



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia

Avaliação toxicogenética e atividade antitumoral *in vitro* de complexos heterolépticos de Rutênio(II): Atividades citotóxicas, genotóxicas e interação com biomoléculas

RONE APARECIDO DE GRANDIS

ARARAQUARA - SP
2016



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia

Avaliação toxicogenética e atividade antitumoral *in vitro* de complexos heterolépticos de Rutênio(II): Atividades citotóxicas, genotóxicas e interação com biomoléculas

RONE APARECIDO DE GRANDIS

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, Área: Mutagênese

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda

ARARAQUARA - SP
2016

Ficha Catalográfica

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

D321a De Grandis, Rone Aparecido
Avaliação toxicogenética e atividade antitumoral *in vitro* de complexos heteroléticos de Rutênio(II): atividades citotóxicas, genotóxicas e interação com biomoléculas / Rone Aparecido De Grandis. - Araraquara, 2016
89 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: Eliana Aparecida Varanda

1. Complexos de rutênio. 2. Genotoxicidade. 3. Antitumoral. 4. Permeação *in vitro*. I.
Varanda, Eliana Aparecida , orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Dedico este trabalho...

À minha orientadora Profª. Dra. Eliana Aparecida Varanda,

Pelo mérito que lhe é devido por tantos anos dedicados ao exercício da docência, à tarefa incansável da pesquisa acadêmica e ao trabalho na gestão universitária. Presto esta singela homenagem, como faria a minha própria mãe, já que ambas são, para mim, um exemplo de conduta a seguir. À senhora, serei eternamente grato pela imensa alegria no convívio ao longo desses anos, pelo carinho e dedicação que teve ao me orientar nesse trabalho e em tantas outras realizações.

Agradeço também, pela honra que me concede em ser o último aluno orientado, dentre tantos que fizeram parte de sua brilhante carreira. Hoje, ao final deste ciclo, em nome de todos os seus alunos, querida professora, agradeço por sua persistência, pela vontade de querer nos fazer pessoas melhores, pela transmissão do conhecimento, pela dedicação, pelo profissionalismo, pelo divertimento, pela competência, pela educação, por ter sido realmente professora!

Nunca me esquecerei da sua primeira aula (transposons, plasmídeos e DNA bacteriano), da sua primeira prova (tão temida prova), nem mesmo do comentário que fez sobre meu desempenho nela! Dali em diante, ouvindo seus ensinamentos, minha admiração pela senhora só aumentou. A gratidão por me proporcionar o desenvolvimento deste trabalho de mestrado, ainda como aluno de graduação, será eterna! A senhora sempre foi para mim, um farol orientador, um ponto de referência no meu caminhar, que sempre respeitou meus próprios caminhos. Foi o ombro materno que me acolheu quando tudo parecia estar confuso. Nas nossas conversas, seus ensinamentos ultrapassaram os muros da faculdade, foram lições que levarei para a vida.

Parabéns pela excepcional profissional e pelo extraordinário trabalho que prestou a esta universidade. Seu legado será eterno!

Aos meus pais Aparecido e Izilda,

Agradeço por terem me ensinado com grandiosidade e simplicidade que na vida não existe verdadeira vitória sem esforço e sacrifício. Vocês sempre me mostraram que ser humilde é a melhor escolha, assim sempre saberemos que ainda precisamos aprender muito, lutar muito, estudar muito, suar muito para conseguir alcançar o que desejamos.

Obrigado por me aceitarem como sou, por respeitarem minha liberdade e minhas escolhas, por terem me dado as asas com as quais posso voar e por serem o colo quentinho que posso sempre contar, o melhor aconchego!

Agradecimentos

Junto com a conclusão deste trabalho, finalizo um ciclo muito importante na minha vida, um ciclo marcado por calorosos momentos na cidade “morada do sol”. Aqui, o tempo passou, mas não foi embora sem deixar história. Ao longo desses anos, em muitas situações, contei com pessoas insubstituíveis ao meu lado, que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho. À essas pessoas, que estiveram presentes nos momentos de dificuldade e alegria da minha vida em Araraquara, deixo registrado meus agradecimentos:

Agradeço primeiro a Deus por manter ao meu lado as pessoas que amo e que são importantes na minha vida.

