relação ao controle negativo do animal portador do tumor nos períodos de 24 ou 48h de incubação; os compostos **Cl** e **SCN**, não induziram a produção de IL-1 após 24 h de incubação, já para 48 h, o **SCN** produziu níveis estatisticamente significativos da citocina e o **Cl** manteve-se sem induzir produção significativa.
- 6- Nenhum dos compostos testados, ligantes ou mesmo a *cis*-Pt estimularam os linfócitos a produzirem IFN- γ em grandes quantidades, fato que pode estar associado ao tipo de modelo tumoral empregado neste estudo;

7- A capacidade citotóxica/citolítica das células aderentes contra células tumorais foi aumentada somente quando estimuladas com os compostos **SCN**, **NCO** e **N₃**, o ligante **dmba**, e o padrão *cis*-Pt por 24h.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.O., HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 283-318, 1984.

AGGARWAL, B. B.; NATARJAN, K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. **Eur. Cytokine Netw.**, v.7, p.93-124, 1996.

ALVERDI, V.; GIOVAGNINI, L.; MARZANO, C.; SERAGLIA, R.; BETTIO, F.; SITRAN, S.; Graziani, R.; Fregona, D. Characterization studies and cytotoxicity assays of Pt(II) and Pd(II) dithiocarbamate complexes by means of FT-IR, NMR spectroscopy and mass spectrometry. **J. Inorg. Biochem.** v.98, p.1117–1128, 2004.

ALY, M. S.; ASHOUR, M. B.; EL NAHAS, L. M.; ABO ZEID, M. A. F. Genotoxicity and cytotoxicity of the anticancer drugs gemcitabine and cisplatin, separately and in combination: *in vivo* studies **J Biol. Sci.** v.11, p.961-972, 2003.

AMBS S.; HUSSAIN S.P.; HARRIS C.C. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. **FASEB J.**, v.11, p.443–448, 1997.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts and figures 2004. Atlanta, 2004. 60 p. Disponível em: www.cancer.org Acesso em: 13 nov. 2006.

ANANIAS, S.R.; SANTANA, A.M.; MAURO, A.E.; DE LUCCA NETO, V.A.; DE ALMEIDA, E.T. Reação de bis-inserção de 1,2-difenilacetileno na ligação Pd-C de ciclometalados. **Quim. Nova**, v.26, p.53-55, 2003.

BABICH, H.; TIPTORB, D. A. In vitro response of human gingival epithelioid S-G cells to minocycle. **Toxicol. in vitro**, v.16, p.11-21, 2002.

BAKHTIAR, R.; OCHIACHI, E.I. Pharmacological applications of inorganic complexes. **Gen. Pharmacol.**, v.32, p.525-540, 1999.

BALKWILL, F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.13, p.135-141, 2002.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v.357, p.539-545, 2001.

BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **New Engl. J. Med.**, v.336, p.1066–1071, 1997.

BAUTISTA, G.C.R.; ACOSTA, G.E.; TOLEDO, G.I.I. Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferación in vitro de linfocitos de bovino, frescos y congelados/ Evaluation of the MTT bioassay to determine in vitro proliferation of fresh and frozen bovine lymphocytes. **Vet. Mex.**, v.31, p.101-106, 2000.

BELLON S.F.; COLEMAN J.H.; LIPPARD S.J. DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). **Biochemistry**, v.30, p.8026-8035, 1991.

BEN-BARUCH, A. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor–microenvironment interactions. **Breast Cancer Res.**, v.5, p.31-36, 2003.

BENDER, J. G.; MCPHAIL, L. C.; VAN EPPS, D. E. Exposure of human neutrophils to chemotactic factors potentiates activation of the respiratory burst enzyme. **J. Immunol.**, Baltimore, v.130, n.5, p.2316-2323, 1983.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sci.**, v.65, p.1865-1874, 1999.

BERKMAN, N.; ROBICHAUD, A.; ROBBINS, R.A.; ROESEMS, G.; HADDAD, E.B.; BARNES, P.J.; CHUNG, K.F. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by interleukin-4 and interleukin-13 in human lung epithelial cells. **Immunology**, v.89, p.363-367, 1996.

BINCOLETTO, C.; TERSARIOL, I. L. S.; OLIVEIRA, C. R.; DREHER, S.; FAUSTO, D. M.; SOUFEN, M. A.; NASCIMENTO, F. D.; CAIRES, A. C. F. Chiral cyclopalladated complexes derived from N,N-dimethyl-1-phenethylamine with bridging bis(diphenylphosphine)ferrocene ligand as inhibitors of the cathepsin B activity and as antitumoral agents. **Bioorg. Med. Chem.** v.13, p.3047–3055, 2005.

BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M.; HOWARD, J.C. Cellular responses to interferon-gamma. **Annu. Rev. Immunol.**, v.15, p.749–795, 1997.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response, **Nat. Immunol.**, v.2, p. 907–916, 2001.

BOULIKAS, T. Low toxicity and anticancer activity of a novel liposomal cisplatin (Lipoplatin) in mouse xenografts. **Oncol. Rep.**, v.12, p.3-12, 2004.

BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. **Oncol. Rep.**, v.10, p.1663-1682, 2003.

BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs. **Oncol. Rep.**, v.11, p.559-595, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Incidência de câncer no Brasil e estimativa 2006. Disponível em: www.inca.gov.br/estimativa/2006. Acesso em: 23 mar. 2007.

BURSTYN, J.N., HEIGER-BERNAYS, W.J.; COHEN, S.M.; LIPPARD S.J. Formation of cis-diamminedichloroplatinum(II) 1,2-intrastrand cross-links on DNA is flanking-sequence independent. **Nucleic. Acids Res.**, v.28, p.4237-4243, 2000.

CAIRES, A.C.F.; ALMEIDA, E.T.; MAURO, A.E.; HEMERLY, J.P.; VALENTINI, S.R.. Síntese e atividade citotóxica de alguns azido-ciclopaladados estabilizados com ligantes bifosfínicos. **Quím. Nova**, v.22, p.329-334, 1999.

CAIRES, A.C.F.; MAURO, A.E. Compostos ciclometalatos de coordenação intramolecular. **Quím. Nova**, v.19, p.59-72, 1996.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.72, p.3666-3670, 1975.

CHANG, H.Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.64, p.821–846, 2000.

CHEN, L.; WATIKINS, J.F. Evidencios against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumor cells. **Nature**, v. 225, p. 734–735, 1970.

CIRINO, G.; SANTAGADA, V.; CALIENDO, G. The nitric oxide related therapeutic phenomenon: a challenging task. **Curr. Pharm. Des.**, San Francisco, v.8, n.3, p.233-239, 2002.

CORADINI, D.; BIFFI, A.; PELLIZZARO, C.; PIRRONELLO, E.; DI FRONZO, G. Combined effect of tamoxifen or interferon- γ and 4-hydroxyphenylretinamide on the growth of breast cancer cell lines. **Tumor Biol.**, v.18, p.22–29, 1997.

COSTA, F.R. **Avaliação dos efeitos de compostos organometálicos de Paládio (II) em culturas de células.** 2004. 74 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

COSTA, M.T.; FABENI, R.C.; APTEKMANN, K.P.; MACHADO, R.R. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Ciência Rural**, v.33, p.967-974, 2003.

COX, G.W.; MELILLO, G.; CHATTOPADHYAY, U.; MULLET, D.; FERTEL, R.H.; VERASIO, L. Tumor necrosis factor- α - dependent production of reactive nitrogen intermediates mediates IFN- γ plus IL-2-induced murine macrophage tumoricidal activity. **J. Immunol.**, v.149, p.3290–3296, 1992.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **J. Immunol. Methods**, v.232, p.3-14, 1999.

DE ALMEIDA, E.T. **Compostos organometálicos de paládio(II): Investigação espectroscópica, análise termogravimétrica, reatividade e aplicações**. 2002. 133f. (Doutorado em Química Inorgânica) – Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

DE ALMEIDA, E. T.; MAURO, A.E.; SANTANA, A. M.; NETTO, A. V. G.; CARLOS, I. Z. Emprego de compostos organometálicos mononucleares de paládio(II) na ativação de macrófagos peritoneais de camundongos. **Quim. Nova**, v.28, p.405-408, 2005.

DE LUCCA NETO, V.A.; MAURO, A.E.; CAIRES, A.C.F.; ANANIAS, S.R.; DE ALMEIDA, E.T. Synthesis, characterization and thermal behaviour of cyclopalladated compounds of the type $[\text{Pd}(\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2)(\mu\text{-X})_2]$ ($\text{X}=\text{Cl}, \text{NCO}, \text{SCN}, \text{CN}$) **Polyhedron**, v.18, p.413-417, 1999.

DECATRIS, M.P.; SUNDAR, S.; O'BYRNE, K.J. Platinum – based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. **Cancer Treat. Rev.**, v.4, p.53-81, 2004.

DENG, W.; THIEL, B.; TANNENBAUM, C. S.; HAMILTON, T. A.; STUEHR, D. J. Synergistic cooperation between T cell lymphokines for induction of the nitric oxide synthase gene in murine peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v.151, p.322–329, 1993.

DEVARAJAN, P.; SAVOCA, M.; CASTANEDA, M.P.; PARK, M.S.; ESTEBAN-CRUCIANI, N.; KALINEC, G.; KALINEC, F. Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: role of death receptor and mitochondrial pathways. **Hear Res.**, v.174, p.45-54, 2002.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1. In: THOMAS, A (Ed). **The Cytokine Handbook**. San Diego, CA: Academic Press, 1998. p.35-72.

DINARELLO, C.A.; WOLFF, S.M. The role of interleukin-1 in disease. **N. Engl. J. Med.**, v.328, p.106-113, 1993.

DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nature Rev. Cancer**, v.4, p.11-22, 2004.

EASTMAN, A.; SCHULTE, N. Enhanced DNA Repair as a Mechanism of Resistance to cis-Diamminedichloroplatinum(II). **Biochemistry**, v.27, p.4730–4734, 1988.

EBERHARDET, M.K. **Reactive oxygen metabolites: chemistry and medical consequences**. Boca Raton: CRC Press, 2001.590 p.

EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen über maligne Mauseumoren. **Berl. Klin. Wschr.**, v.28, p.871-874, 1905.

ELEXPURU, A.; MARTIN-NIETO, J.; JIMENEZ, A.; GOMEZ, C.; VILALOBO, A. Ehrlich ascites tumor cells produce transforming growth factor-beta (TGF β)-like activity but lack receptors with TGF β -binding capacity. **Mol. Cell. Biochem.**, v.170, p.153-162, 1997.

EMERY, P.; SALMON, M. The immune response 2. Systemic mediators of inflammation. **Br. J. Hosp. Med.**, v.45, p.164-168, 1991.

ESTEVEZ-SOUZA, A.; SILVA, T.M.S.; ALVES, C.C.F.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Citotoxic activities against Ehrlich carcinoma and human K562 leukaemia of alkaloids and flavonoid from two *Solanum* species. **J. Braz. Chem. Soc.** v.13, p.838-842, 2002.

FAHIM, F. A., ESMAT, A.Y.; MADY, E. A., IBRAHIM, E. K. Antitumor activities of iodoacetate and dimethylsulphoxide against solid Ehrlich carcinoma growth in mice. **Biol. Res.**, v.36, p., 2003.

FARREL, N. **Transition metal complexes as drugs and chemoterapeutic agents**. Dodrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989, 291 p.

FARRELL, N.; POVIRK, L.F.; DANGE, Y.; DeMASTERS, G.; GUPTA, M.S.; KOHLHAGEN, G.; KHAN, Q.A.; POMMIER, Y.; GEWIRTZ, D.A. Cytotoxicity, DNA strand breakage and DNA-protein crosslinking by a novel transplatinum compound in human A2780 ovarian and MCF-7 breast carcinoma cells. **Biochem. Pharmacol.**, v.68, p.857-866, 2004.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v.14, p.125-132, 1990.

