

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Mauro Guilherme Dall’Acqua Jardim

**Avaliação das atividades citotóxicas e imunomoduladora de paládio(II)
contendo o ligante DMBA= N,N-dimetilbenzilamina.**

Araraquara
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

Mauro Guilherme Dall’Acqua Jardim

**Avaliação das atividades citotóxicas e imunomoduladora de paládio(II)
contendo o ligante DMBA= N,N-dimetilbenzilamina.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara–UNESP como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara
2014

Ficha Catalográfica

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

J37a Jardim, Mauro Guilherme Dall' Acqua
Avaliação das atividades citotóxicas e imunomoduladora de paládio(II) contendo o
ligante DMBA= N,N-dimetilbenzilamina / Mauro Guilherme Dall' Acqua Jardim. –
Araraquara, 2014
102 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e
Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: Iracilda Zeppone Carlos

1. Paládio. 2. Câncer de mama. 3. Macrófagos. 4. Citotoxicidade. 5. Óxido nítrico. 6.
Citocinas. 7. Inflamação. 8. Angiogênese. I. Carlos, Iracilda Zeppone, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

AGRADECIMENTOS

A concretização do conhecimento é linda em sua plenitude, mas sua construção é árdua.

O tempo dedicado ao mestrado significa mais que uma escala temporal. Trata de um investimento de vida e com consequências que certas vezes desagradam, tais como o nosso distanciamento de amigos, parentes e familiares; preocupações, cabelos brancos e quilos a mais, além de situações indescritíveis fisicamente, mas que surgem a partir de insucessos e frustrações relacionadas com a pesquisa, com os trâmites acadêmicos ou consigo mesmo, por conta das próprias limitações. Fazer Ciência, segundo minha vivência até o momento, é um metafórico pêndulo transposto ao cotidiano, oscilante entre muitas dúvidas e poucas certezas.

Discorrer sobre o período do meu mestrado é inevitavelmente apontar algumas comparações com a época de minha graduação, a citar a euforia inicial, pelo ingresso, e a incerteza no final, com a saída. Mas tal como a graduação, meu “universo de idéias”, de gente e de coisas boas também ampliou.

Pode ser agora um ciclo que finda meu vínculo com o Laboratório de Imunologia da UNESP de Araraquara/SP – lugar de idas e vindas diárias por muito tempo (somando-se noites, fins de semanas e feriados) – ou, de agora em diante, o princípio de outros momentos e parcerias. Caberia aqui um agradecimento ao Laboratório, tido para mim como um segundo lar por muito tempo. Pela estranheza, mais adequado é expressar minha gratidão aos servidores públicos do presente e do passado que, no conjunto de suas funções, deram rumos ao Laboratório de Imunologia que se misturaram aos meus e me possibilitaram experiências inigualáveis, nessa instituição formadora de recursos humanos de alto gabarito, graças ao *status* de excelência que ela possui.

A professora **Dra. Iracilda Zeppone Carlos**, minha orientadora, pessoa de invejável organização, seriedade e comprometimento com os seus afazeres acadêmicos, sou grato pelos conselhos, por ter me acolhido em seu laboratório, pela confiança depositada, pelo seu bom humor, apoio e constante participação neste meu trabalho. Certamente um dos melhores exemplos de orientadora. Obrigado!

Ao Departamento de Química Geral e Inorgânica, ao Professor Dr. Antonio Mauro e ao Dr. Rodrigo Souza da Química de Coordenação e Organometálicos, agradeço muito, pela convivência fácil, disposto em ensinar e discutir sobre os compostos.

À Marisa Campos Polesi Placeres por me ajudar em todas as tarefas que precisei, nas dúvidas que eu tive, por me deixar trabalhar com você e a vontade.

Aos Colaboradores deste trabalho: a Livia Ribeiro, minha primeira professora nesse processo, Rodrigo Alves de Souza, Marisa Polesi Placeres, Antonio Eduardo Mauro, Iracilda Zeppone Carlos, Alexander Duharte e Lucas Souza Ferreira meu mestre e professor integral nessa jornada árdua, sem vocês a realização deste trabalho não seria possível.

Gostaria de agradecer a todos, especialmente a equipe do Laboratório de Imunologia do Programa de Biociências e Biotecnologia (conceito 6), e a importante parceria com o Departamento de Química Geral e Inorgânica do Instituto de Química de Araraquara – UNESP. Nada é construído com qualidade sem a consciência e cultura do trabalho em equipe e parceria. Aqui cabe meu reconhecimento e, portanto, agradecimento a vocês: Dra. Livia Ribeiro, Drnd. Lucas Ferreira, Prof. Dr. Rodrigo Souza, Marisa Placeres, Prof. Dr. Antônio Mauro e Profa. Dra. Iracilda Z. Carlos.

Aos funcionários da UNESP, especificamente: Chicão - porteiro, Márcia, Rosemeire, dentre outros, obrigado por encontrar a UNESP sempre em perfeitas condições de trabalho. Dedico essa pesquisa a vocês.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Por fim, meus agradecimentos não menos especiais aos meus pais, ao meu Pai, hoje não aqui presente, um homem que na vida me ensinou muito, mas cabe ressaltar que a melhor foi: Ter personalidade e coragem para enfrentar a vida de cabeça erguida. A minha Mãe aqui comigo, me ensinou a ser forte e lutar pelos meus ideais, ambos, exemplos de honestidade e dignidade. Vocês sempre me deram a melhor oportunidade que puderam, correlacionadas a valores éticos, morais com princípios que imbuíram em mim vontade de lutar por justiça, para um mundo melhor a todos. Obrigado pela minha existência.

"Desejo primeiro que você ame,
E que amando, também seja amado.
E que se não for, seja breve em esquecer.
E que esquecendo, não guarde mágoa.
Desejo, pois, que não seja assim,
Mas se for, saiba ser sem desesperar.
Desejo também que tenha amigos,
Que mesmo maus e inconsequentes,
Sejam corajosos e fiéis,
E que pelo menos num deles
Você possa confiar sem duvidar.
E porque a vida é assim,
Desejo ainda que você tenha inimigos.
Nem muitos, nem poucos,
Mas na medida exata para que, algumas vezes,
Você se interpele a respeito
De suas próprias certezas.
E que entre eles, haja pelo menos um que seja justo,
Para que você não se sinta demasiado seguro.
Desejo depois que você seja útil,
Mas não insubstituível.
E que nos maus momentos,
Quando não restar mais nada,
Essa utilidade seja suficiente para manter você de pé.
Desejo ainda que você seja tolerante,
Não com os que erram pouco, porque isso é fácil,
Mas com os que erram muito e irremediavelmente,
E que fazendo bom uso dessa tolerância,
Você sirva de exemplo aos outros.
Desejo que você, sendo jovem,
Não amadureça depressa demais,
E que sendo maduro, não insista em rejuvenescer
E que sendo velho, não se dedique ao desespero.
Porque cada idade tem o seu prazer e a sua dor e
É preciso deixar que eles escorram por entre nós.
Desejo por sinal que você seja triste,
Não o ano todo, mas apenas um dia.
Mas que nesse dia descubra
Que o riso diário é bom,
O riso habitual é insosso e o riso constante é insano.
Desejo que você descubra ,
Com o máximo de urgência,
Acima e a respeito de tudo, que existem oprimidos,
Injustiçados e infelizes, e que estão à sua volta.
Desejo ainda que você afague um gato,
Alimente um cuco e ouça o João-de-Barro
Erguer triunfante o seu canto matinal
Porque, assim, você se sentirá bem por nada.
Desejo também que você plante uma semente,
Por mais minúscula que seja,

E acompanhe o seu crescimento,
 Para que você saiba de quantas
 Muitas vidas é feita uma árvore.
 Desejo, outrossim, que você tenha dinheiro,
 Porque é preciso ser prático.
 E que pelo menos uma vez por ano
 Coloque um pouco dele
 Na sua frente e diga 'Isso é meu',
 Só para que fique bem claro quem é o dono de quem.
 Desejo também que nenhum de seus afetos morra,
 Por ele e por você,
 Mas que se morrer, você possa chorar
 Sem se lamentar e sofrer sem se culpar.
 Desejo por fim que você sendo homem,
 Tenha uma boa mulher,
 E que sendo mulher,
 Tenha um bom homem
 E que se amem hoje, amanhã e nos dias seguintes,
 E quando estiverem exaustos e sorridentes,
 Ainda haja amor para recomeçar.
 E se tudo isso acontecer,
 Não tenho mais nada a te desejar."
 (Victor Hugo)

“Desejo que vocês tenham a quem amar, no meu caso a Fisioterapia... E lembrem-se,
 quando estiverem bem cansados, enquanto houver amor ainda há tempo para recomeçar.”
 Mauro Jardim

“Os grandes espíritos sempre encontraram fortes oposições de mentes medíocres.” (Albert
 Einstein)

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,
 sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”.
 (João Guimarães Rosa)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara – SP, com auxílio de bolsa CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Lista de Figuras e Tabela

Figura 1. Estrutura molecular da cisplatina. Extraída de Neves e Vargas (2011).

Figura 2. Estrutura molecular da isonicotinamida.

Figura 3. Representação estrutural dos compostos $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-Cl})]_2$ (1) e $[\text{Pd}(\text{dmba})\text{Cl}(\text{isn})]$ (4)

Figura 4. Representação estrutural do $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-N}_3)]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2) e do $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{N}_3)(\text{isn})]$ (5)

Figura 5. Representação estrutural do $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-NCO})]_2$ (3) e do $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{NCO})(\text{isn})]$ (6)

Figura 6. Representação estrutural do composto $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (7).

Figura 7. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-Cl})]_2$ (1).

Figura 8. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-N}_3)]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2).

Figura 9. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto $\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-NCO})]_2$ (3).

Figura 10. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})\text{Cl}(\text{isn})]$ (4).

Figura 11. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{N}_3)(\text{isn})]$ (5).

Figura 12. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{NCO})(\text{isn})]$ (6).

Figura 13. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (7)

Figura 14. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com a cisplatina.

Figura 15. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-NCO})]_2$ (**3**) e com a cisplatina)

Figura 16. Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})\text{Cl}(\text{isn})]$ (**4**) e com a cisplatina

Figura 17. (A) Ensaio do efeito do composto **3** na produção / inibição de NO. **(B)** Viabilidade dos macrófagos em contato com o composto **3**, avaliada pelo teste do MTT.

Figura 18. (A) Ensaio do efeito do composto **4** na produção / inibição de NO. **(B)** Viabilidade dos macrófagos em contato com o composto **4** avaliada pelo teste do MTT.

Figura 19. (A) Ensaio do efeito da cisplatina na produção / inibição de NO. **(B)** Viabilidade dos macrófagos em contato com a cisplatina, avaliada pelo teste do MTT.

Figura 20. Avaliação do efeito citotóxico e citostático do composto $\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-NCO})]_2$ (**3**) e cisplatina na linhagem celular LM3 por MTT.

Figura 21. Avaliação da significância estatística do composto **3** e da cisplatina em comparação ao controle negativo.

Figura 22. Avaliação do efeito citotóxico e citostático do composto $\text{Pd}(\text{dmba})\text{Cl}(\text{isn})]$ (**4**) e cisplatina na linhagem celular LM3 por MTT.

Figura 23. Avaliação da significância estatística do composto **4** e da cisplatina em comparação ao controle negativo.

Figura 24. Avaliação do efeito citotóxico e citostático do composto $[\text{Pd}(\text{Cdmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (**7**) e cisplatina na linhagem celular LM3 por MTT.

Figura 25. Avaliação da significância estatística do composto **7** e da cisplatina em comparação ao controle negativo.

Figura 26. Produção da citocina $\text{TNF-}\alpha$ em cultura de macrófagos.

Figura 27. Produção da citocina IL-6 em cultura de macrófagos.

Figura 28. Produção da citocina IL-10 em cultura de macrófagos.

Figura 29. Produção do mediador VEGF em cultura de macrófagos.

Figura 30. Produção do mediador VEGF em cultura de células tumorais (LM3).

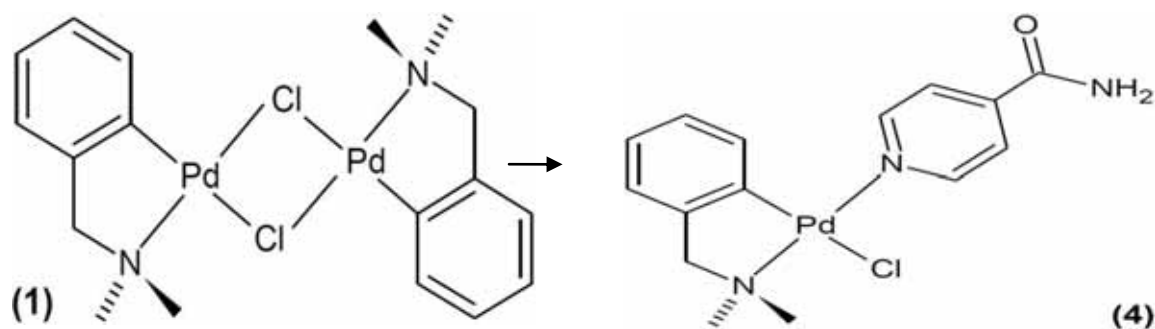
Figura 31. Teste de porcentagem de morte celular.

Figura 32. Análise de apoptose por citometria de fluxo

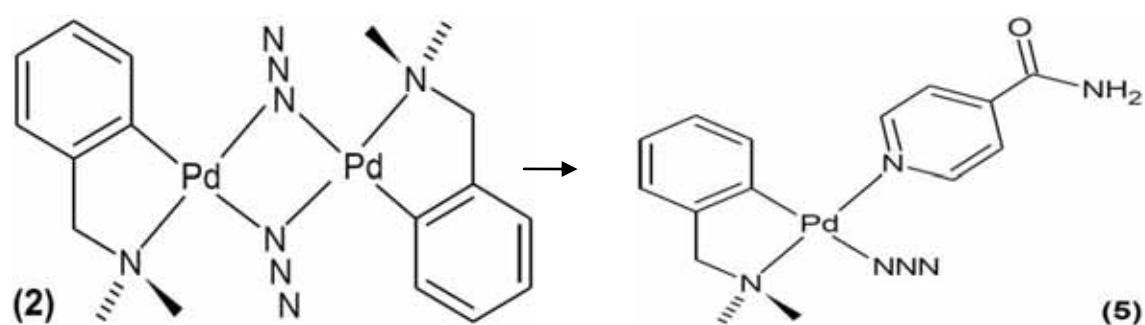
Tabela 1. Percentual do efeito citostático e citotóxico dos compostos e da cisplatina por MTT.

Lista de Estruturas

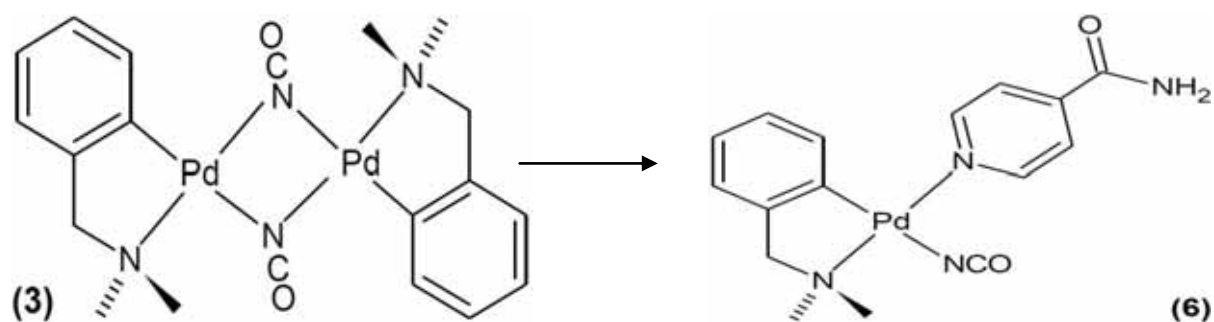
Compostos Organometálicos



Representação estrutural dos compostos $[\text{Pd}(\text{dmmba})(\mu\text{-Cl})]_2$ (1) e $[\text{Pd}(\text{dmmba})\text{Cl}(\text{isn})]$ (4)



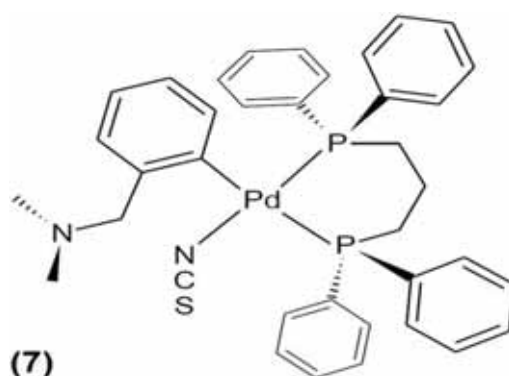
Representação estrutural do $[\text{Pd}(\text{dmmba})(\mu\text{-N}_3)]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2) e do $[\text{Pd}(\text{dmmba})(\text{N}_3)(\text{isn})]$ (5)



Representação estrutural do $[\text{Pd}(\text{dmmba})(\mu\text{-NCO})]_2$ (3) e do $[\text{Pd}(\text{dmmba})(\text{NCO})(\text{isn})]$ (6)

Composto Organometálico

O composto $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (7) {DMBA = *N,N*-dimetilbenzilamina; NCS = tiocianato e DPPP = difenilfosfinapropano} se caracteriza como um composto de paládio(II) um pouco distinto dos anteriores (1 a 6), pois apresenta um ligante difosfinínico quelante que, por sua vez, promove uma ligação muito forte ao Pd(II) e mantém, com isso, uma alta estabilidade do composto em solução.



Representação estrutural do composto $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (7).

Lista de Abreviaturas

°C: graus Celsius
µg: microgramas
µL: microlitros
µM: micromolar
ANOVA: Análise de variância
BSA: Bovine serum albumin
Ca²⁺: Cálcio²⁺
CO₂: Dióxido de carbono
iNOS/NOS2: Óxido nítrico sintetase induzível
DMSO: Dimetilsulfóxido
dmbs: N,N- dimetilbenzilamina
ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄: Ácido sulfúrico
PI: Iodeto de propídeo
IC50: Concentração inibitória de 50%
IQ: Instituto de Química
IFN-γ: Interferon-gama
IL-1β: Interleucina-1β
IL-6: Interleucina-6
IL-10: Interleucina-10
IL-12: Interleucina-12
TNF-α: Fator de necrose tumoral-α
VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial
L: Litro
LPS: Lipopolissacarídeo
mL: Mililitros
mM: Micromolar
MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico
NaCl: Cloreto de sódio
NaNO₂: Nitrito de sódio
NaOH: Hidróxido de sódio
NF-κB: Fator nuclear-κB
ng/mL: Nanogramas por mililitro
nm: Nanômetro
NO: Óxido nítrico
Pd: Paládio
Pt: Platina
PBS: Solução salina tamponada com fosfatos
RNI: Intermediários reativos do nitrogênio
ROI: Intermediários reativos do oxigênio
RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura - série 1640)
Th1: T helper tipo 1
Th2: T helper tipo 2
Tu: Tiuréia
UV: Ultravioleta
xg: Força centrífuga relativa
RM: Razão de mutagenicidade
TBE: Tampão Tris/Borato/EDTA
PMA: Acetato miristato de forbol
MEM: Meio essencial mínimo

Resumo

O câncer, manifestação originada pelo crescimento descontrolado de células, afeta milhões de indivíduos e é uma das principais causas de morte em todo mundo. Tendo em vista que os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento apresentam eficácia limitada (como a cisplatina) comumente atrelada à alta toxicidade, a busca por novos compostos capazes de combater células cancerígenas é uma necessidade premente. Com isso, cresce o interesse de se investigar novas substâncias que não sejam tóxicas, mas sim seletivas. Os compostos de paládio(II) têm sido estudados como uma alternativa aos fármacos disponíveis, mostrando-se promissores por sua menor toxicidade e capacidade de estimular a resposta imune antitumoral. Os macrófagos são as primeiras células a serem ativadas para participar de uma resposta imunológica propriamente dita e são células capazes de secretar mais de cem produtos biologicamente ativos, entre esses, espécies reativas de nitrogênio e citocinas atuantes na resposta imunológica e na formação tecidual. Neste trabalho foram testados sete compostos de paládio(II) quanto ao potencial imunológico e antitumoral, sendo eles: $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-Cl})]_2$ (1), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-N}_3)]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-NCO})]_2$ (3), $[\text{Pd}(\text{dmba})\text{Cl}(\text{isn})]$ (4), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{N}_3)(\text{isn})]$ (5), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{NCO})(\text{isn})]$ (6) {DMBA= N,N-dimetilbenzilamina; ISN= isonicotinamida; Cl= cloro; N3= azida; e NCO= cianato}; e $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (7) {DMBA = N,N-dimetilbenzilamina; NCS = tiocianato e DPPP = difenilfosfinapropano}. Os compostos foram testados quanto pelo teste colorimétrico de MTT, brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio. Os compostos que apresentaram melhores resultados (3,4 e 7, em comparação com a cisplatina), foram submetidos ao teste do MTT a fim de traçar seu perfil citotóxico e citostático frente a linhagem celular LM3 (carcinoma mamário murino), além de quantificar citocinas e analisar a apoptose por Citometria de Fluxo. Os resultados envolvendo a seletividade sobre estes dois tipos celulares mostraram que cada composto atua de forma diferente. Em destaque, contra a linhagem LM3 o composto 3 apresentou melhor resultado na concentração de 25 µg/mL, já o composto 4 apresentou eficácia melhor na concentração de 12,5 µg/mL. Os compostos 6 e 7 apresentaram seletividade para a linhagem celular tumoral LM3 em diferentes concentrações, porém com menor viabilidade quando comparado com os compostos 3 e 4. Foi testada a produção e inibição de óxido nítrico (NO), e observou-se que na concentração 25 µg/mL houve inibição pelos compostos 3 e 4 também à produção das citocinas TNF-α, IL-6, IL-12 e IL-10 em macrófagos. Os compostos 3, 4 e 7 mostraram redução da produção de citocinas inflamatórias, em comparação com cisplatina, ao passo que o composto 4 estimulou a produção de VEGF em ambos os tipos de celulares. O melhor resultado de atividade citotóxica para LM3, baixa citotoxicidade para macrófagos, e efeito anti-inflamatório foi observado para o composto 4, obtendo evidências para um potencial antitumoral. Foi feito o testes de apoptose e necrose das células LM3 e mostrou-se em todas as substâncias testadas um maior número de mortes por apoptose.

Palavras Chave: paládio, câncer de mama, macrófagos, citotoxicidade, óxido nítrico, citocinas, inflamação, angiogênese.

Abstract

The cancer manifestation caused by uncontrolled growth of cells, affects millions of individuals and is a major cause of death worldwide. Considering that the drugs currently available for the treatment of limited efficacy (such as cisplatin) commonly linked to high toxicity, the search for new compounds capable of fighting cancer cells is urgently needed. With this growing interest in investigating new substances that are not toxic, but selective. Compounds of palladium(II) have been studied as an alternative to available drugs showing be promising for its low toxicity and ability to stimulate antitumor immune response. Macrophages are the first cells to be activated to participate in an immune response itself and cells are able to secrete more than hundred biologically active products, among these, reactive nitrogen species and active cytokines in the immune response and tissue formation. In this work seven compounds of palladium(II) were tested for potential antitumor and immune being: $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-Cl})_2]$ (**1**), $[\text{Pd}(\text{dma})(\mu\text{-N}_3)]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2**), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-NCO})]_2$ (**3**), $[\text{Pd}(\text{dmba})\text{Cl}(\text{isn})]$ (**4**), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{N}_3)(\text{isn})]$ (**5**), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{NCO})(\text{isn})]$ (**6**) {DMBA = N, N-dimethylbenzylamine; ISN = -isonicotinamide; Cl = chloro; N₃ = azide; and NCO = cyanate}; and $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (**7**) = {DMBA = N,N' – dimethylbenzylamine; NCS= thiocyanate and DPPP = difenilfosfinapropano}. The compounds were tested by colorimetric assay of MTT, 3 [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl-tetrazolium. Compounds that showed better results (**3,4** and **7**, compared with cisplatin) were subjected to the MTT assay in order to trace their cytostatic and cytotoxic profile against LM3 cell line (murine mammary carcinoma), and analysis of apoptosis Flow Cytometry results involving cytotoxicity on these two cell types showed that each compound acts differently. Featured, against LM3 lineage compound **3** showed efficacy at a concentration of 25 mg / mL, as compound **4** showed the best result in the concentration of 12.5 mg / mL. The **6** and **7** showed selectivity for the tumor cell line LM3 at different concentrations but with lower viability as compared to the compounds **3** and **4**. The production of nitric oxide (NO) has been tested, and in bests concentrations they were inhibited. The production of the cytokines TNF- α , IL-6 and IL-10 in macrophages and vascular endothelial growth factor (VEGF) in macrophages and tumor LM3 lineage. The compounds **3**, **4** and **7** showed reduced production of inflammatory cytokines in comparison with cysplatin, while the compound **4** stimulated the production of VEGF in both cell types. The best result of combined citotoxic activity for LM3, low citotoxicity in PM, anti-inflammatory effect was observed for the compound **4**, supporting evidences for a potential antitumoral effec. Apoptosis and cell necrosis tests were also performed and all the substances tested showed results with a greater number of deaths in apoptosis.

Keywords: palladium(II), cancer, macrophages, cytotoxicity, tumor LM3 Lineage, nitric oxide, cytokines, inflammation, angiogenesis.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELA.....	VI
LISTA DE ESTRUTURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII

Capítulo I

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. Materiais e Métodos.....	17
3.1. Compostos de Paládio(II).....	17
3.2. Animais.....	18
3.3. Manutenção das células tumorais LM3.....	18
3.4. Obtenção das células do exsudato peritoneal.....	18
3.5. Avaliação da viabilidade celular de células peritoneais aderentes.....	19
3.6. Avaliação da viabilidade celular de células tumorais LM3.....	19
3.7. Obtenção do sobrenadante e condições de cultura dos macrófagos.....	20
3.8. Obtenção do sobrenadante e condições de cultura das células tumorais.....	21
3.9. Determinação da produção de óxido nítrico (NO).....	22
3.10. Determinação de mediadores nos sobrenadantes das culturas.....	22
3.11. Análise de apoptose por citometria de fluxo por meio de Annexin-V-FITC/PI.....	22
3.12. Análise estatística.....	23
3.13. Fluxograma das atividades desenvolvidas.....	24
4. Resultados.....	25
4.1. Avaliação da viabilidade de macrófagos peritoneais e células tumorais LM3 pela técnica de MTT (MOSSMAN, 1983).....	25

4.1.2. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto [Pd(dmba)(μ -Cl)] ₂ (1).....	25
4.1.3. Avaliação da viabilidade e dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto [Pd(dmba)(μ N3)] ₂ •H ₂ O(2).....	26
4.1.4. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto Pd(dmba)(μ -NCO)] ₂ (3).....	27
4.1.5. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto Pd(dmba)Cl(isn)] (4).....	28
4.1.6. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto [Pd(dmba)(N3)(isn)] (5).....	29
4.1.7. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto do [Pd(dmba)(NCO)(isn)] (6).....	30
4.1.8. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto [Pd(C-dmba)(NCS)(dppp)] (7).....	31
4.2. Avaliação da atividade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com a cisplatina.....	32
4.3. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto [Pd(dmba)(μ -NCO)] ₂ (3) e com a cisplatina.....	33
4.4. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto [Pd(dmba)Cl(isn)] (4) e com a cisplatina.....	35
4.5. Teste de viabilidade celular dos macrófagos por MTT e teste produção/inibição do NO com os compostos Pd(dmba)(μ -NCO)] ₂ (3), Pd(dmba)Cl(isn)] (4) e cisplatina....	36
4.6. Avaliação do efeito citotóxico e citostático do composto Pd(dmba)(μ NCO)] ₂ (3) e da cisplatina na linhagem celular LM3 por MTT.....	43
4.7. Avaliação do efeito citotóxico e citostático do composto Pd(dmba)Cl(isn)] (4) e da cisplatina na linhagem celular LM3 por MTT.....	46
4.8. Avaliação do efeito citotóxico e citostático do composto [Pd(Cdmba)(NCS)(dppp)] (7) e da cisplatina na linhagem celular LM3 por MTT.....	48
4.9. Determinação de mediadores no sobrenadante da cultura de macrófagos.....	50
4.9.1. Perfil imunológico da citocina TNF- α	50
4.9.2. Perfil imunológico da citocina IL-6.....	52
4.9.3. Perfil imunológico da citocina IL-10.....	53
4.9.4. Perfil imunológico do mediador VEGF em macrófagos.....	54
4.9.5. Perfil imunológico do mediador VEGF na linhagem celular LM3.....	55
4.10. Análise de apoptose por citometria de fluxo por meio de Annexin-V-FITC/PI....	57
5. Discussão.....	60
6. Conclusões.....	68
7. Referências.....	69

Capítulo II

Artigo.....83

CAPÍTULO 01

1. Introdução

Câncer é o termo utilizado para se referir a mais de 100 tipos de doenças, nas quais células sofreram mutações genéticas, sendo chamadas então de neoplásicas ou cancerígenas. Estas células se dividem sem controle, proliferando de forma exacerbada e invadindo tecidos normais, através da circulação sanguínea e do sistema linfático, podendo metastizar e comprometer as células hematopoiéticas mielóides e linfóides (M'ERIC *et al.*, 2006).

Milhões de indivíduos são afetados pela doença, sendo uma das principais causas de morte em todo mundo (PIVETTA, 2004). Estima-se que 84 milhões de pessoas morrerão de câncer entre 2005 e 2015 (WHO, 2009). Dentre os vários tipos, o câncer de mama é o segundo mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres (INCA 2009). Para o Brasil, somente em 2014, serão 57.120 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres (INCA 2014).

O câncer de mama constitui um problema de saúde pública no Brasil e em diferentes países tais como Estados Unidos, Reino Unido, Suécia, Itália e Uruguai. Nestes países as taxas anuais de incidência e mortalidade pela doença são superiores a 100 casos/100.000 mulheres e cerca de 40 óbitos/100.000 casos, respectivamente (JEMAL *et al.*, 2008).

A prevenção primária do câncer de mama ainda não é totalmente possível devido à variação dos fatores de risco e às características genéticas que estão envolvidas em sua etiologia. Até o momento, a realização periódica de exame clínico e mamográfico constitui a principal estratégia de rastreamento da doença, cujo principal objetivo é sua detecção precoce (ELMORE *et al.*, 2005). O auto-exame das mamas é considerado importante estratégia para a detecção do tumor de mama em estadiamento inicial (MENDONÇA *et al.*, 2008), embora não esteja relacionado à redução da taxa de mortalidade pela doença (KOSTERS; GOTZSCHE, 2003). O diagnóstico do câncer de mama em estágio inicial possibilita um tratamento mais efetivo e menos agressivo (SINGLETERY; CONNOLLY, 2006).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, 60% dos casos de câncer de mama no Brasil são detectados em fase mais avançadas, o que tem por consequência o aumento de recidivas, aparecimento de metástases redução da sobrevida (BRASIL, 2007). Tal situação exige um tratamento mais agressivo que

inclui o uso de drogas quimioterápicas, cujo benefício consiste na redução da progressão tumoral. Sabe-se que a resposta à quimioterapia neoadjuvante é um fator preditivo de sobrevida livre de doença (BONADONNA *et al.*, 1998).

As opções terapêuticas mais utilizadas para o tratamento locorregional do câncer de mama são a cirurgia e a radioterapia, enquanto que para o sistêmico são a quimioterapia, a hormonioterapia e a imunoterapia.

O câncer é um tecido complexo, composto de múltiplos tipos celulares que interagem entre si e influenciam na progressão tumoral, por exemplo, ele se beneficia da inflamação para favorecê-lo, chamado de primeiro evento e se beneficia da angiogênese para seu desenvolvimento, chamado de segundo evento na formação tecidual. Muitas das células envolvidas nestas interações são células normais do hospedeiro que estavam no sítio de surgimento do tumor ou que foram atraídas para tal região (HANAHAAN E WEINBERG, 2011).

Os tratamentos usualmente utilizados são extremamente agressivos e podem também provocar efeitos deletérios nas células imunológicas necessárias ao desenvolvimento de uma resposta imune efetiva (MALIK *et al.*, 2009). Desta maneira, existe um interesse crescente na descoberta de novos fármacos direcionados ao tratamento eficiente e seletivo às células tumorais associados à atividade imunomoduladora, (ROCHA *et al.*, 2001; ORSOLIC *et al.*, 2006; ISRAILIDES *et al.*, 2008), bem como na busca por terapias alternativas, como apresentado em um estudo de Roberts e colaboradores (2014), onde demonstraram que a injeção intratumoral de uma versão atenuada da bactéria *Clostridium novyi* pode reduzir o volume do tumor em vários modelos animais pré-clínicos, bem como em humanos.