À minha família, por seus gestos solidários, pelo amor e carinho que me ensinaram os limites da vida, por ter investido e acreditado sempre na educação e me incentivado a trilhar os caminhos do conhecimento.

À minha orientadora, Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda, pelas muitas oportunidades oferecidas e por toda a confiança em mim depositada.

À todos os amigos do Laboratório de Mutagênese, Flávia, Mariana, Débora, Márcio, Livia e Caterine. Obrigado a todos pela recepção amigável e pela ajuda nas atividades do laboratório.

Às amigas da faculdade, Flávia, Larissa, Mariane e Roberta por toda a alegria do convívio diário, brincadeiras e companheirismo. Obrigado por manterem a estabilidade da nossa amizade tão forte.

Aos amigos do coração, Érica e Flávia, amigas de tantos anos, e Wellington, agradeço muito a ajuda no laboratório e fora dele, o amor e carinho incondicionais e o apoio nos momentos bons e nem tão bons desse tempo que passou, agradeço por terem sido minha família em Araraquara e por manterem tão forte esse sentimento que nos une. Amo vocês!

Aos meus queridos professores da graduação, Dra. Márcia da Silva (*in memoriam*), Dra. Mara Pinto, Dr. Sandro Valentini, Dra. Patrícia Mastroiani, Dra. Hérica Salgado, Dr. Jean dos Santos e Dra. Rosângela Peccinini, pelas brilhantes aulas que se tornaram os momentos de maior aprendizado acadêmico durante a faculdade.

À Jornada Farmacêutica da UNESP, que foi o local onde eu pude treinar diversas competências pessoais. Agradeço especialmente a 61ª Gestão que me deu o prazer de realizar um evento excepcional.

Aos meus alunos e à coordenação do CUCA-UNESP, pelos 3 anos de troca de experiências e pela oportunidade de aprender ensinando.

Aos funcionários da FCF, Silva Helena e Margareti Rossi do Departamento de Ciências Biológicas, Alexandre Pazoti e Helenisa Hudari da Seção Técnica de Graduação, Cláudia Molina e Daniela Tita da Seção Técnica de Pós-graduação, Sebastiana Cândida da portaria, Max Brandão e Lívia Laila da Biblioteca, meu muito obrigado pela ajuda mais do que profissional nas suas respectivas competências.

Aos professores, Dr. Roberto Santana da Silva e Dra. Denise Tavares, por suas riquíssimas colocações durante o exame geral de qualificação, e a Dra. Patrícia Bento pela gentileza em ler esse texto.

Aos Membros da Banca Examinadora, por sua disposição e paciência em analisar este trabalho e trazer contribuições preciosas para sua finalização.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp 2012/22364-1) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes 03/2014) pelo apoio financeiro.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, UNESP, por ter sido local de grande aprendizado nesses anos, tornando-se minha verdadeira morada em Araraquara, um lugar que aprendi a amar e que fará muita falta. Um até logo!

A todos que foram importantes direta ou indiretamente na construção deste trabalho,

Meu mais sincero obrigado!