FILDER, I.J.; SCHROIT, A.J. Recognition and destruction of neoplastic cells by activated macrophages: discrimination of altered self. **Biochim. Biophys. Acta**, v.948, p.151-73, 1988.

FILEP J.G.; BARON C.; LACHANCE S.; PERREAULT, C.; CHAN, J.S. Involvement of nitric oxide in target cell lysis and DNA fragmentation induced by murine natural killer cells.

Blood, v.87, p.5136 -5143, 1996.

FORMAN, H.J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Mol. Aspects Med.**, v.22, p.189-216, 2001.

FRANKOVÁ, D.; ZIDEK, Z. IFN- gamma -induced TNF- alpha is a prerequisite for *in vitro* production of nitric oxide generated in murine peritoneal macrophages by IFN- gamma. **Eur. J. Immunol.**, v.28, p.838–843, 1998.

GALLI, S.; LABATO, M. I.; JOFFÉ, E. B. K.; CARRERAS, M. C., PEDROSO, J. J. Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behaviour. **Cancer Res.**, v.63, p.6370-6377, 2003.

GLOCKZIN, S.; VONKNETHEN, A.; SCHEFFNER, M.; BRUNE, B. Activation of cell death program by nitric oxide involves inhibition of the proteasome. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p.19581–19586, 1999.

GHOSH P.; BAG, S.P.; SUR, B.; SUR P. Antitumor properties of boron complexes with hydroxy biguanide and salicyl hydroxamic acid against Ehrlich ascites carcinoma. **Neoplasma**, n.2, v. 45, p. 68–72, 1998.

GOSH, P.; KOMSCHLIES, K.L.; CIPITELLI, M.; LONGO, D.L.; SUBLESKI, J.; YE, J.; SICA, A.; YOUNG, H.A.; WILTROUT, R.H.; OCHOA, A.C. Loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.87, p.1478-1483, 1995.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v.126, p.131-138, 1982.

GRESSER, I. Wherefore interferon?. **J. Leukoc. Biol.**, v.61, p.567–574. 1997.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; KUMAR, R.S.; KUMAR, T.S. Antitumor activity and antioxidant role of *Bauhinia racemosa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Acta Pharmacologica Sinica** 25, 1070–1076, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. (Eds.). **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press Inc., 1999.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood**, v.92, p.3007-3017, 1998.

HANDEL-FERNANDEZ, M.E.; CHENG, X.; HERBERT, L.M.; LOPEZ, D.M. Down-regulation of IL-12, not a shift from a T helper-1 to a T helper-2 phenotype, is responsible for impaired IFN- γ production in mammary tumor-bearing mice. **J. Immunol.**, n.1, v.158, p.280-286, 1997.

HEINRICH, P.C.; BEHRMANN, I.; MULLER-NEWEN, G., SCHAPER, F.; GRAEVE, L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. **Biochem. J.**, v.334, p.297–314, 1998.

HIGGINS, III. J.D.; NEELY, L.; FRICKER, S. Synthesis and cytotoxicity of some cyclometallated palladium complexes. **J. Inorg. Biochem.**, v.49, p.149-156. 1993.

HILL, J.M.; SPEER, R.J. Organo-platinum complexes as antitumor agents. **Anticancer Res.**, v.2, p.173-186, 1982.

HUSSAIN, S.P.; TRIVERS, G.E.; HOFSETH, L.J.; HE, P.; SHAIKH, I.; MECHANIC, L.E.; DOJA, S.; JIANG, W.; SUBLESKI, J.; SHORTS, L.; HAINES, D.; LAUBACH, V.E.; WILTROUT, R.H.; DJURICKOVIC, D.; HARRIS, C.C. Nitric Oxide, a Mediator of Inflammation, Suppresses Tumorigenesis. **Cancer Res.**, v.64, p.6849–6853, 2004.

ISCHIROPOULOS, H.; NELSON, J.; DURAN, D.; AL-MEDHDI, A. Reactions of nitric oxide and peroxynitrite with organic molecules and ferrihorseradish peroxidase: interference with the determination of hydrogen peroxide. **Free Radical Biol. Med.**, v.20, p.373-81, 1996.

ISHIDA, S.; LEE, J.; THIELE, D.J.; HERSKOWITZ, I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctrl in yeast and mammals. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.99, p.14298 – 14302, 2002.

JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2467-2498, 1999.

JANEWAY, C.J. **Imunobiologia**: o sistema imunológico na saúde e na doença, 6.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2006.824p.

JUNG, Y.; LIPPARD S.J. Nature of full-length HMGB1 binding to cisplatin-modified DNA. **Biochemistry**, v.42, p.2664-2671, 2003.

KARIN, M.; LIU, Z.G.; ZANDI, E. AP-1 function and regulation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.9, p.240–246, 1997.

KARPUZOGLU, E.; AHMED, S. A. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: Implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. **Nitric Oxide**, v.15, p.177–186, 2006.

KELLER, R. Susceptibility of normal and transformed cell lines to cytostatic and cytotoxic effects exerted by macrophages. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.56, p.369- 374, 1976.

KELM, M.; DAHMANN, R.; WINK, D.; FEELISCH, M. The nitric oxide/superoxide assay. Insights into the biological chemistry of the NO/O₂⁻ interaction. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 922-932, 1997.

KILLION, J.; FIDLER, I.J. Systemic targeting of liposome-encapsulated immunomodulators to macrophages for treatment of cancer metastasis. **Immunomethods**, v.4, p.273-279, 1994.

KIM, Y.M.; CHUNG, H.T.; SIMMONS, R.L.; BILLIAR, T.R. Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis and caspase inhibition. **J. Biol. Chem.**, v.275, p.10954–10961, 2000.

KLAUNING, J.E.; KAMENDULIS, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.44, p. 239-67, 2004.

KLIMP, A.H.; DE VRIES, E.G.E.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit. Rev. Oncol./Hematol.**, v.44, p.143-161, 2002.

KLOSTERGAARD, J.; LEROUX, M.E.; EZELL, S.M.; KULL JR, F.C. Tumoricidal effector mechanisms of murine Bacillus Calmette-Guerin activated macrophages: Mediation of Cytolysis, Mitochondrial Respiration Inhibition, and Release of Intracellular Iron by Distinct Mechanisms. **Cancer Res.**, v.47, p.2014-2019, 1987.

KLOSTERGAARD, J.; LEROUX, M.E.; HUNG, M.C. Cellular models of macrophage tumoricidal effector mechanisms *in vitro*. **J. Immunol.**, v.147, p.2802-8, 1991.

KOMEDA, S.; BOMBARD, S.; PERRIER, S.; REEDIJK, J.; KOZELKA, J. Kinetic study of azole-bridged dinuclear platinum(II) complexes reacting with a hairpin-stabilized double-stranded oligonucleotide. **J. Inorg. Biochem.** v.96, p.357-366, 2003.

KURTZMAN S.H.; ANDERSON, K.H.; WANG, Y.; MILLER, L.J.; RENNA, M.; STANKUS, M.; LINDQUIST, R.R.; BARROWS, G.; KREUTZER, D.L. Cytokines in human breast cancer: IL-1alpha and IL-1beta expression. **Oncol. Rep.**, v.6, p.65-70, 1999.

LAKE, D.F. Imunofarmacologia. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap.56, p. 833-856.

LALA, P.K. Significance of nitric oxide in carcinogenesis, tumour progression and cancer therapy. **Cancer Metastasis Rev.**, v.17, p.1–6, 1998.

LALA, P. K.; CHAKRABORTY, C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. **Lancet Oncol.**, v.2, p.149–56, 2001.

LASKIN, D.L.; LASKIN, J.D. Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity. *Toxicology*, v.160, p.111-18, 2001.

LAURELL, G.; BAGGER-SJOBACK, D. Dose-dependent inner ear changes after i.v. administration of cisplatin. **J. Otolaryngol.**, v.20, p.158-167, 1991.

LAVNIKOVA, N.; DRAPIER, J. C.; LASKIN, D. L. A single exogenous stimulus activates resident rat macrophages for nitric oxide production and tumor cytotoxicity. **J. Leukoc. Biol.**, v.54, p.322-328, 1993.

LEE, K.B.; WANG D.; LIPPARD, S.J.; SHARP, P.A. Transcription coupled and DNA damage-dependent ubiquitination of RNA polymerase II *in vitro*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.99, p.4239-4244, 2002.

LEEK, R.D.; LANDERS, R.; FOX, S.B.; NG, F.; HARRIS, A.L.; LEWIS, C.E. Association of tumour necrosis factor alpha and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma. **Br. J. Cancer**, v.77, p.2246-2251, 1998.

LIEW, F.Y.; LI, Y.; SEVERN, A.; MILLOTT, S.; SCHMIDT, J.; SALTER, M.; MONCADA, S. A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2)

cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase in macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v.21, p.2489–2494, 1991.

LIN, X.; OKUDA, T.; HOLZER, A.; HOWELL, S.B. The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Pharmacol.*, v.62, p.1154 – 1159, 2002

LINARES, E.; GIORGIO, S.; MORTARA, R.A.; SANTOS, C.X.C.; YAMADA, A.T.; AUGUSTO, O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. **Free Radic. Biol. Med.**, v.30, p.1234-1242, 2001.

LINDNER, D.; BORDEN, E. Synergistic antitumor effects of a combination of interferon and tamoxifen on estrogen receptor-positive and receptor-negative human tumor cell lines *in vivo* and *in vitro*. **J. Interferon Cytokine Res.**, v.17, p.681–693, 1997.

LOEWENTHAL, H.; JAHN, G. Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mouse- ascites flüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische Einwirkungen. **Z. Krebsforsch.**, v.37, p.439-447, 1932.

LOPES, F. C. M.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; CARLOS, I. Z. Inhibition of Hydrogen Peroxide, Nitric Oxide and TNF- α Production in Peritoneal Macrophages by Ethyl Acetate Fraction from *Alchornea glandulosa*. **Biol. Pharm. Bull.** v.28, p.1726-1730, 2005.

LUM, H.K.; BUTT, Y.K.C.; LO, S.C.L. Hydrogen peroxide induces a rapid production of nitric oxide in mung bean (*phaseolus aureus*). **Nitric Oxide**, v.6, p.205-213, 2002.

MACMICKING, J.; QIHO-WEN, X.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v.15, p. 323–350, 1997.

MAIA, D.C.G.; SASSÁ, M.F.; PLACERES, M.C.P.; CARLOS, I. Z. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, n.1, v.161, p.11-19, 2006.

MALTSEVA, V.N.; AVKHACHEVA N.V.; SANTALOV, B.F.; SAFRONOVA, V.G. Dynamic analysis of modification of peripheral neutrophils functional activity and its regulation during tumor growth in vivo. **Tsitologiia**, v.48, n. 12, p. 1000-1009, 2006.

MARCINKIEWICKZ, J. Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. **Immunopharmacol.**, v.37, p.35-41, 1997.

MCAULIFFE, C.A.; SHARMA, H.L.; TINKER, N.D. Cancer chemotherapy involving platinum and other platinum group complexes. In: _____ **Chemistry of the platinum group metals-recent development**. Holanda: Elsevier, 1991. v.11, cap.16, p.546-593.

McKEAGE, M.J.; HIGGINS, III J.D.; KELLAND, L.R. Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy. A commentary on the sixth international symposium: San Diego, California Jan. 1991. **Brit. J. Cancer.**, n.4, v.64, p.788-792, 1991.