Paul Erlich, em 1909, desenvolveu a hipótese de que o câncer poderia ser controlado pelo sistema imune e até mesmo através de estímulos adequados poderia ser tratado pelo sistema imune (ERLICH, 1909, revisto por ULLRICH *et al.*, 2008). Bem mais tarde, em 1970, esta ideia originou a Teoria da Imunovigilância contra Tumores, nas mãos de Burnet. Segundo ele, os tumores iriam se originar com maior frequência do que seriam de fato notados, e seria uma função do sistema imune eliminá-los antes de se tornarem clinicamente detectáveis (BURNET, 1970, revisto por CROCI *et al.*, 2007). Estes trabalhos teorizaram que o sistema imune é extremamente importante contra o desenvolvimento do câncer, mais ainda, que

poderia combatê-lo antes mesmo de sua completa formação. Atualmente sabemos que esta é uma face da moeda, mas existe a outra face: a edição tumoral.

Em um microambiente tumoral, a resposta imune elimina células malignas que possam ser reconhecidas como “estranhas” e que sejam sensíveis aos mecanismos imunológicos. E por isso mesmo, o sistema imune acaba selecionando as células tumorais mais aptas a sobreviverem nesse ambiente hostil (CROCI *et al.*, 2007). E não apenas isso, a enchente de mediadores imunológicos tanto da inflamação como da cicatrização, liberados neste ambiente disfuncional e, portanto, patológico, acabam por estimular o crescimento tumoral.

Após a fase inicial do processo inflamatório desencadeado pelas células tumorais, uma série de mediadores induz a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, responsáveis pela adesão de monócitos. Concomitante a isso, ocorre aumento da permeabilidade vascular no microambiente, permitindo que os monócitos migrem pelas fenestras entre as células endoteliais e sejam ativados, assumindo então o fenótipo de macrófagos. Este processo é mediado por citocinas pró-inflamatórias que recrutam células de defesa para o local através da formação de um gradiente de mediadores químicos com ação quimio-atraente (ASSOIAN *et al.*, 1983; HELDIN *et al.*, 2002).

Os macrófagos desempenham importantes funções na contenção de agentes agressores, sendo um dos principais constituintes do sistema imune inato envolvido na defesa do hospedeiro. Além disso, os macrófagos são imprescindíveis mediadores entre imunidade inata e adaptativa através do processamento e apresentação de antígeno às células T e liberação de moléculas moduladoras, direcionando desta maneira a imunidade adaptativa para uma resposta celular (Th1) ou humoral (Th2) (IONTCHEVA *et al.*, 2004). O sistema imune adaptativo, sob estimulação do sistema imune inato, desempenha um papel crucial na resposta imune, com participação imprescindível das células B e T. Estas últimas compreendem os tipos citotóxico (células Tc) e “helper” (células Th), as quais, por sua vez, podem sofrer diferenciação para diversos fenótipos com ações efectoras ou de memória. Os diferentes fenótipos de Th são o resultado da ativação das células T “naive” face a diferentes estímulos. Os clones Th se diferenciam em quatro categorias distintas, com base no padrão de citocinas produzidas por cada subpopulação. (NOBEN-TRAUTH, 2000)

As células Th1 produzem IFN- γ , IL-2, TNF- α , com perfil para a resposta celular, via ativação de macrófagos. As células Th2 liberam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que ativam a imunidade humoral e/ ou inibem a resposta celular Th1, e podem ser secretadas de maneira acentuada na presença de antígenos persistentes (RENGARAJAN *et al.*, 2000). Foi descrito também um novo fenótipo de linfócitos T designado por Th17. Estas células produzem essencialmente IL-17, IL-6 e estão associadas ao desenvolvimento de respostas inflamatórias e possível proteção do hospedeiro contra bactérias intracelulares e fungos (WEAVER *et al.*, 2007).

Sabe-se que o IFN- γ regula negativamente a diferenciação de células Th17 e a produção da IL-23 (uma citocina importante para a expansão das células Th17), enquanto que TGF- β (fator de crescimento transformador beta) juntamente com IL-6, estimula a diferenciação de células Th17 (KORN *et al.*, 2007). As células TCD4+ regulatórias (Treg) suprimem a resposta imune pela secreção de elevados níveis de TGF- β , uma citocina imunossupressora que também pode inibir a secreção de citocinas Th1, com quantidades variáveis de IL-4 e IL-10. Estas citocinas auxiliam no equilíbrio entre proteção e progressão de doenças (WANG *et al.*, 2003; MCGEACHY E Cua, 2008).

Os macrófagos do hospedeiro produzem citocinas que poderiam levar a uma ativação imune efetiva contra o tumor, como a IL-12, que estimula a imunidade inata e adaptativa, sendo que, uma põe a outra em movimento, levando a uma resposta imune celular Th1, e à eliminação tumoral, com atividades antiangiogênicas, e capaz de levar à regressão de tumores já estabelecidos (BERRAONDO *et al.*, 2009; HAO *et al.*, 2012). Porém, estudos mostram que os macrófagos são as principais células leucocitárias encontradas no microambiente tumoral e que sua presença está relacionada ao crescimento do tumor. Nos casos de câncer de mama as infiltrações de macrófagos fazem parte de uma característica molecular que compõem o mau prognóstico do desenvolvimento da doença (MANTOVANI *et al.*, 2007; ALLAVENA *et al.*, 2008; SICA *et al.*, 2008; QIAN E POLLARD; 2010; SOLINAS *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010, BROWN *et al.*, 2012). Esta associação dos macrófagos ao ambiente tumoral auxilia no comportamento maligno das células neoplásicas não apenas pela produção de citocinas, mas também através da liberação de fatores de crescimento e enzimas degradadoras de matriz, estimulando assim a neovascularização tumoral (MANTOVANI *et al.*, 2007; WYCKOFF *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2008; PINA *et al.*, 2010; U'REN *et al.*, 2010; BROWN *et al.*, 2012).

Portanto, devido às características positivas e negativas dos macrófagos sobre este microambiente se faz necessária à busca de substâncias capazes de gerenciar e modular estas distintas características.

Os macrófagos ativados podem se polarizar em M1 ou M2. Os macrófagos do tipo M1 são aqueles ativados classicamente e podem ser eficazes no combate às células tumorais. Eles são estimulados por interferon- γ (IFN- γ) ou por estímulos de origem microbiana, liberam fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e fator estimulador de colônias granulócito-macrófagos (GM-CSF). Estas células possuem um fenótipo com alta produção de IL-12 e de IL-23 e baixa produção de IL-10. Os macrófagos M1 são eficientes produtores de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , responsáveis pela indução de respostas do tipo Th1 (BENOIT *et al.*, 2008; ; MANTOVANI *et al.*, 2014; MANTOVANI *et al.*, 2008).

Os macrófagos do tipo M2 são gerados na presença principalmente de IL-4 e IL-13. Estes possuem caracteristicamente baixa produção de IL-12 e de IL-23 e alta produção de IL-10, com capacidade variável de produzir citocinas inflamatórias, dependendo do estímulo recebido. Estas células possuem grande quantidade de receptores do tipo “scavenger”, receptores de manose e galactose. Além disto, nos macrófagos do tipo M2, o metabolismo da arginina tende a ser voltado para a produção de ornitina e poliaminas, e não para a formação de óxido nítrico (NO). Em geral, células M2 participam de respostas Th2, promovendo morte e encapsulação de parasitas, e possuem funções imunorreguladoras, não sendo normalmente eficientes contra o câncer (RENGARAJAN *et al.*, 2000; BENOIT *et al.*, 2008).

Quando presentes no microambiente tumoral, os macrófagos recebem o nome de macrófagos associados ao tumor (“Tumor-Associated Macrophages”, TAM). Os TAM acumulam-se em regiões hipóxicas do tumor, o que desencadeia a ativação de suas funções pró-angiogênicas e a polarização predominantemente para um perfil M2, embora também sejam capazes de gerar moléculas anti-angiogênicas que danificam a integridade dos vasos (LIN E POLARD, 2007). De encontro a isso, já foi demonstrado que, em tumor de mama, não ocorre angiogênese sem infiltração macrófagica (ALLAVENA *et al.*, 2008). Além de seu papel direto na angiogênese, os macrófagos também podem atuar recrutando outras células inflamatórias para o microambiente tumoral, especialmente neutrófilos. Além dos macrófagos e neutrófilos, células imunossupressoras mielóides e células dendríticas podem

contribuir para a linfangiogênese e angiogênese no câncer (NOONAN *et al.*, 2008; ONO, 2008).

A alteração dos níveis de oxigênio pode resultar em ativação ou de repressão de determinados genes reguladores homeostáticos, permitindo a sobrevivência de células e tecidos, apesar das variações das condições ambientais. Os genes tais como o HIF-1, cuja ativação é devida às condições de hipóxia, podem interagir com as enzimas e outros fatores de transcrição, de modo a controlar o crescimento de tecidos e a vascularização. Em um estudo de Zhong e colaboradores (1999) foi observado que a proteína HIF-1 α foi expressa em vários tipos de câncer humano e nas metástases. Este estudo identificou um aumento da expressão de HIF-1 α (em relação ao tecido normal adjacente) em 13 tipos de tumores, incluindo pulmão, próstata, mama, e carcinoma de cólon. Enquanto microambientes que cercam tumores cancerígenos são extremamente hipóxicos, a proliferação de tais massas, muitas vezes é possível graças a ativação do gene HIF-1, o que leva ao aumento da angiogênese e, assim, um aumento da oferta de oxigênio para a área (LADEROUTE *et al.*, 2006).

O gene HIF-1 é um heterodímero que aumenta a transcrição de vários genes por meio da ligação às regiões de DNA RCGTG consenso 5'-3' - (R = A ou G). Este fator de transcrição compreende duas proteínas chamadas HIF-1 α e HIF-1 β , também conhecida como ARNT (Aryl hidrocarboneto Receptor Nuclear Translocator), que tem no seu terminal amino, um domínio bHLH (básico-Helix-Loop-Helix) e dois domínios PAS (Period clock-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-Single minded). O domínio bHLH regula a dimerização de HIF-1 e impede a ligação ao DNA. O domínio PAS parece participar na seleção do gene alvo (HELLWIG-BÜRGE *et al.*, 1999, MAKINO *et al.*, 2001, KE E COSTA 2006).

A neogênese vascular é o processo fisiológico pelo quais novos vasos sanguíneos se formam, sendo indispensável para o organismo por promover o desenvolvimento embrionário, reparo tecidual e a fertilidade (BALBINO *et al.*, 2005). No entanto, a angiogênese pode estar associada com situações patológicas tais como a inflamação, desenvolvimento tumoral e a metástase. Os novos vasos sanguíneos se desenvolvem a partir de vasos pré-existentes ou através do recrutamento de células derivadas da medula óssea (FOLKMAN, 1995; COSTA E INCIO, 2007, LOPES *et al.*, 2009).

A angiogênese associada ao câncer normalmente se ativa durante os estágios pré-neoplásicos do desenvolvimento tumoral e é regulada positiva ou negativamente por células tumorais, endoteliais, estromais e leucócitos. Dentre outros fatores, as células tumorais produzem mediadores capazes de atrair os macrófagos, o que ocorre de forma mais intensa em estado de hipóxia. Os macrófagos são capazes de produzir fatores pró-angiogênicos, como as citocinas, fatores de crescimento, mediadores lipídicos, tais como as prostaglandinas, mas também são capazes de gerar moléculas antiangiogênicas, que danificam a integridade dos capilares. No entanto, as funções pró-angiogênicas tendem a ser mais importantes. Os macrófagos do hospedeiro são considerados como células infiltrantes fundamentais ao desenvolvimento da angiogênese, por produzirem citocinas e mediadores atuantes neste cenário (HAO *et al.*, 2012).

Durante as duas últimas décadas, vários fatores de crescimento foram identificados como tendo atividade pró-angiogênica e, dentre estes, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um dos mais potentes indutores da formação vascular. O VEGF-A foi o primeiro a ser isolado, e faz parte de uma família de ligantes que consiste de seis proteínas relacionadas (VEGF-A, B, C, D e E; e o fator de crescimento placentário (PIGF). O VEGF-A, frequentemente abreviado como VEGF apenas, é um indutor chave da angiogênese, essencial para o crescimento invasivo e metastático do câncer. Neste contexto, o VEGF promove a proliferação de células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular (SCHIAVETTI *et al.*, 2012).

O óxido nítrico (NO) é produto de macrófagos ativados e é derivado do aminoácido L-arginina pela atividade enzimática do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e funciona como uma molécula tumoricida e antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*, promovendo inibição da proliferação e redução da progressão metastática (BOGDAN, 2001; GALLI *et al.*, 2003; LALA E CHAKRABORTY, 2001, KITAGAWA *et al.*, 2011). O descontrole na síntese de NO está implicado na patogênese da hipertensão, sepse, doenças cerebrais degenerativas e câncer (BOGDAN, 2001; COSTA *et al.*, 2003; GALLI *et al.*, 2003; BEGO *et al.*, 2009; CARLI *et al.*, 2009).

Localmente, os macrófagos ou as próprias células tumorais podem alterar os níveis de NO. É bem estabelecido que tumores sólidos possuam regiões normalmente vascularizadas e, portanto, normóxicas, assim como regiões de pouca vascularização, nutrição insuficiente e baixo pH devido à produção de lactato. Em regiões normóxicas, os macrófagos infiltrados podem produzir NO de modo a

garantir a sobrevivência da célula e gerar efeitos pró-angiogênicos. No entanto, em regiões hipóxicas, a grande geração de NO pode ser tóxica e reduzir a sobrevivência das células tumorais (WEIGERT E BRÜNE, 2008). Paradoxalmente, quando o tumor está mais avançado, a produção de NO pelas próprias células tumorais ou por outras células do microambiente tumoral representa um pior prognóstico em vários tipos de tumores, incluindo câncer de mama e de ovário (THOMSEN *et al.*, 1995; COBBS *et al.*, 1995; NOMEINI *et al.*, 2008; WEIGERT E BRUNE, 2008). Sendo assim, os efeitos do NO dependem fundamentalmente de sua concentração.

Além da iNOS, os macrófagos possuem outra enzima fundamental à resposta imune: a arginase. A hidrólise da arginina pela enzima arginase produz uréia e ornitina, que são precursores para a síntese de poliaminas, prolina e glutamato. Existem duas arginases em mamíferos: arginase I (citossólica) e arginase II (mitocondrial). A arginase I é uma isoforma mais induzível, sensível a alterações locais, e é proposto que esta enzima participa em muitos processos patológicos, como doenças vasculares, doença pulmonar, infecções, disfunções imunes e câncer (JENKINSON *et al.*, 1996; MORRIS *et al.*, 2009).

Além do NO, outros mediadores produzidos pelas células imunes influenciam no crescimento de um tumor. O IFN- γ é uma citocina pleiotrópica liberada principalmente por linfócitos T e atua principalmente ativando macrófagos e aumentando a produção de IL-12 e intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio por células fagocíticas. Desta forma, esta citocina representa um mecanismo de comunicação entre a imunidade adaptativa já desenvolvida, estimulando ainda mais a imunidade inata pré-existente. Ela possui um potente efeito antitumoral, pois controla o crescimento celular, aumenta a apoptose e reduz a angiogênese (KOVALOYSKY *et al.*, 2000; DRANOFF, 2004; ROCHA *et al.*, 2007; TODARO *et al.*, 2008).

Citocinas são estruturas proteicas de baixo peso molecular, que coordenam o sistema imunológico desde a fase inflamatória até a maturação e remodelação do tecido (BALBINO *et al.*, 2005), são sintetizadas por diferentes células principalmente fagócitos mononucleares e linfócitos T, ativados quando estimuladas (NICOLINI; CARPI; ROSSI, 2006). Elas são produzidas em resposta a vários estresses celulares, tais como lesão induzida por carcinógeno, infecção e inflamação. Nessas situações, elas agem estimulando a resposta imune para controlar o estresse celular e minimizar os danos celulares. Considerando que o controle efetivo da causa do

estresse celular promove a reparação celular, quando não ocorre resolução, isto pode levar à produção persistente de citocinas e uma exacerbação da destruição celular. Em vista disso, as reações do hospedeiro ao estresse celular podem causar impacto em vários estágios de formações e progressão tumoral (DRANOFF, 2004).

O fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma importante citocina produzida por macrófagos, e possui atividade antitumoral contra uma ampla variedade de linhagens “tumorais”, tais como a L929 (célula do tecido conjuntivo e/ ou adiposa da aréola mamária imortalizada, ou seja, recebeu um gene de uma célula cancerígena, porém permanece com os parâmetros de um célula normal) (CARLI *et al.*, 2009), mas paradoxalmente esta citocina pode aumentar a capacidade de invasão da célula tumoral. Por ativar a produção de intermediários reativos de oxigênio, em altos níveis esta citocina pode estar relacionada com a tumorigênese. Seus efeitos dependem do local de produção, da duração desta produção e da quantidade produzida durante a resposta imune. Em pequenas quantidades, a TNF- α tende a contribuir para o tratamento, remodelando os tecidos e melhorando a defesa local do hospedeiro, mas a produção de grandes quantidades de TNF- α induz ao choque (sepse) e gera lesão tecidual (CHARALAMPOS, 2005; LIN E KARIN, 2007; GERMANO *et al.*, 2008; BEGO *et al.*, 2009).

A IL-6, por sua vez, é uma citocina pleiotrópica que pode afetar células T, B e macrófagos, contribuindo para o aumento da inflamação e auxiliando na passagem entre a resposta inflamatória inata e a adaptativa. Esta é uma citocina-chave para o crescimento tumoral, capaz de aumentar a invasão da célula tumoral, além de desempenhar função inflamatória e anti-apoptótica, atuando em genes fundamentais para o controle do ciclo celular (LIN e KARIN, 2007; GERMANO *et al.*, 2008).

A IL-12, produzida por macrófagos, estimulando linfócitos e célula vigilante natural killer (NK) (RAULET E GUERRA, 2009), cujo papel biológico inclui a ativação de células T citotóxicas, e a ativação de macrófagos e linfócitos T para liberar citocinas inflamatórias, induzindo uma resposta imune efetora mais aguda, mediada especialmente contra células. Esta citocina estimula a imunidade inata e adaptativa direcionando o sistema imunológico à resposta imune Th1, necessária à eliminação tumoral, e ainda possui atividade antiangiogênica. É capaz de gerar a regressão de tumores já estabelecidos e normalmente, encontra-se reduzida em neoplasias mais

avanzadas (BARNES, 2003; LIN E KARIN, 2007; GERMANO *et al.*, 2008; BERRAONDO *et al.*, 2009; HAO *et al.*, 2012).

Contrária às citocinas citadas anteriormente, a IL-10 é uma molécula produzida principalmente por macrófagos e linfócitos, e possui propriedades anti-inflamatórias e funções imunossupressoras, parecendo agir no estímulo do crescimento tumoral. No entanto, esta citocina é capaz de reduzir a produção IL-6 e TNF- α , que em determinados tumores são cruciais para o desenvolvimento do câncer. Além disto, a IL-10 parece ser capaz de modular a apoptose e suprimir a angiogênese. Apesar de seu efeito dúbio, esta citocina é encontrada em maiores concentrações em neoplasias mais avançadas (LIN E KARIN, 2007; GERMANO *et al.*, 2008; NAUNDORF *et al.*, 2009).

Dentre estas citocinas, destacam-se a IL-8 e o mediador VEGF, com funções predominantemente angiogênicas, capazes de serem produzidas pelas células imunes e pelas próprias células tumorais e endoteliais do microambiente tumoral (CULIG, 2011).

O VEGF é produzido pelos macrófagos. É estabelecido o infiltrado de macrófagos na promoção do tumor, ou na inibição do mesmo. Os extremos obtidos *in vitro* são o fenótipo M1, associado matando patógenos que os ativam, e o fenótipo M2, associado no remodelamento tecidual e angiogênese (NOONAN *et al.*, 2008). Este último fenótipo parece ser o que predomina em tumores. Macrófagos M2 são conhecidos por serem capazes de produzir uma série de fatores angiogênicos, incluindo VEGF. Paradoxalmente o VEGF recruta macrófagos e estes são capaz de produzir citocinas pró-inflamatórias, tal com o TNF- α que estimula os macrófagos na regulação da angiogênese e no combate às células tumorais.

Para compreender o mecanismo da ação antitumoral de um composto associado ao sistema imunológico é necessário investigar as características citotóxicas desta substância e sua capacidade de seletividade a uma determinada linhagem celular. Uma mudança em qualquer parâmetro vital ocasionada, por exemplo, por uma substância antitumoral, pode desencadear o estresse celular, que é uma adaptação essencial às condições anormais celulares.

Os últimos anos evidenciam um crescente interesse na química de compostos organometálicos, notadamente dos ciclometalados – compostos cíclicos contendo pelo menos um metal em sua constituição –, pelas suas vastas e diversificadas

aplicações, desde processos catalíticos e materiais líquido-cristalinos até na área médica (ANANIAS *et al.*, 2003; MORO *et al.*, 2004).

Na Química Medicinal, destacam-se atualmente os compostos de paládio(II), sobre os quais há muitas citações contemplando espécies organopaladadas mono, bi e polinucleares, com propriedades biológicas como o organopaladado que apresentou atividade citotóxica *in vitro* frente a certos tipos de células cancerígenas, sendo a mesma atividade superior àquela do análogo com Platina (II) (ANANIAS *et al.*, 2003; MORO *et al.*, 2004; QUILLES *et al.*, 2010).

A cisplatina (Figura 1) é utilizada clinicamente como antitumoral desde 1979, sendo o primeiro fármaco comercializado a ser adotado para tal finalidade no mundo. No entanto, esforços são despendidos há mais de 30 anos para se encontrar substitutos tão potentes quanto ela, mas, principalmente, que apresentem menos efeitos adversos, pois a cisplatina é tão citotóxica para as células sadias quanto para as tumorais, apresentando, portanto, uma baixa seletividade (NEVES; VARGAS, 2011).

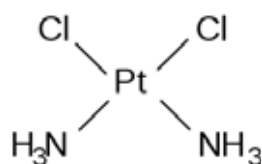


Figura 1. Estrutura molecular da cisplatina. Extraída de Neves e Vargas (2011).

Embora a cisplatina seja um dos cinco agentes antitumorais mais utilizados em terapia clínica (O'DWYER *et al.*, 1999) esta possui várias limitações, incluindo toxicidade (nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade e emetogenesis) e resistência intrínseca ou adquirida (REEDIJK, 1996). Em razão disto, a busca por novos compostos que possam ser úteis no combate às células cancerígenas tem levado à investigação dos compostos de Paládio(II), metal mais reativo e menos citotóxicos que a cisplatina, visto como potenciais candidatos a novos fármacos para o tratamento do câncer.

Considerando a geometria quadrática-planar ao redor, tanto da platina(II) quanto do paládio(II), esse último despontou para fazer parte da síntese de compostos de coordenação potencialmente substitutos da cisplatina, sobretudo,

devido a menor toxicidade de compostos de Paládio(II) frente às células sadias (ALMEIDA *et al.*, 2005; BEGO *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2010).

Predominantemente a partir dos anos 1990, a literatura exibiu muitos trabalhos direcionados à síntese de compostos inorgânicos muito distintos da cisplatina, objetivando alcançar atividades antitumorais e contendo, particularmente, outros metais de transição nas estruturas (ZHANG; LIPPARD, 2003).

A utilização de compostos de paládio(II) ganhou visibilidade mundial a partir da publicação de Quiroga e colaboradores (1998), que apontou compostos de paládio(II) – análogos de platina(II) – com atividades antitumoral contra várias linhagens celulares mas, em especial, contra linhagens resistentes à cisplatina. No ano seguinte, o artigo de Caires e seu grupo, (1999) reforçou o posicionamento dos compostos de paládio(II) no cenário global, por destacar a relevante atividade antitumoral de uma série de compostos organometálicos classificados como ciclopaladados, contendo os ligantes *N,N'*-dimetilbenzilamina (DMBA), azido (N_3^-) e difosfinas.

O emprego do ligante DMBA é interessante, pois promove considerável estabilidade aos compostos organometálicos de paládio(II), ao se ligar a este centro metálico de modo quelante.

No caso dos compostos apresentados no trabalho Caires e seu grupo, (1999) o fragmento metalo-orgânico apresenta um ciclo contendo cinco átomos, envolvendo uma ligação $C_{DMBA}-Pd$ e outra $N_{DMBA}-Pd$. No mesmo trabalho, as difosfinas também apresentavam um ótimo efeito quelante sobre paládio(II) e por isso acredita-se que a boa atividade antitumoral destes compostos pode ser decorrente das estruturas muito estáveis presentes no meio biológico.

O trabalho de Souza (2013) apresenta uma série de compostos do tipo $[Pd(dmba)X(isn)]$, sendo $X = Cl, N_3$ ou NCO ; $ISN =$ isonicotinamida, com excelentes atividades antitumorais *in vitro* contra linhagens murinas de câncer mamário LM3. Apesar de conter o fragmento quelante DMBA, os três compostos mencionados não apresentam total integridade em solução de DMSO – fato comprovado por experimentos de ressonância magnética nuclear realizada por Souza, em seu trabalho de doutoramento (2013). Por outro lado, a presença de espécies concomitantes àquelas caracterizadas no estado sólido deve ser importante para que haja a boa atividade biológica dos compostos do tipo $[Pd(dmba)X(isn)]$

supramencionados, que devem atuar como pró-fármacos, assim como ocorre no caso da cisplatina (NEVES; VARGAS, 2011).

A ISN é uma piridina substituída na posição quatro do anel aromático com uma amida (figura 2) e apresenta estrutura relativamente semelhante às substâncias pirazinamida e isoniazida, usadas no tratamento da tuberculose.

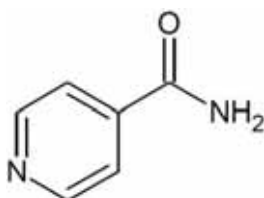


Figura 2. Estrutura molecular da isonicotinamida. Molécula usada como ligante nos compostos de paládio(II), presentes neste trabalho. Extraída de Souza (2013).

Uma das justificativas de Souza (2013) utilizar o ligante isonicotinamida é que, em trabalho recente de sua própria autoria, compostos de Pd(II) contendo este ligante apresentaram destacada ação antituberculose (SOUZA *et al.*, 2010).

Um pressuposto para atender boas ações antitumorais de compostos contendo a ISN é que ela apresenta a interessante propriedade de reforçar a atividade da sirtuína desacetilase, evitando a ação inibitória da nicotinamida (SAUVE *et al.*, 2005). Em um trabalho de Li e colaboradores, (2009) a sirtuína desacetilase foi relacionada com a repressão na produção de novos tumores.

Os compostos de fórmula geral $[Pd(C^2,N-dmba)(\mu-X)]_2$ {DMBA = *N,N*-dimetilbenzilamina, X = Cl, Br} e $[Pd(C^2,N-dmba)(X)tu]$ {[X = Cl, Br} apresentaram potencial citotóxico *in vitro* frente a linhagem LM3 e LP07 (linhagem tumoral de mama e pulmão, respectivamente) em pesquisas realizadas em nosso laboratório (ANANIAS *et al.*, 2003; MORO *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2009).

Estes compostos e ligantes citados não foram capazes de induzir quebras no DNA pelo ensaio com plasmídeo pUC 9.1. Levando em consideração a não mutagenicidade dos compostos e de seus ligantes, assim como a capacidade dos mesmos de estimularem a produção de citocinas pró-inflamatórias em animais portadores do tumor de Ehrlich, tais substâncias se mostraram promissoras por serem capazes de estimular o sistema imune e não provocar toxicidade e mutagenicidade ao DNA (QUILLES *et al.*, 2010).

Desta forma, os compostos de paládio(II) podem ser promissores na pesquisa contra o câncer. No presente trabalho foi avaliada a citotoxicidade dos compostos organometálicos, contra a linhagem tumoral LM3, bem como as suas citotoxicidades potenciais *in vitro*, além de seus efeitos na resposta imunológica, afim de visualizar seu perfil na produção de citocinas por macrófagos e o mediador VEGF tanto por macrófagos como para a linhagem LM3.

Os compostos investigados no presente trabalho foram $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-Cl})_2]$ (**1**), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-N}_3)]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2**), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-NCO})]_2$ (**3**), $[\text{Pd}(\text{dmba})\text{Cl}(\text{isn})]$ (**4**), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{N}_3)(\text{isn})]$ (**5**) e $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{NCO})(\text{isn})]$ (**6**) {DMBA= *N,N*-dimetilbenzilamina; ISN= isonicotinamida; Cl= cloro; N_3 = azida; e NCO= cianato}, sendo que os compostos **4**, **5**, e **6** foram sintetizados a partir dos compostos **1**, **2**, e **3**. Neste caso, houve uma alteração molecular e acrescentou-se o ligante do tipo piridínico isonicotinamida, cuja estrutura apresenta grande similaridade com a nicotinamida – componente químico da vitamina B3 –, e que possui um importante papel na cadeia celular respiratória.

O composto $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (**7**) {DMBA = *N,N*-dimetilbenzilamina; NCS = tiocianato e DPPP = difenilfosfinapropano} se caracteriza como um composto de paládio(II) um pouco distinto dos anteriores (**1** a **6**), pois apresenta um ligante difosfinínico quelante que, por sua vez, promove uma ligação muito forte ao Pd(II) e mantém, com isso, uma alta estabilidade do composto em solução. Os compostos e seus ligantes se encontram na sequência de forma representativa e na ordem numérica citada no texto.

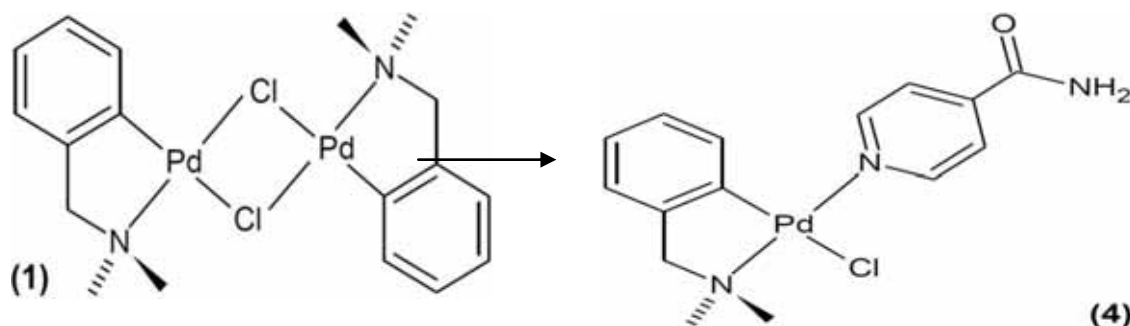


Figura 3. Representação estrutural dos compostos $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-Cl})_2]$ (**1**) e $[\text{Pd}(\text{dmba})\text{Cl}(\text{isn})]$ (**4**)

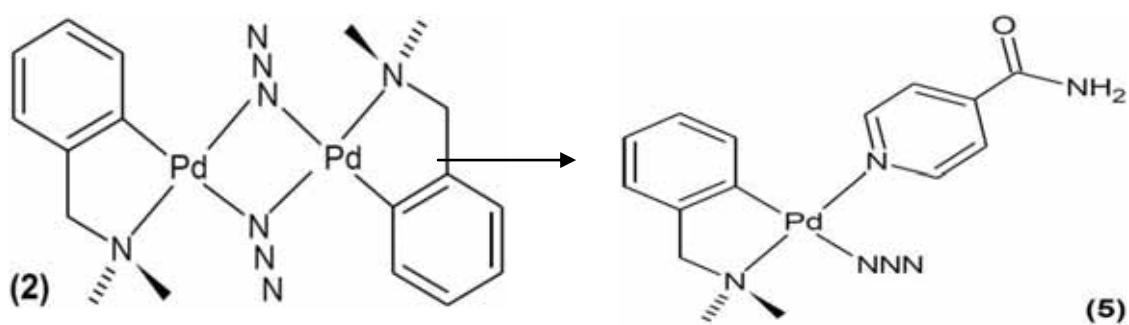


Figura 4. Representação estrutural do $[\text{Pd}(\text{dmmba})(\mu\text{-N}_3)]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2) e do $[\text{Pd}(\text{dmmba})(\text{N}_3)(\text{isn})]$ (5)

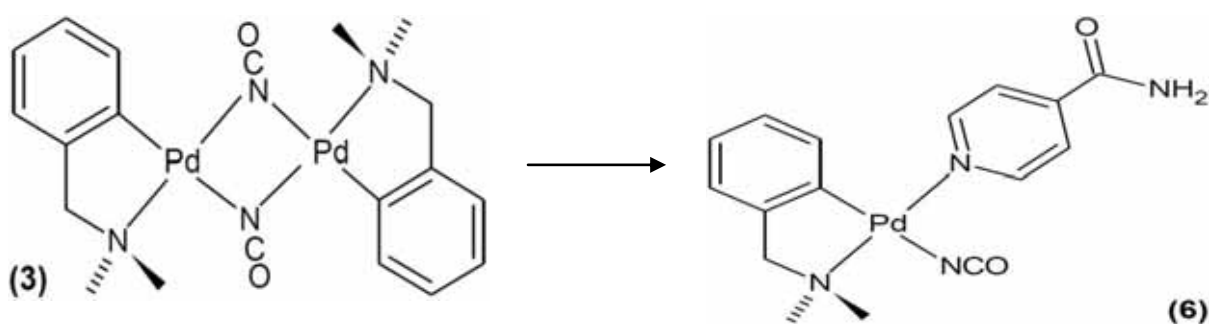


Figura 5. Representação estrutural do $[\text{Pd}(\text{dmmba})(\mu\text{-NCO})]_2$ (3) e do $[\text{Pd}(\text{dmmba})(\text{NCO})(\text{isn})]$ (6)

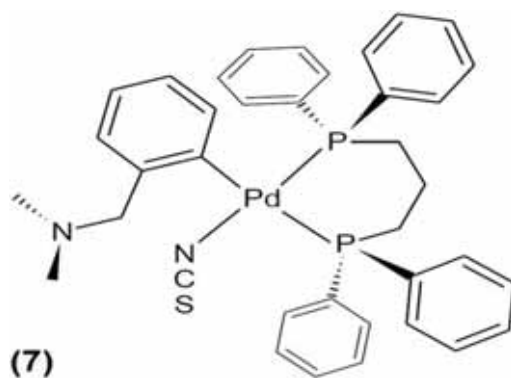


Figura 6. Representação estrutural do composto $[\text{Pd}(\text{C-dmmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (7).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Face ao exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a citotoxicidade dos compostos organometálicos de paládio(II), mediante a linhagem celular tumoral LM3 e macrófagos peritoneais, bem como avaliar seu efeito sobre a produção de diversos mediadores imunológicos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos compostos de paládio(II) e da cisplatina sobre células tumorais (LM3) e macrófagos peritoneais de animais normais *in vitro*.