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade. A dor é inevitável. O sofrimento é opcional.”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Os ensaios de toxicologia genética são utilizados como base no desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que podem identificar rapidamente agentes que causam danos ao material genético. Agências regulatórias preconizam a utilização de ensaios que identificam danos genotóxicos, de forma que possam servir como triagem de processos que levam à carcinogênese. Na busca por novos fármacos, a química inorgânica medicinal representa um campo de grande promessa, com potencial de expansão devido a diversidade química e reatividade dos metais. Especialmente, os complexos de rutênio, têm recebido destaque no tratamento de doenças como o câncer e a tuberculose multi-droga resistente (TB-MDR). Neste contexto, este trabalho teve como objetivo, avaliar os efeitos toxicogenéticos e antitumorais de três complexos de rutênio(II), com promissora atividade anti-TB-MDR, denominados de SCAR 4, SCAR 5 e SCAR 6 e, diante da importância do conhecimento farmacocinético de novos fármacos, outro objetivo foi avaliar a permeabilidade *in vitro* desses complexos. A avaliação toxicogenética foi realizada por meio dos ensaios de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) e pelo ensaio do micronúcleo citoma com bloqueio da citocinese (CBMN-cit) em ausência e em presença do sistema de metabolização. Ensaios de sobrevivência clonogênica foram utilizados para avaliar a viabilidade das células CHO-K1 e HepG2, utilizadas no ensaio do CBMN-cit. A avaliação da atividade antitumoral foi investigada por meio de ensaios de citotoxicidade frente às linhagens tumorais humanas Caco-2, DU-145, HeLa, HepG2 e MDA-MB-231, pela capacidade de inibição da topoisomerase I humana (Top IB) e por ensaios físico-químicos de interação com o *calf thymus* DNA (ct-DNA). A permeabilidade foi analisada por meio do ensaio *in vitro* de permeação em monocamadas de células Caco-2 na presença e ausência de albumina do soro bovino (BSA). A interação dos complexos com albumina foi analisada por meio da medida da supressão da fluorescência dos resíduos de triptofano da BSA. Os resultados mostraram que apenas o complexo SCAR 6 apresentou efeito mutagênico, observado no Teste de Ames e no CBMN-cit e, em ambos os modelos, o efeito foi apresentado apenas quando o complexo fora submetido a sistemas metabolizadores. Na avaliação da citotoxicidade frente às linhagens tumorais, todos os complexos se mostraram seletivos contra as linhagens de câncer de próstata e mama, com destaque para o complexo SCAR 6, que se apresentou seletivo em quatro diferentes linhagens celulares tumorais. Por outro lado, o complexo SCAR 5 foi altamente ativo na inibição da Top IB, seguido do complexo SCAR 4. Ensaios físico-químicos apontaram os efeitos de interação dos complexos com o ct-DNA, confirmando a capacidade do complexo SCAR 6 se ligar ao DNA de forma covalente, enquanto SCAR 4 e 5 apresentaram um perfil de interação eletrostática com o ácido nucleico. SCAR 4 e 5 também apresentaram alta permeabilidade aparente (*Papp*) *in vitro*. O complexo SCAR 6 apresentou baixa *Papp*, sobretudo com a adição de BSA no tampão de permeabilidade, provavelmente devido a alta afinidade pela albumina apresentada nos ensaios de interação com a BSA, onde, os complexos SCAR 4 e 5, apresentaram constante de ligação moderada. Nossos estudos mostraram que os complexos SCAR 4, 5 e 6 apresentam uma afinidade relevante por biomoléculas como DNA, Top IB e albumina. A interação, mesmo que ainda pouco elucidada por esses alvos biológicos, pode sugerir a aplicação terapêutica desses complexos de rutênio, seja interrompendo vias bioquímicas, causando danos no DNA ou, inclusive, interagindo de forma sinérgica, promovendo terapias mais seguras e eficazes.

Palavras-chave: complexos de rutênio, genotoxicidade, antitumoral, permeação *in vitro*.

ABSTRACT

The genetic toxicology assays are used as the basis in the development of new drugs since it's may rapidly identify agents that cause damage to the genetic material. Regulatory agencies have recommend the use of assays that identify genotoxic effects, thus they may serve as a screening processes that lead to carcinogenesis. In the search of new molecules for therapeutic purposes, medicinal inorganic chemistry is a major promise of the field, with potential expansion due to chemical diversity and reactivity of metals. Especially, ruthenium complexes, have been highlighted in the treatment of growing diseases such as cancer and multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB). In this context, this study aimed to evaluate the toxicogenetic effects of three ruthenium(II) complex, that showed promising anti-MDR-TB activity, called SCAR 4, SCAR 5 and SCAR 6. In addition to this safety profile, and cosidering the traditionally antitumor activity of ruthenium complexes, this study also aimed to evaluate the antitumor activity of these complexes. In front of the importance of pharmacokinetic knowledge of new drugs, another aim of this study was to evaluate the *in vitro* permeability of these complexes. The toxicogenetics evaluation was performed by reverse gene mutation assays with *Salmonella typhimurium* (Ames test) and by Cytokinesis-block micronucleus cytome assay (CBMN-cyt). In both assays, we used models to assess the effect of complexes's metabolization. The clonogenic survival assays were used to assess the viability of HepG2 and CHO-K1 cells, that it has been used in CBMN-cyt assay. The evaluation of the antitumor activity was investigated by means of cytotoxicity assays with the human tumor cell lines Caco-2, DU-145, HeLa, HepG2 and MDA-MB-231, by the ability to inhibit human topoisomerase I (Top IB) and physico-chemical assays of interaction with the thymus calf DNA (ct-DNA). The permeability was examined by means of *in vitro* permeation assay with Caco-2 cell monolayers in presence and absence of Bovine Serum Albumin (BSA). The interaction of the complex with albumin was analyzed by measuring the suppression of the fluorescence of tryptophan residues from BSA. In genotoxicity evaluation, only SCAR 6 complex showed mutagenic effect. This effect was observed in the Ames test and the CBMN-cyt and, in both models, the effects were observed only when the complex was subjected to metabolizers systems. In cytotoxicity evaluation, all the complexes showed selective index against prostate and breast cancer cell lines, especially SCAR 6, which was selective in four different tumor cell lines. Moreover, the SCAR 5 complex was highly active in inhibiting Top IB, followed by SCAR 4. Physico-chemical assays showed the effects of interaction of the complexes with ct-DNA, confirming the capacity of SCAR 6 to bind covalently to DNA, while SCAR 4 and 5 showed an electrostatic interaction profile with DNA. SCAR 4 and 5 also showed high apparent permeability (*Papp*) *in vitro*. The SCAR 6 complex showed low *Papp*, especially with the addition of BSA in the permeability buffer, probably due to the high affinity for albumin presented in interaction assays with BSA, where the complexes SCAR 4 and 5 have showed moderate binding. Our studies showed that SCAR 4, 5 and 6 have presented a relevant affinity for biomolecules such as DNA, Top IB and albumin. The interaction, even middling elucidated, by these biological targets, may suggest the therapeutic application of these ruthenium complexes, such as disrupting biochemical pathways, causing DNA damage, or even interacting synergistically, promoting more safer and effective therapies.