McKEAGE, M.J. Comparative adverse effect profiles of platinum drugs. **Drug Saf.**, v.13, p.228-244, 1995.

MEDOT-PIRENNE, M.; HEILMAN, M.J.; SAXENA, M.; McDERMOTT, P.E. ; MILLS, C.D. Augmentation of antitumour CTL response in vivo by inhibition of suppressor macrophage nitric oxide. **J. Immunol.**, v.163, p. 5877–5882, 1999.

MEIJER, C.; MULDER, N.H.; HOSPERS, G.A.P.; UGES, D.R.A.; DE VRIES, E.G.E. The role of glutathione in resistance to cisplatin in a human small cell lung **cancer** cell line. **Br. J. Cancer**, v.62, p.72–76, 1990.

MILES D.W.; HAPPERFIELD, L.C.; NAYLOR, M.S.; BOBROW, L.G.; RUBENS, R.D.; BALKWILL, F.R. Expression of tumour necrosis factor (TNF- α) and its receptors in benign and malignant breast tissue. **Int. J. Cancer**, v.56, p.777-782, 1994.

MILLER, L.J.; KURTZMAN, S.H.; ANDERSON, K.; WANG, Y.; STANKUS, M.; RENNA, M.; LINDQUIST, R.; BARROWS, G.; KREUTZER, D.L. Interleukin-1 family expression in human breast cancer: interleukin-1 receptor antagonist. **Cancer Invest.**, v.18, p.293-302, 2000.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. **Pharmacological Rev.**, v.43, n.2, p.109-142, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB J.**, v.9, p.1319-1330, 1995.

MORTENSEN, K.; SKOUV, J.; HOUGAARD, D.M.; LARSSON, L.I. Endogenous endothelial cell nitric oxide synthase modulates apoptosis in cultured breast cancer cells and is transcriptionally regulated by p53. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.37679–37684, 1999.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J.Immunol. Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

NASCIMENTO, F.R.F.; CRUZ, G.V.B.; PEREIRA, P.V.S.; MACIEL, M.C.G.; SILVA, L.A.; AZEVEDO, A.P.S.; BARROQUEIRO, E.S.B.; GUERRA, R.N.M.. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment **Life Sciences**, v.78, p.2650 – 2653, 2006.

NATH, A.; CHATTOPADHYA, S.; CHATTOPADHYAY, U.; SHARMA, N. K.. Macrophage inflammatory protein (MIP)1a and MIP1b differentially regulate release of inflammatory cytokines and generation of tumoricidal monocytes in malignancy. **Cancer Immunol. Immunother.** v.55, p.1534–1541, 2006.

NATHAN, C.F.; ROOT, R.K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: dependence on sequential activation and triggering. **J. Exp. Med.**, v.146, p.1648–1662, 1977.

NAVARRO, M.; PEÑA, N. P.; COLMENARES, I.; GONZÁLEZ, T.; ARSENAK ,M.; TAYLOR, P. Synthesis and characterization of new palladium–clotrimazole and palladium–chloroquine complexes showing cytotoxicity for tumor cell lines in vitro **J. Inorg. Biochem.** v.100, p.152–157, 2006.

NAVARRO - RANNINGER, C.; LÓPEZ-SOLERA, I.; PÉREZ, J. M.; MASAGUER, J. R.; ALONSO, C. In vitro antitumor-activity of 2 isomeric cyclopalladated compounds derived from benzoylbenzylidenimines. **Appl. Organometal. Chem.**, v.7, p.57-61, 1993a.

NAVARRO - RANNINGER, C.; LÓPEZ-SOLERA, I.; PÉREZ, J. M.; RODRIGUES, J.; GARCIA-RUANO, J. L.; RAITHBY, P. R.; MASAGUER, J. R.; ALONSO, C. Analysis of 2 cycloplatinated compounds derived from N-(4-methoxyphenyl)-alpha-benzoylbenzylidenamine — comparison of the activity of these compounds with other isostructural cyclopalladated compounds. **J. Med. Chem.**, v.36, p.3795-3801, 1993b.

NAVARRO-RANNINGER, C.; LÓPEZ-SOLERA, I.; GONZÁLEZ, V. M.; PÉREZ, J. M.; ALVAREZ-VALDÉZ, A.; MARTIN, A.; RAITHBY, P. R.; MASAGUER, J. R.; ALONSO, C. Cyclometalated complexes of platinum and palladium with N-(4-chlorophenyl)-alpha-benzoylbenzylideneamine. In vitro cytotoxic activity, DNA modification, and interstrand cross-link studies. **Inorg. Chem.**, v.35, p.5181-5187, 1996.

NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. Deactivation of primed respiratory burst response of goldfish macrophages by leucocyte-derived macrophages activating factors. **Dev. Comp. Immunol.**, v.20 p.427-439, 1996.

NICOLINI, A.; CARPI, A.; ROSSI, G. Cytokines in breast cancer. **Cytokine & Growth Factor Rev.**, v.17, p.325–337, 2006.

OBERLING, F. Monocyte/macrophages as effector cells in cancer immunotherapy. **Transfusion Sci.**, v.18, p.243-250, 1997.

PANTSCHENKO, A. G.; PUSHKAR, I.; ANDERSON, K. H.; WANG, Y.; MILLER, L. J.; KURTZMAN, S. H.; BARROWS, G.; KREUTZER, D. L. The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: Implications for tumor progression. **Int. J. Oncol.** v.23, p.269-284, 2003.

STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLow, T.G. **Imunologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 669p.

PERRIN, D.D.; AMAREGO, W.L.F.; PERRIN, D. R. **Purification of laboratory chemicals**. 2.ed. Oxford: Pergamon Press, 1993.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cell in culture. **J. Immunol. Methods**, v.38, p.161-170, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassay of measurement of superoxide and hydrogen producties. **J. Immunol. Methods**, v.46, p.211-226, 1981.

PIHL, E.; HUGHES, E.S.R.; NIND, A.P.P.; NAIRN, R.C. Colonic Carcinoma: Clinicopathological Correlation with Immunoreactivity. **British Medical Journal**, v.3, p. 742-743, 1975.

PIVETTA, M. Câncer: esperanças divididas. **Pesq. FAPESP**, n.99, p.46-53, Maio 2004.

QUIROGA, A.G.; PÉREZ, J.M.; MONTERO, E.I.; MASAGUER, J.R.; ALONSO, C.; NAVARRO-RANNINGER, C. Palladated and platinated complexes derived from phenylacetaldehyde thiosemicarbazone with cytotoxic activity in *cis*-DDP resistant tumor cells. Formation of DNA intertrand cross-links by these complexes. **J. Inorg. Biochem.**, v.70, p.117-123, 1998a.

QUIROGA, A.G.; PÉREZ, J.M.; LÓPEZ-SOLERA, I.; MASAGUER, J.R.; ROMÁN, A.L.P.; EDWARDS, A.; ALONSO, C.; NAVARRO-RANNINGER, C. Novel Tetranuclear Orthometalated Complexes of Pd(II) and Pt(II) Derived from *p*-Isopropylbenzaldehyde Thiosemicarbazone with Cytotoxic Activity in cis-DDP Resistant Tumor Cell Lines. Interaction of These Complexes with DNA. **J. Med. Chem.**, v.41, 1399-1408, 1998b.

QUIROGA, A.G.; PÉRES, J.M.; MONTERO, E.I.; MASAGUER, J.R.; ALONSO, C.; NAVARRO-RANNINGER, C. Synthesis and characterization of Pd (II) and Pt (II) complexes of *p*-isopropylbenzaldehyde N – protected thiosemicarbazones. Cytotoxic activity against ras-transformed cells. **J. Inorg. Biochem.**, v.75, p.293-301, 1999.

RAMASARMA, T. H₂O₂ has a role in cellular regulation. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v.27, p.269-274, 1990.

ROBBINS, R. A.; GRISHAM, M. B. Nitric oxide. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.29, p.857-860, 1997.

ROCHA, C.O.; CAIRES, A.C.F.; BINCOLETTO, C. Avaliação da citotoxicidade de complexos organometálicos contendo paládio como metal de transição – paladociclos. **XXXIV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, 2003.

ROCHA, M.C.; SANTANA, A.M.; ANANIAS, S.R.; DE ALMEIDA, E.T.; MAURO, A.E.; PLACERES, M.C.P.; CARLOS, I.Z. Cytotoxicity and immune response induced by organopalladium(II) compounds in mice bearing Ehrlich ascites tumour. **J. Braz. Chem. Soc.**, artigo submetido.

ROSENBERG B.; VAN CAMP, L.; TROSKO, J. E.; MANSOUR, V. H. Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents. **Nature**, v.222, p.385-386, 1969.

RUIZ-RUIZ, C.; MUNHOZ-PINEDO, C.; LOPEZ-RIVAS, A. Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program. **Cancer Res.**, v.60, p.5673-5680, 2000.

RUSHMORE, T.H.; PICKET, C.B. Glutathione-S-transferase, structure, regulation, and therapeutic implication. **J. Biol. Chem.**, v.268, p.11475– 11478, 1993.

SAAD-HOSSNE, R. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho. Implantação do modelo no Brasil. **Acta Cir. Bras.**, v.17, p.208-215, 2002.

SAAD-HOSSNE, R.; SAAD-HOSSNE, W.; PRADO, R. G. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich: estudo experimental in vitro. **Acta Cir. Bras.** v.19, p.210-220, jan-fev. 2004.

SAYED-AHMAD, M.M.; SHOUMAN, S.A.; RAMADAN, L.A. Contribution of nitric oxide in doxorubicin-related cytotoxicity in murine tumor model. **J. Egyptian Nat. Cancer Inst.**, v.14, p.111-116, 2002.

SCHAAF, G.J.; MAAS, R.F.; DE GROENE, E.M.; FINK-GREMMELS, J. Management of oxidative stress by heme oxygenase-1 in cisplatin induced toxicity in renal tubular cells. **Free Radic. Res.**, v.36, p.835-843, 2002.

SEGURA, J.A.; BARBERO, L.G.; MÁRQUEZ, J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. **FEBBS Lett.**, n.1, v.414, p.1-6, 1997.

SEGURA, J.A., BARBERO, L.G., MÁRQUEZ, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to Staphylococcus aureus enterotoxin B stimulation. **Immunology Letters**, v. 74, p. 111– 115, 2000.

SHANKARAN, V.; IKEDA, H.; BRUCE, A.T.; WHITE, J. ; SWANSON, P.E.; OLD, L.J.; SCHREIBER, R.D. IFN- γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, v.410, p.1107-1111, 2001.

SHEEN-CHEN, S.M.; CHEN, W.J.; ENG, H.L.; CHOU, F.F. Serum concentration of tumor necrosis factor in patients with breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 43, p.211-215. 1997.

SHERMAN, S.E.; LIPPARD, S.J. Structural aspects of platinum anticancer drug-interactions with DNA. **Chem. Rev.**, v.87, p.1153-1181, 1987.

SHIMAOKA, M.; LIDA, T; OHARA, A.; TANAKA, N.; MASHIMO, T.; HONDA, T.; YOSHIYA, I. NOC, a nitric-oxide-releasing compound, induces dose dependent apoptosis in macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.209, p.519–526, 1995.

SHISHODIA, S.; SHRIVASTAVA, A.; SODHI, A. Protein kinase C: a potential pathway of macrophage activation with cisplatin. **Immunol. Lett.**, v.61, p.179-186, 1998.

SHRIVASTAVA, A.; SHISHODIA, S.; SODHI, A. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.** v.10, p.13, 1997.

SIGIURA, K. Tumor transplantation. In: GRAY, W.I. **Methods of animal experimentation**. New York: Academic Press, 1965. v.2, p.171-222.