E em culturas de células aderentes do exsudato peritoneal em contato com os compostos organometálicos e a cisplatina nosso objetivo foi:

- Avaliar a produção do intermediário reativo do nitrogênio (NO),
- Determinar a produção das citocinas TNF- α , IL-6, e IL-10 por macrófagos;
- Quantificar o mediador VEGF-A em culturas de macrófagos e células tumorais.
- Realizar o ensaio de apoptose para a linhagem LM3, a fim de analisar o estímulo que os compostos induzem a morte celular.

3. Materiais e Métodos

3.1. Compostos de paládio(II)

Todos os compostos utilizados neste trabalho foram preparados pelo Dr. Rodrigo Alves de Souza da Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), no Instituto de Química de Araraquara, sob supervisão do Prof. Dr. Antonio Eduardo Mauro.

O composto $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-Cl})]_2$ (**1**) é conhecido desde o final dos anos 1960 (COPE; FRIEDRICH, 1968), enquanto os compostos $[\text{Pd}(\text{dma})(\mu\text{-N}_3)]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**2**) e $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-NCO})]_2$ (**3**) seguiram metodologias de preparo relativamente distintas daquelas inicialmente apresentadas por Almeida *et al.*, (2007) e Lucca Neto e colaboradores, (1999). Os compostos $[\text{Pd}(\text{dmba})\text{Cl}(\text{isn})]$ (**4**), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{N}_3)(\text{isn})]$ (**5**), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{NCO})(\text{isn})]$ (**6**), inicialmente apresentados na literatura por Stevanato, Mauro e Netto (2009) também tiveram seus procedimentos de síntese modificados. Todas as alterações nas preparações dos compostos **1** a **6** bem como suas caracterizações moleculares foram devidamente tratadas por Souza em sua Tese de Doutorado em 2013.

O composto $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (**7**) foi preparado segundo a metodologia apresentada por Almeida e colaboradores (2005).

Os compostos assim obtidos foram solubilizados em dimetilsulfóxido [(DMSO), Merck, Alemanha] para a formação de uma solução-mãe de modo que a concentração desta substância não fosse maior do que 1% v/v (DMSO/meio de cultura) para a realização dos testes propostos. A solução-mãe foi diluída em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Aldrich, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina e $5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de β -mercaptoetanol, designado como RPMI-Completo (RPMI-1640-C) para os testes realizados com macrófagos peritoneais; para os testes com as células tumorais, a solução-mãe foi diluída em meio MEM (Sigma Aldrich, EUA), para a linhagem LM3, suplementados com 10% de soro fetal bovino, 100 mg/mL de estreptomicina e 100.000 U/mL de penicilina, 50 mg/mL de gentamicina e 2,5 mg/mL de anfotericina B, essa solução é denominada de: ATB 200x, designado como MEM-Completo. Para a utilização da linhagem LM3, foi padronizado para utilizá-la na quarta passagem em todos os testes. Essas soluções foram preparadas de forma seriada

1:2, que foram de 100 a 0,781 $\mu\text{g/mL}$, tanto para macrófagos como para a linhagem LM3.

3.2. Animais

Camundongos BALB/C machos, pesando entre 18-25g, procedentes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da UNICAMP (CEMIB) – Campinas (SP), foram mantidos em gaiolas, divididos em grupo de 5 animais em condições estáveis de ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$ e $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar) e ciclos de claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam água e ração (Purina) *ad libitum*, e de acordo com o protocolo dos experimentos a eutanásia foi realizada em câmara de CO_2 . Todos os procedimentos realizados nesse trabalho foram submetidos ao Comitê de Ética local e aprovados. (CEUA/FCF/CAR nº 25/2012).

3.3. Manutenção das células tumorais LM3

As células tumorais da Linhagem LM3 foram mantidas em meio MEM-C. Os repiques foram feitos três vezes por semana. No momento da análise, a concentração celular foi ajustada à 5×10^4 células/mL em meio apropriado conforme descrito anteriormente.

3.4. Obtenção das células do exsudato peritoneal

Os animais foram previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de tioglicolato de sódio (Difco Lab. Ltda) a 3,0%. A pele da região abdominal foi retirada com pinças e tesoura, assepticamente, em câmara de fluxo laminar Classe 100, deixando o peritônio exposto. Posteriormente, foram inoculados 5,0 mL de solução PBS gelado com pH 7,2 na cavidade abdominal. O líquido peritoneal resultante foi coletado e transferido para um tubo tipo Falcon estéril, com capacidade de 15,0 mL (Corning, Inc.) e centrifugado a 200 xg durante 10 minutos a 4°C (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.). O sedimento celular lavado duas vezes com 3,0 mL de PBS. Após a última lavagem as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640-C, conforme descrito no item 3.1, de modo a se obter uma suspensão celular ajustada à concentração de 5×10^6 células que, após 60 minutos de aderência, foi usada para a realização dos testes propostos. O procedimento do

tioglicolato foi realizado três dias antes dos animais serem eutanasiados em câmara de CO₂.

3.5. Avaliação da viabilidade celular de células peritoneais aderentes

As suspensões de células do exsudato peritoneal (PEC) foram distribuídas em placa de cultura de tecidos de 96 poços de fundo plano (Corning, Inc.) na presença dos compostos, da cisplatina, LPS (lipopolissacarídeo obtido de *Escherichia coli*, Sigma-Aldrich) a 10 e 5 µg/mL e controle negativo (RPMI-1640C), em duplicata. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ (Forma Scientific). A seguir, os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio) (Across Organics) a 1 mg/mL em RPMI-1640-C (MOSMANN, 1983).

A placa foi então incubada por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores e foi utilizado isopropanol para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da absorvância foi feita em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems) em 540 nm com filtro de referência de 620 nm. A viabilidade celular foi calculada como porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade.

3.6. Avaliação da viabilidade celular de células tumorais, LM3

As células tumorais LM3 foram distribuídas em placa de cultura de tecidos de 96 poços (Corning, Inc.) de fundo plano, uma placa ficou 24 horas somente para aderência das células, após esse período o sobrenadante foi descartado e foi então incubada por mais três horas e o isopropanol foi utilizado para solubilizar os cristais de formazana, logo em seguida foi feita a leitura, essa placa não recebeu tratamento, sendo chamada de tempo zero. A outra placa ficou incubada por 24 horas para aderência como o procedimento anterior. Após descartado o sobrenadante, as células aderentes foram tratadas na presença dos compostos de paládio(II) em triplicatas, da cisplatina, dos controles positivos (LPS a 10 e 5 µg/mL, e acetato de forbol miristato - PMA, Sigma-Aldrich - a 20 e 5 ng/mL) e controle negativo (MEM), em duplicata. As duas placas foram incubadas nas mesmas condições, porém a tratada pelos compostos, chamada de tempo 24 horas, ficou

incubada por mais 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ (Forma Scientific) e a seguir o sobrenadante foi descartado e as células aderentes tratadas com solução de MTT (Across Organics) a 1 mg/mL em RPMI-1640-C (MOSMANN, 1983).

A placa foi então incubada por mais três horas nas mesmas condições anteriores e isopropanol foi utilizado para solubilizar os cristais de formazana. A leitura da absorvância foi feita em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems) em 540 nm com filtro de referência de 620 nm. Esse procedimento tempo zero, sem tratamento e tempo 24 horas com tratamento, possibilitou a comparação do controle negativo tempo zero e controle negativo tempo 24 horas, correlacionados a viabilidade celular, que foi calculada como porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade e os dados tratados no programa computacional Excel for Windows. Esse procedimento metodológico possibilitou a visualização dos efeitos citotóxicos e citostáticos. (SANAMBAR SADIGHI *et al.*, 2014).

3.7. Obtenção do sobrenadante e condições de cultura dos macrófagos

Os macrófagos foram obtidos do exsudato peritoneal foram distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 poços. A cada poço foi adicionado 1,0 mL dessa suspensão celular a 5×10^6 células/mL e as placas foram incubadas a 37°C por 60 min em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Thermo Electron Hepa Class 100). Após a incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagens com o meio de cultura RPMI-1640-C. Aos macrófagos que ficaram aderidos à placa foram adicionados 1,0 mL de RPMI-1640-C como controle negativo e ainda: 1,0 mL de LPS (lipopolissacarídeo obtido de *E. coli*, Sigma-Aldrich) a 10 µg/mL, como controle positivo, em outro poço a cisplatina e aos demais poços foram adicionados os compostos de paládio(II) de **1** a **7**, em poços separados. A concentração escolhida para o sobrenadante foi estabelecida nos resultados prévios do MTT, sobre cada composto, os mesmos valores foram seguidos devido à viabilidade celular. Sendo assim, foi escolhida a maior concentração de cada composto com a maior viabilidade celular. As placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ (Thermo Electron Hepa Class 100) por 24 h. Após esta incubação, os sobrenadantes obtidos das placas de

culturas foram centrifugados a 4°C, durante 10 minutos a 14000 xg e estocados em freezer a -80°C até o momento da determinação dos mediadores.

3.8. Obtenção do sobrenadante e condições de cultura das células tumorais

As células tumorais foram distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 poços. A cada poço foi adicionado 1,0 mL da suspensão celular a 5×10^4 células/mL, em meio de cultura MEM para a linhagem LM3, e as placas incubadas a 37°C por 24 horas em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ (Thermo Electron Hepa Class 100). Após esta incubação, o meio de cultura foi descartado e foram adicionados 1,0 mL dos compostos de paládio(II), 1,0 mL da cisplatina, 1,0 mL de LPS (lipopolissacarídeo obtido de *E. coli*, Sigma-Aldrich) a 10 µg/mL e 1,0 mL de PMA, Sigma-Aldrich) a 20 ng/mL como controles positivos em poços separados e controle negativo com o meio de cultura MEM-C. Estas placas foram novamente incubadas a 37 °C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ (Thermo Electron Hepa Class 100) por 24 h. Após este período os sobrenadantes obtidos foram centrifugados a 4 °C, durante 10 minutos a 35060 xg e estocados em freezer a -80 °C até o momento da determinação dos mediadores. As concentrações estabelecidas foram às mesmas usadas para macrófagos, conforme descrito anteriormente no item 3.7.

3.9. Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico foi quantificado pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de macrófagos através do Reagente de Griess (Green *et al.*, 1982). Alíquotas de 50 µL dos sobrenadantes das culturas de células do exsudato peritoneal foram transferidas para nova placa de cultura de 96 poços de fundo plano (Corning, Inc.), acrescidas de igual volume do Reagente de Griess e então incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e mantidas em ambiente sem luz. A leitura da absorvância foi feita em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems) em 540 nm. As concentrações de NO liberado no sobrenadante das culturas celulares foram calculadas a partir da curva padrão, previamente estabelecida.

3.10. Determinação de mediadores nos sobrenadantes das culturas

Os mediadores TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-10 foram quantificados no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais, enquanto que o mediador VEGF foi quantificado tanto no sobrenadante das culturas de macrófagos peritoneais como no sobrenadante das culturas de células tumorais – LM3, através do teste imunoenzimático ELISA. Foram utilizados kits da BD *Biosciences Pharmingen* de acordo com as instruções do fabricante.

A absorvância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems), e as concentrações de cada citocina foram quantificadas através de curvas padrão estabelecidas com quantidades conhecidas dos padrões das citocinas. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.11. Análise de apoptose por citometria de fluxo por meio de Annexin-V-FITC/PI

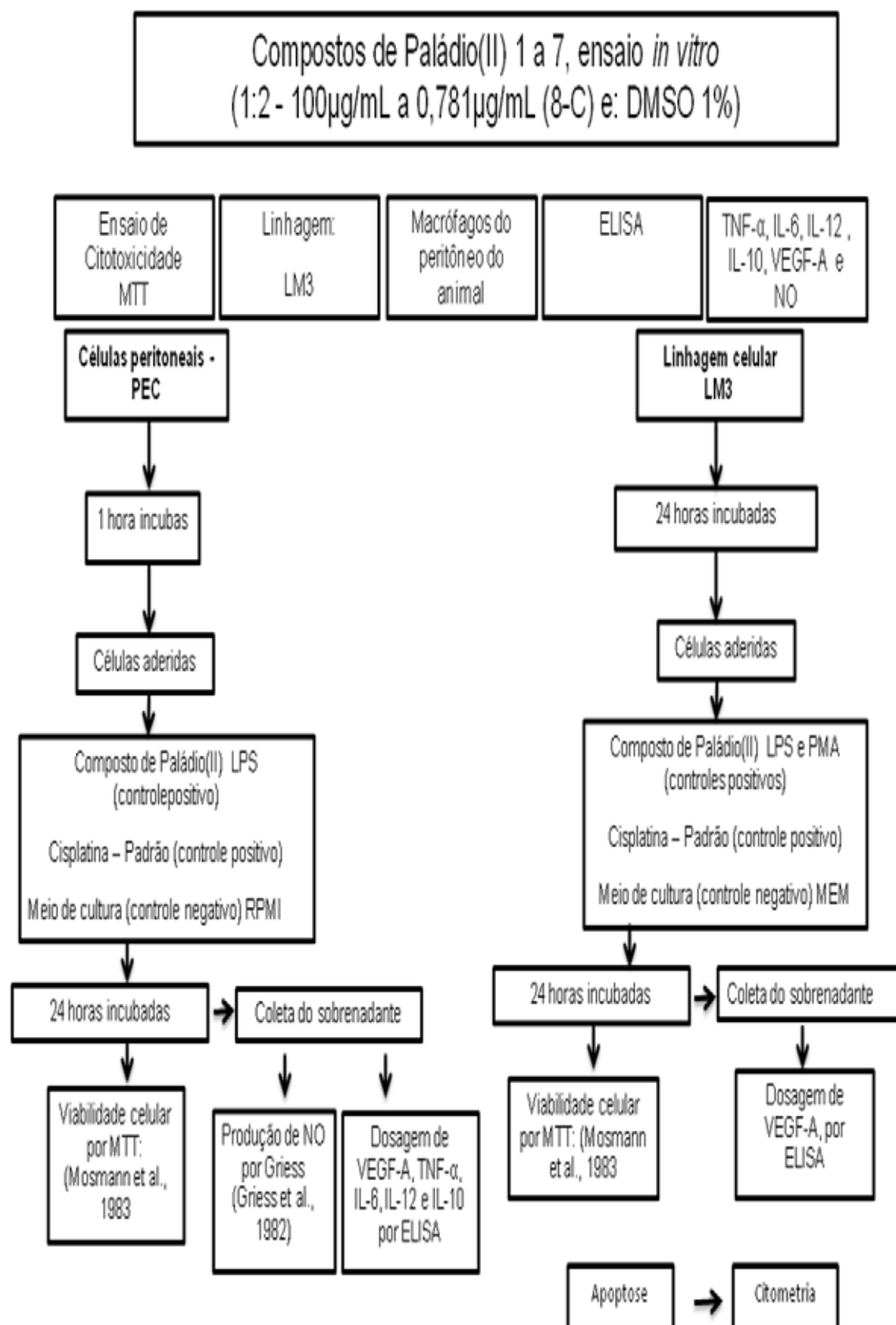
A linhagem celular LM3 (1×10^6 céls/mL) foi distribuída em placa de cultura de 24 poços. O teste foi realizado através do kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, Pharmingen, San Jose, CA) no período de 24 horas. Após 24 horas de contato com os eluídos dos cimentos, as células foram lavadas e coletadas dos poços da placa de cultura com um detergente não enzimático (*Cell dissociation buffer*- Gibco/Life Technologies), resuspendidas em tampão *Binding Buffer* 1X (0.1M Hepes/NaOH; 1.4M NaCl; 25mM CaCl₂ – pH: 7.4) e coradas com os marcadores para apoptose: FITC Annexin V e/ou PI (*Propidium Iodide Staining Solution*- 50 μ g/mL), além dos controles não marcados e controle positivo (Peróxido de Hidrogênio 3%). Os tubos *Eppendorf*® foram incubados por 15 minutos fora da luz e adicionados mais 400 μ L de *Binding Buffer* 1X em cada amostra. Os resultados e as análises foram realizados em Citômetro de fluxo (BD FACS Verse 4C) de acordo com os parâmetros do kit: Células viáveis (FITC-/ PI-); Células em apoptose inicial (FITC+/ PI-); Células em apoptose final (FITC+/ PI+); Necrose celular. A suspensão celular obtida foi submetida à marcação com anexina V e iodeto de propídeo (PI) de acordo com instruções do fabricante. As células foram transferidas para tubos de citometria contendo 100 μ L de tampão de ligação de anexina V. Em seguida, a suspensão foi adicionada de 5 μ L de anexina V e PI e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro. Logo após, foram acrescentados mais 150 μ L

de tampão de ligação a cada tubo e os mesmos foram lidos em citômetro de fluxo para um total de 10.000 eventos/teste. Depois de obtidos, os dados foram submetidos ao testes estatísticos ANOVA e pós-teste de *Tukey*. Como se trata de resultados preliminares o teste foi a "2-way ANOVA" com comparações múltiplas corrigidas por Sidak. (HUERTA et al., 2007).

3.12. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se um método de análise ANOVA, seguido pelo teste *t*-Student na versão de comparações múltiplas com correção de Tukey-Kramer, para avaliar a diferença significativa entre pares. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o programa GraphPad Prism InStat 6.01 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, Estados Unidos).

3.13. Fluxograma das atividades desenvolvidas



4. Resultados

4.1. Avaliação da viabilidade de macrófagos peritoneais e células tumorais LM3 pela técnica de MTT (MOSSMAN, 1983).

A viabilidade das linhagens celulares foi analisada e os resultados obtidos foram determinados de acordo com cada concentração pré-estabelecida.

4.1.2. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-Cl})]_2$ (**1**).

Os resultados iniciais deste estudo indicaram uma diferença estatística entre os macrófagos e a linhagem celular LM3, quando o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-Cl})]_2$ (**1**) foi testado na diluição menos concentrada (0,78125 $\mu\text{g/mL}$), demonstrando maior viabilidade celular para a linhagem celular LM3 (Figura 7).

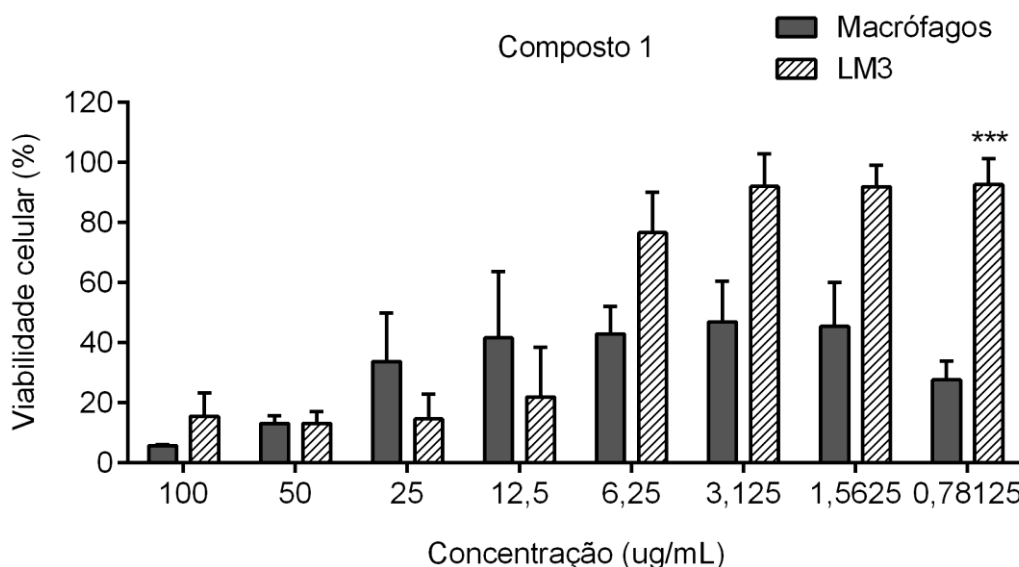


Figura 7. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-Cl})]_2$ (**1**). As barras representam a porcentagem da viabilidade celular nas concentrações especificadas. As diferenças estatísticas são relativas à diferença entre os macrófagos e a linhagem celular LM3 em cada concentração. *** $p < 0,001$.

4.1.3. Avaliação da viabilidade e dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-N}_3)]_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**2**)

Os macrófagos tratados com o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-N}_3)]_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**2**) apresentaram melhor viabilidade nas concentrações mais elevadas, porém sem diferença estatística. E a partir de concentrações menores que 6,25 $\mu\text{g/mL}$ a viabilidade celular foi maior para a linhagem LM3 com diferença estatística quando comparada aos macrófagos (Figura 8).

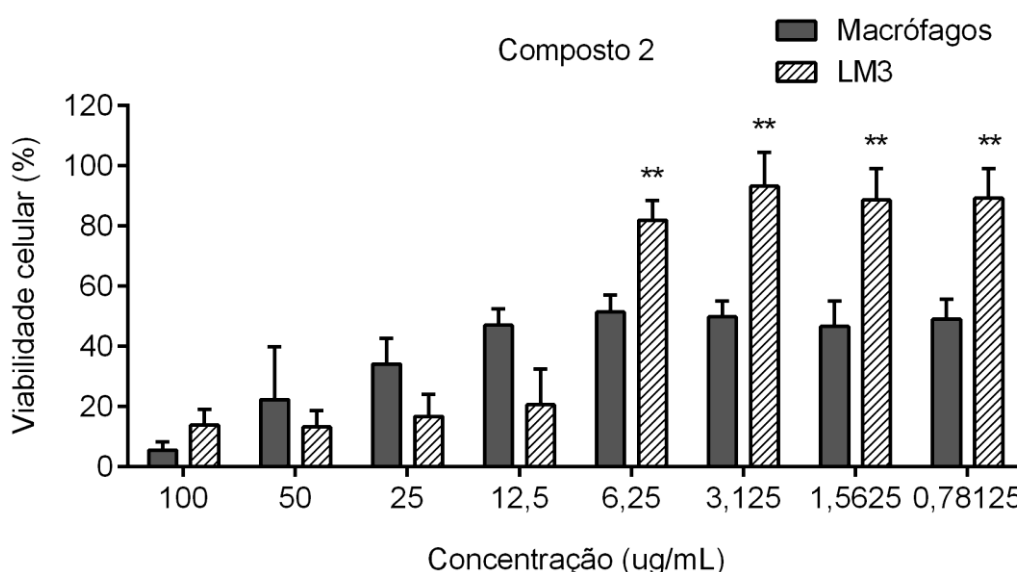


Figura 8. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-N}_3)]_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**2**). As barras representam a porcentagem da viabilidade celular nas concentrações especificadas. As diferenças estatísticas representadas são relativas à diferença entre os macrófagos e a linhagem celular LM3 em cada concentração. ** $p < 0,01$.

Analisando os dados obtidos, podemos inferir que ao contrário do composto **1**, que contém cloro (Cl), o composto **2** contém o ligante aniônico azida (NNN), atuando como ponte entre dois paládios. Essa diferença estrutural, em relação a **1**, demonstra uma atuação biológica de **2** relativamente distinta atuando no composto **1**, tanto contra as células tumorais LM3 como sobre os macrófagos.

4.1.4. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto Pd(dmba)(μ -NCO)]₂ (3).

Os macrófagos tratados com o composto Pd(dmba)(μ -NCO)]₂ **3** apresentaram viabilidade celular próxima ou igual a 100% nas concentrações de 50 a 0,78125 μ g/mL com diferença estatística quando comparada a linhagem celular LM3 até a concentração de 1,5625 μ g/mL. Além disso, a concentração de 25 μ g/mL apresentou 100% de viabilidade dos macrófagos e uma seletividade elevada frente à linhagem LM3, com aproximadamente 80% de morte celular (Figura 9).

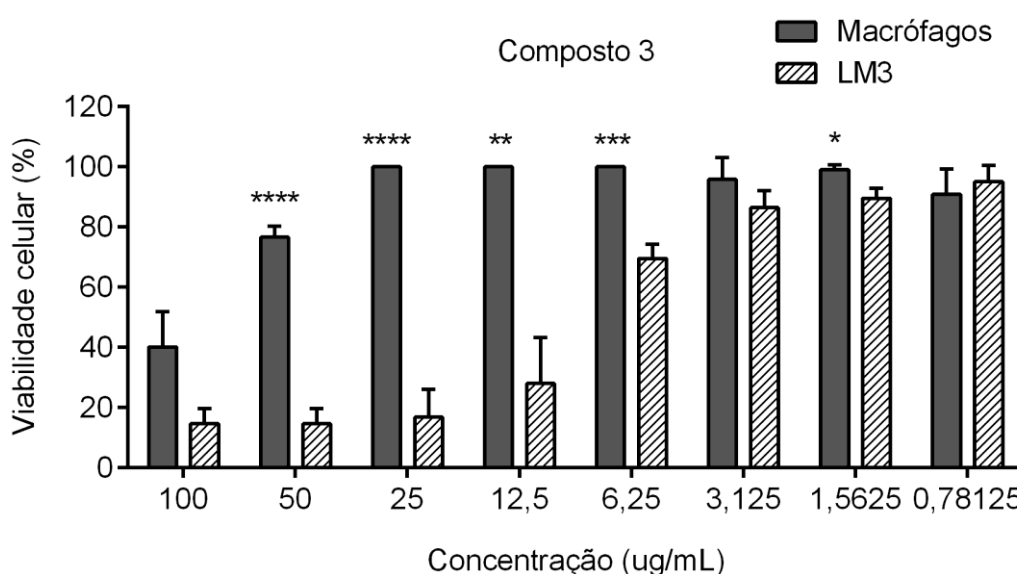


Figura 9. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto Pd(dmba)(μ -NCO)]₂ (**3**). As barras representam a porcentagem da viabilidade celular nas concentrações especificadas. As diferenças estatísticas representadas são relativas à diferença entre os macrófagos e a linhagem celular LM3 em cada concentração. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

O composto **3** contém o ligante aniônico cianato (NCO). Os resultados obtidos demonstram que ele atua como ponte entre dois paládios, apresentando um perfil de atividade biológica muito diferente dos outros compostos testados. Foi possível observar sua seletividade frente à linhagem celular LM3, possivelmente associada ao grupo NCO presente em sua estrutura.

4.1.5. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto Pd(dmiba)Cl(isn)] (4).

Os macrófagos tratados com o composto Pd(dmiba)Cl(isn)] (4) apresentaram diferença estatística quando comparados com a linhagem celular LM3 nas concentrações de 25 a 6,25 µg/mL. Este composto apresentou um melhor resultado na concentração 12,5 µg/mL com 100% de viabilidade dos macrófagos e elevada seletividade contra a linhagem celular LM3 (Figura 10).

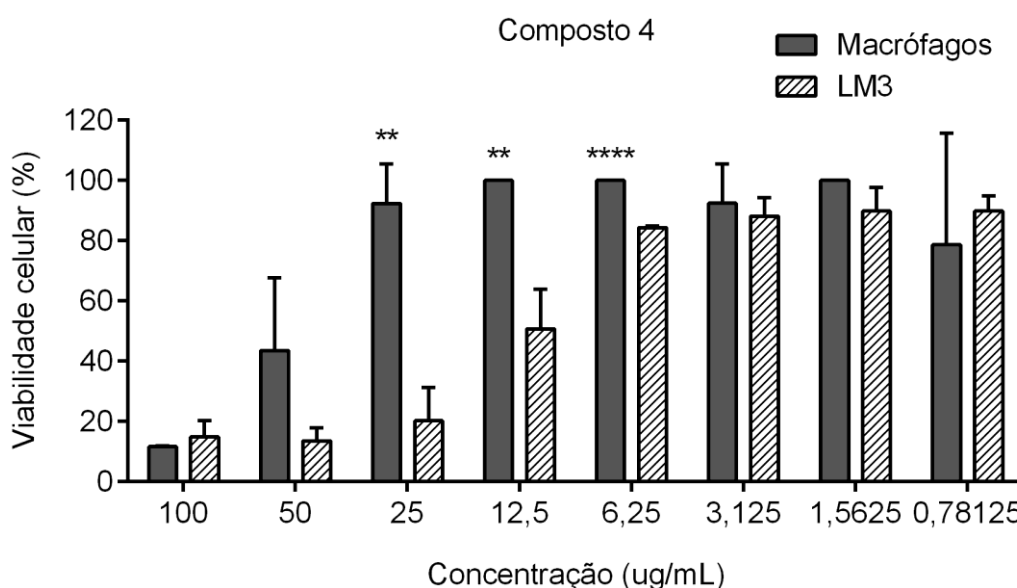


Figura 10. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto Pd(dmiba)Cl(isn)] (4). As barras representam a porcentagem da viabilidade celular nas concentrações especificadas. As diferenças estatísticas representadas são relativas à diferença entre os macrófagos e a linhagem celular LM3 em cada concentração. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Apesar de conter o ligante aniônico cloro (Cl), também presente no composto 1, o composto 4 possui uma estrutura mononuclear, ou seja, contendo apenas um paládio. Tal fato, associado à presença do ligante isonicotinamida (ISN), atribuiu em uma atividade bem distinta dos demais compostos. Isso explicaria o motivo de observarmos uma alta viabilidade dos macrófagos na maioria das concentrações usadas.

4.1.6. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto [Pd(dmba)(N₃)(isn)] (5).

No estudo do composto [Pd(dmba)(N₃)(isn)] **5**, houve maior viabilidade dos macrófagos nas concentrações mais elevadas (100 a 25 µg/mL), quando comparadas com a linhagem LM3, sendo que apenas a concentração de 25 µg/mL resultou em diferença estatística. Nas concentrações entre 3,125 e 1,5625 µg/mL a linhagem celular LM3 apresentou maior viabilidade quando comparada, nas mesmas concentrações, com os macrófagos, que apresentaram diferença estatística (Figura 11).

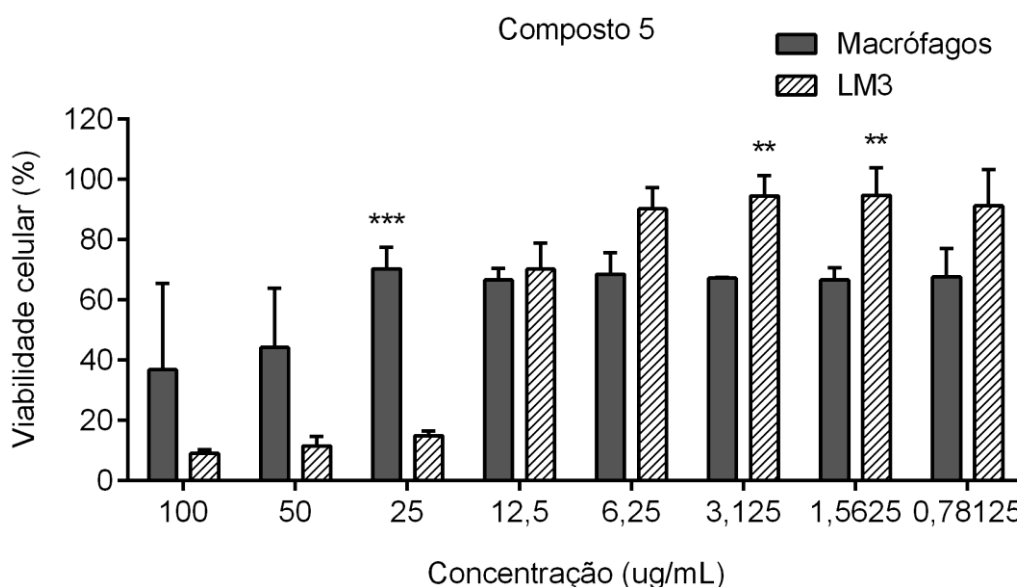


Figura 11. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto [Pd(dmba)(N₃)(isn)] (**5**). As barras representam a porcentagem da viabilidade celular nas concentrações especificadas. As diferenças estatísticas representadas são relativas à diferença entre os macrófagos e a linhagem celular LM3 em cada concentração. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

A análise dos resultados demonstrou que o composto **5** se assemelha ao composto **4**, devido ao fato de conter um paládio(II) na estrutura. Contudo este possui um ligante azida no lugar do cloro. Por sua vez, o composto **5**, quando comparado ao composto **4**, demonstrou-se mais seletivo à linhagem LM3 nas concentrações de 100 a 25 µg/mL, além de mostrar-se mais tóxico frente aos

macrófagos, não apresentou 100% de viabilidade, como o composto **4** apresenta em determinadas concentrações. .