Keywords: ruthenium complexes, genotoxicity, antitumor, *in vitro* permeation.

Lista de Abreviaturas e Siglas

Abreviaturas	
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina do Soro Bovino
Caco-2	Adenocarcinoma coloretal humano
CBMN-cit	Ensaio do micronúcleo citoma com bloqueio da citocinese
CHO-K1	Células de ovário de hamster chinês
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CO₂	Dióxido de carbono
ct-DNA	DNA de <i>calf thymus</i>
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DU-145	Carcinoma de próstata humano
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HeLa	Adenocarcinoma cervical humano
HEPES	Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfônico
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSA	Albumina do Soro Humano
IC₅₀	Concentração Inibitória de 50%
IS	Índice de Seletividade
Log P	Logaritmo de lipofilicidade
MDA-MB-231	Adenocarcinoma mamário humano
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MRC-5	Fibroblastos normais de pulmão humano
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
Papp	Coeficiente de Permeabilidade Aparente
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico
RET	Resistência Elétrica Transepitelial
RNA	Ácido ribonucleico
SCAR	Complexos de Rutênio(II) fosfina/diimina/picolinato
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
SFB	Soro Fetal Bovino
SWV	Voltametria de Onda Quadrada
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose multi-droga resistente
TB-XDR	Tuberculose extensivamente-droga resistente
Top IB	DNA-Topoisomerase I humana
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

Lista de ilustrações

Figura 1. Principais adutos formados através da interação da cisplatina com o DNA.....	19
Figura 2. Distribuição seletiva preferencial de íons de rutênio por meio da transferrina.	21
Figura 3. <i>Pipeline</i> de desenvolvimento de fármacos anti-TB.	24
Figura 4. Estrutura dos complexos SCAR.....	31
Figura 5. Representação das diferentes linhagens celulares humanas utilizadas para avaliar a atividade citotóxica dos complexos SCAR.	33
Figura 6. Representação esquemática da microplaca de 96 poços no ensaio de citotoxicidade da resazurina.....	35
Figura 7. Esquema da monocamada de células Caco-2 cultivadas em suporte de membrana permeável, empregado em estudos de permeabilidade <i>in vitro</i>	39
Figura 8. Relaxamento do DNA plasmidial superenovelado pela Top IB na presença de crescentes concentrações do complexo SCAR 4.	47
Figura 9. Relaxamento do DNA plasmidial superenovelado pela Top IB na presença de crescentes concentrações do complexo SCAR 5.	47
Figura 10. Ensaio de relaxamento da Top IB em contato com os com complexos SCAR 4, 5 e 6 e com o DNA.....	48
Figura 11. Relaxamento do DNA plasmidial superenovelado pela Top IB ao longo do tempo..	49
Figura 12. Voltagramas de onda quadrada de 1.0 mM dos complexos SCAR 4, 5 e 6 no eletrodo de carbono vítreo em tampão Tris-HCl (pH 7,4)	50
Figura 13. Efeito da concentração dos complexos SCAR e da cisplatina na viscosidade do ct-DNA a 298K.....	51
Figura 14. Cromatogramas de injeções de solução branco (tampão de permeabilidade) e das soluções dos complexos SCAR 4, 5 e 5 em tampão de permeabilidade no pH 7,4.	52
Figura 15. (A) Valores de RET obtidos com as membranas de células Caco-2 aos 10, 15 e 21 dias de cultivo em meio DMEM com pH 7,4 e (B) nas condições do ensaio de permeabilidade do complexo SCAR 5 no início (T15) e no fim (T180) do experimento.	54
Figura 16. Fotomicrografia de células Caco-2 em diferentes pontos após o subcultivo a uma densidade de $5,0 \times 10^4$ células/cm ²	55