SILVA, R.J.; FECCHIO, D.; BARRAVIERA, B. Effect of *Crotalus durissus terrificus* (LAURENTI, 1768) venom on the evolution of Ehrlich ascites tumor. **J. Venom. Anim. Toxins**, v.3, p.324-341, 1997.

SIMEONE, A.-M.; EKMEKCIOGLU, S.; BROEMELING, L.D.; GRIMM, E.A.; TARI, A.M. A Novel Mechanism by Which N-(4-hydroxyphenyl)retinamide Inhibits Breast Cancer Cell Growth: The Production of Nitric Oxide. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.1, p.1009–1017, 2002.

SLATER, L.M.; MURRAY, S. L.; WETZEL, M.W.; WISDOM, R.M.; Du VALLE, E.M. Verapamil restoration of daunorubicin responsiveness in daunorubicin-resistant Ehrlich ascites carcinoma. **J.Clin.Invest.**, v.70, p.1131-1134, Nov. 1982.

SORIMACHI, K.; AKIMOTO, K.; HATTORI, Y.; IEIRI, T.; NIWA, A. Secretion of TNF- α , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with polyanions, and involvement of interferon- γ in the regulation of cytokine secretion. **Cytokine.**, v.11, p.571-578, 1999.

STATHOPOULOS, G.P.; RIGATOS, S.; MALAMOS, N.A. Paclitaxel combined with cis-platin as second-line treatment in patients with advanced non-small cell lung cancers refractory to cis-platin. **Oncol. Rep.**, v.6, p.797-800, 1999.

STEWART, T.H.M.; HEPPNER, G.H. Immunological enhancement of breast cancer. **Parasitology**, v.115, p.S141-S153, 1997.

SUN, Y.; OBERLEY, L.W.; ELWELL, J.H.; SIERRA-RIVERA, E. Antioxidant enzyme activities in normal and transformed mice liver cells. **Int. J. Cancer**, v.44, p.1028– 1033, 1989.

TADA, T; OHZEKI, S.; UTSUMI, K.; TAKIUCHI, H.; MURAMATSU, M.; LI, X.F.; SHIMIZU, J.; FUJIWARA, H.; HAMAOKA, T. Transforming growth factor- β -induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. **J. Immunol.**, v.146, p.1077-1082, 1991.

TAYLOR-ROBINSON, A.W. Counter-regulation of T helper 1 cell proliferation by nitric oxide and interleukin-2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, n.1, v.39, p.14–19, 1997.

THOMASZ, L.; ARAN, M.; PIZARRO, R.A.; IBAÑEZ, J.; PISAREV, M.A.; CONVERSO, D.; JUVENAL, G.J.; KRAWIEC, L. Inhibition of peroxidase and catalase activities and modulation of hydrogen peroxide level by inositol phosphoglycan-like compounds. **Horm Metab Res.**, v.39, p.14 – 19, 2007.

TRACEY, K.J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. **Annu. Rev. Cell Biol.** v.9, p.317–343, 1993.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOLA, J.; IZAKOVIC, M.; MAZURA, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p. 1–40, 2006.

VERDOT, L.; LALMANACH, G.; VERCRUYSES, V.; HARTMAN, S. Cystatins up-regulate nitric oxide release from interferon-gamma-activated mouse peritoneal macrophages. **J. Biol. Chem.**, v.271, p.28077–28081, 1996.

VERMORKEN, J.B.; KAPTEIJN, T.S.; HART, A.A.; PINEDO, H.M. Ototoxicity of cis-diamminedichloroplatinum (II): influence of dose, schedule and mode of administration. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, v.19, p.53-58, 1983.

VLADUTIU, A.O. Role of nitric oxide in autoimmunity. **Clin. Immunol. and Immunopathol.**, n.1, v.76, p.1-11, 1995.

VON BIBERSTEIN, S.E.; SPIRO, J.D.; LINDQUIST, R.R.; KREUTZER, D.L. Interleukin-1 receptor antagonist in head and neck squamous cell carcinoma. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.122, p.751-759, 1996.

WAUD, W.R. Differential uptake of cis-diamminedichloroplatinum(II) by sensitive and resistant murine LI 210 leukemia cells. **Cancer Res.**, v.47, p.6549–6555, 1987.

WEISZ, A.; OGUSHI, S.; CICATIELLO, L.; ESUMI, H. Dual mechanism for the control of inducible-type NO synthase gene expression in macrophages during activation by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. Transcriptional and post-transcriptional regulation. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.8324–8333, 1994.

WEITSMAN, G.E.; RAVID, A.; LIBERMAN, U.A.; KOREN, R. The role of p38 MAP kinase in the synergistic cytotoxic action of calcitriol and TNF-alpha in human breast cancer cells. **J. Steroid Biochem. Mo. Biol.**, v.89–90, p.361–364, 2004.

WERNER-FELMAYER, G.; WERNER, E.R.; FUCHS, D.; HAUSEN, A.; REIBNEGGER, G.; WACHTER, H. Tetrahydrobiopterin-dependent formation of nitrite and nitrate in murine fibroblasts. **J. Exp. Med.**, v.172, p.1599–1607, 1990.

WINK, D.A.; MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Rad. Biol. Med.**, v.25, p.434-456, 1998.

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

YAMASHITA, T.; UCHIDA, T.; ARAKI, A.; SENDO, F. Nitric oxide is an effector molecule in inhibition of tumor cell growth by rIFN- γ -activated rat neutrophils. **Int. J. Cancer.**, v.71, p.223–230, 1997.

ZAMBLE, D.B.; MIKATA, Y.; ENG, C.H.; SANDMAN, K.E.; LIPPARD, S.J. Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin. **J. Inorg. Biochem.**, v.91, p.451-462, 2002.

ZHOU, P.; SIEVE, M. C.; BENNETT, J.; KWON-CHUNG, K. J.; TEWARI, R. P.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A.; SEDER, R. A. IL-12 prevents mortality in mice infected with *Histoplasma capsulatum* through induction of IFN-gamma. **J. Immunol.**, v.155, p.785-795, 1995.

ZIELINSKI, C.C.; BUDINSKY, A.C.; WAGNER, T.M.; WOLFRAM, R.M.; KOSTLER, W.J.; KUBISTA, M.; BRODOWICZ, T.; KUBISTA, E.; WILTSCHKE, C. Defect of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production and TNF-alpha-induced ICAM-1-expression in BRCA1 mutations carriers. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.81, p.99–105, 2003.

ZWILLING, B. S.; EISENSTEIN, T. K. **Macrophage-pathogen interactions**. New York: Marcel Dekker, 1994, p.634.

Capítulo 2

----- Forwarded Message -----

From: office@jbcs.sbq.org.br
To: carlosiz@fcar.unesp.br
Sent: Wed, 2 May 2007 22:51:07 -0300 (BRT)
Subject: [JBACS] - 436/06V2

REF.: 436/06V2

To Prof. Carlos, Iracilda
Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Dpto Análises Clínicas
Araraquara, São Paulo

I am pleased to inform you that your paper "Citotoxicity and immune response induced by organopalladium(II) compounds in mice bearing Ehrlich ascites tumour" [REF.: 436/06V2] has been accepted for publication.

Please check at EDITOR, Referee and/or Editorial Manager's Comments if extra corrections and modifications should be incorporated in the revised final version files.

Follow the Instructions below to send your files.

Editor's Report:

Recommendation: Publish

Editor's Comments:

Dear Prof. Rocha,
Thank you for submitting the revised version of your manuscript. I am sorry to have taken so much time to reply, due to personal problems.
Your manuscript is now almost ready to be published
Thank you for supporting the JBACS.
Yours sincerely,
Maria D. Vargas

=====

Citotoxicity and immune response induced by organopalladium(II) compounds in mice bearing Ehrlich ascites tumour

Michelle C. da Rocha^a, Anderson M. Santana^b, Sandra R. Ananias^{a,b}, Eduardo T. de Almeida^c, Antonio E. Mauro^b, Marisa C. P. Placeres^a, Iracilda Z. Carlos^{a,*}

^a Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, UNESP, CP 502, 14801-902, Araraquara, São Paulo – Brazil.

^b Departamento de Química Geral e Inorgânica, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, UNESP, CP 355, 14801-970, Araraquara – São Paulo, Brazil.

^c Departamento de Ciências Exatas, UNIFAL, 31130-000, Alfenas – Minas Gerais, Brazil.

* Corresponding author. Phone: ++ 55 16 3301-6549; FAX: ++ 55 16 3332-0486

E-mail address: carlosiz@fctar.unesp.br

Resumo

Os ciclometalados de paládio(II) são compostos inorgânicos reativos empregados em vários estudos biológicos devido a seu potencial antitumoral e interação com o sistema imune. Neste estudo, a resposta imune e citotóxica induzida por dois complexos organopaladados: [Pd(N,C-dmba)(μ -NCS)]₂ (**1**), [Pd(C-dmba)(NCS)(dppp)] (**2**) [dmba = N,N'-dimetilbenzilamina, dppp = 1,3-difenilfosfina(propano)] e cisplatina (*cis*-DDP), como padrão, foram investigados em camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich. Os camundongos portadores do tumor foram divididos em cinco grupos e inoculados com **1** ou **2** ou *cis*-DDP ou apenas veículo ou salina (PBS). Diversos parâmetros foram avaliados tal como a porcentagem de células tumorais presentes no exsudato peritoneal, o óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral (TNF- α) séricos e aumento na expectativa de vida. Os dados obtidos demonstram que o composto **2** apresentou atividade similar à *cis*-DDP, como por exemplo, aumento na expectativa de vida, diminuição dos níveis séricos de TNF- α e aumento da produção de NO.

Palavras-chave: Complexos de Pd(II); Tumor ascítico de Ehrlich; Macrófagos; Óxido nítrico; Fator de necrose tumoral- alfa.

Abstract

The palladium(II) cyclometallated are reactive inorganic compounds employed in several biological studies because its antitumour potential and interaction with immune system. In the present study, the immune and cytotoxic response induced by two organopalladated complexes: $[\text{Pd}(\text{N,C-dmba})(\mu\text{-NCS})]_2$ (**1**), $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (**2**) [dmba = N,N'-dimethylbenzylamine, dppp = 1,3-diphenylphosphine(propane)] and *cis*-platin (*cis*-DDP), as standard, were investigated in mice bearing Ehrlich ascites tumour. The mice bearing Ehrlich ascites tumour were divided into five groups and inoculated with the compounds **1** or **2** or *cis*-platin or only vehicle or saline (PBS). Many parameters were evaluated such as tumour cells percentage in the peritoneal exsudate, serum nitric oxide (NO) and tumour necrosis factor - alpha (TNF- α) and increase in life span. All data showed similar action between compound **2** and *cis*-platin, like increase in life span, decrease of TNF- α levels and enhance in the NO production.

Keywords: Pd(II) complexes; Ehrlich ascites tumour; Macrophages; Nitric oxide; Tumour necrosis factor- alpha.