4.1.7. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto do [Pd(dmba)(NCO)(isn)] (**6**).

A avaliação do composto [Pd(dmba)(NCO)(isn)] (**6**), resultou uma diferença estatística entre os macrófagos e a linhagem celular LM3 nas concentrações de 100 a 25 µg/mL, sendo esta última concentração a melhor para se manter a viabilidade dos macrófagos, embora tenha induzido baixo índice de morte e/ ou inibição celular dos macrófagos (Figura 12).

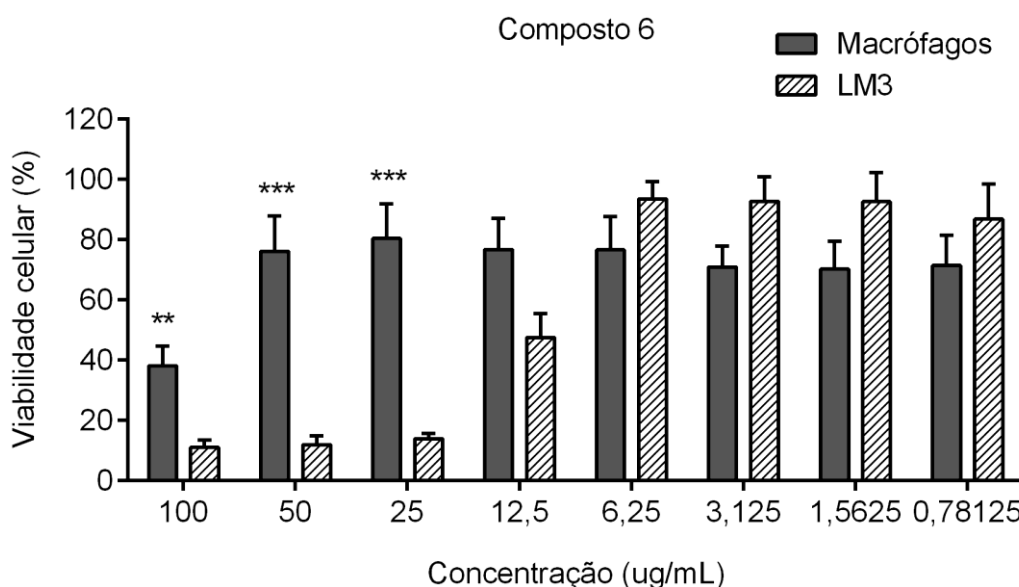


Figura 12. Avaliação da viabilidade e dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto do [Pd(dmba)(NCO)(isn)] (**6**). As barras representam a porcentagem da viabilidade celular nas concentrações especificadas. As diferenças estatísticas representadas são relativas à diferença entre os macrófagos e a linhagem celular LM3 em cada concentração. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

O composto **6** apresentou uma ação biológica muito semelhante ao composto **5**, porém este contém o grupo cianato no lugar da azida. Mesmo com a grande similaridade das atividades entre estes dois últimos compostos, fica evidente, comparando-se os compostos **4**, **5** e **6**, que a troca dos ligantes gera, para cada substância organometálica testada, uma capacidade maior ou menor de ação, seja contra as células tumorais, ou frente aos macrófagos.

Tais diferenças foram aprofundadas nos aspectos químico-estruturais em função das atividades dos seis compostos aqui tratados no item: **5. Discussão**.

4.1.8. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto [Pd(C-dmba)(NCS)(dppp)] (7).

Para o composto [Pd(C-dmba)(NCS)(dppp)] (7), todas as concentrações resultaram em diferenças estatísticas entre os macrófagos e a linhagem celular LM3, exceto na concentração 0,78125 µg/mL. Embora tenha mostrado maior viabilidade dos macrófagos, estes tiveram uma grande porcentagem de morte e/ ou inibição celular (Figura 13). Os resultados sugerem que quando comparado aos demais compostos apresentados neste trabalho, frente aos macrófagos e à linhagem celular tumoral LM3, o composto **7** é mais citotóxico.

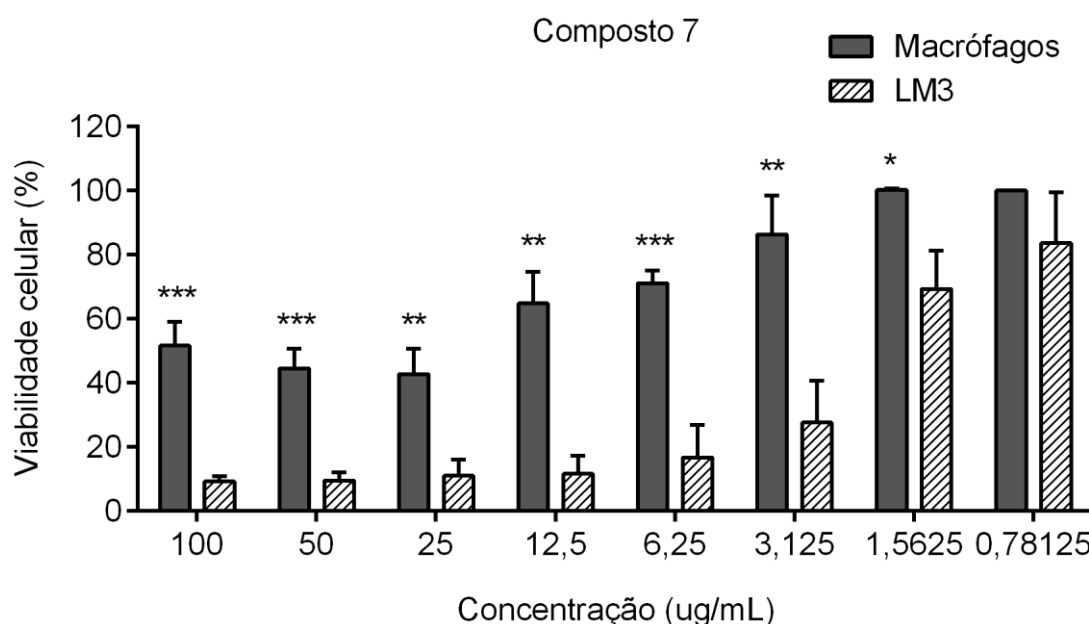


Figura 13. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto [Pd(C-dmba)(NCS)(dppp)] (7). As barras representam a porcentagem da viabilidade celular nas concentrações especificadas. As diferenças estatísticas representadas são relativas à diferença entre os macrófagos e a linhagem celular LM3 em cada concentração. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

O composto **7**, ao contrário dos demais, possui diferenças moleculares significativas que não proporcionam uma comparação em função da estrutura-atividade com os seis compostos utilizados neste estudo.

Rocha e colaboradores (2007) demonstraram que ele possui forte ação antitumoral e mais seletividade contra a linhagem LM3, contudo, sugere-se que é relativamente mais tóxico aos macrófagos. Apesar de possuir alta estabilidade, mantendo a estrutura preservada em solução por conta do ligante DPPP (difosfínico), que atua como quelante, essa característica não o torna o composto mais eficiente neste trabalho, em termos de citotoxicidade e seletividade. Contudo, como há um histórico do composto **7** em ensaios *ex vivo*, atestando sua capacidade antitumoral melhor que a cisplatina, fez-se necessário, um aprofundamento nos estudos correlacionados ao perfil imunológico deste composto.

4.2. Avaliação da atividade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com a cisplatina.

Com a finalidade de comparar os compostos de paládio(II) utilizados neste estudo, além de um padrão antitumoral, foi empregado nos ensaios contra a linhagem celular LM3 e nos macrófagos peritoneais a cisplatina, que se trata de um composto inorgânico que apresenta, de certo modo, proximidade molecular com os compostos de Pd(II), uma vez que a platina(II) apresenta geometria de coordenação quadrática-planar, assim como os compostos deste trabalho.

Os dados resultantes desta comparação mostraram que a cisplatina foi mais seletiva para os macrófagos quando comparada a linhagem celular LM3, exceto nas concentrações de 100 e 50 µg/mL, porém com alta toxicidade para ambas as linhagens em todas as concentrações, além de observarmos que não houve diferença estatística (Figura 14).

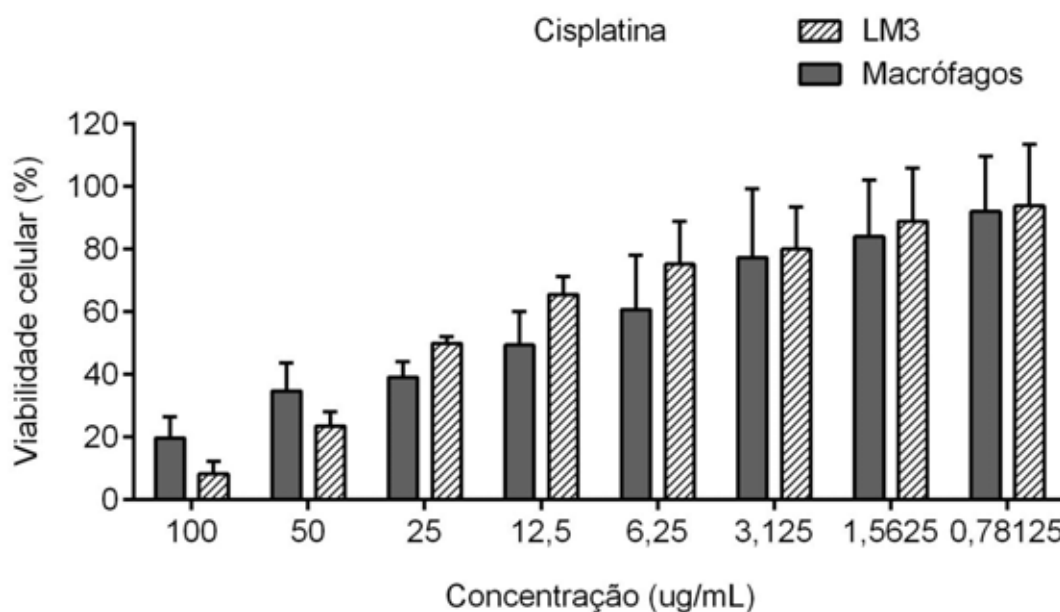


Figura 14. Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com a cisplatina. As barras representam a porcentagem da viabilidade celular nas concentrações especificadas. Não houve diferença estatística significativa.

4.3. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-NCO})]_2$ (**3**) e com a cisplatina.

Dentre os compostos avaliados neste estudo, um dos mais seletivos contra a linhagem LM3 foi o composto **3**. Para dimensionarmos uma comparação dos dados do composto **3** e os dados da cisplatina, os gráficos foram agrupados: comparação do composto **3** com macrófagos, macrófagos com cisplatina, composto **3** com a linhagem celular LM3 e cisplatina com linhagem celular LM3 (Figura 15).

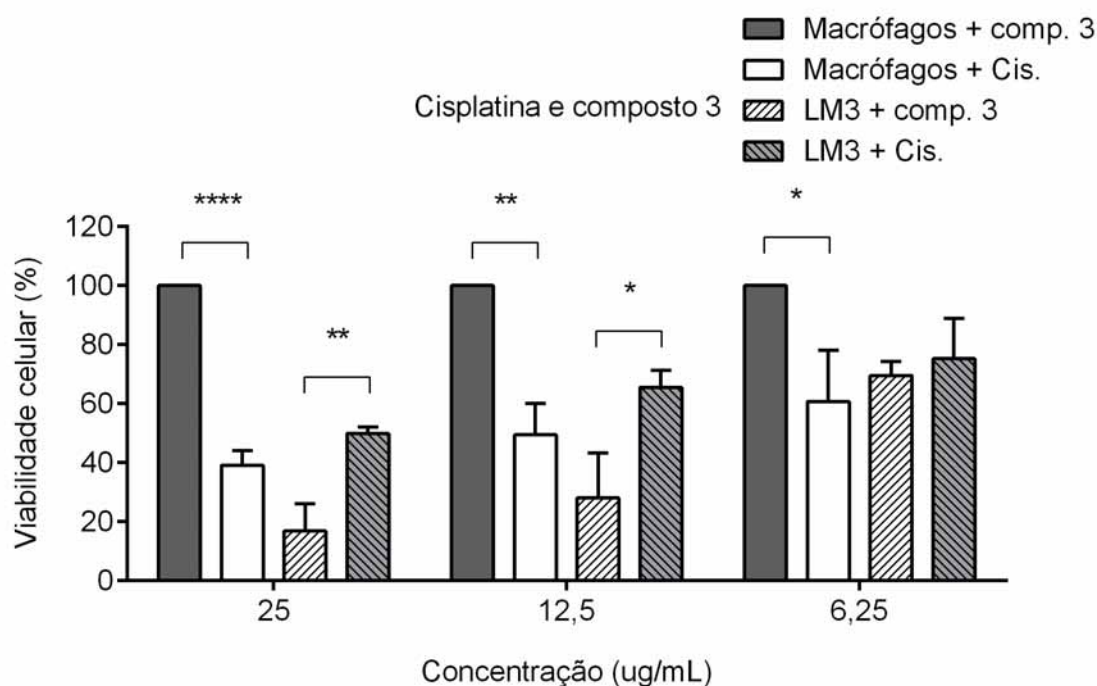


Figura 15. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-NCO})]_2$ (**3**) e com a cisplatina. As barras representam a porcentagem da viabilidade celular nas concentrações especificadas. A significância estatística representada é relativa à diferença entre os macrófagos cultivados na presença do composto **3** e da cisplatina, em cada concentração, da linhagem celular LM3 cultivadas na presença do composto **3** e da cisplatina. **** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Os resultados mostraram que macrófagos tratados com o composto **3** apresentaram viabilidade celular igual a 100% em todas as concentrações testadas, com diferença estatística quando comparado ao resultado de macrófagos com a cisplatina. A comparação de viabilidade entre o composto **3** e a cisplatina, demonstrou que a cisplatina é mais seletiva para os macrófagos e menos para a linhagem LM3. O composto **3** é mais seletivo para a linhagem celular LM3, quando comparado a cisplatina e LM3, apresentando diferença significativa nas concentrações 25 e 12,5 µg/mL.

4.4. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto [Pd(dmba)Cl(isn)] (4) e com a cisplatina.

Os macrófagos tratados com o composto **4** apresentaram diferença estatística quando comparados com os macrófagos tratados pela cisplatina na concentração 25 a 6,25 µg/mL. Este composto apresentou um melhor resultado na concentração 12,5 µg/mL com 100% de viabilidade dos macrófagos e elevada citotoxicidade e/ ou inibição quando tratados pela cisplatina. Portanto, a cisplatina mostrou-se mais tóxica para os macrófagos quando comparada ao composto **4** em todas as concentrações (Figura 16). A linhagem celular LM3 aparentou semelhança na viabilidade quando tratada com o composto **4** e com a cisplatina nas concentrações de 12,5 e 6,25 µg/mL. Um dado interessante deve ser ressaltado, quando analisados os resultados da concentração 25 µg/mL, onde se observou uma diferença significativa na linhagem celular LM3 com o composto **4**, quando comparada a linhagem celular com a cisplatina, indicando seletividade para o tratamento da linhagem LM3 com o composto.

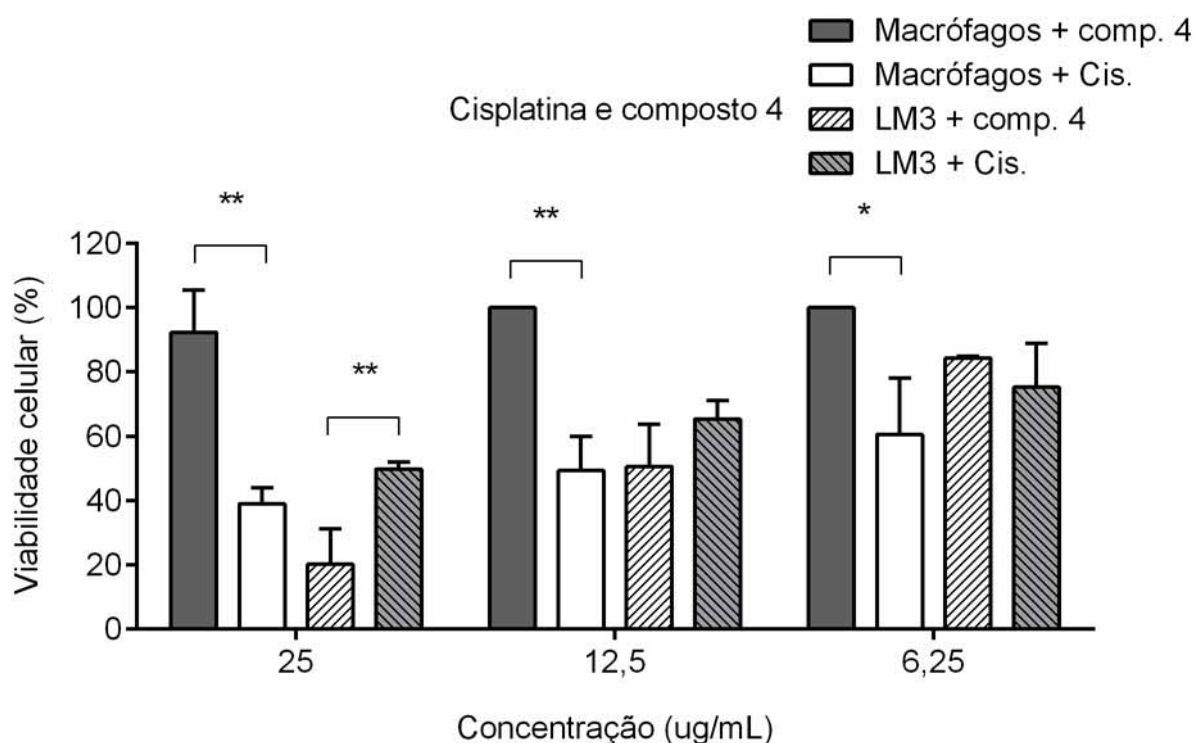


Figura 16. Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos e da linhagem celular LM3 tratados com o composto [Pd(dmba)Cl(isn)] (**4**) e com a cisplatina. As barras representam a porcentagem da viabilidade celular nas concentrações de 25, 12,5 e 6,25 µg/mL. As diferenças estatísticas representadas são relativas aos macrófagos cultivados na presença do composto **4** e da cisplatina, em cada concentração e da linhagem celular LM3 cultivada na presença do composto **4** e da cisplatina** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

4.5. Teste de viabilidade celular dos macrófagos por MTT e teste produção/inibição do NO com os compostos Pd(dmba)(µ-NCO)]₂ (**3**), Pd(dmba)Cl(isn)] (**4**) e cisplatina.

O teste do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formam-se, intracelularmente, cristais azuis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria UV/visível. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico.

Foram realizados testes de viabilidade celular por MTT com macrófagos para os compostos **3** (Figura 17 B), **4** (Figura 18 B) e com a cisplatina (Figura 19 B). Como comparativo, o MTT foi realizado com controle positivo adicionado a todas as

concentrações testadas. Além disso, foi realizado o teste de produção/inibição de NO, com os compostos **3** (Figura 17 A), **4** (Figura 18 A) e cisplatina (Figura 19 A) nas concentrações de 25 a 0,78 µg/mL. Foram tomados como base os valores das concentrações dos resultados dos compostos que apresentavam em média 100% de viabilidade celular, objetivando verificar se os compostos produziram ou inibiram NO.

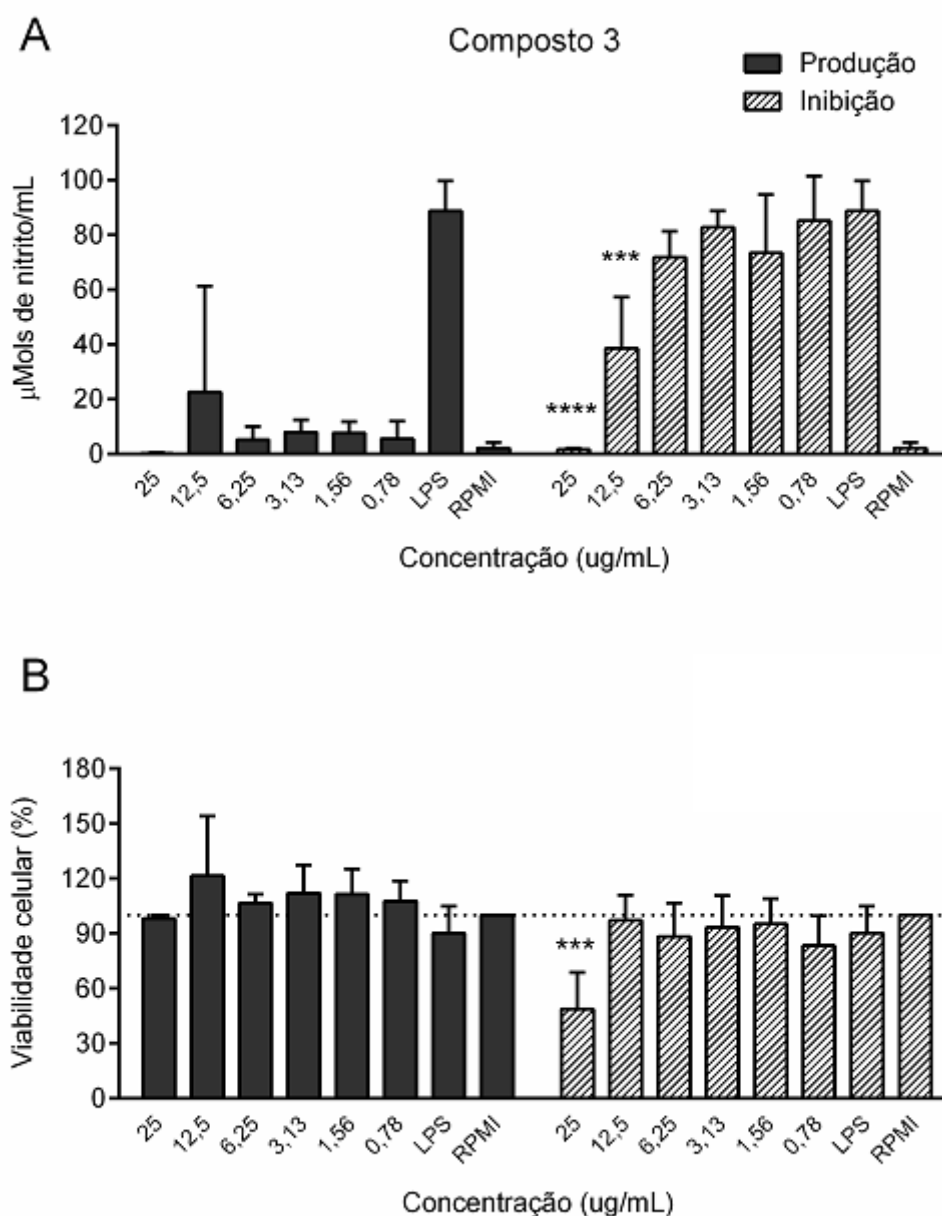


Figura 17. (A) Ensaio de produção / inibição de NO com o composto **3**. As colunas em preto representam a produção de NO e as colunas hachuradas (em cinza) representam a inibição do NO nas diferentes concentrações. **(B)** Viabilidade dos macrófagos em contato com o composto **3**, avaliada pelo teste do MTT. As colunas em preto representam a porcentagem de células viáveis nas diferentes concentrações testadas do composto, além do controle positivo (LPS) e controle negativo (RPMI). As colunas hachuradas (em cinza) representam a porcentagem de células viáveis nas diferentes concentrações testadas do composto adicionado o controle positivo em todas as situações. **** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$.

Na **Figura 17 A**, estão ilustrados os valores obtidos no teste de produção de NO. Apenas na concentração 12,5 µg/mL houve produção de 20 µMols de nitrito/mL e no controle positivo houve produção, sendo que para essa situação não houve significância estatística em nenhuma das concentrações testadas. Nos resultados de inibição houve significância estatística nas concentrações 25 e 12,5 µg/mL. Nas demais concentrações e no controle positivo não houve inibição. Exceto nas primeiras concentrações, apesar de que na concentração de 25 µg/mL houve morte celular de aproximadamente 50% no MTT, foi visível nessa concentração a inibição com significância estatística acentuada. E na concentração 12,5 µg/mL houve uma inibição aproximadamente de 60%. Houve também inibição no controle negativo, o que é esperado.

No resultado do ensaio do MTT, figura B com o composto **3**, houve morte celular na concentração 25 µg/mL, apesar da morte celular, foi possível visualizar que houve inibição de NO nesta concentração pela substância. Porém na concentração 12,5 µg/mL foi possível observar o aumento na viabilidade celular em quase 100%. Portanto, na concentração 12,5 µg/mL pode-se afirmar que houve inibição de NO, no entanto, a inibição em termos de porcentagem foi menor se comparada com a concentração 25 µg/mL, que apesar de 50% de viabilidade, podemos dizer que nesta concentração teve inibição. Nossos resultados mostraram que a partir desta concentração o composto não foi citotóxico para os macrófagos, apresentando elevados de células viáveis. Não houve diferença estatística significativa no teste do MTT.

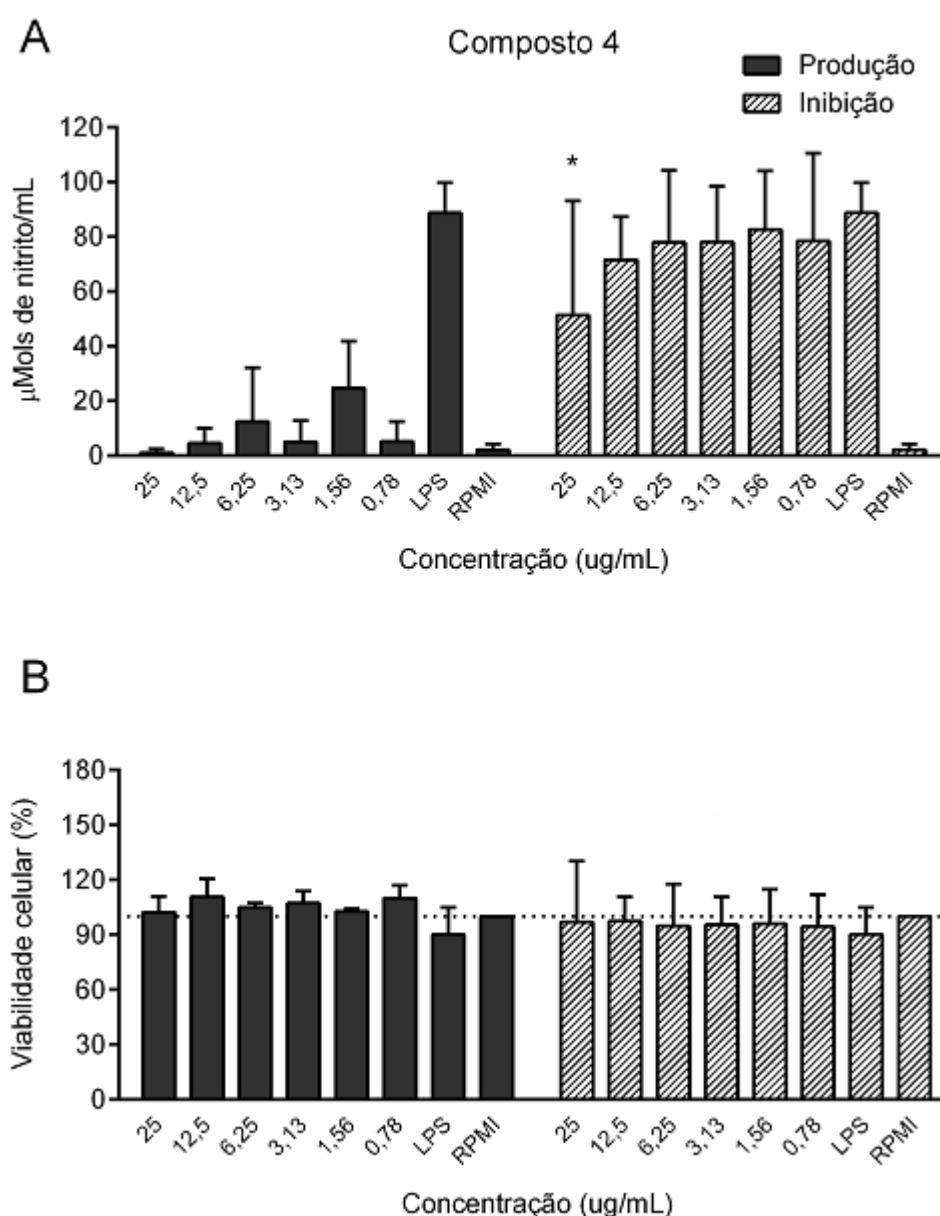


Figura 18. (A) Ensaio do efeito do composto 4 na produção / inibição de NO. As colunas em preto representam a produção de NO e as hachuradas (em cinza) representam a inibição do NO nas diferentes concentrações. **(B)** Viabilidade dos macrófagos em contato com o composto 4 avaliada pelo teste do MTT. As colunas em preto representam a porcentagem de células viáveis nas diferentes concentrações testadas do composto, além do controle positivo (LPS) e controle negativo (RPMI). As colunas hachuradas (em cinza) representam a porcentagem de células viáveis nas diferentes concentrações testadas do composto adicionado o controle positivo em todas as situações. * $p < 0,05$.

O ensaio para avaliar a produção de NO demonstrou que em contato com a substância **4**, para todas as concentrações testadas não houve significância estatística e o aumento da produção só foi observado no controle positivo. No teste de inibição houve significância estatística somente na concentração 25 µg/mL, onde a inibição foi expressiva, pois nessa concentração o composto **4** estimula a inibição. Portanto, assim como para o composto **3**, podemos inferir que o composto **4** inibe NO na concentração 25 µg/mL e não produz NO na mesma concentração.

O teste do MTT com o composto **4** demonstrou 100% de viabilidade celular em todas as concentrações testadas, porém sem significância estatística. No controle positivo (LPS) houve uma leve diminuição na viabilidade e o controle negativo manteve-se em 100%. Os resultados sugerem que a substância em questão não afetou a viabilidade celular.