Lista de Tabelas

Tabela 1. Condições cromatográficas utilizadas no método de quantificação.	41
Tabela 2. Substâncias utilizadas na curva para a determinação do log P	43
Tabela 3. Média dos valores de IC ₅₀ e IS dos complexos SCAR 4, 5 e 6 e da cisplatina nas linhagens celulares tumorais Caco-2, DU-145, HeLa, HepG2, MDA-MB-231 e na linhagem celular normal MRC-5, avaliada pelo ensaio redox da resazurina	46
Tabela 4. Linearidade dos analitos avaliados.....	53
Tabela 5. Valores de log P e <i>P_{app}</i> para o transporte apical-basal dos complexos SCAR em monocamadas de células Caco-2 na ausência (-) ou na presença (+) de 4% de BSA no compartimento basolateral ^a	56
Tabela 6. Resultados obtidos para a constante K _{sv} e K _q dos complexos SCAR 4, 5 e 6	56
Tabela 7. Valores obtidos de K _b e n para os complexos SCAR 4, 5 e 6	58
Tabela 8. Valores encontrados para os parâmetros termodinâmicos apresentados pelos complexos SCAR 4, 5 e 6	59

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Química Inorgânica Medicinal	16
1.2. Complexos de Rutênio	19
1.3. Pesquisa de novos agentes terapêuticos com Rutênio	22
1.3.1. Terapia contra a Tuberculose	23
1.3.2. Terapia contra o Câncer	25
1.4. Desenvolvimento de novos agentes terapêuticos de rutênio: Interação com biomoléculas	27
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivos Gerais	29
2.2. Objetivos Específicos	29
2.2.1. Avaliação Toxicogenética	29
2.2.2. Avaliação Antitumoral	29
2.2.3. Avaliação da Permeabilidade <i>in vitro</i>	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Síntese dos complexos	31
3.2. Avaliação do potencial toxicogenético <i>in vitro</i>	31
3.3. Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i>	32
3.3.1. Ensaios de citotoxicidade frente a linhagens tumorais	32
3.3.2. Teste de inibição da topoisomerase I humana	35
3.3.3. Ensaios de interação com o <i>calf-thymus</i> DNA	37
3.4. Avaliação da Permeabilidade <i>in vitro</i>	38
3.4.1. Cultivo das células Caco-2	38
3.4.2. Ensaio de permeabilidade <i>in vitro</i>	39
3.4.3. Análise das amostras por CLUE	40
3.4.4. Coeficiente de Permeabilidade Aparente	42
3.4.5. Determinação do log P	42
3.4.6. Ensaio de interação com a Albumina do Soro Bovino	43
4. RESULTADOS	44
4.1. Avaliação do potencial toxicogenético <i>in vitro</i>	44
4.2. Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i>	44
4.2.1. Citotoxicidade frente a linhagens tumorais	45
4.2.2. Inibição da topoisomerase I humana	46
4.2.3. Interações com o <i>calf-thymus</i> DNA	49
4.4. Avaliação da Permeabilidade <i>in vitro</i>	51
4.4.1. Validação dos métodos analíticos	51
4.4.2. Avaliação da integridade de membranas de células Caco-2 por meio da Resistência Elétrica Transepitelial	53
4.4.3. Permeabilidade dos complexos SCAR através das células Caco-2	55