Introduction

Cancer is a disease in which unremitting clonal expansion of somatic cells kills by invading, subverting, and eroding normal tissues.¹ Millions of people die every year from the metastatic spread of cancer that occurs through blood and lymphatic vessels or directly into tissues and body cavities.² Between the several types of cancer, breast cancer is the most common malignancy in women worldwide.³

In some cases, immune cells constitute an additional prominent component of the host response to cancer, but their participation in tumour pathogenesis remains not completely understood. Dense intratumoral lymphocyte infiltrates in early stages of neoplasm are strongly related with reduced frequencies of metastasis and improved survival time of patients with several types of cancer.⁴ Macrophages play an important role in the host defence against the neoplastic disease, recognizing and killing tumour cells, which are activated with a variety of agents and so they produce a number of cytostatic or cytotoxic mediators upon stimulation.⁵ This process involves the release of reactive oxygen intermediates (ROI) during the respiratory burst, along with reactive nitrogen intermediates (RNI) and proinflammatory cytokines like tumour necrosis factor- α (TNF- α).⁶ However, when these inflammatory mediators are produced in high quantities, they mediate the tissue damage associated with inflammation and ischemic injury.^{7,8}

Cis-diamminedichloroplatinum(II),⁹ a clinically important antitumour drug, acts like classical alkylating agent in chemotherapy against some types of cancers. It has been acting as a potent stimulator of macrophages and polymorphonuclear leukocytes of human body. This drug has been proved to be effective alone or in addition with other drugs or cytokines for the treatment of a variety of human and animal malignancies,¹⁰ but its administration in human shows many side effects such as nausea, nephrotoxicity and

neurotoxicity.¹¹ In addition, its applicability is still limited to a relatively few number of tumours. This effect occurs because of the natural resistance to *cis*-platin development or because of the resistance that happens after the initial treatment. These drawbacks are a strong reason for the development of new metal drugs containing other metallic centres, for instance, cyclopalladated complexes, which in a previous research presented citotoxic potential in tests *in vitro* against several tumour lineages.¹² However, currently *in vivo* investigations are so scarce, mainly evaluate effects of organopalladium solutions in cell viability and their ability to induce murine macrophages to recognize and to attack tumour cells.

As part of a program directed at the synthesis of complexes having ligands with noteworthy biological properties, such as aromatic amines and diphenylphosphines, the present research evaluated: the citotoxic activity of organopalladated compounds $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-SCN})_2]$ (**1**) and $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (**2**), *dmba* = N,N' - dimethylbenzylamine, *dppp* = 1,3-diphenylphosphine(propane), Fig. 1, against Ehrlich ascites tumour (EAT), evaluating their citotoxic potential *in vitro* (IC₅₀), besides their effects in the inflammatory response, the mean survival time and the increase in life span of the groups of Swiss mice. In all experiments *cis*-diamminedichloroplatinum (II) (*cis*-DDP) was used as standard drug.

Insert Figure 1

Experimental

Synthesis

All the syntheses were carried out at room temperature and the reagents were employed without further purification.

The compound $[\text{Pd}(\text{N,C-dmba})(\mu\text{-NCS})]_2$ (**1**) was obtained and characterized according to literature methods.¹³ The $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (**2**) was obtained as described: to a yellow suspension of 250 mg (0.42 mmol) of $[\text{Pd}(\text{N,C-dmba})(\mu\text{-NCS})]_2$ (**1**) in 30 mL of acetone was added 71.90 mg (0.84 mmol) of 1,3-bis(diphenylphosphine) propane (dppp). The resulting solution was stirred for 1 h; and then concentrated under reduced pressure. Addition of dichloromethane and pentane gave a white solid. The solid was filtered off washed thoroughly with pentane and dried in vacuo. Yield: 90% (Found: C, 62.25; H, 5.78; N, 4.06; S, 4.32. $\text{C}_{37}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{S}_2\text{Pd}$ calcd. : C,62.40; H, 5.52; N, 3.93; S, 4.50%). We have employed commercial cis-platin Fauldiscipla[®] 1mg/mL in this investigation as standard.

Instrumental

IR spectra were recorded on a NICOLET IMPACT 400 spectrophotometer in the 4000-400 cm^{-1} range with the samples in the form of KBr pellets.

Tumour Cell Line

The tumour cell line used in this experiment was Ehrlich ascites tumour (EAT). The maintenance of tumour was made according to literature methods.¹⁴ This procedure was made in the Laboratory of Clinical Immunology of “Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara” - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil. Cell viability was evaluated by trypan blue exclusion test, and only the cell suspensions that showed 95% of viability were employed in the studies.

Animals

Seventy-six male Swiss mice weighing 18 to 25g were supplied by the Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil. They were maintained in polycarbonate boxes at $23 \pm 2^\circ\text{C}$, $56 \pm 2\%$ humidity, 10-18 cycles/h and a 12 h light/dark cycle), with water and food available *ad libitum*.

In vitro and in vivo assays from mice bearing EAT

Animals were sacrificed five days after of tumour transplantation, considering as pure culture those ones containing 95% of tumour cells, without significantly inflammatory cells influx.¹⁴

Cells suspensions were collected in an sterile conic tube for centrifuge (Corning Inc) and then were centrifuged with 15 parts of NH_4Cl 0.17 molL^{-1} followed by phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, for 5 min at 2000 rpm and 25°C .¹⁵ Cell concentration was adjusted in RPMI medium (Sigma), using a Neubauer haemocytometer (Boeco) and Trypan blue solution. For *in vitro* assays it was added 1.0 mL of RPMI-1640-Complete, RPMI-1640-C (containing 5% fetal calf serum, mercaptoethanol, penicillin and streptomycin), adjusting the concentration to $1 \times 10^6 \text{ cell /mL}$ ¹⁶ or for *in vivo* assays it was added 1.0 mL of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, adjusting the concentration to $1 \times 10^3 \text{ cell /mL}$.¹⁴

Assessment of cytotoxicity, using MTT assay for EAT cells

100.0 μL samples of tumour peritoneal cells suspension ($1 \times 10^6 \text{ cell/ mL}$, adjusted in RPMI-1640-C), obtained from 10 mice bearing EAT, were added to each well of a 96-well tissue culture plate (Corning) and 100.0 μL of the compounds **1**, **2** and *cis*-DDP in different concentrations (between 100.0 and $5.0 \mu\text{molL}^{-1}$) or RPMI 1640-Complete

medium containing 0.3% of dimethylsulphoxyde (DMSO) or only RPMI 1640-Complete as cell control of viability, using the Mossman assay.¹⁷ The effects of the compounds under the cells were determined 48h after culture incubation.

Then, supernatants were removed and 100.0 μL of solution of [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,4-dipheniltetrazolium bromide] (MTT) was added in each well containing the samples. MTT assay was performed and the plates were incubated for 3h. Then, absorbances were measured and the citotoxic midpoint value, the concentration of chemical agent needed to reduce the spectrophotometric absorbance to 50%, was determined by linear regression analysis with 95% of confidence limits. The IC_{50} was defined as the medium of three independent experiments through the equation of graphic line obtained (Microcal Origin 5.0TM).

Assays in vivo

Male healthy Swiss mice were divided in five groups each one containing 10 animals. They were inoculated intraperitoneally (i.p.) with cell suspension at 1×10^3 cells/mL of PBS. After 3 days of tumour development, the compounds $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-NCS})_2]$ (**1**), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (**2**) and *cis*-DDP were inoculated, according to literature methods.¹⁸ Groups were named according to the compounds inoculated:

Group 1 or G1: *cis*-DDP (1 mL, i.p., 10 mg/kg); *Group 2 or G2:* $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (1 mL, i.p., 1 mmolL^{-1}); *Group 3 or G3:* $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-NCS})_2]$ (1 mL, i.p., 1 mmolL^{-1}); *Group 4 or G4:* Vehicle control (1mL, i.p., DMSO 0.3%); *Group 5 or G5:* Tumour control (1mL, i.p., PBS).

EAT cells score

Six animals of each group ($n=12$) were sacrificed six days after the inoculation with the complexes, i.e. ninth day of tumour development.¹⁴ Score of total number of EAT cells were carried out in a Neubauer haemocytometer (Boeco). Differentiation of cells was made by May-Grünwald Giemsa (Reagen) with subsequent observation in an optical microscope under immersion lens (100X).¹⁸

Cell viability by trypan blue exclusion

100.0 μL samples of the cell suspension were added in 100.0 μL of Trypan blue solution (1:10) and the samples were dropped into glass sheets and observed in a microscope under 40X lens. We have considered dead the cells, which absorbed Trypan blue solution.

Spreading of macrophages

The spreading of peritoneal macrophages from tumour bearing mice was assessed according to the technique adapted from Rabinovich et al (1977).¹⁹ Briefly, aliquots of 200.0 μL of peritoneal cell suspensions were placed over glass cover slips (Corning Inc.) and incubated for 15 min at 37°C. The non-adherent cells were removed by washing with PBS and the adherent cells were incubated in RPMI-C culture medium, at 37°C, in a humidified chamber containing 7.5% of CO₂ (Forma Scientific). Subsequently, the medium was removed and the cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde (Sigma Chemical Co.) and examined under an optical microscope to determine the percentage of spread cells.

Nitric oxide assay

Nitric oxide (NO) measurements were made in the mice serum after conversion of NO_3^- to NO_2^- by bacteria reductase nitrate.²⁰ All groups mice serum samples of 100.0 μL were incubated at room temperature in 83.0 μL of milli-Q water, 15.0 mL of NADPH (reduced dinucleotide adeninine β -nicotinamide phosphate – 0.5 mg/mL) and 2.0 mL of nitrate reductase (5.0 U/mL NADPH reductase) for 2h. Later, nitrite concentrations were indirectly measured by a quantitative colorimetric assay using Griess reagent system: 50.0 μL aliquots of serum were added to 50.0 μL of Griess reagent [1% sulphanilamide (Merck), 0.1% naphthylethylenediamine (Merck) and 3% H_3PO_4 (Mallinckrodt)], incubated at room-temperature for 10 min., and the absorbance was measured at 540 nm in an ELISA reader (Multiskan Ascent Labsystems). Samples in quadruplicate were assayed in four experiments and reported as $\mu\text{mols NO} / \text{mL}$ of serum \pm SD quantified from the standard curve.

TNF- α bioassay

L929 mouse tumour cells were used to measure TNF- α levels in mice serum. Killing of L929 mouse tumour cells was used to measure the cytotoxicity of soluble factor(s) present in the serum.²¹ Briefly, L929 cells in RPMI-1640-Complete medium were seeded at 4×10^4 cells per well in 96-well microtitre plates (Corning) and incubated overnight in an incubator at 37°C in an atmosphere of air/7.5% CO_2 . It was added 100 μL of serum samples previously obtained or serum of normal mice or cells only as control, more the same volume of medium containing 1.0 mg Actinomycin D/mL in triplicate. The next day, cell survival was assessed fixing and staining the cells with crystal violet (0.2% in 20% methanol), dissolving the stained cells with 0.1 mL 1% SDS (duodecil sulphate

sodium, v/v) per well and reading the absorbance of each well at 490 nm with an ELISA reader (Multiskan Ascent Labsystems). TNF- α units were calculated using a standard curve obtained with recombinant TNF- α constructed for each test run. The criterion employed in this bioassay is that fifty percent of L929 cells death corresponds to one unit of TNF- α , approximately one picogram of recombinant TNF- α .²² To confirm the presence of TNF- α in the culture supernatants these preparations were previously incubated with rabbit anti-r TNF- α immune serum, and the test samples were added to L929.

Analysis of the effect of compounds in the mice survival

The mean survival time (MST) of each group containing 6 mice was monitored by recording daily the mortality for 90 days and based on the values of MST found we calculated the increase in life span (ILS). These parameters were calculated²³ according to the following equations: $MST = [(Day\ of\ first\ death + day\ of\ last\ death)/2]$; $ILS\ (\%) = \{[(MST\ of\ the\ treated\ group/MST\ of\ the\ control\ group)-1] \times 100\}$.

Statistical analysis

Results are representative of three independent experiments and they are presented as means \pm Standard Deviation from quadruplicate observations. Data were analyzed statistically by the ANOVA by variance test and after by Tukey-Kramer post-test, using significance level $p < 0.05$; in the Graph Instat Pad™ software.