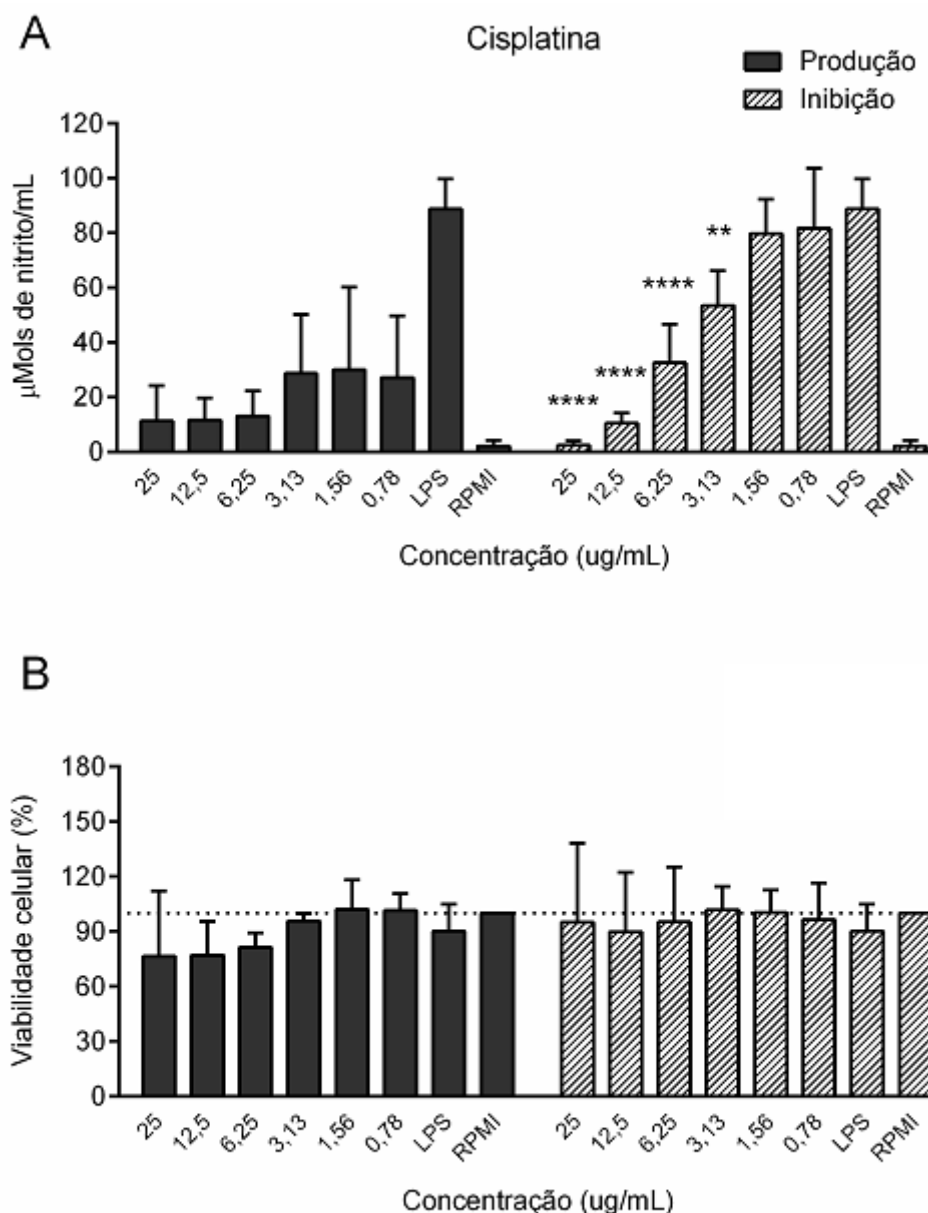


Figura 19. (A) Ensaio do efeito da cisplatina na produção / inibição de NO. As colunas em preto representam a produção de NO e as hachuradas (em cinza) representam a inibição do NO nas diferentes concentrações **(B)** Viabilidade dos macrófagos em contato com a cisplatina, avaliada pelo teste do MTT. As colunas em preto representam a porcentagem de células viáveis nas diferentes concentrações testadas com substância, além do controle positivo (LPS) e controle negativo (RPMI). As colunas hachuradas (em cinza) representam a porcentagem de células viáveis nas diferentes concentrações testadas da substancia adicionado o controle positivo em todas as situações. **** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$.

O teste do MTT realizado com a cisplatina apresentou uma diminuição na viabilidade celular para a maioria das concentrações testadas e para o controle positivo. Apenas nas menores concentrações a viabilidade ficou em 100% e para o controle negativo, demonstrando ser citotóxica em concentrações elevadas.

Os resultados do teste de produção e inibição de NO com cisplatina mostrou que nas maiores concentrações, entre 25 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$ há pouca produção de NO, porém nas concentrações mais baixas, entre 3,13 a 0,78 $\mu\text{g/mL}$ houve um aumento na produção de NO em torno de 30 μMols de nitrito/mL, sem diferenças estatísticas significativas. No teste de inibição as quatro maiores concentrações apresentaram potencial inibidor, com diferenças significativas. Nas duas situações testadas, como esperado, não houve produção de NO quando as células foram expostas somente ao meio de cultura, controle negativo (RPMI).

4.6. Avaliação do efeito citotóxico e citostático do composto $\text{Pd(dmba)(}\mu\text{NCO)}_2$ (3) e da cisplatina na linhagem celular LM3 por MTT.

Com o intuito de comparar o efeito citotóxico e citostático do composto **3** e da cisplatina nas células tumorais, foi realizado o ensaio de MTT (Figura 20).

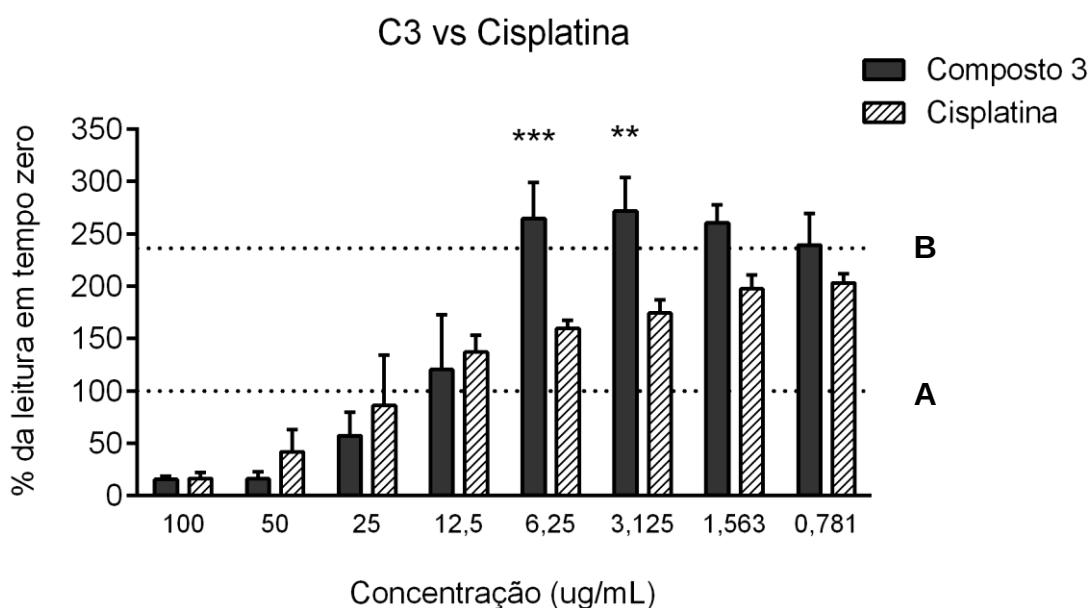


Figura 20. Avaliação do efeito citotóxico e citostático do composto $\text{Pd(dmba)(}\mu\text{-NCO)}_2$ (**3**) e da cisplatina na linhagem celular LM3 por MTT. As colunas em preto representam as atividades do composto **3** em contato com as células e as colunas hachuradas (em cinza) representam a cisplatina em contato com as células. O gráfico não apresenta controle negativo. O intervalo de 0% até **A**: efeito citotóxico. Intervalo de **A** até **B**: efeito citostático. Acima da linha **B**: proliferação celular. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Os resultados da comparação do composto **3** e da cisplatina nas maiores concentrações apresentaram efeito citotóxico, tanto com o composto, quanto com a cisplatina, porém a composto **3** mostra-se nas concentrações 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$ mais seletivo para a linhagem LM3 que a cisplatina. A partir da concentração 12,5 $\mu\text{g/mL}$ para ambos os testes houve efeito citostático, porém mais elevado com o composto **3**. Nas concentrações 6,25 a 1,563 $\mu\text{g/mL}$, foi indicado que houve proliferação celular. Enquanto no teste com a cisplatina a porcentagem manteve-se estável com efeito citostático nas concentrações 12,5 a 0,781 $\mu\text{g/mL}$. Nossos resultados mostraram que a melhor concentração do composto **3** em células tumorais foi a 25 $\mu\text{g/mL}$, tendo melhor efeito que a cisplatina na mesma concentração e onde o composto atuou com efeito citotóxico. Houve significância estatística apenas em duas concentrações do composto **3**.

O resultado abaixo trata-se do mesmo apresentado anteriormente, porém foi incluso o controle negativo de zero hora e 24 horas a fim de avaliar mais precisamente o perfil citotóxico e citostático (Figura 21).

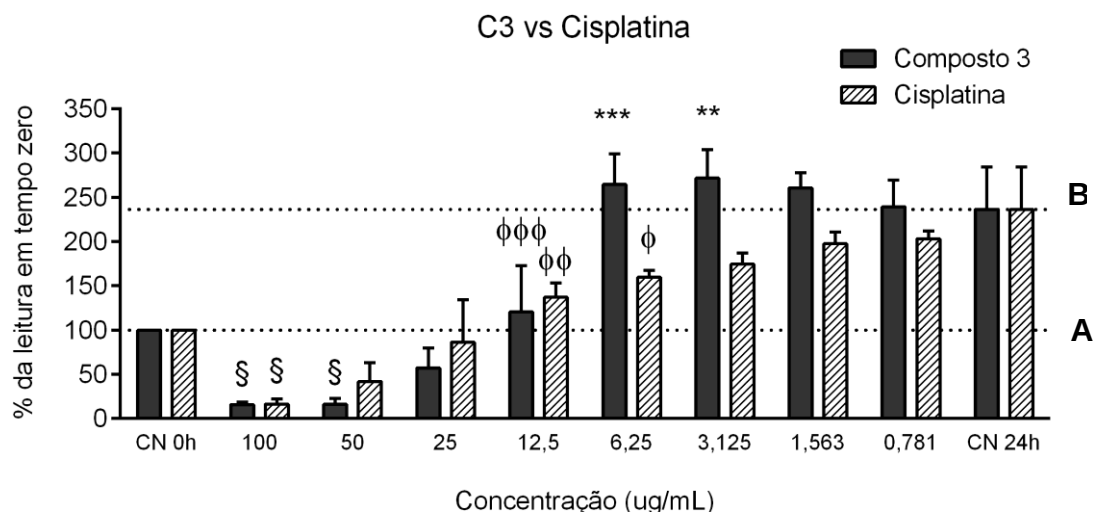


Figura 21. Avaliação da significância estatística do composto **3** e da cisplatina em comparação ao controle negativo. As colunas em preto representam o composto **3** e as colunas hachuradas (em cinza) representam a cisplatina ambas em contato com a linhagem celular LM3. Intervalo de 0% até A: efeito citotóxico. Intervalo de A até B: efeito citostático. Acima da linha B: proliferação celular. O símbolo § representa a significância estatística em relação ao controle negativo de zero hora e Φ representa a significância estatística em relação ao controle negativo de 24 horas, quando comparado o efeito do composto com a cisplatina. O número de símbolos nas colunas dos gráficos acima representam as análises estatísticas correlacionadas aos asteriscos. Mas os símbolos foram comparados com o CN e os asteriscos foram comparados compostos com cisplatina. Esse exemplo foi seguido para todos os gráficos da avaliação do efeito citotóxico e citostático dos compostos e da cisplatina na linhagem celular LM3 por MTT. Nessa figura está sendo comparado o composto **3** com a cisplatina. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Foi possível verificar, na comparação com o controle negativo zero hora que houve realmente atividade citotóxica nas concentrações mais elevadas, tanto no composto **3**, quanto na cisplatina. Porém o composto **3** mostrou-se mais eficiente. E

quando comparado o controle negativo de 24 horas, a concentração de 12,5 µg/mL apresentou significância estatística para ambas substâncias testadas. Sendo que o composto **3** apresentou mais eficiência tanto na concentração 25 µg/mL com efeito citotóxico, quanto na concentração 12,5 µg/mL com efeito citostático, quando comparado a cisplatina.

4.7. Avaliação do efeito citotóxico e citostático do composto Pd(dmba)Cl(isn)] (**4**) e da cisplatina na linhagem celular LM3 por MTT.

Com o intuito de comparar o efeito citotóxico e citostático do composto **4** e da cisplatina nas células tumorais LM3, foi realizado o ensaio de MTT em diferentes concentrações (Figura 22).

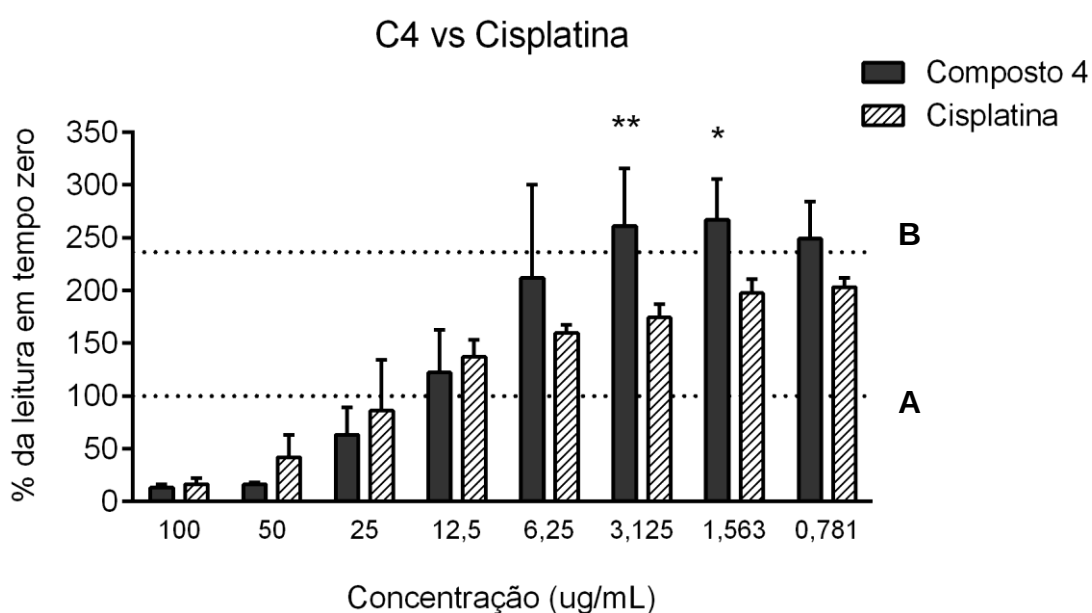


Figura 22. Avaliação do efeito citotóxico e citostático do composto Pd(dmba)Cl(isn)] (**4**) e cisplatina na linhagem celular LM3 por MTT. As colunas em preto representam a atividade do composto **4** em contato com as células e as colunas hachuradas (em cinza) representam a cisplatina em contato com as células. O gráfico não apresenta controle negativo. O intervalo de 0% até **A**: efeito citotóxico. Intervalo de **A** até **B**: efeito citostático. Acima da linha **B**: proliferação celular. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Os resultados da análise do MTT mostraram que nas concentrações mais altas (de 100 a 25 µg/mL), tanto o composto quanto a cisplatina exibiram atividade citotóxica. A partir da concentração 12,5 µg/mL, na faixa que compreende o intervalo

entre as linhas **A** e **B**, foi possível verificar uma atividade citostática para ambas substâncias testadas. Porém as três ultimas concentrações das células testadas com o composto **4** apresentaram proliferação celular.

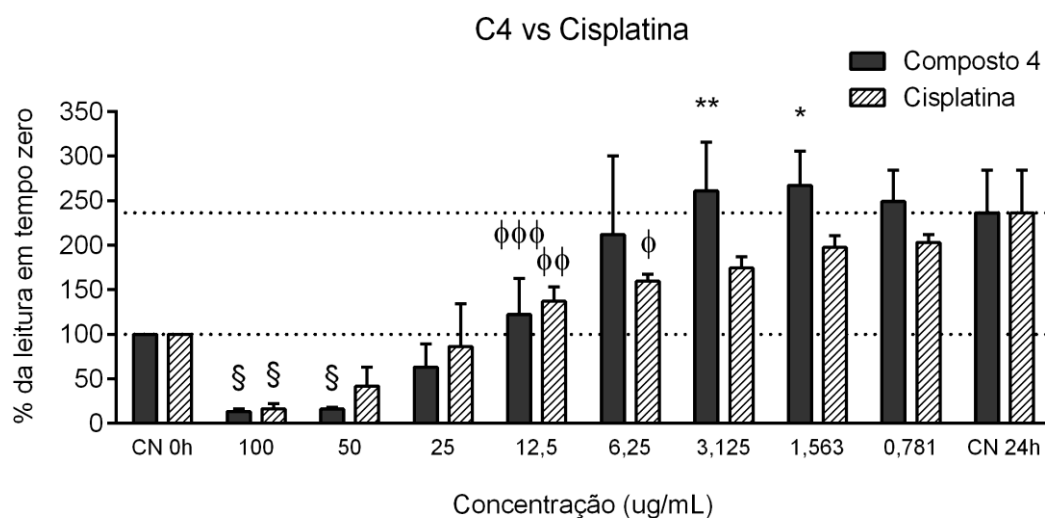


Figura 23. Avaliação da significância estatística do composto **4** e da cisplatina em comparação ao controle negativo. As colunas em preto representam o composto **4** e as colunas hachuradas (em cinza) representam a cisplatina ambas em contato com a linhagem celular LM3. Intervalo de 0% até **A**: efeito citotóxico. Intervalo de **A** até **B**: efeito citostático. Acima da linha **B**: proliferação celular. § representa a significância estatística em relação ao controle negativo de zero hora e Φ representa a significância estatística em relação ao controle negativo de 24 horas. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Assim como para o composto **3**, foi realizado o ensaio usando os controles negativos (Figura 23), para demonstrar a significância estatística entre os controles e as substancias testadas. Foi possível verificar, na comparação com o controle negativo zero hora que houve atividade citotóxica e significância estatística nas concentrações mais elevadas, similar aos resultados obtidos com o composto anterior. E quando comparado o controle negativo de 24 horas, a concentração de 12,5 µg/mL apresentou significância estatística para ambas substâncias testadas, comprovando mais uma vez a atividade citotóxica dos compostos **3** e **4** na concentração de 25 µg/mL e suas atividades citostática na concentração 12,5 25 µg/mL.

4.8. Avaliação do efeito citotóxico e citostático do composto [Pd(Cdmba)(NCS)(dppp)] (7) e da cisplatina na linhagem celular LM3 por MTT.

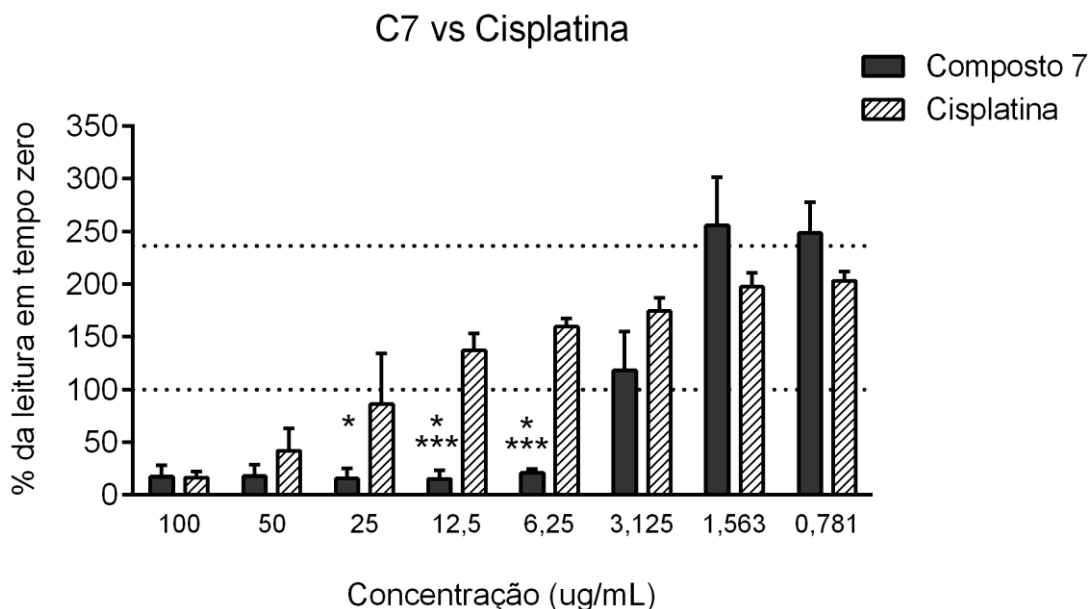


Figura 24. Avaliação do efeito citotóxico e citostático do composto [Pd(Cdmba)(NCS)(dppp)] (7) e cisplatina na linhagem celular LM3 por MTT. As colunas em preto representam as a atividade do composto 7 em contato com as células e as colunas hachuradas (em cinza) representam a cisplatina em contato com as células. O gráfico não apresenta controle negativo. O intervalo de 0% até **A**: efeito citotóxico. Intervalo de **A** até **B**: efeito citostático. Acima da linha **B**: proliferação celular. **** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$.

O composto 7 foi o que a apresentou um perfil mais diferenciado em relação aos outros compostos utilizados neste estudo. Isso pode ser mais uma vez observado nos resultados do teste do MTT que serviram para comparar o efeito citotóxico e citostático do composto e da cisplatina em contato com as células tumorais LM3 (Figura 24).

Nossos resultados mostraram que diferentemente do composto 3 e 4 o composto 7 apresentou atividade citotóxica nas cinco primeiras concentrações testadas. Na concentração 3,125 $\mu\text{g/mL}$ ele se mostrou mais citostático que a cisplatina. E assim como nos resultados anteriores foram adicionados os controles para uma melhor compreensão da significância estatística no comportamento deste

composto e da cisplatina (Figura 25). O perfil citotóxico do composto **7** apresentou significância estatística com relação ao controle zero hora nas concentrações de 100 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e para o controle negativo 24 horas apresentou significância estatística na concentração 3,125 $\mu\text{g/mL}$, por isso se faz necessário estudos adicionais com este composto. E a cisplatina não apresentou significância estatística com relação ao controle negativo zero hora, mas apresentou no controle negativo 24 horas nas concentrações 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$.

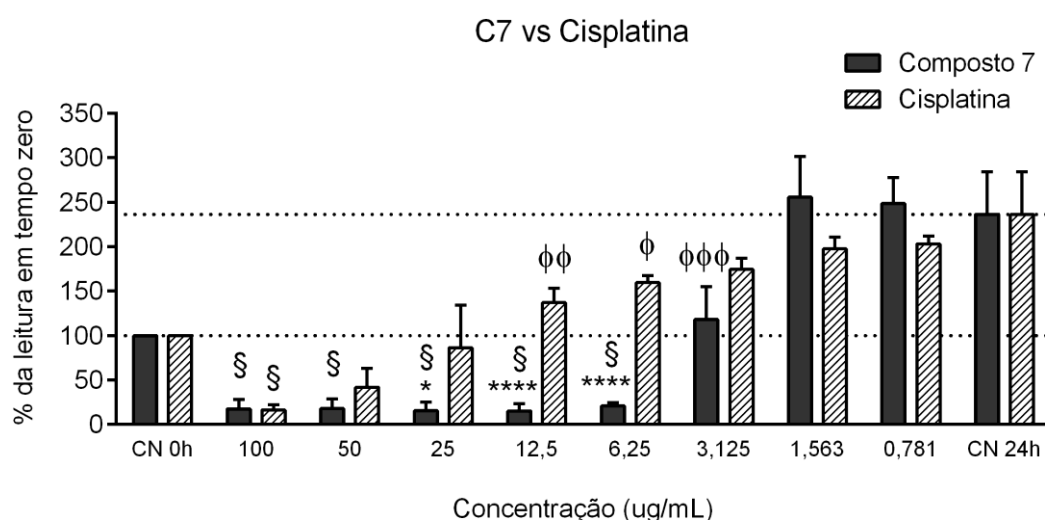


Figura 25. Avaliação da significância estatística do composto **7** e da cisplatina em comparação ao controle negativo. As colunas em preto representam o composto **7** e as colunas hachuradas (em cinza) representam a cisplatina ambas em contato com a linhagem celular LM3. Intervalo de 0% até **A**: efeito citotóxico. Intervalo de **A** até **B**: efeito citostático. Acima da linha **B**: proliferação celular. § representa a significância estatística em relação ao controle negativo de zero hora e Φ representa a significância estatística em relação ao controle negativo de 24 horas. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Para melhor visualização dos resultados do MTT a tabela abaixo expressa os valores percentuais citotóxicos e citostáticos dos compostos usados, além da cisplatina.

Efeito Citostático (%)				
Concentração (ug/mL)	Composto 3	Composto 4	Composto 7	Cisplatina
12,5	83,15 ± 32,70	82,59 ± 25,03	-	71,18 ± 11,85
6,25	-	-	-	52,28 ± 17,67
3,13	-	-	80,19 ± 32,85	41,19 ± 19,54
1,56	-	-	-	21,48 ± 31,12
0,78	-	-	-	15,11 ± 39,99

Efeito Citotóxico (%)				
Concentração (ug/mL)	Composto 3	Composto 4	Composto 7	Cisplatina
100	84,01 ± 2,90	86,85 ± 3,24	82,23 ± 10,42	83,57 ± 5,80
50	83,77 ± 6,86	83,91 ± 1,99	82,15 ± 11,05	58,11 ± 21,17
25	42,63 ± 22,25	36,83 ± 26,00	84,47 ± 9,82	13,70 ± 48,04
12,5	-	-	84,75 ± 8,33	-
6,25	-	-	79,10 ± 3,80	-

Tabela 1. Percentual do efeito citostático e citotóxico dos compostos e cisplatina por MTT.

4.9. Determinação de mediadores no sobrenadante da cultura de macrófagos.

4.9.1 Perfil imunológico da citocina TNF- α

Os compostos **3**, **4**, **7** e a cisplatina foram comparados. Como o controle positivo (LPS) e o negativo (RPMI), a fim de avaliar o perfil imunológico da citocina TNF- α na concentração mais elevada de cada composto e com maior viabilidade celular apresentada nos resultados do MTT, as citocinas foram quantificadas através de curvas padrão estabelecidas com quantidades conhecidas dos padrões da citocina, de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram reproduzidos em pg/mL (Figura 26).

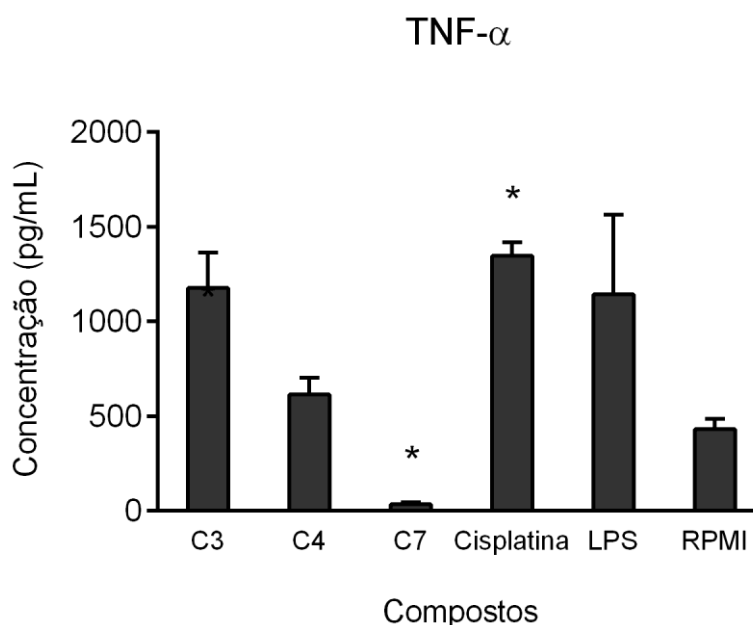


Figura 26. Produção da citocina TNF- α em cultura de macrófagos. As barras representam o resultado do composto **3**, **4**, **7** e da cisplatina. A TNF- α foi quantificada no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais e a concentração escolhida foi a mais elevada de cada composto e com maior viabilidade celular apresentada nos resultados do MTT, aproximadamente 100% de viabilidade. Os macrófagos foram cultivados por 24 horas na presença dos compostos. As citocinas liberadas no sobrenadante foram dosadas por ELISA de acordo com as instruções do fabricante. Como controle positivo foi utilizado LPS e controle negativo RPMI. * $p < 0,05$.

Os resultados obtidos apresentaram significância estatística para o composto **7** e a cisplatina. O sobrenadante com o composto **4** produziu menos TNF- α que o composto **3**, sendo importante observar que o composto **7** apresentou um comportamento diferente, não demonstrando produção de citocinas, dado este importante quando o comparamos com a cisplatina, que teve alta produção de TNF- α , que tem um perfil pró-inflamatório e que, de certa forma, beneficia e favorece microambiente do câncer gerando inflamação.

4.9.2. Perfil imunológico da citocina IL-6.

O mesmo teste foi realizado com a IL-6 (Figura 27), sendo que neste experimento houve significância estatística entre os três compostos.

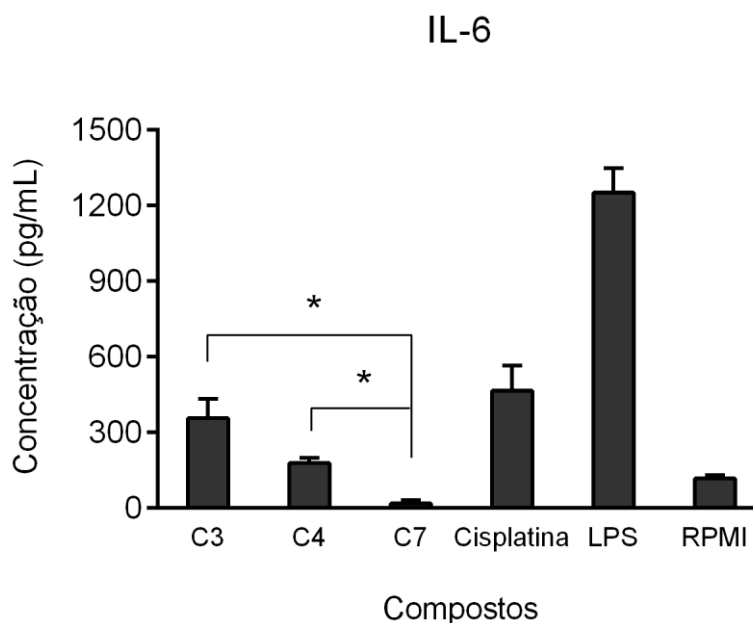


Figura 27. Produção da citocina IL-6 em cultura de macrófagos. As barras representam o resultado do composto **3**, **4**, **7** e da cisplatina. A IL-6 foi quantificada no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais e a concentração escolhida foi a mais elevada de cada composto e com maior viabilidade celular apresentada nos resultados do MTT, aproximadamente 100% de viabilidade. Os macrófagos foram cultivados por 24 horas na presença dos compostos. As citocinas liberadas no sobrenadante foram dosadas por ELISA de acordo com as instruções do fabricante. Como controle positivo foi utilizado LPS e controle negativo RPMI. * $p < 0,05$.

Os resultados deste teste apresentaram baixa produção da citocinas com os compostos, enquanto a cisplatina apresentou uma maior produção de citocinas. É possível verificar que o controle positivo apresentou uma alta produção. Mais uma vez o melhor resultado foi observado no composto **7**, que não apresentou produção de IL-6, que é uma citocina pleitrópica, pode favorecer tanto o microambiente pró-inflamatório, como o anti-inflamatório, ter diferentes efeitos nos diferentes tecidos e diferentes funções em seus respectivos eventos. Esta é uma citocina chave para o

crescimento tumoral, capaz de aumentar a invasão celular tumoral, além de desempenhar função inflamatória e anti-apoptótica, atuando em genes fundamentais para o controle do ciclo celular (LIN e KARIN, 2007; GERMANO et al., 2008). Quando comparados com a cisplatina, os compostos apresentaram melhores resultados.

4.9.3. Perfil imunológico da citocina IL-10.

No teste com a citocina IL-10 tanto nos sobrenadantes dos compostos, quanto no sobrenadante da cisplatina e no meio de cultura dos macrófagos RPMI - controle negativo, apresentaram baixa produção. A IL-10 é considerada uma citocina anti-inflamatória. Quanto maior sua produção melhor seria (Figura 28).

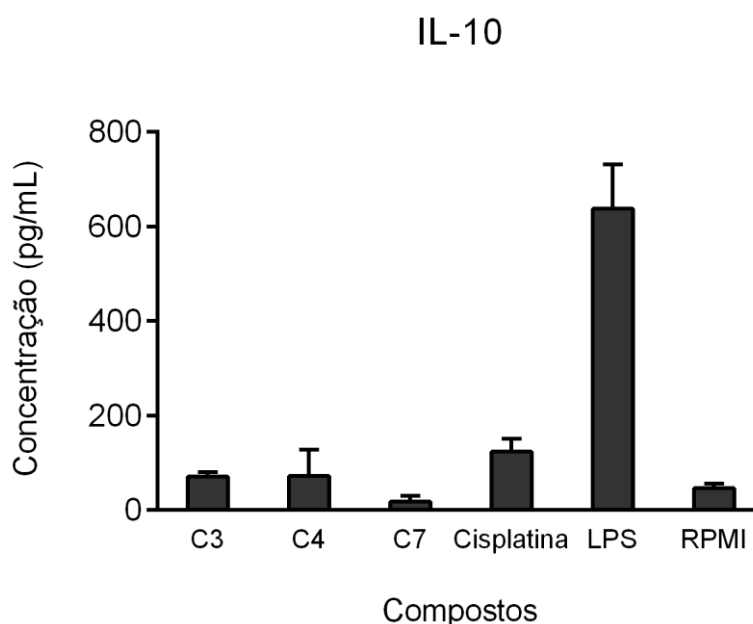


Figura 28. Produção da citocina IL-10 em cultura de macrófagos. As barras representam o resultado do composto **3**, **4**, **7** e da cisplatina. A IL-10 foi quantificada no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais e a concentração escolhida foi a mais elevada de cada composto e com maior viabilidade celular apresentada nos resultados do MTT, aproximadamente 100% de viabilidade. Os macrófagos foram cultivados por 24 horas na presença dos compostos. As citocinas liberadas no sobrenadante foram dosadas por ELISA de acordo com as instruções do fabricante. Como controle positivo foi utilizado LPS e controle negativo RPMI.

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, podendo atuar no controle da inflamação. Sendo assim, seria interessante que tivéssemos observado a produção no sobrenadante dos macrófagos com os compostos, porém a produção foi baixa e não houve significância estatística.

4.9.4. Perfil imunológico do mediador VEGF em macrófagos.

Foi realizado o teste com o mediador VEGF no sobrenadante das culturas de macrófagos, a fim de verificar sua produção nos sobrenadantes dos compostos **3**, **4**, **7** e da cisplatina, além dos controles positivo e negativo (Figura 29).

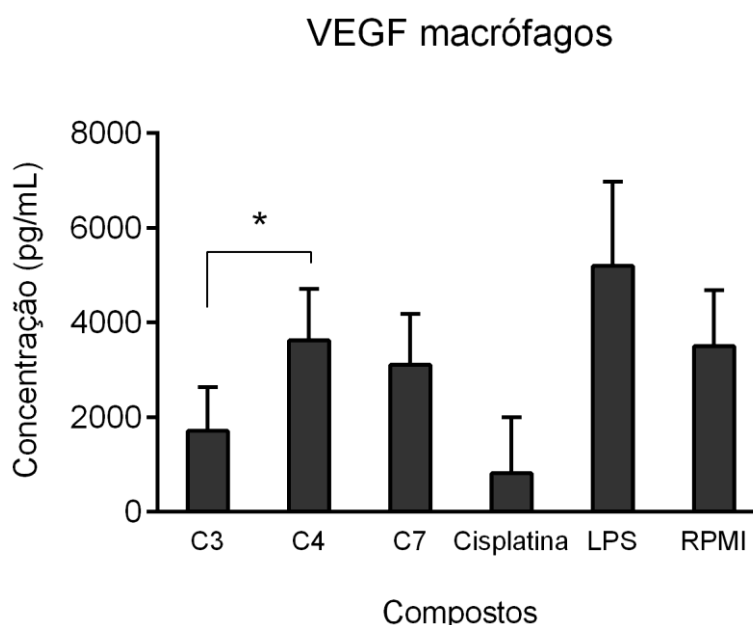


Figura 29. Produção do mediador VEGF em cultura de macrófagos. As barras representam o resultado do composto **3**, **4**, **7** e da cisplatina. O mediador VEGF foi quantificado no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais e a concentração escolhida foi a mais elevada de cada composto e com maior viabilidade celular apresentada nos resultados do MTT, aproximadamente 100% de viabilidade. Os macrófagos foram cultivados por 24 horas na presença dos compostos. Os mediadores liberados no sobrenadante foram dosados por ELISA de acordo com as instruções do fabricante. Como controle positivo foi utilizado LPS e controle negativo RPMI. * $p < 0,05$.

Nossos resultados demonstraram uma baixa produção de VEGF na cisplatina, porém os compostos apresentaram uma produção mais elevada, sendo que a maior

produção foi no sobrenadante do composto **4**, que teve significância estatística com o composto **3**, que por sua vez o composto **3** teve menor produção que o composto **7**. O controle positivo foi o que mais produziu e o controle negativo produziu mais que os compostos **3** e **7**.

O VEGF é um dos mais potentes indutores no fator de desenvolvimento dos vasos. Apesar do câncer se favorecer também da angiogênese, acredita-se que quando o VEGF produzido pelos macrófagos, pode ser um evento fisiológico para a reparação tecidual e não para favorecer o câncer. Tudo indica neste caso, que o composto **4** pode favorecer o tratamento pelo fato de ajudar com o estímulo da produção do VEGF e que o VEGF induz a formação de novos vasos e sendo assim, com a angiogênese estabelecida no local, pode chegar o futuro fármaco proposto para tratar o câncer.

4.9.5. Perfil imunológico do mediador VEGF na linhagem celular LM3.

É sabido que VEGF é produzido por células tumorais. A fim de fazer um comparativo e estabelecer a produção quando em contato com os compostos, o mesmo teste proposto com macrófagos foi realizado com a linhagem tumoral LM3 (Figura 30).

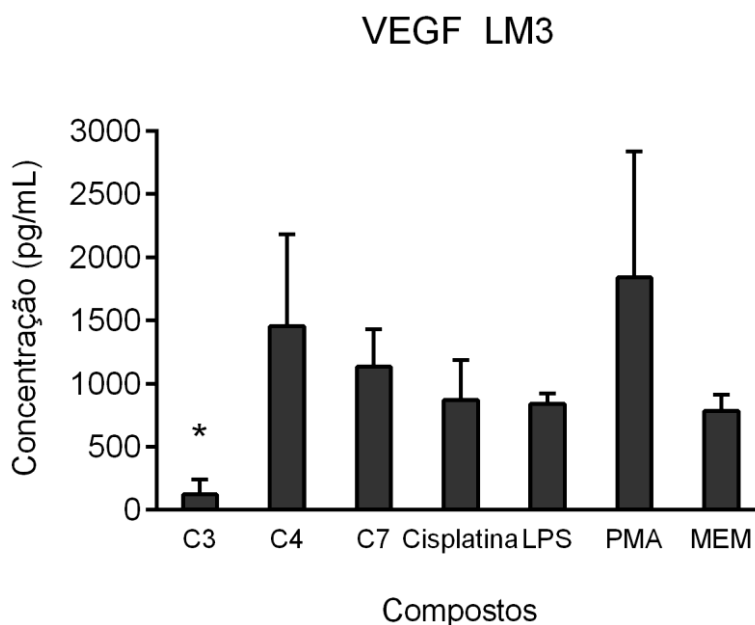


Figura 30. Produção do mediador VEGF em cultura de células tumorais (LM3). As barras representam o resultado do composto **3**, **4**, **7** e da cisplatina. O mediador VEGF foi quantificado no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais e a concentração escolhida foi a mais elevada de cada composto e com maior viabilidade celular apresentada nos resultados do MTT, aproximadamente 100% de viabilidade. Os macrófagos foram cultivados por 24 horas na presença dos compostos. Os mediadores liberados no sobrenadante foram dosados por ELISA de acordo com as instruções do fabricante. Como controle positivo foi utilizado LPS e controle negativo RPMI.

Nossos resultados demonstraram que VEGF foi menos produzido no composto **3**, que apresentou significância estatística. Houve uma maior produção no sobrenadante do composto **4**, seguido pelo composto **7**. A LM3 no sobrenadante da cisplatina teve um comportamento semelhante ao controle LPS e ao controle negativo. E o controle positivo PMA foi o que mais estimulou a produção do VEGF pela LM3.

Desta forma entende-se que o composto **3** obteve um excelente resultado, com baixa produção do VEGF no sobrenadante da linhagem LM3 cancerígena, onde o mediador nesse caso, pode favorecer o desenvolvimento do câncer pela formação de novos vasos e sucessivamente sua proliferação.

4.10. Análise de apoptose por citometria de fluxo por meio de Annexin-V-FITC/PI

Foi realizado o teste de apoptose a fim de verificar a porcentagem de morte celular (LM3), de acordo com os parâmetros do kit: Células viáveis (FITC-/ PI-); Células em apoptose inicial (FITC+/ PI-); Células em apoptose final - Apoptose tardia ou necrose (FITC+/ PI+); (Figura 31). As células foram transferidas para tubos de citometria contendo 100uL de tampão de ligação de anexina V. Em seguida, a suspensão foi adicionada de 5uL de anexina V e PI e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro. Logo após, foram acrescentados mais 150 uL de tampão de ligação a cada tubo e os mesmos foram lidos em citômetro de fluxo para um total de 10.000 eventos/teste (Figura 31). Depois de obtidos, os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA e pós-teste de *Tukey*.

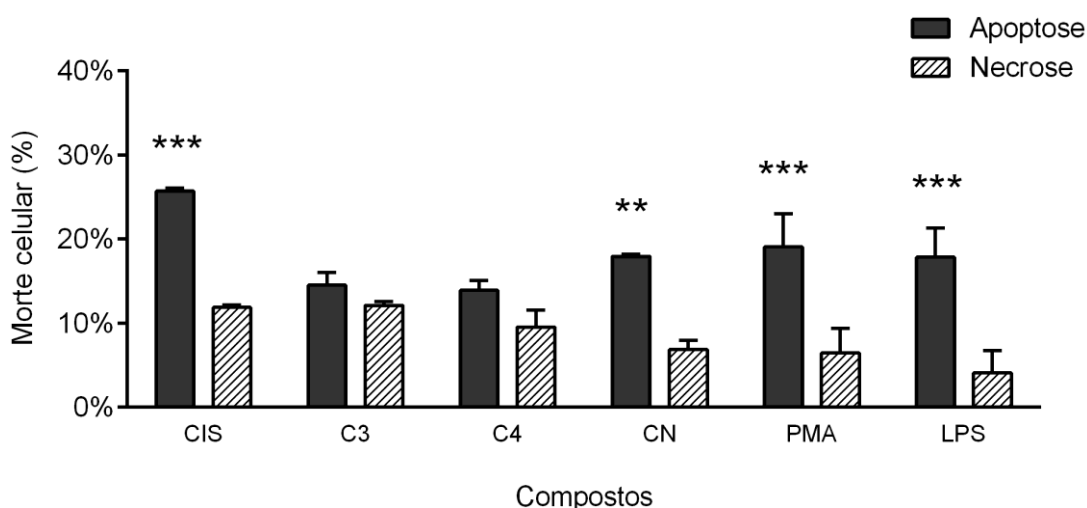


Figura 31. Teste de apoptose e de necrose em células LM3. As barras em preto significam a expressão de apoptose. As barras hachuradas (em cinza), expressam a necrose celular da linhagem LM3 em contato com a cisplatina, e os compostos **3** e **4** além dos controles positivo e negativo. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Nossos resultados demonstraram significância estatística da cisplatina, dos controles positivos e do controle negativo, quanto comparada a apoptose com a necrose, na análise da morte por apoptose. Os compostos apresentaram padrões parecidos na apoptose e em necrose, porém os compostos **3** e **4** apresentaram uma porcentagem ligeiramente mais alta de morte por apoptose do que por necrose. No

geral os compostos apresentaram mais morte por apoptose, apesar de não dar diferença significativa.

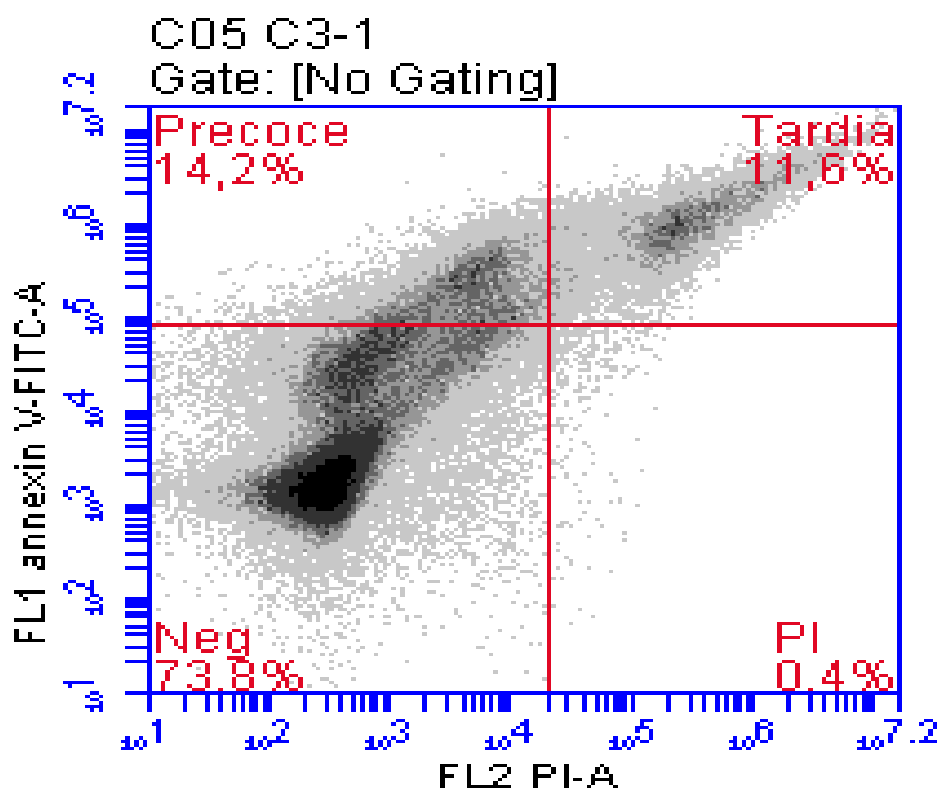


Figura 32. Análise de apoptose por citometria de fluxo: quadrante esquerdo inferior, negativo para anexina e para PI, esquerdo superior positivo só para anexina. No quadrante inferior direito positivo para PI e no quadrante superior direito positivo para os dois. No quadrante esquerdo observamos morte precoce e no quadrante direito tardia.

Foi possível observar que houve maior morte por apoptose, pela marcação de anexina, onde o quadrante superior esquerdo ilustra uma porcentagem de 14,2%. Isso sugere que as células estão entrando em apoptose. O marcador anexina se liga a fosfatidilserina, (PS), um componente fosfolipídico, normalmente mantido no folheto interno, o lado citosólico, das membranas celulares. Quando uma célula passa por morte por apoptose a fosfatidilserina não está mais restrita ao lado citosólico da membrana, mas torna-se exposta na superfície da célula. Nossos

resultados sugerem, portanto, que os compostos induzem morte mais por apoptose do que por necrose.

5. Discussão

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo todo, 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, 2009).

O interesse por novos compostos químicos que induzem o mecanismo de ação e as tentativas de melhorar a atividade destes compostos apresenta um crescimento contínuo na busca de melhorar as terapias existentes contra o câncer.

Dentre os principais tratamentos do câncer está a quimioterapia, que utiliza compostos orgânicos e inorgânicos, como a cisplatina, usada em nossos estudos a fim de comparar os efeitos produzidos *in vitro* pelos compostos que foram o foco do nosso trabalho. Porém a cisplatina vem apresentando ao longo do tempo resistência celular e baixa solubilidade em água, estreito espectro de atividade, além de apresentar graves efeitos colaterais, como neurotoxicidade, nefrotoxicidade e toxicidade ao trato intestinal, que se manifestam através de náuseas e vômitos intensos. Os efeitos adversos surgem principalmente pela complexação da cisplatina com proteínas e peptídeos, como por exemplo, a glutatona, o que leva ao seu acúmulo no organismo e consequente toxicidade. Além disso, em vários tipos de câncer tratados com a cisplatina adquirem resistência no decorrer de seu uso na quimioterapia (DECATRIS *et al.*, 2004).

Neste trabalho os compostos de paládio(II) foram testados através de ensaios biológicos, a fim de comparar sua atividade imunológica com o fármaco padrão, a cisplatina. Para isso foi fundamental avaliar a viabilidade em células tumorais LM3 e macrófagos quando colocadas em contato com os compostos em diferentes concentrações, através da técnica do MTT, amplamente utilizada para avaliar viabilidade celular.

Há várias décadas os complexos organometálicos de paládio(II) são estudados em diversas aplicações, dentre elas a área médica, como agentes antitumorais (HIGGIUS 1996).

Embora atualmente haja uma forte tendência no estudo da atividade biológica envolvendo os complexos inorgânicos, observa-se também a escassez de estudos envolvendo a atividade destes complexos na atividade em macrófagos e linhagens tumorais. Este fato motivou o delineamento deste estudo, voltando nossos objetivos

para testar o comportamento e a viabilidade celular quando submetidas às diferentes concentrações dos compostos.

Considerando que os complexos são estruturalmente similares, ou seja, tratam-se de espécies quadrado-planares mononucleares de Pd(II), os compostos avaliados neste trabalho podem ser divididos em três grupos. O primeiro, contendo os compostos binucleares do tipo $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-X})_2]$ $\{\text{X} = \text{Cl}$ (**1**), N_3 (**2**) e NCO (**3**) $\}$, o segundo grupo seria daqueles derivados do primeiro, mas contendo o ligante isonicotinamida, com fórmula geral $[\text{Pd}(\text{dmba})\text{X}(\text{isn})]$ $\{\text{X} = \text{Cl}$ (**4**), N_3 (**5**) e NCO (**6**) $\}$ e o terceiro grupo formado apenas pelo composto $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (**7**), sendo este último (**7**), distinto dos anteriores.

Os resultados apontam que todos os compostos de paládio(II) testados contra a linhagem tumoral LM3 possuem eficácia na ação, com valores de citotoxicidade em torno de 25 $\mu\text{g/mL}$ ou menos. Tais valores são próximos ou inferiores a cisplatina – antitumoral padrão adotado nesta dissertação. Particularmente para os compostos do primeiro grupo, o mais ativo foi o **1**, no entanto, considerando-se a avaliação destas substâncias frente aos macrófagos peritoneais, pode-se notar que os macrófagos apresentam mais viabilidade na presença do composto **3**, já que a viabilidade celular para estas células normais se mantém em 100% mesmo na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$. Além disto, na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ a citotoxicidade foi muito elevada contra a linhagem LM3, com aproximadamente 80% de morte celular.

Os macrófagos tratados com o composto **3** (Figura 15) apresentaram viabilidade celular igual a 100% nas concentrações de 25 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$, com diferença estatística quando comparado a cisplatina. Além disso, a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ apresentou 100% de viabilidade dos macrófagos tratados com o composto **3** e uma seletividade elevada contra os macrófagos quando tratados pela cisplatina. Quando comparada a viabilidade do composto **3** com a cisplatina na linhagem LM3, mostrou-se que o composto é mais seletivo para a linhagem que a cisplatina e que a cisplatina é mais seletiva para os macrófagos, quando comparada ao composto **3**.

Diante destes resultados o composto **3** apresentou-se promissor para novas e mais profundas investigações acerca de sua atividade seletiva para a linhagem murina mamária cancerígena LM3 e por isso foi selecionado para alguns ensaios imunológicos neste trabalho.

No segundo grupo de compostos, os valores de seletividade estiveram na faixa de 12,5 a 25 $\mu\text{g/mL}$. Neste grupo, o uso de ligantes piridínicos foi determinado por Souza (2013) por fatores relacionados à elevada afinidade do Pd^{2+} por estes ligantes, segundo o conceito de ácidos e bases de Pearson (1963). Além disto, há exemplos na literatura envolvendo complexos não organometálicos de Pd(II) com derivados piridínicos e que apresentam atividades antitumorais, como no caso do composto contendo o ligante piridínico 2,6-dimetil-4-nitropiridina (KUDUK-JAWORSKA; et al., 2004).

Cabe ressaltar alguns exemplos de ciclopaladados ativos contra algumas linhagens tumorais. Especificamente para as células LM3, os primeiros e até então únicos ciclopaladados testados contra essa linhagem foram relatados por Moro e colaboradores (2009). Nesse trabalho, os compostos $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{Cl})(\text{tu})]$ e $[\text{Pd}(\text{C}^2, \text{N-dmba})(\text{Br})(\text{tu})]$ apresentaram valores de Cl_{50} de 72,4 e 29,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Diante do histórico de complexos contendo ligantes piridínicos biologicamente ativos, bem como ciclopaladados com ação frente à linhagem LM3, objetivamos testar os compostos organometálicos contendo, em sua composição, o ligante piridínico isonicotinamida.

Sendo assim, constatamos que todos os ciclopaladados deste grupo foram ativos frente a LM3, destacando o composto $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{Cl})(\text{isn})]$ (**4**).

Em termos de citotoxicidade, **4** é comparável à cisplatina, quando testados contra a LM3, contudo, ao se comparar a ação contra os macrófagos, percebe-se que **4** mantém estas células com maior percentual de viabilidade em todas as concentrações comparadas (Figura 16).

A substância **4**, ao contrário de **1**, contém o ligante cloro ligado apenas a um paládio, e o fato de se ter o ligante isonicotinamida atribuiu uma atividade bem distinta dos demais compostos do primeiro grupo. A presença e o modo de como todos estes ligantes se conectam ao átomo central de paládio, confere, além de sua eficácia na ação contra células LM3, também apresenta seletividade, sendo menos agressivo (este composto) aos macrófagos.

Enquadrando-se num terceiro grupo, composto apenas por ele, o composto $[\text{Pd}(\text{C-dmba})(\text{NCS})(\text{dppp})]$ (**7**) destoa significativamente dos anteriores, sendo o mais poderoso, em termos de citotoxicidade, frente a LM3. Sua porcentagem de viabilidade é a mais baixa entre todos, estando no intervalo de 3,125 a 1,5625

µg/mL. No entanto, a citotoxicidade elevada também se estende aos macrófagos peritoniais.

A configuração molecular desta substância foi projetada para manter uma alta estabilidade no meio biológico, tanto pela presença do fragmento DMBA (a parte que insere a ligação Carbono–Paládio) quanto pelo ligante difosfínico quelante DPPP. Em 2007, Rocha e colaboradores mostraram uma surpreendente atividade frente a tumor de Ehrlich em ensaios *ex vivo*, promovendo um aumento da sobrevivência de camundongos, em comparação ao uso da cisplatina, e isso nos motivou entender um pouco mais sobre este organometálico diante agora de uma linhagem distinta neste trabalho, a linhagem tumoral LM3.

Constatada a eficácia do composto **7** em termos de atividade, mecanismo de ação citotóxico e seletivo contra a LM3, assim como a dos compostos **3** e **4**, ensaios imunológicos visando encontrar relações com a ação antitumoral destes compostos foram realizados.

Em nossos resultados pode-se observar o potencial citotóxico dos compostos de paládio(II) e da cisplatina. Neste estudo foi possível observar que a linhagem celular LM3 apresentou um comportamento bem diferente dos macrófagos e sua viabilidade foi baixa nas maiores concentrações de todos os compostos testados e apresentou o mesmo padrão para a cisplatina, sugerindo que para essa linhagem tumoral é dose-dependente. Em relação à sensibilidade da linhagem tumoral LM3, esta se mostrou tão sensível quanto outras linhagens celulares citadas em literatura ao potencial citotóxico dos compostos.

Considerando nossos resultados com os macrófagos, deve-se lembrar de que os macrófagos são células de defesa imunológica e que podem ser elementos fundamentais no combate às células tumorais, além de serem células do hospedeiro, sendo utilizada como comparação com a célula cancerígena, e por isso devem ter sua viabilidade preservada, de preferência sua atividade aumentada a fim de combater o tumor.

Toda vez que são estimulados, os macrófagos passam por um processo de ativação, caracterizado por um aumento no metabolismo, motilidade e atividade fagocítica. Macrófagos ativados não funcionam somente como fagócitos. Eles também são capazes de secretar diversas enzimas, fatores de coagulação, espécies reativas de oxigênio, citocinas, etc. (STITES *et. al.*, 2000). Os macrófagos também

são capazes de responder à diferentes estímulos de membrana, através da produção de espécies reativas de oxigênio, entre elas o óxido nítrico (NO).

Por essa razão foi realizado o experimento para determinar se em contato com os compostos de paládio(II) havia a produção ou a inibição de NO. Nossos resultados mostraram que na presença do composto sem o controle positivo a produção de NO foi baixa para os compostos testados e que a cisplatina mostrou um resultado mais elevado na produção deste mediador, bem como na inibição deste.

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 em estágios iniciais (MACMICKING *et al.*, 1997). Em concentração moderada e persistente o NO pode favorecer a vasodilatação dos vasos ajudando as células cancerígenas a receberem oxigênio e nutrientes. Porém, este mediador torna-se citotóxico, não seletivo e, com efeito deletério (MONCADA *et al.*, 1991; MONCADA e HIGGS, 1995; LALA, 1998), podendo agir contra ou a favor das células tumorais. Isso vai depender de sua concentração, local e estágio da disfunção.

Estudos revelam que o NO não é consideravelmente tóxico para uma variedade de tipos celulares. Comparado ao peróxido de hidrogênio em 66 concentrações similares, as quais resultam em 99% ou mais de morte celular, o NO não é um potente agente tóxico em pequenas concentrações (WINK e MITCHELL, 1998).

Os testes de inibição foram realizados para os compostos **3**, **4** e com a cisplatina. Observou-se que o potencial de inibição dos compostos foi menor do que quando comparado à cisplatina. O fato de promover a inibição 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, arterosclerose. Ainda, as condições inflamatórias crônicas podem induzir o desenvolvimento do câncer (CIRINO *et al.*, 2002). Os compostos **3** e **4** somente inibiram o NO nas mais altas concentrações (25 e 12,5 µg/mL).

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).

É sabido 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).

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 – eventos da disfunção celular, 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).

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. 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).

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).

Nos experimentos inerentes ao TNF- α verificou-se que dois compostos, o **3** e o **4** foram capazes de estimular significativamente a produção desta citocina, porém o composto **7** não foi capaz de estimular sua produção e estudos adicionais sobre este composto se fazem necessários, pois nos testes com as citocinas IL-6 e IL-10, o composto **7** também não estimulou a produção, enquanto a cisplatina estimulou

mais a produção das citocinas, quando comparados os resultados dos compostos. Uma explicação para tal evento poderia ser que câncer pode se favorecer da inflamação (HANAHAHAN E WEINBERG, 2011). Sendo assim, a produção de citocinas pro-inflamatórias não são bem vindas no sobrenadante, correlacionado aos compostos. Mesmo assim, estudos adicionais fazem-se necessários.

Outro dado obtido em nosso trabalho foi com o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Este é um dos mais potentes indutores no desenvolvimento dos vasos. Ele induz a proliferação de células endoteliais, promove migração celular e inibe a apoptose, e, como tal, é uma peça chave na regulação da angiogênese fisiológica e disfuncional - patológica (FERRARA, 2001).

Nossos resultados mostraram a comparação entre o composto **3** e **4** com diferença significativa, apesar de que ambos produziram o VEGF, o composto **4** apresentou uma concentração mais elevada cultivados no macrófago. Se compararmos como o resultado do composto **7**, veremos que este também produziu, porém a cisplatina apresentou uma produção bem inferior. Apesar do câncer se favorecer também do evento da angiogênese, acredita-se que se quando é produzido o VEGF pelos macrófagos, pode ser fisiológico para a reparação tecidual e não para favorecer o câncer. Além disto, é preciso também a formação de vasos para a chegada do fármaco no local do tratamento. Os resultados do VEGF produzido pela linhagem tumoral LM3 demonstraram que, nesse contexto, a célula passa por hipóxia, liberando a molécula HIF. Zhong e colaboradores (1999) observaram que a proteína HIF-1 α foi expressa em vários tipos de câncer humano e nas metástases. Este estudo identificou um aumento da expressão de HIF-1 α . Enquanto microambientes que cercam tumores cancerígenos são extremamente hipóxicos, a proliferação de tais massas, muitas vezes é possível graças a ativação do gene HIF-1, o que leva ao aumento da angiogênese e, assim, um aumento da oferta de oxigênio para a área (LADEROUTE *et al.*, 2006). E onde uma das suas subunidades estimula a produção de VEGF favorecendo o câncer.

Baseando-se nos resultados discutidos, os compostos testados são promissores agentes por seus efeitos sobre as células tumorais e macrófagos, muitas vezes de forma igual ou superior à cisplatina, fármaco de uso corrente na quimioterapia do câncer. É importante ressaltar que outros estudos serão necessários, principalmente como o composto **7** e que testes sobre culturas celulares *in vitro* nem sempre correspondem aos observados em situações *in vivo*.

Testes *in vitro* nos 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*.

6. Conclusões

Os resultados obtidos durante este estudo nos permitem concluir que:

- ✓ As células tumorais e os macrófagos são sensíveis aos potenciais tóxicos dos compostos em concentrações mais elevadas.
- ✓ Os compostos **3** e **4** apresentaram os melhores resultados nos teste de viabilidade celular.
- ✓ O composto **7** foi o que mais se diferiu dos outros compostos, sendo necessário que seja realizado um trabalho minucioso a fim de elucidar o comportamento diferencial deste.
- ✓ Os macrófagos apresentaram alta viabilidade celular quando tratados com os compostos **3** e **4**, em todas as concentrações testadas, diferentemente das células tumorais LM3.
- ✓ O ELISA detectou que todos os compostos **3**, **4**, e **7** quando comparados com a cisplatina estimularam menos a produção de citocinas pró-inflamatória.
- ✓ O VEGF foi produzido mais com estímulos dos compostos **3**, **4** e **7** do que com a cisplatina, tanto dos macrófagos quanto da linhagem LM3. Exceto o composto **3** que estimulou menos a produção do VEGF da LM3. Supondo neste caso que o composto **3** inibi a angiogênese. Paradoxalmente o composto **4** foi o que mais estimulou a produção do VEGF, que por sua vez se faz necessário para a chegada do composto no local do tratamento, células cancerígenas.
- ✓ Na análise por citometria de fluxo detectou-se que todas as substâncias testadas induziram mais morte por apoptose do que por necrose. O que resulta em um microambiente favorável no tratamento do câncer.
- ✓ Com os resultados obtidos, pode-se concluir que os compostos **3** e **4** apresentaram ótima atividade em todos os testes a que foram submetidos, e se mostraram promissores para o desenvolvimento de fármacos antineoplásicos.

7. Referências

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.

ALMEIDA, E. T. de. et al. Self-assembly of organometallic Pd(II) complexes via $\text{CH}_3 \cdots \pi$ interactions: the first example of a cyclopalladated compound with herringbone stacking pattern. **Inorganic Chemistry Communications**, v.10, n. 12, p.1394-1398, 2007.

ALLAVENA, P.; GARLANDA, C.; BORRELLO, M.G.; SICA, A.; MANTOVANI, A. Pathways connecting inflammation and cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.18, p.3-10, 2008.

ALLAVENA, P.; SICA, A.; SOLINAS, G.; PORTA, C.; MANTOVANI A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. **Crit. Rev. Oncol. Hematol**, v.66, p.1-9, 2008.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts and figures 2009. Atlanta, 2009. 60 p. Disponível em: www.cancer.org.

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.

ASSOSIAN, R.K.; KOMORIYA, A.; MEYERS, C.A.; MILLER, D.M.; SPORN, M.B. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. **J. Biol.Chem**, v.158, p.7155-7160, 1983.

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.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41(1), p.27-51, 2005.

BARNES, P.J. Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases. **Cytokine and Growth Factor Rev**, v.14, p.511-522, 2003.

BEGO, A. M.; FREM, R. C. G.; NETTO, A. V. G.; MAURO, A. E.; ANANIAS, S. R.; CARLOS, I. Z.; ROCHA, M. C. Immunomodulatory effects of palladium(II) complexes of 1,2,4-triazole on murine peritoneal macrophages. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.20(3), p.437-444, 2009.

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.

BENOIT, M.; DESNUES B.; MEGE, J. L. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. **The Journal of Immunology**, v.181, p.3733-3739, 2008.

BERRAONDO, P.; PRIETRO, J.; GONZALES-ASEQUINOLAZA, G. Advances in Interleukin-12 Gene Therapy for Acquired Liver Diseases. **Current Gene Therapy**, v.10 p.62-71, 2009.

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

BONADONNA, G. et al. Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience an the Milan Cancer Institute. **J Clin Oncol**, v. 16, p. 93-100, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2007.

BROWN, D. A.; HANCE, K. W.; ROGERS, C. J.; SANSBURY, L. B.; ALBERT, P. S.; MURPHY, G.; LAIYEMO, A.O.; WANG, Z.; CROSS, A. J.; SCHATZKIN, A.; DANTA, M.; SRASUEBKUL, P.; AMIN, J.; LAW, M.; BREIT, S. N.; LANZA, E. Serum Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1/GDF15): A Potential Screening Tool for the Prevention of Colon Cancer? **Cancer Epidemiol Biomarkers**. v.21, p.337, 2012

BURNET, FM. The concept of immunological surveillance. **Prog Exp Tumor Res**, 13:1-27, 1970.

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

CARLI, C. B. A.; QUILLES, M. B.; MAIA, D. C. G.; LOPES, F. C. M.; PAVAN, R. S. F. R.; LEITE, C. Q. F.; CALVO T. R.; VILEGAS W.; CARLOS I. Z. Antimycobacterial activity of *Indigofera suffruticosa* with activation potential of the innate immune system. **Pharmaceutical Biology**, v.10.3109, p.01-05, 2009.

CHARALANPOS, A.; ROILIDES, E. Cytokines and fungal infections. **J. Hematol**, v.129, p.583-596, 2005.

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.

COBBS, C.S.; BRENMAN, J.E.; ALDAPE, K.D.; BREDT, D.S.; ISRAEL, M.A. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. **Cancer Res**, v.55, p.727-730, 1995.

COPE, A. C.; FRIEDRICH, E. C. Electrophilic aromatic substitution reactions by platinum(II) and palladium(II) chlorides on N,N-dimethylbenzylamines. **Journal of the American Chemical Society**, v.90, n. 4, p.909-913, 1968.

COSTA, C.; INCIO, J. S. R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? **Angiogenesis**. v.10, p.149-166, 2007.

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(5), p.967-974, 2003.