Results and discussion

IR spectra

Treatment of the thiocyanate-bridged dimer $[\text{Pd}(\text{N},\text{C-dmba})(\mu\text{-SCN})]_2$ (**1**) with dppp gave $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (**2**) in which the diphosphine behaves as a chelating ligand. The i.r spectrum of **2** showed ν_{CN} , ν_{CS} and δ_{NCS} bands at 2048, 840 and 440 cm^{-1} , respectively, characteristic of a terminal *N*-thiocyanate group, together with the $\nu_{\text{P-C}}$ and δ (C-P-C_{ar}) bands at 696 and 1096 cm^{-1} , respectively, characteristic of the diphosphine coordinated to Pd.

These characteristics indicate that compound **2** has the *N*-coordination of thiocyanate. Taking into account that the coordination geometry around the Pd atom is square planar, it is suggested that two phosphorus atoms of the phosphine ligand and one carbon atom of dmba, leaving the nitrogen atom of dmba uncoordinated, occupy the three remaining coordination sites. Thus, the compound may be formulated as $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (**2**).

Biological activities

Ehrlich ascites tumour (EAT) has been used for evaluating both the cytotoxic properties of many classes of substances and the influence of substances in immune response.^{16,24,25} Since *cis*-diamminedichloroplatinum (II) (*cis*-DDP) emerged as the mostly employed antitumour metal-drug,⁹ many novel complexes containing metals of platinum group are being investigated.

Some cyclopalladated²⁶ of the type [Pd(C-N)(X)(L)], where C-N is an aromatic or aliphatic amine coordinated via C and N atoms to Pd; L=nitrogen ligand; X= chloride or acetate, have showed to be citotoxic towards seven tumour lines²⁷, e.g., [Pd(dmba)(Cl)(py)]; dmba = N,N' - dimethylbenzylamine and py = pyridine.²⁶ Cyclopalladated containing thiosemicarbazones ligands also have showed antitumour properties when coordinatined to palladium atoms.^{27,28}

In MTT assay¹⁷ the compound [Pd(N,C-dmba)(μ - NCS)]₂ (**1**) has not showed a considerable activity when compared to the citotoxic behaviour of the complex [Pd(C-dmba)(NCS)(dppp)] (**2**) as presented in Fig. 2. So, we have verified that complex **2** showed lower IC₅₀ value (5.29 \pm 3.89 μ M) than those values of *cis*-DDP (33.77 \pm 2.29) and **1** (47.86 \pm 4.32). These previous results suggest that structural differences between compounds **1** and **2** such as number of metallic centres and the presence of diphenylphosphine in **2** have influenced on their citotoxic effects towards EAT cells *in vitro*. DMSO has the ability to suppress the growth of Ehrlich carcinoma in the solid form.²⁹ In this study the vehicle, DMSO 0.3% diluted in RPMI-Complete medium, was not toxic to EAT cells *in vitro* (99% of cell viability, data not showed).

Insert Figure 2

Besides the tests *in vitro*, in this study we have performed tests *in vivo*, evaluating the inflammatory response of the peritoneal cavity of mice bearing EAT, inoculated intraperitoneally with solutions of compounds **1**, **2** and *cis*-DDP as standard drug.

As related in literature,¹⁴ it has been verified that the inoculation of 1x10³ cells/mL have maintained the tumour growth unchanged till the ninth day. During this time the number of polimorphonuclear (PMN) and mononuclear (MN) cells in the cavity was very low. It was observed that the tumour cells did not induce a significant influx of inflammatory cells in this period. Taking into consideration that the spreading observation

due to tumour inoculation occurs in the three first days after inoculation but not later on (nine days), the spreading verified could be due to the action of the compounds. Based in all information above, the complex solutions were injected three days after tumour transplantation, adopted like day zero, and the animals were sacrificed on the ninth day of tumour development.

The intensity of the inflammatory reaction evoked by tumour cells is of fundamental importance in the evolution of tumour growth. In clinical pathology, tumours presenting an intense inflammatory infiltrate are considered to have a good prognostic.¹⁴

Organopalladated solutions of **1** and **2** were responsible for a significant increase of inflammatory influx of macrophages (Fig. 3). *Cis*-DDP and **2** showed values equal to $58.28\% \pm 7.52$ ($p < 0,001$) and $36.71\% \pm 13.2$, respectively, both different from that of tumour control group. However, compound **1** has not showed a statistically significant behaviour, $32.85\% \pm 3.97$.

Insert Figure 3

According to other research, PMN citotoxic activity *in vitro* against EAT is significantly high in Swiss mice. The data indicate that PMN act against EAT controlling tumour development *in vivo*.³⁰

The Table 1 shows better performance of complex **2** when compared to **1** and similar to *cis*-DDP. Polimorphonuclear cells score suggests that *cis*-DDP and complex **2** has promoted local inflammatory influx of PMN cells of 22.5 ± 4.39 and $38.43\% \pm 11.7$, respectively ($p < 0.001$, significantly different of tumour control group), and complex **1** did not cause the same effects in peritoneal cavity ($9.57\% \pm 3.36$). The tumour cells percentage has showed equivalent results between *cis*-DDP ($27.14\% \pm 4.10$) and complex **2** ($24.86\% \pm 4.26$), while that **1** showed higher value 57.57 ± 5.22 , demonstrating lower

citotoxicity *in vivo*. In the cellular death the percentage observed in all groups ranged from 18.75 ± 4.85 to 26.25 ± 4.78 , statistically not significant difference ($p > 0.05$).

Activated macrophages present a large number of morphologic, functional, and metabolic differences from resting cells. They are bigger and display pronounced ruffling of the plasma membrane, and increased capacity for adherence and spreading on surfaces, increased formation of pseudopods, and increased number of picnotic vesicles, as well as functional differences.³¹ The results obtained for spreading macrophages have showed that complex **1** presents an expressive value of $62.0\% \pm 22.81$, different from that found in the tumour control group and similar to *cis*-DDP value of $78.4\% \pm 16.82$ ($p < 0.001$) while that complex **2** did not present the same effect: $37.4\% \pm 11.78$.

Insert Table1

Our research group has demonstrated that organopalladated compounds containing diphenylphosphine ligands have activated macrophages *in vitro*³² by the immunological activation, *in vitro*, determining the H_2O_2 released in cultures of peritoneal macrophage cells from Swiss mice in the presence of organopalladated compounds of the type $[Pd(dmba)(X)(dppp)]$, $dmba = N,N$ -dimethylbenzylamine, $dppp = 1,3$ -bis(diphenylphosphine)propane, $X = Cl, N_3, NCO, NCS$. An excellent activation of macrophages by the $[Pd(dmba)(X)(dppp)]$ compounds was observed and the influence of the X ligand on the immune response could be verified.

Activated macrophages secrete several substances that are directly involved in tumour cell killing i.e. tumour necrosis factor (TNF) and nitric oxide (NO). Taken together, TNF and NO are considered as the most important mediators directly involved in tumour cell killing.⁵

NO is formed in activated phagocytes as a product of the conversion of L-arginine to L-citruline by an inducible isoform of nitric oxide synthase. This reaction, like the

oxidative burst, involves O₂ uptake. Nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻) are generally believed to be the end products of the macrophage reactive nitrogen intermediates generating system.³³ Although many other agents are cytotoxic to target cells, NO is often found to be the primary mediator of macrophage-induced cytotoxicity.³⁴

Serum NO release, Fig. 4, has showed that macrophages were activated with the three substances, **1**, **2** and *cis*-DDP, presenting similar results: 7.61±0.68 for **1**; 9.18±1.06 for **2** and 7.36±1.25, (*cis*-DDP), $p < 0.001$, significantly different of tumour control group 2.05±0.47.

Insert Figure 4

These findings can be considered a good prognostic because the cytotoxicity as a result of a substantial NO-formation is established to initiate apoptosis, characterized by upregulation of the tumour suppressor p53, changes in the expression of pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family members, cytochrome c relocation, activation of caspases, chromatin condensation, and DNA fragmentation.³⁵

It has been reported that murine macrophages treated with *cis*-platin acquire enhanced capacity to lise tumour cells *in vitro*, produce increased amount of interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), reactive oxygen metabolites (ROI), reactive nitrogen intermediates (RNI), lysozyme and arginase.³⁶

Tumour necrosis factor alpha (TNF- α) is an immunomodulatory cytokine that has exhibited an antitumour activity in a variety of tumour cell lines, including breast cancer cell lines.³⁷ On the other hand, it is becoming more evident that many aspects of tumour promotion arise from persistent and unresolving inflammation. Clinically, elevated serum concentrations and increased expression of TNF- α are present in various pre-neoplastic and malignant diseases, compared with serum and tissue from healthy individuals.³⁸

TNF- α serum levels (Fig. 5) in the group treated with *cis*-DDP have presented 48.45 ± 3.68 U/mL, and complex **2** 67.27 ± 5.89 U/mL ($p < 0.001$, significantly different of tumour control, 330.57 ± 8.12). Complex **1** have presented similar results of tumour group (318.14 ± 14.44).

Insert Figure 5

The decrease of TNF- α serum levels in the groups treated with compound **2** may be a good prognostic because the TNF- α over-expression may lead to malignancy as described above. Besides, a potential tumour-promoting effect of TNF- α has been demonstrated in study, showing that mice deficient in TNF- α were resistant to skin carcinogenesis.³⁹ Other data have demonstrate that over-expression of TNF- α increased metastatic activity of tumour lines,⁴⁰ and treatment of mice with TNF- α promoted development of liver metastasis.⁴¹ In a study involving patients with prostate cancer, the results suggest that TNF- α directly correlate with the extent of disease.⁴²

Despite described in literature, in this paper mice treated with *cis*-DDP presented decrease in TNF- α levels. IFN- γ is a cytokine that stimulates the synthesis of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the release of NO from macrophages.⁴³ Based on *in vivo* and *in vitro* observations, many anti-tumour mechanisms have been attributed to IFN- γ in several tumour lineages, including against breast cancer cells.^{37, 44, 45}

In this paper enhancing of NO concentration was observed concomitantly at decreasing of TNF- α level. In future, experiments IFN- γ determinations deserve to be performed in order to verify its levels in mice treated with the compounds and the correlation with the NO levels.

A reliable criterion for judging the value of any anticancer agents is the prolongation of life span of animals.²³ Regarding this point compound **2** has presented the

best performance values, showing mean survival time superior to 90 days, equivalent to more than 100% of ILS, as *cis*-DDP (Table 2).

Insert Table 2

Conjunction of overall data, mainly those related to the serum NO and TNF- α release, showed that the mononuclear compound [Pd(C-dmba)(NCS)(dppp)] (**2**), presented a similar behaviour to *cis*-DDP. Organopalladated compounds deserve to be tested with other lines of tumour mammary cells, *in vitro* and *in vivo*, according to studies developed with many compounds of palladium(II) to confirm its antitumour properties.

The cyclometallated [Pd(N,C-dmba)(μ -NCS)]₂ (**1**) has presented a good performance promoting inflammatory influx of macrophages and PMN cells to the peritoneal cavity, however, has not showed so high citotoxic activities and immunomodulatory effects as [Pd(C-dmba)(NCS)(dppp)] (**2**), justified by the elevated number of EAT cells percentage in the peritoneal cavity and the lower increase in the mice life span.

Conclusion

Both compounds $[\text{Pd}(\text{N,C-dmba})(\mu\text{-NCS})_2]$ (**1**) and $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (**2**) have showed citotoxic potential *in vitro* and *in vivo*, increasing the life span of the mice bearing EAT, but **1** presented a lower citotoxic potential when compared to the compound **2**. All data have showed similar activity between compound **2** and *cis*-DDP, showing that this compound is a promising one in the study of the antitumour and immunological activity. The presence of dppp in the complex **2**, along with other structural characteristics, may be responsible for its better performance.