CROCI DO; Fluck MFZ; Rico MJ; Matar P; Rabinovich GA; Scharovsky OG (2007). Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the 110 immunosuppressive network at the tumor microenvironment. **Cancer Immunol Immunother**, v.56, p.1687-1700, 2007.

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 $[\text{Pd}(\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2)(\mu\text{-X})]_2$ ($\text{X}=\text{Cl}$, NCO , SCN , 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.

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

EHRLICH, P. Experimentally carcinomastudien an Mäusen. **Arb Inst Exp Ther Frankfurt.**, v.1, p.78-80, 1932.

ELMORE, J. G. et al. Screening for breast cancer. **JAMA**, v. 293, p. 1245-1256, 2005.

FERRARA N 2001 Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. **Am. J Physiol**; 280:C1358-C1366

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nat Med.** v.1, p.27-31, 1995.

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.

GERMANO, G.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. **Cytokine**, v.43, p.374-379, 2008.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and $[\text{^{15}N}]$ nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126(1), p.131-138, 1982.

CULIG Z. Cytokine disbalance in common human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813:p. 308-314, 2011

HANAHAN D; Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, p.P646-674, 2011.

HAO NB; Lü MH; Fan YH; Cao YL; Zhang ZR; Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clin Dev Immunol**, 2012:948098, 2012.

HELDIN, C.H.; ERIKSSON, U.; OSTMAN, A. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. **Arch. Biochem. Biophys**, v.398, p.284-290, 2002.

HELLWIG-BÜRGE T, RUTKOWSKI K, METZEN E, FANDREY J, JELKMANN W. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. **Blood**. 1999.

HERNÁNDEZ, El Factor inducido por la hipoxia-1 (HIF-1) y la glucólisis en las células tumorales, **REB** v.28(2): p.42-51, 2009.

HIGGIUS, J. D.; J. INORG. BIOCHEM. 1993, 49, 149; Navarro-Ranninger, C.; López-Solera, I.; González, V. M.; Pérez, J. M.; Alvarez-Valéz, A.; Martín, A.; Raibithby, P. R.; Masaguer, J. R., Alonso, C.; Inorg. Chem. 1996, 35, 5181.

HUERTA, S.; GOULET, E.J.; HUERTA-YEPEZ, S.; LIVINGSTON, E.H. Screening and Detection of Apoptosis. **J Surg Res**, v. 139, p. 143–156, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCÊR (INCA). Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. **Rio de Janeiro**, Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em: 16 de julho, p.98, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCÊR (INCA). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. **Rio de Janeiro**, Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=5>. Acesso em: 05 de outubro, 2014.

IONTCHEVA, I.; AMAR, S.; ZAWAWI, K.H.; KANTARCI, A.; VAN DYKE, T.E. Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. *Infect Immun.*, n.72, p.2312-20, 2004.

ISRILIDES, C.; KLETSAS, D.; ARAPOGLOU, D.; PHILIPPOUSSIS, A.; PRATSINIS, H.; EBRINGEROVA, A.; HRIBALOVA, V.; HARDING, S.E. In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. **Phytomedicine**, v.15, p.512–519, 2008.

JENKINSON, C.P.; GRODY, W.W.; CEDERBAUM, S.D. Comparative properties of arginases. **Comp Biochem Physiol**, v.114(B), p.107–132, 1996.

JEMAL, A. et al. Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, v. 58, p.71-96, 2008.

KE Q, COSTA M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). **Mol Pharmacol**. 2006 Nov;70(5):1469-80. Epub 2006 Aug 3. Review. PubMed PMID: 16887934.

KITAGAWA, R. R.; VILEGAS, W.; CARLOS, I. Z.; RADDI, M. S. G. Antitumor and immunomodulatory effects of the naphthoquinone 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21(6). p.1084-1088, 2011.

KORN, T., OUKKA, M., KUCHROO, V., BETTELLI, E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. **Semin Immunol**. v.19(6). p.362-371, 2007.

KÖSTERS, J. P.; GOTZSCHE, P. C. Regular self-examination or clinical examination for early detection of breast cancer. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2, p. CD003373, 2003.

KOVALOYSKY, D.; REFOJO, D.; HOSBOER, F.; ARZT, E. Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. **J Neuroimmunol**, v.109(1) p.23-29, 2000.

KUDUK-JAWORSKA, J. et al. Synthesis, structural, physico-chemical and biological properties of new palladium(II) complexes with 2,6-dimethyl-4-nitropyridine. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 8, p. 1447-1456, 2004.

LADEROUTE KR, AMIN K, CALAOAGAN JM, KNAPP M, LE T, ORDUNA J, FORETZ M, VIOLLET B. 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. **Mol Cell Biol.** 2006.

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

LALA, PK.; CHAKRABORTY C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. **Lancet Oncol**, v.2, p.149-156, 2001.

LI, Y. et al. Resveratrol inhibits proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells. **European Journal of Pharmacology**, v.609, n. 1/3, p.13-18, 2009.

LIN, E.Y.; POLLARD, J.W. Tumor-Associated Macrophages Press the Angiogenic Switch in Breast Cancer. **Cancer Res**, v.67(11) p.5064–5066, 2007.

LIN, W.W.; KARIN, M A. Cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J. Clin. Invest**, v.117, p.1175-1183. doi:10.1172/JCI31537, 2007.

LOPES, F. C. M.; ROCHA, A.; PIRRACO, A.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H.S.; BOLZANI, V. S.; AZEVEDO, I.; CARLOS, I. Z.; SOARES R. Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea glandulosa*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.9(15), p.01-11, 2009.

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

MALIK, F.; KUMAR, A.; BHUSHAN, S.; MONDH, D. M.; PAL, H. C.; SHARMA, R.; KHAJURIA, A.; SINGH, S.; SINGH, U.; SAXENA, A. K.; SURI, K. A.; QAZI, G. N. ; SINGH J. Immune modulation and apoptosis induction: Two sides of antitumoural activity of a standardised herbal formulation of *Withania somnifera*. **Eur. J. Cancer**, v.45, p.1494-1509, 2009.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; ANNUNCIATA, V.; LOCAT, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Immunology**, v.25, p.677-686, 2004.

MANTOVANI, A.; MARCHESI, F.; PORTA, C.; SICA, A.; ALLAVENA, P. Inflammation and cancer: Breast cancer as a prototype. **Breast**, v.16, p.27-33, 2007.

MANTOVANI, A.; ROMERO, P.; PALUCKA, A.K.; MARINCOLA, F.M. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. **Lancet**, v.371, p.771–783, 2008.

MAKINO Y, CAO R, SVENSSON K, BERTILSSON G, ASMAN M, TANAKA H, CAO Y, BERKENSTAM A, POELLINGER L. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. **Nature**. 2001 Nov 29;414(6863):550-4. PubMed PMID: 11734856.

MCGEACHY, M.J; CUA, D.J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. **Immunity**, v.28, p.445-453, 2008.

MENDONÇA, M. A. O. et al. Relationship between risk factors and tumor stage in breast cancer patients in a university hospital – Brazil. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. XXIX, n. 1, p. 80, 2008.

M'ERIC, J.B.; ROTTEY, S.; OLAUSSEN, K.; SORIA, J.C.; KHAYAT, D.; RIXE, O.; SPANO, J.P. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. **Oncology Hematology**, v.59, p.51–64, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Instituto Nacional do Câncer. Controle de câncer de mama: documento de consenso. Rio de Janeiro: INCA; 2004.

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.

MORO, A.C.; MAURO, A.E.; ANANIAS, S.R. Clivagem dos ciclopalladados diméricos [Pd(dmmba)(m-X)]₂ (dmmba = N,N-dimetilbenzilamina; X = Cl, N₃, NCO) por tiouréia. **Eclética Química**, v.29, p.57-61, 2004.

MORO, A.C.; MAURO, A.E.; NETTO, A.V.G.; ANANIAS, S.R.; QUILES, M.B.; PAVAN, F.R.; LEITE, C.Q.F.; HORNER, M.; CARLOS, I. Z. . Antitumor and antimycobacterial activities of cyclopalladated complexes: X-ray structure of [Pd(C₂N-dmmba)(Br)(tu)] (dmmba=N,N-dimethylbenzylamine, tu= thiourea). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.30, p.01-05, 2009.

MORRIS, S.M. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. **British Journal of Pharmacology**, doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00278.x, 2009.

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

NAUNDORF, S.; SCHRODER, M.; HOFlich, C.; SUMAN, N.; VOLK, H.D.; GRUTZ, G. IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells. **Eur. J. Immunol**, v.39(4), p.1066-1077, 2009.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de platina(II) na terapia do câncer. **Revista Virtual de Química**, v.3, n. 3, p.196-211, 2011.

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

NOBEN-TRAUTH, N. Conventional naive CD4⁺ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation. **J. Immunol**, v.165, p.3620-3625, 2000.

NOMELINI, R.S.; RIBEIRO, L.C.A.; TAVARES-MURTA, B.M.; ADAD, S.J.; MURTA, E.F.C. Production of Nitric Oxide and Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Ovarian Cystic Tumors. **Mediators of Inflammation**, doi:10.1155/2008/186584, 2008.

NOONAN, D.M.; BARBARO, A.L.; VANNINI, N.; MORTARA, L.; ALBINI, A. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. **Cancer Metastasis Rev**, v.27, p.31–40, 2008.

O'DWYER, P.J.; STEVENSON, J.P.S.; JOHNSON W.; LIPPERT B. (Ed.), Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. **Wiley VCH, Weinheim**, p.31–69, 1999.

ONO, M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. **Cancer Sci**, v.99, p.1501-1506, 2008.

ORSOLIC, N.; SARANOVIC, A.B.; BASIC, I. Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of Propolis and its polyphenolic compounds. **Planta Med.**, v.72, p.20-27, 2006.

PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 22, p. 3533-3539, 1963.

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

QIAN, B.; AND POLLARD, J. W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. **Cell**, v.141, p.39-51, 2010.

QUILLES, M. B. Atividade Anti – Tumoral e Imunomodulatória de Complexos de Paládio(II) Utilizando Modelo Experimental de Ehrlich. **Dissertação apresentada ao Programa em Biociências e Biotecnologia Aplica à Farmácia (área de Imunologia)**, p.01-107, 2010.

QUIROGA, A. G.; et al. 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. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.41, n.9, p.1399-1408, 1998.

RAULET, D.H.; GUERRA, N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. **Nature Reviews**, 2009.

REEDJIK, J. Improved understanding in platinum antitumour chemistry. **Chem. Commun**, p.801-806, 1996.

RENGARAJAN, J.; SZABO, S.J.; GLIMCHER, L.H. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. **Immunol Today**, v.21(9), p.479-483, 2000.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Curr. Opin.Pharmacol**, v.1, p.364–369, 2001.

ROCHA, F.V.; BARRA, C.V.; NETTO, A.V.G.; MAURO, A.E.; CARLOS, I.Z.; FREMA, R.C.G.; ANANIAS, S.R.; QUILLES, M.B.; STEVANATO, A.; ROCHA, M.C. 3,5-Dimethyl-1-thiocarbamoylpyrazole and its Pd(II) complexes: Synthesis, spectral studies and antitumor activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p.1698-1702, 2009.

ROCHA, M. C.; SANTANA, A. M.; ANANIAS, S. R.; ALMEIDA, E. T.; MAURO, A. E.; PLACERES, M. C. P.; CARLOS, I. Z. Citotoxicity and immune response induced by organopalladium(II) compounds in mice bearing Ehrlich ascites tumour. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18(8), p.1473-1480, 2007.

SANAMBAR SADIGHI¹, SAEID AMANPOUR², BITA BEHROUZI¹, ZHINOOS KHORGAMI³, SAMAD MUHAMMADNEJAD⁴, Lack of Metformin Effects on Different Molecular Subtypes of Breast Cancer under Normoglycemic Conditions: An *in vitro* Study. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.15 (5), p. 2287-2290, 2014.

SAUVE, A. A. et al. Chemical activation of Sir2-dependent silencing by relief of nicotinamide inhibition. **Molecular Cell**, v.17, n. 4, p. 595-601, 2005.

SCHIAVETTI, A; MCDOWELL, H. P; CONTI, L; ALTAVISTA, P; ANTENUCCI, A; PIZER, B; DOMINICI, C. Vascular Endothelial Growth Factor Serum Levels in Children With Newly Diagnosed Rhabdomyosarcoma. **Pediatr Blood Cancer**, v. DOI 10.1002/pbc.24072, p.01-04, 2012.

SICA, A.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cancer related inflammation: The macrophage connection. **Cancer Lett.**, v.264, p.204–215, 2008.

SINGLETARY, S. E.; CONNOLLY, J. L. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. **CA Cancer J Clin**, v. 56, n. 1, p. 37-47, 2006.

SOLINAS, G.; SCHIAREA, S.; LIGUORI, M.; FABBRI, M.; PESCE, S.; ZAMMATARO, L.;

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.

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

PASQUALINI, F.; NEBULONI, M.; CHIABRANDO, C.; MANTOVANI, A.; ALLAVENA P. Tumor-Conditioned Macrophages Secrete Migration-Stimulating Factor: A New Marker for M2-87Polarization, Influencing Tumor Cell Motility. **J immunol.**, doi:10.4049/jimmunol.1000413

PIÑA, Y.; BOUTRID, H.; MURRAY, T. G.; JAGER, M. J.; CEBULLA, C. M.; SCHEFLER, A.; LY, L. V.; ALEGRET, A.; CELDRAN, M.; FEUER, W.; JOCKOVICH, M. Impact of Tumor-86Associated Macrophages in LHBETATAG Mice on Retinal Tumor Progression. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci**, v.51, p.2671-2677, 2010.

SOUZA, R. A.; STEVANATO, A.; TREU-FILHO, O.; NETTO, A. V. G.; MAURO, A. E.; CASTELLANO, E. E.; CARLOS, I. Z.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F. Antimycobacterial and antitumor activities of Palladium(II) complexes containing isonicotinamide (isn): X-ray structure of *trans*-[Pd(N₃)₂(isn)₂]. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45(11), p.4863-4868, 2010.

SOUZA, R. A. de. **Compostos de Pd(II) contendo ligantes piridínicos: potencialidades biológicas e aspectos estruturais**. 2013. 152 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

THOMSEN, L.L.; MILES, D.W.; HAPPERFIELD, L.; BOBROW, L.G.; KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. **Br. J. Can**, v.72 p.41-44, 1995.

TODARO, M.; LOMBARDO, Y.; FRANCIPANE, M.G.; ALEA, M.P.; CAMMARERI, P.; IOVINO, F.; STEFANO, A.B.; BERNARDO, C.D.; AGRUSA, A.; CONDORELLI, G.; WALCZAK, H.; STASSI, G. Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. **Cell Death and Differentiation**, v.15, p.762–772, 2008.

Ullrich E; Bonmort M; Mignot G; Kroemer G; Zitvogel L. Tumor stress, cell death and the ensuing immune response. **Cell Death and Differentiation**, v.15, p.21-28, 2008.

U'REN, L.; GUTH, A.; KAMSTOCK, D.; DOW, S. Type I interferons inhibit the generation of tumor-associated macrophages. **Cancer Immunol**, Immunother, v.59, p.587-598, 2010.

WANG, Z., WANG, Y., ZHU, K., GUO, L., YANG, Y. Mechanism of three inhibitors of TACE in blocking the converting of pro-TNF alpha into sTNF alpha. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v.23(2), p.116-120, 2003.

WEAVER, C.T., HATTON, R.D., MANGAN, P.R., HARRINGTON, L.E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annu Rev Immunol**. v.25,p.821-852, 2007.

WEIGERT, A.; BRÜNE, B. Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. **Nitric Oxide**, v.19, p.95-102, 2008.

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.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Disponível em: www.who.int/tdr/diseases/cancer/direction.htm. Acesso em: 16 de julho, 2009.

WYCKOFF, J. B.; WANG, Y.; LIN, E. Y.; LI, J.; GOSWAMI, S.; STANLEY, E. R.; SEGALL, J. E.; POLLARD, J. W.; CONDEELIS J. **Cancer Res.** v.67, p.2649–2656, 2007.

YANG, L.; HUANG, J.; REN, X.; GORSKA, A. E.; CHYTIL, A.; AAKRE, M.; CARBONE, D. P.; MATRISIAN, L.M.; RICHMOND, A.; LIN, P. C.; MOSES, AND H.L. Abrogation of TGF β Signaling in Mammary Carcinomas Recruits Gr-1+CD11b+ Myeloid Cells that Promote Metastasis. **Cancer Cell**, v.13, p.23–35, 2008.

ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.7, p. 481-489, 2003.

ZHANG, W.; ZHU, X.; SUN, H.; XIONG, Y.; XU, H.; KONG, L.; WANG, L.; WU, W.; TANG, Z. Depletion of Tumor-Associated Macrophages Enhances the Effect of Sorafenib in Metastatic Liver Cancer Models by Antimetastatic and Antiangiogenic Effects. **Clin Cancer Res**, v.16, p.3420-3430, 2010.

ZHONG H, DE MARZO AM, LAUGHNER E, LIM M, HILTON DA, ZAGZAG D, BUECHLER P, ISAACS WB, SEMENZA GL, SIMONS JW. Overexpression of hypoxia inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. **Cancer Res.** 1999.

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- α (TNF- α) production and TNF- α -induced ICAM-1-expression in BRCA1 mutations carriers. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.81, p.99–105, 2003.

CAPÍTULO 02

Manuscript Number:

Title: Antitumoral and immunomodulatory activity of novel palladium II derivative containing the binder N, N-dimethylbenzylamine

Article Type: Regular Paper

Keywords: Palladium; Pd complex; antitumor; cytotoxicity; immunomodulation

Corresponding Author: Dr Iracilda Zeppone Carlos,

Corresponding Author's Institution: UNESP

First Author: Mauro Jardim

Order of Authors: Mauro Jardim; Lucas Souza Ferreira; Livia Ribeiro; Rodrigo Alves de Souza; AE Mauro; Marissa Polesi; Alexander Batista-Duharte; Iracilda Zeppone Carlos

Abstract: Compounds of palladium (II) have been studied as an alternative to available antitumoral drugs by their specific cytotoxic effect and low toxicity. In this work were tested the in vitro antitumoral and immunomodulatory effect of six palladium (II) compounds, namely: [Pd (dmdba) (μ -Cl)] 2 (1), [Pd (dmdba) (μ -N₃)] 2 * H₂O (2) [Pd (DMBA) (μ -NCO)] 2 (3), [Pd (DMBA) Cl (ISN)] (4) [Pd (DMBA) (N₃) (ISN)] (5) [Pd (DMBA) (NCO) (ISN)] (6) {DMBA = N, N-dimethylbenzylamine; ISN = -isonicotinamide; Cl = chloro; N₃ = azide; and NCO = cyanate}. The compounds were tested by colorimetric assay of MTT, 3 [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl-tetrazolium. in order to evaluate their cytostatic and cytotoxic profile against LM3 cell line (murine mammary carcinoma) and normal peritoneal macrophages (PM) from Balb/c mice. The best results were observed using the compounds 3 and 4 at 25 and 12.5 mg/mL with high cytotoxicity in LM3 cells and low cytotoxicity in PC. The immunomodulatory effect was tested for these two compounds, measuring the nitric oxide (NO) activity, the production of the cytokines TNF- α , IL-6 and IL-10 in macrophages and VEGF in macrophages and tumor LM3 lineage. The compounds 3 and 4 showed reduced production of inflammatory cytokines in comparison with cisplatin, while the compound 4 stimulated the production of VEGF in both cell types. The best result of combined cytotoxic activity for LM3, low cytotoxicity in PM, anti-inflammatory and pro-angiogenic effect was observed for the compound 4, supporting evidences for a potential antitumoral effect.

May 1, 2013

To J.H. Dawson

Editor-in-Chief Journal of Inorganic Biochemistry

Dear Dr.

We are sending a manuscript titled: "**Antitumoral and immunomodulatory activity of novels palladium II derivative containing the binder N, N-dimethylbenzylamine**

", of the authors: Jardim MGD^a, Ferreira LS^a, Ribeiro LC;, Alves de Souza R^a, Mauro AE^a; Polesi MP^a, Batista-Duharte A^a, Carlos IZ^{a*}

to be evaluated in the category of Regular paper

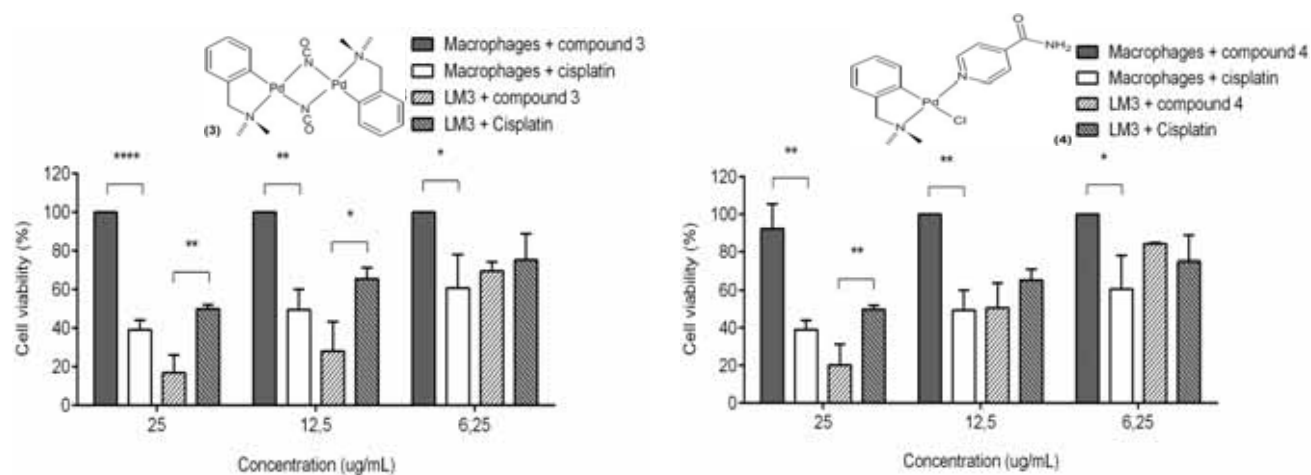
In this work were evaluated six compounds of palladium (II) as an alternative to available antitumoral drugs by their specific citotoxic effect and immunomodulatory activity. Of the six evaluated compounds, two compounds showed a superior antitumor activity and selectivity regarding the other compounds and even cisplatin (used as positive control) using LM3 cells (murine breast cancer line) and peritoneal macrophages as in vitro biomodels. These compounds also exhibited a potential anti-inflammatory profile and reduction of vascular endothelial growth factor (VEGF) production in the tumor cells. These results support evidences to design new studies evaluating these compounds as potential antitumor tools.

The authors declare that there are no conflicts of interest

Thank you very much for your kind attention

Dr. Iracilda Zeppone Carlos

Corresponding author



Comparative viability of macrophages and cell line LM3 treated with A) the compound [Pd (DMBA) (μ-NCO)]₂ (3); and cisplatin; B) the compound Pd(dmba)Cl(ISN)] (4) and cisplatin.

Antitumoral and immunomodulatory activity of novels palladium II derivative containing the binder N, N-dimethylbenzylamine

Jardím MGD^a, Ferreira LS^a, Ribeiro LC^a, Alves de Souza R^a, Mauro AE^a; Polesi MP^a, Batista-Duharte A^a, Carlos IZ^{a*}

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences. Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, UNESP. Rua Expedicionarios do Brasil 1621-CEP:14801-902, Araraquara, SP, Brazil, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil, ^b CAPES/Brasil Grant. Foreigner Visiting Professor Program.

* Corresponding author

Iracilda Zeppone Carlos. Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, Department of Clinical Analysis, Laboratory of Clinical Mycology, Univ Estadual Paulista (UNESP), R. Expedicionários do Brasil, 1621, CEP. 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil CEP:14801-902 Phone 55 16 3301-5712

E-mail: carlosiz@fcar.unesp.br

Abstract

Compounds of palladium (II) have been studied as an alternative to available antitumoral drugs by their specific citotoxic effect and low toxicity. In this work were tested the in vitro antitumoral and immunomodulatory effect of six palladium (II) compounds, namely: [Pd (dmba) (μ-Cl)] 2 (1), [Pd (dmba) (μ-N3)] 2 • H2O (2) [Pd (DMBA) (μ-NCO)] 2 (3), [Pd (DMBA) Cl (ISN)] (4) [Pd (DMBA) (N3) (ISN)] (5) [Pd (DMBA) (NCO) (ISN)] (6) {DMBA = N, N-dimethylbenzylamine; ISN = -isonicotinamide; Cl = chloro; N3 = azide; and NCO = cyanate}. The compounds were tested by colorimetric assay of MTT, 3 [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl-tetrazolium. in order to evaluate their cytostatic and cytotoxic profile against LM3 cell line (murine mammary carcinoma) and normal peritoneal macrophages (PM) from Balb/c mice. The best results were observed using the compounds 3 and 4 at 25 and 12.5 mg/mL with high citotoxicity in LM3 cells and low citotoxicity in PC. The immunomodulatory effect was tested for these two compounds, measuring the nitric oxide (NO) activity, the production of the cytokines TNF-α, IL-6 and IL-10 in macrophages and Vascular endothelial growth factor (VEGF) in macrophages and tumor LM3 lineage. The compounds 3 and 4 showed reduced production of inflammatory cytokines in comparison with cisplatin, while the compound 4 stimulated the production of VEGF in both cell types. The best result of combined citotoxic activity for LM3, low citotoxicity in PM, anti-

inflammatory and pro-angiogenic effect was observed for the compound 4, supporting evidences for a potential antitumoral effect.

Keywords: Palladium (II), cancer, macrophages, cytotoxicity, tumor LM3 Lineage

1. Introduction:

Cancer is the term used to refer to more than 100 types of diseases in which cells underwent genetic mutations, then being called neoplastic or cancerous transformation. These cells proliferate without control and invading normal tissues through the blood and lymphatic system, and may metastasize and compromise myeloid and lymphoid hematopoietic cells (1).

Breast cancer is a worldwide public health problem with annual incidence and mortality from the disease are over 100 cases / 100,000 women and about 40 deaths / 100,000 cases, respectively in many countries (2). The diagnosis of breast cancer in early stage enables a more effective and less aggressive treatment. (3)

The breast cancer microenvironment is a complex combination of several different cell types and molecules as key contributor to malignant progression. Therapeutic options most used for locoregional treatment of breast cancer are surgery and radiotherapy, while for are systemic chemotherapy, hormone therapy and immunotherapy (4).

Cisplatin is clinically used as antitumor drug since 1979, and was the first drug to be marketed adopted for this purpose in the world. However, efforts are taken over more of 30 years to find alternative as powerful as it, but mainly with fewer adverse effects, since cisplatin is cytotoxic to healthy cells as to the tumor, thus presenting a low selectivity (5).

Several researchers have evaluated the antitumor effect of Palladium (II), on which there are many quotes contemplating organopaladadas species mono, bi and polynuclear, with biological properties such as cytotoxic activity *in vitro* against certain types of cancer cells being higher than the same activity with analogous platinum (II) (5,7). Thus, the compounds of Palladium (II) may be promising in cancer research.

In the present study we assessed the cytotoxicity of six organometallic compounds containing N, N-dimethylbenzylamine (DMBA) as ligand, against the tumor cell line LM3, as well as their potential cytotoxicity *in vitro*, and its effect on the immune response in order to visualize the profile of cytokine production by macrophages and Vascular endothelial growth factor (VEGF) mediating both macrophage lineage and for the LM3. The use of DMBA ligand is interesting because it promotes considerable stability to organometallic compounds of palladium (II), by binding to this metal center chelating mode (7).

The compounds analyzed in this study were [Pd (dmba) (μ -Cl)] 2 (1), [Pd (dmba) (μ -N3)] 2 • H₂O (2), [Pd (dmba) (μ -NCO)] 2 (3), [Pd (dmba) Cl (isn)] (4) [Pd (dmba) (N3) (isn)] (5) and [Pd (dmba) (NCO) (isn)] (6) {DMBA = N, N-dimethylbenzylamine; ISN = -isonicotinamide; Cl = chloro; N3 = azide; and isocyanate NCO =}, and the compounds 4, 5, and 6 were synthesized starting from compounds 1, 2 and 3. In this case, there was a molecular change and the binder was added isonicotinamide the pyridine type, whose structure has high similarity (isomer) and nicotinamide - chemical compound of the vitamin B3 - and which has a role in cellular respiration chain.

2. Material and Methods:

Material and Methods:

2.1. Compounds of palladium (II)

All compounds used in this work were prepared using standardized methods by Dr. Rodrigo Alves de Souza from the Institute of Chemistry of the Paulista University Júlio de Mesquita Filho (UNESP), in Araquara, under the supervision of Prof. Dr. Antonio Eduardo Mauro. The compounds analyzed in this study were [Pd (dmba) (μ -Cl)] 2 (1), [Pd (dmba) (μ -N3)] 2 • H₂O (2), [Pd (dmba) (μ -NCO)] 2 (3), [Pd (dmba) Cl (isn)] (4) [Pd (dmba) (N3) (isn)] (5) and [Pd (dmba) (NCO) (isn)] (6) {DMBA = N, N-dimethylbenzylamine; ISN = -isonicotinamide; Cl = chloro; N3 = azide; and isocyanate NCO =}, and the compounds 4, 5, and 6 were synthesized starting from compounds 1, 2 and 3. In this case, there was a molecular change and the binder was added isonicotinamide the pyridine type, whose structure has high similarity (isomer) and nicotinamide - chemical compound of the vitamin B3 - and which has a role in cellular respiration chain. (Figure 1).

2.2 LM3 murine breast cells

The murine breast tumor cells of the line LM3 were maintained in MEM medium (Sigma Aldrich, USA). Subcultures were performed three times a week.

2.3. Laboratory animals and conditions

For the collection of peritoneal macrophages (PM), were utilized male Balb/c mice, weighing 8-25 g, the Multidisciplinary Center for Biological Research in the Area of Science in Animal Laboratory at UNICAMP (CEMIB) - Campinas (SP). They were maintained into groups of 5 animals in stable environmental conditions (23 $\pm$ 2 ° C and 56 $\pm$ 2% relative humidity) and cycles of light / dark 12 hours. The animals received water and food (Purina) ad libitum, and

according to the protocol of the experiments the animals were sacrificed in a CO₂ chamber. All procedures performed in this work were submitted to the local ethics committee and approved. (CEUA / FCF / CAr No. 25/2012).

2.4. Peritoneal exudate cells (PEC) preparation

The animals were previously stimulated by intraperitoneal inoculation of 3.0 mL of sodium thioglycollate (Difco Lab. Ltd.) 3.0%. Three days before the animals were euthanized in a CO₂ chamber. The skin of the abdominal region was removed with tweezers and scissors, aseptically in Class 100 laminar flow chamber, exposing the peritoneum. Subsequently, 5.0 ml of cold PBS pH 7.2 were inoculated into the abdominal cavity. The resulting peritoneal fluid was collected and transferred to a sterile Falcon tube type with a capacity of 15.0 ml (Corning, Inc.) and centrifuged at 200 g for 10 minutes at 4 ° C (centrifuge FANEM, Ind. Bras.). The cell pellet washed twice with 3.0 mL PBS. After the last wash the cells were resuspended in RPMI-1640 culture-C so as to obtain a cell suspension adjusted to a concentration of 5×10^6 cells after 60 minutes of adhesion, was used to perform the proposed testing. Macrophages obtained from peritoneal exudate were distributed into tissue culture 24-well plates. To each well was added 1.0 mL of cell suspension at 5×10^6 cells / ml and the plates were incubated at 37 ° C for 60 min in an oven having constant strain of 5% CO₂ (Thermo Electron Hepa Class 100). After incubation, non-adherent cells were removed by washing with RPMI-1640).

2.5 MTT assay for LM3 cells and PEC

For the cytotoxicity evaluation, 200 µL samples of LM3 (5×10^6 cells / ml, adjusted in MEM-Complete), were added to each well of a 96-well tissue culture plate (Corning) and then preincubated in the absence of compounds for 24 h to allow adaptation of cells prior to the addition of the test agents. Then, supernatants were removed and 200.0 µL of the compounds were add to each well in concentrations ranging from 0,78 to 100 µg/mL or 200 µL of MEM-Complete as negative control of cytotoxicity. After incubation, the culture medium was discarded and 1.0 ml were added of compounds of palladium (II), 1.0 ml of cisplatin, 1.0 mL of LPS (E. coli lipopolysaccharide obtained from Sigma-Aldrich) 10 mg / mL and 1.0 mL of PMA, Sigma-Aldrich) at 20 ng / ml as positive controls in separate wells and negative control with the C-MEM medium culture. These plates were again incubated at 37 ° C in an oven with constant tension of 5% CO₂ (Thermo Electron Hepa Class 100) for 24 h. After this period the supernatants obtained were centrifuged at 4 ° C for 10 minutes at 35060 xg and stored in a freezer at -80 ° C until the determination of the mediators. 100 µL of solution of

[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) was added in each well containing the samples for the MTT assay of cytotoxicity (8). The same procedure was performed for PM but using RPMI 1640-C as culture medium

2.6. Determination of nitric oxide (NO)

Nitric oxide was analyzed by accumulation of nitrite in the culture supernatant of macrophages by Griess reagent (9). 50 μ L aliquots of the culture supernatants of peritoneal exudate cells were transferred to new culture plate 96 well flat bottom (Corning, Inc.), added to an equal volume of Griess reagent and then incubated for 10 minutes at room temperature and maintained in an environment without light. The absorbance reading was taken spectrophotometer UV / visible microplate (Multiskan Ascent, Labsystems) at 540 nm. The concentration of NO released in the supernatant of cell cultures were calculated from the standard curve established in advance.