Acknowledgments

The authors acknowledge CNPq and FAPESP for financial support.

References

- [1] Galli, S.; Labato, M. I.; Joffé, E. B. K.; Carreras, M. C.; Poderoso, J. J.; *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6370.
- [2] Stacker, S. A.; Achen, M. G.; Jussila, L.; Baldwin, M. E.; Alitalo, K.; *Nature Rev. Cancer.* **2002**, *2*, 573.
- [3] Parkin, D.M.; Pisani, P.; Ferlay, J.; *Int. J. Cancer.* **1999**, *80*, 827.
- [4] Dranoff, G.; *Nature Rev. Cancer.* **2004**, *4*, 11.
- [5] Klimp, A.H.; De Vries, E.G.E.; Scherphof, G.L.; Daemen, T.; *Crit.Rev. Oncol./Hematol.* **2002**, *44*, 143.
- [6] Kim, C.; Park, E.; Quinn, M.R.; Schuller-Levis, G.; *Immunopharmacol.* **1996**, *34*, 89.
- [7] Kroencke, K. D.; Kolb-Bachofen, V.; Bershick, B.; Burkart, V.; Kolb, H.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *175*, 752.
- [8] Grisham, M. B.; *Lancet.* **1994**, *344*, 859.
- [9] Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Krigas, T.; *Nature.* **1965**, *205*, 698.
- [10]. Singh, R. A. K; Sodhi, A.; *Biochimica et Biophysica Acta.* **1998**, *1405*, 171.
- [11] Decatris, M.P.; Sundar, S.; O' Byrne, K.J.; *Cancer Treatment Rev.* **2004**, *4*, 53.
- [12] Higgins, J. D.; Neely, L.; Fricker, S. J.; *Inorg. Biochem.* **1993**, *49*, 149.
- [13] De Lucca Neto, V.A.; Mauro, A.E.; Caires, A.C.F.; Ananias, S.R.; De Almeida, E.T.; *Polyhedron.* **1999**, *18*, 413.
- [14] Fecchio, D.; Sirois, P.; Russo, M.; Jancar, S.; *Inflammation.* **1990**, *14*, 125.
- [15] Slater, L.M.; Murray, S. L.; Wetzel, M.W.; Wisdom, R.M.; Du Valle, E.M.; *J.Clin. Invest.* **1982**, *70*, 1131.
- [16] Esteves-Souza, A.; Silva, T.M.S.; Alves, C.C.F.; Carvalho, M.G.; Braz-Filho, R.; Echevarria, A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 838.
- [17] Mossman, T.; *J. Immunol. Methods.* **1983**, *65*, 55.

- [18] Saad-Hossne, R.; Saad-Hossne, W.; Prado, R.G.; *Acta Cir. Bras.* **2003**, *18*, 534.
- [19] Rabinovitch, M.; Manejias, R.E.; Russo, M.; Abbey, E.E.; *Cell. Immunol.* **1977**, *29*, 86.
- [20] Ahmad, A.; Abdin, M.Z.; *Plant. Sci.* **1999**, *43*,1.
- [21] Carswell, E.A.; Old, L.J.; Kassel, R.L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1975**, *72*, 3666.
- [22] Carlos, I.Z.; Zini, M.M.C.; Sgarbi, D.B.G.; Angluster, J.; Alviano, C.S.; Silva, C.L.; *Mycopathologia.* **1994**, *127*, 189.
- [23] Gupta, M.; Mazumder, U.K.; Kumar, R.S.; Kumar, T.S.; *Acta Pharmacol. Sin.* **2004**, *25*, 1070.
- [24] Rajkapoor, B.; Jayakar, B.; Murugesh, N.; *Indian J. Pharmacol.* **2004**, *36*, 38.
- [25] Saad-Hossne, R.; Saad-Hossne, W.; Prado, R. G.; *Acta Cir. Bras.* **2004**, *19*, 210.
- [26] Caires A.C.F.; Mauro, A.E.; *Quím. Nova.* **1996**, *19*, 59.
- [27] Caires, A.C.F.; De Almeida, E.T.; Mauro, A.E.; Hermely, J.P.; Valentini, S.; *Quím. Nova.* **1999**, *22*, 329.
- [28] Quiroga, A. G.; Ranninnger, C. R.; *Coordination Chem. Rev.* **2004**, *248*, 119.
- [29] Fahim, F. A.; Esmat, A.Y.; Mady, E. A.; Ibrahim, E.K.; *Biol. Res.* **2003**, *36*, 253.
- [30] Bergami-Santos, P. C.; Mariano, M.; Barbuto, J. A.; *Life Sci.* **2004**, *75*, 245.
- [31] Pinello, K. C.; Fonseca, E.S.M.; Akisue, G.; Silva, A. P.; Oloris, S. C. S.; Sakai, M.; Matsuzaki, P.; Nagamine, M. K.; Neto, J. P.; Daglia, M. L. Z.; *Life Sci.* **2006**, *78*, 1287.
- [32] De Almeida, E. T.; Mauro, A. E.; Santana, A. M.; De Godoy Netto, A. V.; Carlos, I. Z.; *Quím. Nova*, **2005**, *28*, 405.
- [33] Moncada, S.; Palmer, R. M. J.; Higgs, E. A.; *Pharmacol. Rev.* **1991**, *43*, 109.
- [34] Tamir, S.; Tannenbaum, S. R.; *Biochimica et Biophysica Acta.* **1996**, *1288*, 31.
- [35] Brune, B.; Von Knethen, A.; Sandau, K.B.; *Cell Death Differentiation.* **1999**, *6*, 969.

- [36] Shishodia, S.; Sodhi, A.; Shrivastava, A.; *Int. J. Immunopharmacol.* **1997**, *19*, 683.
- [37] Kopreski, M. S.; Lipton, A.; Harvey, H.; Kumar, A.R.; *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 433.
- [38] Szlosarek, P.; Charles, K.A.; Balkwill, F.R.; *Eur. J. Cancer.* **2006**, *42*, 745.
- [39] Moore, R.J.; Owens, D.M.; Stamp, G.; *Nat. Med.* **1999**, *5*, 828.
- [40] Malik, S.T.A.; Naylor, S.; East, N.; Oliff, A.; Balkwill, F.R.; *Eur. J. Cancer.* **1990**, *26*, 1031.
- [41] Orosz, P.; Kruger, A.; Hubbe, M.; Ruschoff, J.; Von Hoegen, P.; Mannel, D.N.; *Int. J. Cancer.* **1995**, *60*, 867.
- [42] Michalaki, V.; Syrigos, K.; Charles, P.; Waxman, J.; *Br. J. Cancer.* **2004**, *90*, 2312.
- [43] Biringanine, G.; Vray, B.; Vercruyse, V.; Vanhaelen-Fastré, R.; Vanhaelen, M.; Duez, P.; *Nitric Oxide.* **2005**, *12*, 1.
- [44] Wadler, S.; Schwartz, E. L.; *Cancer Res.* **1990**, *50*, 3473.
- [45] Ruiz-Ruiz, C.; Munoz-Pinedo, C.; Lopes-Rivas, A.; *Cancer Res.* **2000**, *60*, 5673.

Table 1– Effect of organopalladated compounds in mice bearing Ehrlich ascites tumour

Parameters	[Pd(dmba)(μ -NCS)] ₂ (1)	[Pd(dmba)(NCS)(dppp)] (2)	<i>cis</i> -[Pt(Cl) ₂ (NH ₃) ₂] (<i>Cis</i> -DDP)	Vehicle Control	Tumour control
EAT cells (%) ^a	57.57±5.22***	24.86±4.26***	27.14±4.10***	81.25±6.58	73.87±6.92
PMN (%) ^b	9.57±3.36	38.43±11.7***	22.57±4.39***	2.50±1.52	2.80±1.92
Cell death (%) ^c	26.25±4.78	18.75±4.85	22.50±2.88	25.50±3.32	25.50±3.32
Spread macrophages (%) ^d	62.0±22.81***	37.40±11.78	78.40±16.82***	15.14±5.55	17.71±7.06

a-d = data are reported as MEAN ± SD for at least three independent experiments carried out in triplicate. **a** = differentiate score by Giemsa methods, *** p < 0.001 different when compared to Tumour control group *n* = 6; **b** = differentiate score by Giemsa methods, *** p < 0.001 different when compared to Tumour control group; *n* = 6; **c** = results obtained by trypan blue methods, *p* > 0.05, similar to Tumour control group *n* = 6; **d** = spreading of macrophages, *** p < 0.001 different when compared to Tumour control group, *n* = 6.

Table 2- Effect of organopalladated compounds in the mean survival time (MST) and increase in life span (ILS) of the mice bearing EAT.

Groups	MST(days)	ILS (%)
G1	90*	100***
G2	90*	100***
G3	36	5.88
G4	34	—
G5	34	—

n = 6 mice in each group. * time that the mice were monitored daily, ***p* < 0.001 related to Tumour control group, the values were expressed as media. *Group 1 or G1*: *Cis-DDP*; *Group 2 or G2*: [Pd(dmba)(NCS)(dppp)] (2); *Group 3 or G3*: [Pd(dmba)(μ-NCS)]₂ (1); *Group 4 or G4*: PBS/DMSO 0,3% (Vehicle control); *Group 5 or G5*: PBS (Tumour control).

Figure captions

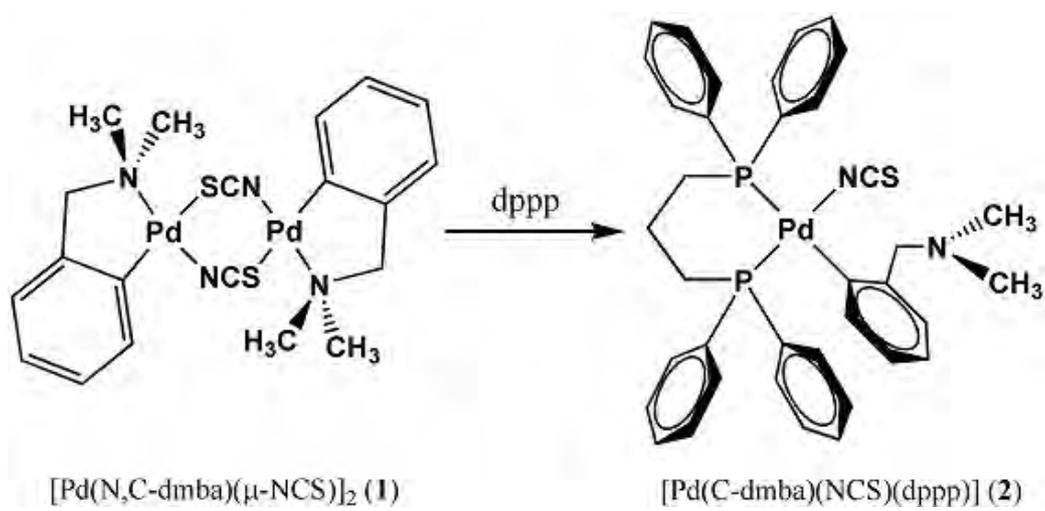
Figure 1- Structures of cyclopalladated compounds $[\text{Pd}(\text{N,C-dmba})(\mu\text{-X})_2]$ (**1**) and $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{X})(\text{dppp})]$ (**2**), X=NCS.

Figure 2- IC_{50} values (μM) for compounds, determined by concentration *vs* cell viability, assay *in vitro* after 48 h exposition – 1×10^6 cells/mL; $n = 10$ mice.

Figure 3- Influence of compounds at the percentage of macrophages in the peritoneal exsudate. The values are represented as mean \pm SD. $***p < 0.001$, significantly different of Tumour control group.

Figure 4- Influence of compounds in the NO serum levels. The values are represented as mean \pm SD. $***p < 0.001$, significantly different of Tumour control group.

Figure 5 – Influence of compounds in the serum levels of TNF- α . The values means mean \pm SD. $***p < 0.001$, significantly different of tumour control group.

**Figure 1**

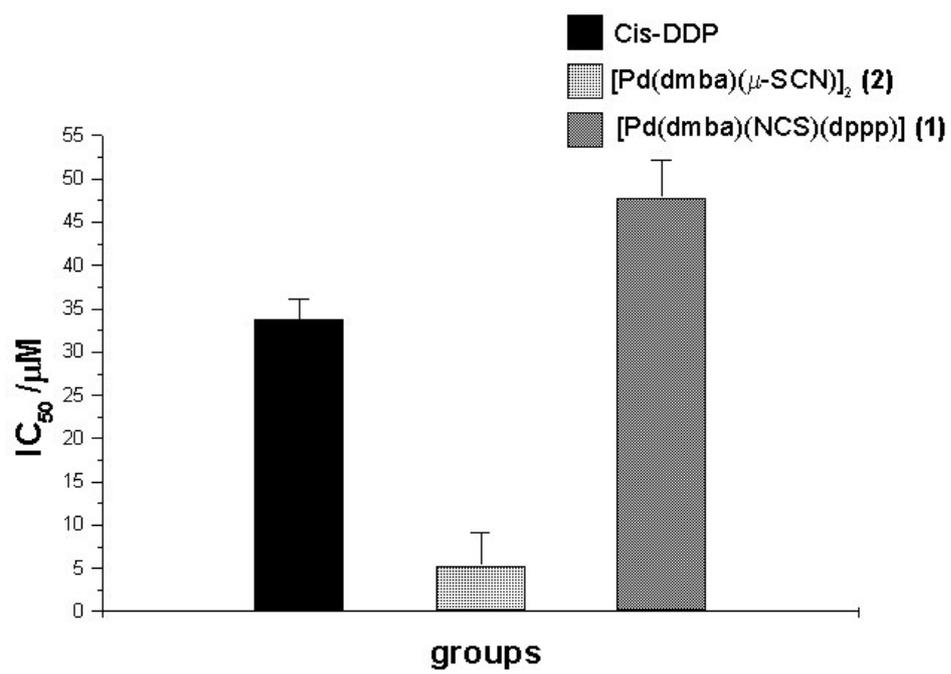


Figure 2

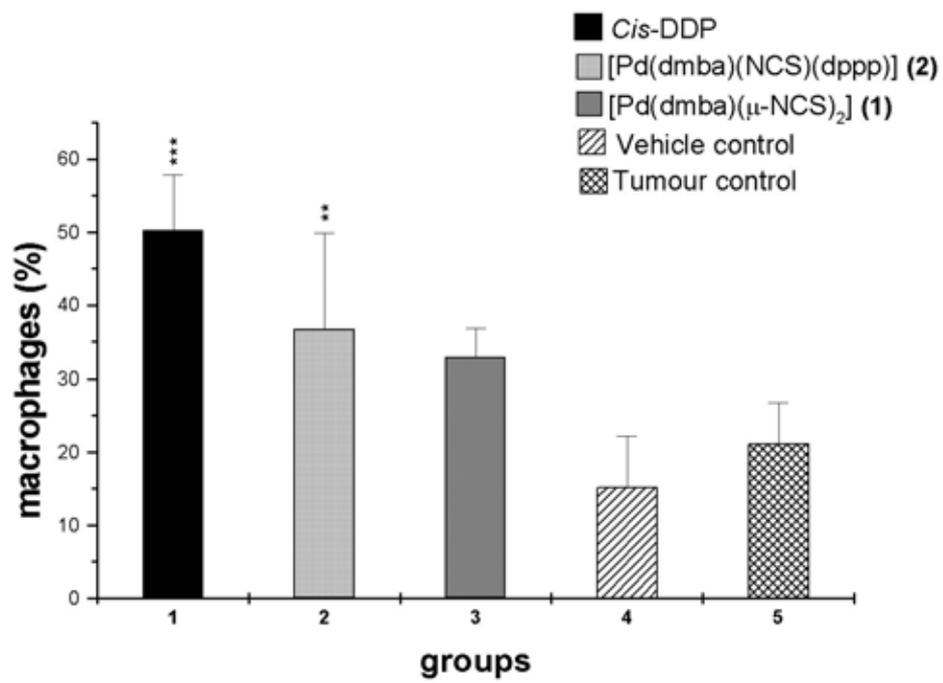


Figure 3

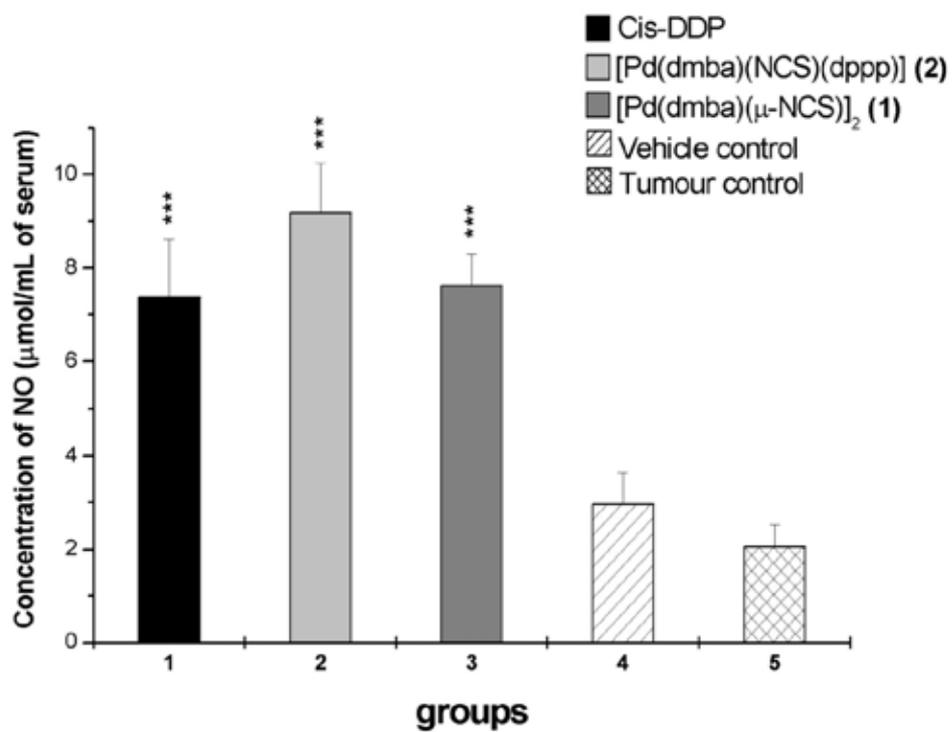


Figure 4

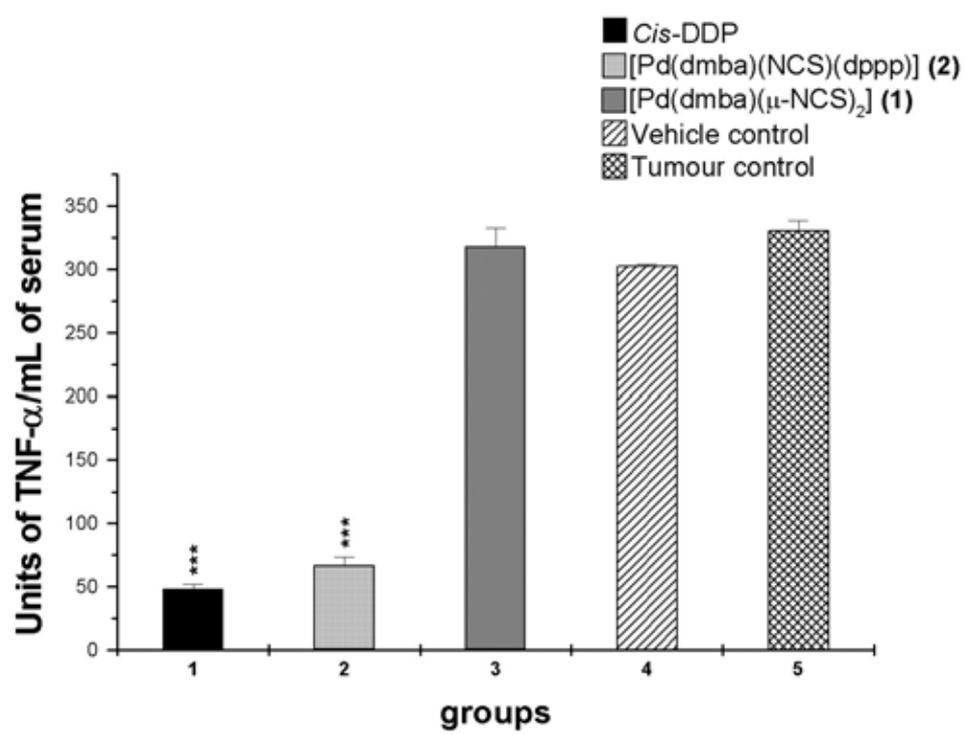
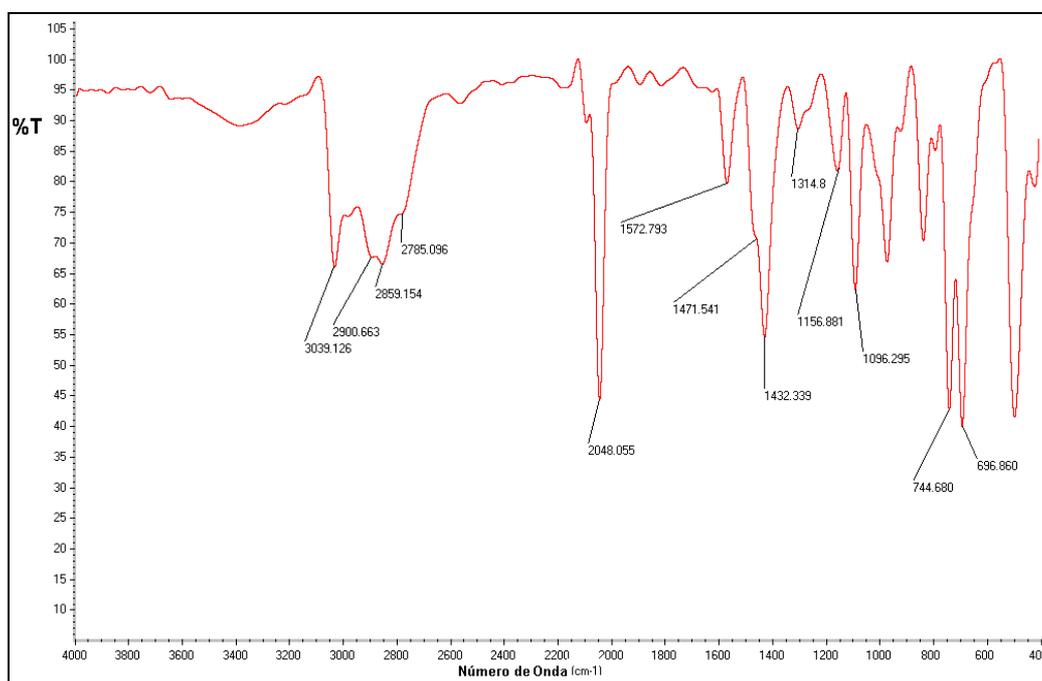


Figure 5

SUPPLEMENTARY INFORMATION



IR spectrum of the compound [Pd(C-dmba)(NCS)(dppp)] recorded as KBr pellets.