2.7. Determination of cytokines in the culture supernatants

The cytokines TNF- α , IL-6, IL-12 and IL-10 were quantified from the culture supernatant of peritoneal macrophages, whereas VEGF was quantified both in the supernatant of cultures of peritoneal macrophages and in the supernatant of cultures of tumor cells - LM3 by immunoenzymatic ELISA test. BD Biosciences Pharmingen kit according to the manufacturer's instructions, were used. The absorbance was read at 450 nm on spectrophotometer UV/visible microplate (Multiskan Ascent, Labsystems), and the concentrations of each cytokine were quantified using standard curve established with known quantities of cytokine patterns. The results were expressed as pg/mL.

2.8 Statistical analysis

The statistical significances of differences between the experimental groups were tested using the Tukey's test and the software program GraphPad Prism version 6.0. A value of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. The reported data are representative of three independent experiments and are presented as the means $\pm$ SD of triplicate observations.

3. Results

3.1 Citotoxicity of palladium II compounds and cisplatin in LM3 cells and PM

In order to compare the action of the compounds of palladium (II), regarding to its antitumor effect, it was used cisplatin as positive control of citotoxicity for testing in PEC and LM3 cell line. The data resulting from this comparison showed that the cisplatin was citotoxic for both cells in a dose-dependent manner, principally above 25 µg/mL, with a citotoxicity less of 50 % (Figure 2). The study of citotoxicity of the six compounds of Palladium II showed that best results regarding citotoxicity in LM3 and non-citotoxicity in macrophages were observed for the compounds 3 and 4 using the lower doses (Figure 3).

Macrophages treated with compound 3 showed 100% cell viability at all concentrations tested, with statistical difference when compared to the result of macrophages with cisplatin. A comparison of viability between cisplatin and compound 3 showed that the cisplatin is apparently more selective for macrophages and less strain for the LM3. Compound 3 is more selective for the LM3 cell line when compared to cisplatin and LM3, with a significant difference at concentrations 25 and 12.5 mg/mL (Figure 4). By the way, the compound 4 showed similar characteristics in comparison with the compound 3, although it exhibited mildly less citotoxicity for LM3 than the compound 3 at the same dose (Figure 5). The best result for this compound was obtained using the concentration of 12.5 mg/mL with 100% viability for macrophages and a high cytotoxicity for LM3. The rate of citotoxicity between PEC/LM3 were superior for both compounds in comparison with cisplatin as evidence of a best antitumor effect and safety. With these results, the following studies were performed using the compounds 3 and 4.

3.4. NO production by peritoneal macrophages

Nitric oxide was measured by accumulation of nitrite in the culture supernatant of PEC using Griess Reagent. In the assessment of NO production, the results show that the cisplatin and compounds 3 and 4 did not stimulated the production of NO. The assay of inhibition of the production previous stimulation with LPS showed that the compound 4 only inhibited the NO production at half using the higher concentration, while cisplatin and compound 3 caused a whole inhibition at the same doses. In doses lower than 6,25 µg/mL, there were not observed inhibition for the both palladium compounds (Figure 5).

3.5. Determination of cytokines in the culture supernatant of macrophages

Compounds 3, 4 and cisplatin were compared to positive control (LPS) and negative (RPMI) in order to evaluate the immunological status of proinflammatory cytokines TNF- α , and IL-6 at different concentrations, and the anti-inflammatory cytokine IL-10. They were measured using standard curves established with standards of known amounts of cytokine. The compound 3 stimulated higher production of TNF- α than the compound 4 in comparison with the cisplatin with the higher stimulation of this cytokine. There was statistical significance between compounds 3 and 4. Also there was statistical significance between the compound 4 and cisplatin. Regarding IL-6 the results showed a low stimulation of their production for the both compounds of palladium and even for cisplatin, although again the compound 4 was the more inhibitory for this cytokine. In the test with IL-10 both compounds as wells as cisplatin showed low stimulation almost similar to negative controls. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine, may act to control inflammation.

3.6. VEGF in macrophages and cell line LM3.

Our results showed a low expression of VEGF after the use of cisplatin, while the compounds 3 and 4 not stimulated the production of VEGF in macrophages. On the other hand in the LM3 cell line the compound 3 caused a significant reduction of this production, while the compound 4 apparently caused a mild stimulation although not statistically significant.

4. Discussion

Cancer is in the first's cause of death worldwide; being the second leading cause of death in industrialized countries after cardiovascular diseases, especially breast cancer by high incidence and mortality rate among women (10). The chemotherapy is one of the pillars in the treatment of cancer. Cis-Diamminedichloroplatinum (II) or cisplatin is a widely used metal-based anticancer drug, useful in the treatment of cancer localized in different organs and tissues, including breast, but due to the toxicity is necessary to use doses above therapeutic (11). Other concern is that cancer cells exhibit an inherent or acquired refractory to platinum, which reduces its efficacy resulting in disease relapse (12). Cisplatin reacts with nucleophilic sites in DNA forming monoadducts as well as intra- and interstrand cross-links, destroying proliferative cells but beyond of their antitumoral effect (13, 14), its administration in humans shows many side-effects such as nausea, anemia, alopecia, nephrotoxicity and neurotoxicity (15).

The limitations of cisplatin have stimulated research in the field of other related metal-based antitumor chemistry by giving specific goals. One of the strategies has focused on changing the type of the metal center using other transition metals such as palladium or nickel (16-21).

Numerous platinum complexes have been synthesized and evaluated for their anticancer activity. However, a few of these complexes have entered clinical trials (16). According to the history of biologically active complexes containing pyridine ligands as well as with cyclopalladated front LM3 lineage action, we aimed to test the organometallic compounds containing in its composition, the pyridine ligand -isonicotinamide.

The results of this study showed that all compounds of palladium (II) tested against tumor line LM3 have selective cytotoxic action at around 25 mg/mL or less. These values are close to or lower than cisplatin. Considering the evaluation of these substances across the peritoneal macrophages can be noted that compound 3 is more selective, since the cell viability for these cells is maintained at 100% even at the concentration of 25 mg/mL, while showed a very high cytotoxicity against LM3 line, with approximately 80% cell death using this concentration.

In terms of cytotoxicity, the compound 4 was comparable to cisplatin when tested against LM3. However, it was less selective producing some grade of cytotoxicity in macrophages in comparison with the compound 3. The compounds 1, 2, 5 and 6 exhibited cytotoxicity under 80 % for macrophages, and it was considered sufficiently toxic. For this reason, the following studies were performed with the compounds 3 and 4, which exhibited the best results in the antitumor selectivity.

It is known that interactions between tumor cells with their microenvironment can affect tumor growth and metastasis formation. The tumor microenvironment may vary among tumor types and stages of the disease, a fact that is complex and consists of many factors and cell types. Among the components of the tumor microenvironment, inflammatory cells and cytokines have been shown to play a key role in cancer. Today is considered the inflammation one of the hallmark of cancer, participating in different events of induction and tumor progression (22). In this way, reducing the inflammatory signals in the tumor microenvironment can be favorable in the success of the therapy. According to this precept, it was evaluated the production of proinflammatory cytokines and NO by macrophages after the exposition to the palladium compounds.

Our results showed that the compounds tested did not stimulate the production of NO in macrophages and just inhibited their production by LPS in the higher doses. NO production is influenced by the presence of inflammatory cytokines. These cytokines are the first signs that communicate the presence of infection and inflammation by activating the immune system in a coordinated manner. Macrophages are the first cells to recognize the invading agent and produce a variety of cytokines, including TNF- α , IL-1 and IL-6 (23). Interrelated with the

cytokine TNF- α are the IL-6 and IL-1 cytokines, and these may act together in a cooperative manner, suggesting that these three cytokines form a network of factors that can affect tumor cell progression cooperatively. Currently, many studies *in vitro* and *in vivo* have advanced the understanding of the involvement of cytokines in oncology. Some cytokines (IL-1, IL-6, IL-11, TGF- β) stimulate while others (IL-12, IL-18, IFNs) inhibit the proliferation and/or invasion of breast cancer (24). In this study was observed that the compounds 3 and 4 favors a microenvironment less inflammatory than cisplatin, and it can be favorable for the antitumor therapy.

Another finding in our study was obtained with the VEGF. This is one of the most potent inducers of vessels in the development factor. It induces endothelial cell proliferation, promotes cell migration and inhibits apoptosis, and as such, is a key player in regulating physiological and pathological angiogenesis (25). Our results show that the compound 3 and 4 did not stimulated the production of VEGF in macrophages. On the other hand in the LM3 cell line the compound 3 caused a significant reduction. Taking into count that intratumor angiogenesis is important for the tumor development, it would be an additional antineoplastic mechanism of this compound.

In resume, our results showed that the compounds 3 and 4 are promising agents for their selective citotoxic effects on tumor cells and low toxicity in macrophages, often equally or superior to cisplatin, in addition to the lower induction of inflammatory cytokines compared with cisplatin and anti-angiogenic properties exhibited. More studies are necessary to evaluate the *in vivo* effect of the compounds 3 and 4.

Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES, Brazil), The Foreigner Visiting Professor Program from CAPES (Grant 07610130), and the Post-graduation Program of Bioscience and Biotechnology Applied to Pharmacy from Pharmaceutical Sciences Faculty, UNESP, Araraquara, SP, Brazil.

6. References:

1. Meric, J.B.; Rottey, S.; Olaussen, K.; Soria, J.C.; Khayat, D.; Rixe, O.; Spano, J.P. *Oncology Hematology*. 59 (2006) 51–64.
2. Jemal, A. *CA Cancer J Clin*, 58 (2008) 71-96.
3. Singletary, S. E.; connolly, J. L. *CA Cancer J Clin*, 56 (2006) 37-47.
4. MA XJ, Dahiya S, Richardson E, et al. *Breast Cancer Res* (2009) 11:R7.
5. Neves, A. P.; Vargas, M. D. *Revista Virtual de Química*, 3 (2011) 196-211.

6. Ananias, S.R.; Santana, A.M.; Mauro, A.E.; De Lucca Neto, V.A.; De Almeida, E.T..
Quim. Nova, 26 (2003) 53-55.
7. Moro, A.C.; Mauro, A.E.; Ananias, S.R. Eclética Química, 29 (2004) 57-61.
8. Mosmann, T. J. Immunol. Methods 65 (1983) 55–63.
9. Green I.C.; Wagner D.A.; Glogowski J.; Skipper P.L.; Wishnok J.S.; Tannenbaum
S.R. Analytical Biochemistry, 126 (1982):131-138.
10. American Cancer Society. Cancer facts and figures. Atlanta, (2009). 60 p. Disponível
em: www.cancer.org
11. Zhang J, Wang Z, Hu X, Wang B, Wang L, Yang W, Liu Y, Liu G, Di G, Hu Z, Wu
J, Shao Z Int J Cancer. (2014) doi: 10.1002/ijc.28966.
12. Li Z, Wu C, Wu J, Ji M, Shi L, Jiang J, Xu B, Yuan J. Oncol Lett. (2014) 8(4):1603-
1607.
13. Marverti G, Cusumano M, Ligabue A, Di Pietro ML, Vainiglia PA, Ferrari
A, Bergomi M, Moruzzi MS, Frassinetti C. J Inorg Biochem. (2008) 102(4):699-712.
14. Monneret C. Ann Pharm Fr (2011) 69: 286-295.
15. Wood PA, Hrushesky WJ.. J Clin Invest. (1995) 95(4):1650-9.
16. Abu-Surrah AS, Kettunen M. Curr Med Chem. (2006) 13(11):1337-57.
17. Moro A.C.; Mauro A.E.; Netto A.V.G.; Ananias S.R.; Quiles M.B.; Pavan F.R.; Leite
C.Q.F.; Horner M.; Carlos, I. Z. European Journal of Medicinal Chemistry (2009):
01-05.
18. Casas JS, Castellano EE, Ellena J, García-Tasende MS, Pérez-Parallé ML, Sánchez
A, Sánchez-González A, Sordo J, Touceda A. J Inorg Biochem. (2008) 102(1):33-45.
19. Tan J, Zhu L, Wang B. From GC-rich DNA binding to the repression of survivin gene
for quercetin nickel (II) complex: implications for cancer therapy. Biometals. (2010)
23(6):1075-84.
20. Atasever B, Ulküseven B, Bal-Demirci T, Erdem-Kuruca S, Solakoğlu Z Invest New
Drugs. (2010) 4:421-32. doi: 10.1007/s10637-009-9272-2.
21. Jagadeesh M, Kalangi SK, Sivarama Krishna L, Reddy AV. Spectrochim Acta A Mol
Biomol Spectrosc. (2014) 24;118:552-6.
22. Hanahan D, Weinberg RA. Cell. (2011) Mar 4;144(5):646-74
23. Arango Duque G, Descoteaux A. Front Immunol. (2014);5:491. doi:
10.3389/fimmu.2014.00491.
24. Bhatelia K, Singh K, Singh R. Cell Signal. (2014) 11:2350-7. doi:
10.1016/j.cellsig.2014.07.035.

325 25. Prager GW; Poettler M; UnseldM; Zielinski Ch C. Transl Lung Cancer Res
326 (2012);1(1):14-25.

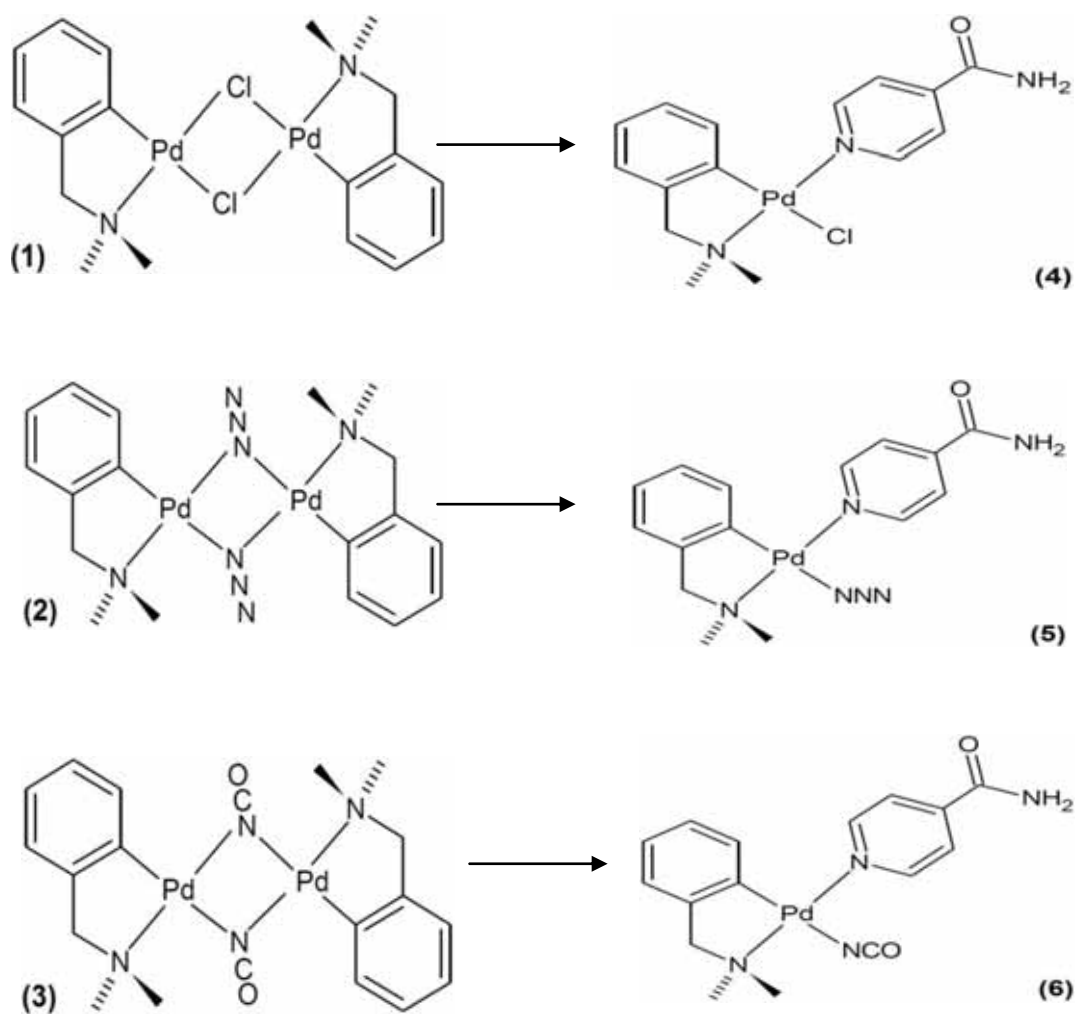


Figure 1. Structure of the Palladium II compounds: [Pd(dmha)(μ-Cl)]₂ (1) and [Pd(dmha)Cl(isn)] (4); [Pd(dmha)(μ-N₃)]₂·H₂O (2) and [Pd(dmha)(N₃)(isn)] (5); [Pd(dmha)(μ-NCO)]₂ (3) and [Pd(dmha)(NCO)(isn)] (6)

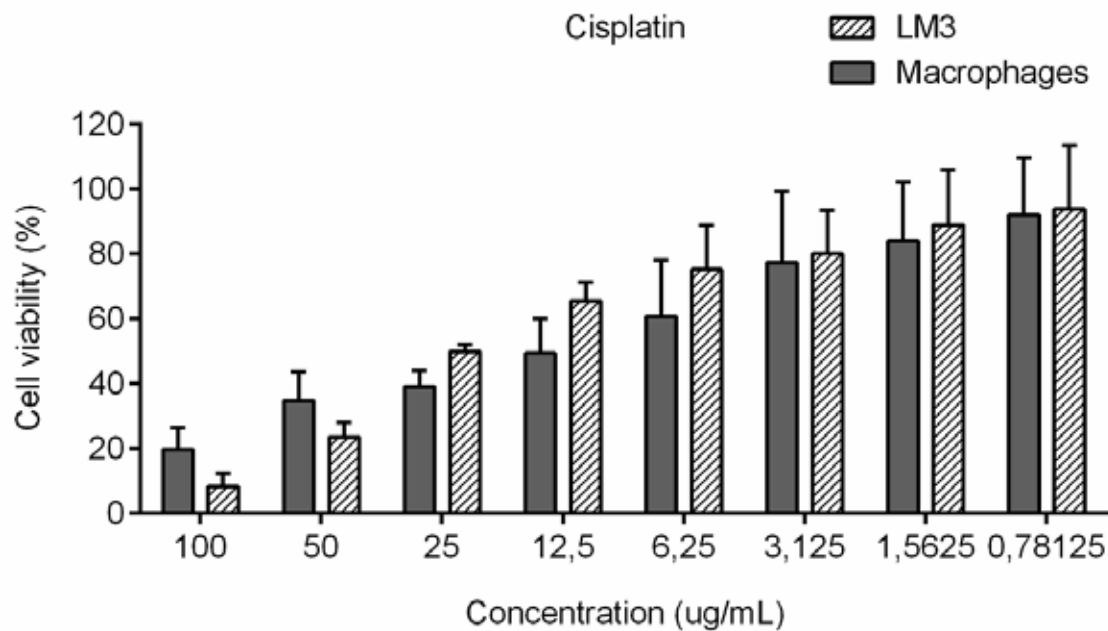


Figure 2. Assessment of the activity of PEC and LM3 cell line treated with cisplatin, representing the percentage of cell viability in the concentrations specified. There was no statistically significant difference.

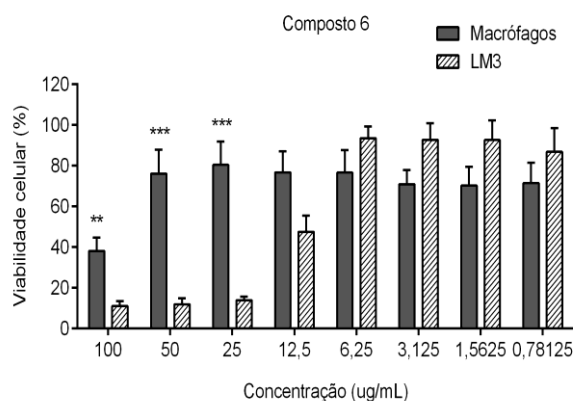
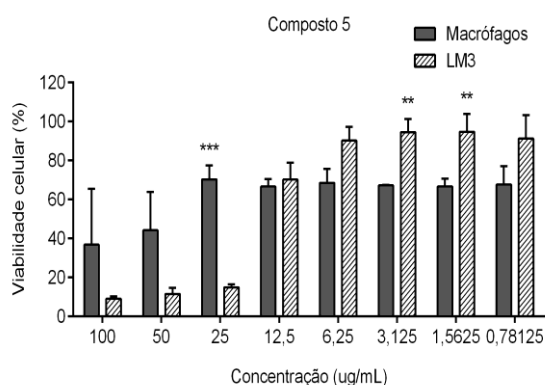
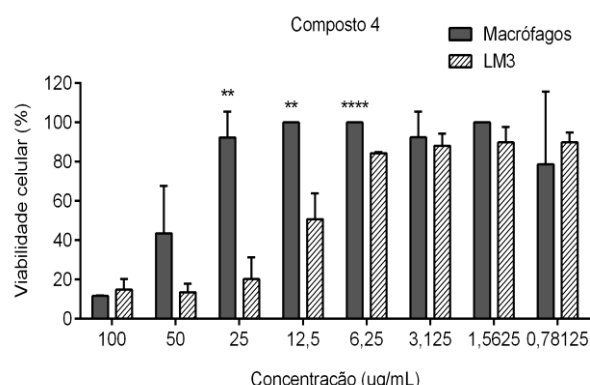
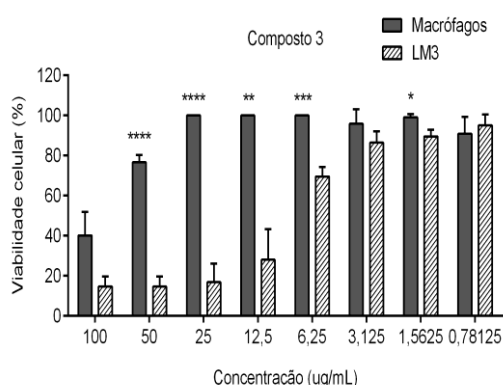
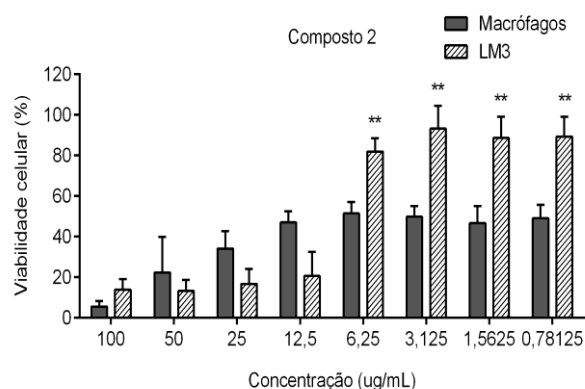
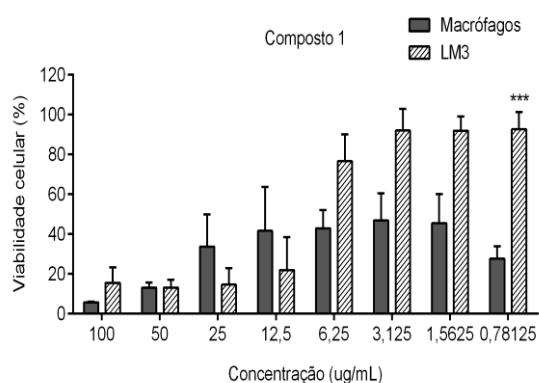


Figure 3. Viability of macrophages and cell line LM3 treated with: A) $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-Cl})_2]$ (1); B) $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-N}_3)]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2); B) the compound $[\text{Pd}(\text{DMBA})(\mu\text{-NCO})]$; C) $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-NCO})]_2$ (3); $[\text{Pd}(\text{dmba})\text{Cl}(\text{ISN})]$ (4); $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{N}_3)(\text{isn})]$ (5); $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{NCO})(\text{isn})]$ (6). The statistical significance is represented on the difference between the macrophages and LM3 cell line cultured in the presence of the Palladium's compounds (1-6) at each concentration, **** $p < 0.0001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$

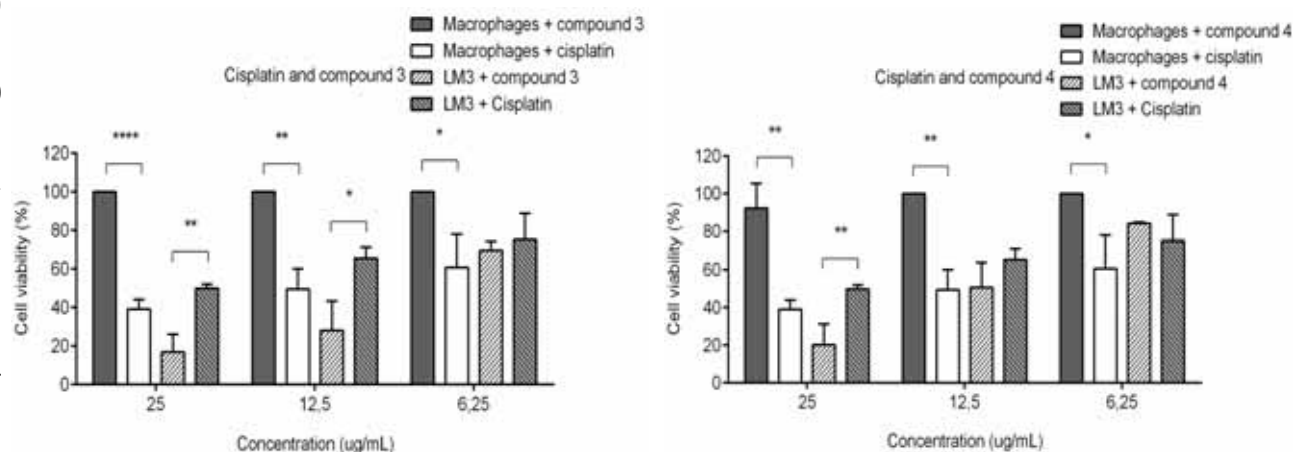


Figure 4. Comparative viability of macrophages and cell line LM3 treated with A) the compound [Pd (DMBA) (μ -NCO)]₂ (3); and cisplatin; B) the compound Pd(dmba)Cl(ISO)] (4) and cisplatin. Bars represent percentage of cell viability in the concentrations specified. The statistical significance is represented on the difference between the macrophages cultured in the presence of cisplatin and compound 3 at each concentration, LM3 cell line cultured in the presence of cisplatin and compound 3. **** p < 0.0001; ** P < 0.01; * P < 0.05

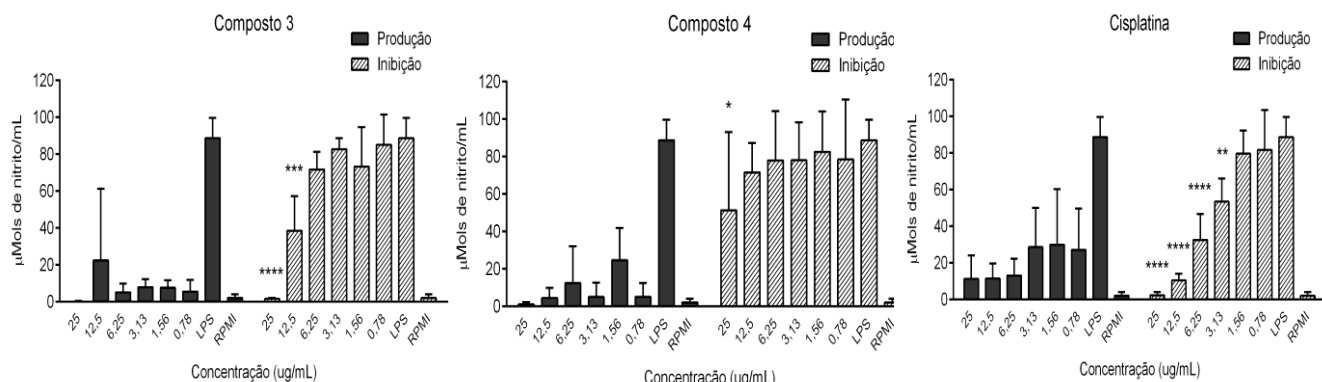


Figure 5. NO production/inhibition by compounds 3, 4 and cisplatin, tested in peritoneal macrophages testing the **** p <0.0001.; *** p <0.001; ** p <0.01; * p <0.05.

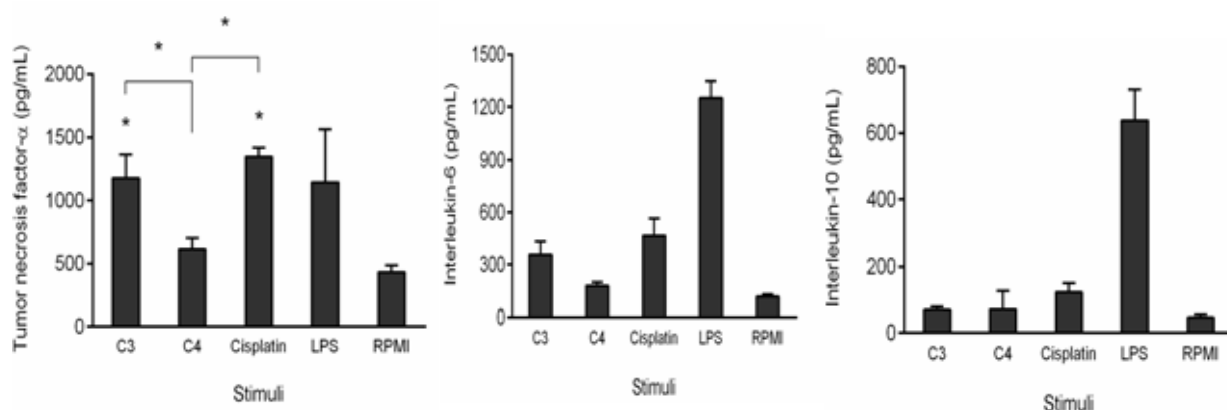


Figure 6. Immunological profile of TNF-α, IL-6 and IL-10. The bars represent the expression of compound 3, 4, and cisplatin. It was used LPS as positive control and RPMI as negative control, * p <0.01.

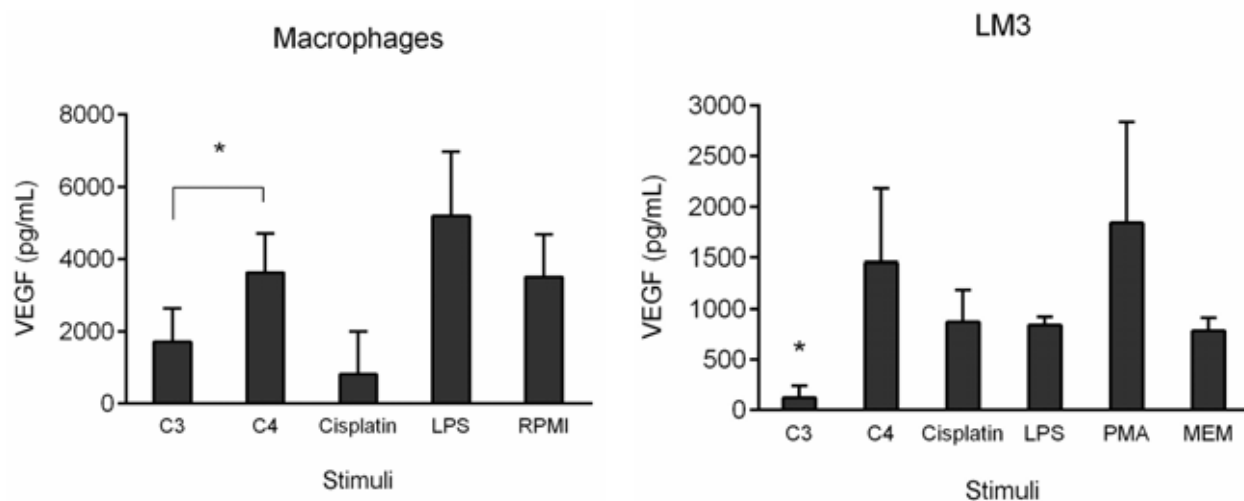


Figure 7. Production of VEGF in macrophages and LM3 after the use of [Pd (DMBA) (μ -NCO)]₂ (3); Pd(dmba)Cl(ISN)] (4) and cisplatin. It was used LPS as positive control and RPMI as negative control, * $p < 0.01$.