4.4.4. Cálculo do log P	56
4.4.5. Interação com a Albumina do Soro Bovino	56
5. DISCUSSÃO	60
5.1. Avaliação do potencial toxicogenético <i>in vitro</i>	60
5.2. Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i>	60
5.3. Avaliação da permeação <i>in vitro</i>	66
6. CONCLUSÃO	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
 CAPÍTULO II	 91
PUBLICAÇÕES REFERENTES AO TRABALHO	

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

O aumento do número de moléculas farmacologicamente ativas, descobertas e lançadas no mercado, a partir do início do século passado, mostrou que a falta de controle na deliberação de novos fármacos pode causar efeitos colaterais graves, podendo desencadear processos como a carcinogênese e a teratogênese (Tilmant et al., 2013). Mesmo com a melhor compreensão da biologia celular e molecular, o desenvolvimento de fármacos mais seguros ainda é limitado, principalmente devido aos métodos inequívocos que preveem a eficácia e segurança desses medicamentos (Dueñas-Gonzalez et al., 2014).

Grande parte do perfil de segurança de novas moléculas é resultado de estudos de toxicologia genética, os quais podem identificar danos causados ao DNA e mesmo, quantificá-los, de forma que seu estudo torna-se importante na prevenção do desenvolvimento de cânceres além de outras doenças degenerativas (Custer & Sweder, 2008). Na busca por fármacos mais seguros, agências como o FDA e a OECD, têm padronizado constantemente protocolos para a avaliação da segurança de novos fármacos.

Dentro dos ensaios pré-clínicos de segurança, a avaliação *in vitro* da mutagenicidade por meio de testes de mutação gênica reversa em bactéria e da mutagenicidade em células de mamíferos são considerados obrigatórios por fornecerem dados confiáveis, para dar subsídios às futuras pesquisas clínicas (OECD, 1997, 2014; FDA, 2012).

As avaliações *in vitro* dos danos genotóxicos vêm de encontro do panorama internacional que fomenta o princípio dos 3Rs (*replace, reduce, refine*) no uso de animais, fortalecidos pelo fato de resultados positivos em ensaios *in vitro* no Teste de

Ames se correlacionarem com a carcinogenicidade em roedores. Desta forma, resultados negativos ou de baixo risco em modelos *in vitro* poderiam evitar o seguimento em ensaios *in vivo* (Aardema, 2013; OECD, 2014)

Portanto, mecanismos de mutagênese e carcinogênese podem estar intrinsicamente ligados, havendo significativa associação entre respostas positivas em testes de toxicologia genética e carcinogenicidade. No teste de Ames, por exemplo, mundialmente reconhecido como ferramenta fundamental na triagem de compostos potencialmente genotóxicos, a concordância entre resultados positivos no ensaio e a carcinogenicidade em roedores pode ser de aproximadamente 90%, dependendo do grupo químico (Claxton et al., 1998; ICPEMC, 1988).

A mutação é uma consequência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (Ribeiro et al., 2003). Assim, estudos que apontem possíveis danos ao material genético podem ser usados para a prevenção de riscos à saúde.

Por outro lado, mecanismos específicos de danos ao DNA de células tumorais, podem ser utilizados no combate a tumores, uma vez que fármacos potencialmente mutagênicos desempenham um papel estabelecido na quimioterapia contra o câncer, apesar de suas implicações genotóxicas ao longo prazo (Ferguson & Pearson, 1996).

1.1. Química Inorgânica Medicinal

A química inorgânica medicinal foi inicialmente alimentada pela descoberta da cisplatina, cerca de 50 anos atrás. Desde sua aprovação como agente quimioterapêutico, a cisplatina ainda é um dos fármacos anticâncer mais utilizados no mundo, principalmente para o tratamento de câncer de ovário, cabeça e pescoço,

bexiga, câncer cervical e linfomas (Van Rijt & Sadler, 2009). Por muitos anos foi considerada como o fármaco mais promissor para a terapia anticâncer, recebendo o título de “fármaco do século 20” (Gómez-Ruiz et al., 2012)

No entanto, todo esse entusiasmo foi substituído por dados desanimadores sobre sua toxicidade. Foram verificados efeitos adversos graves, como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, além de baixa biodisponibilidade e desenvolvimento de resistência, o que restringe seu uso a alguns protocolos (Giaccone, 2000; Gómez-Ruiz et al., 2012; Liu et al., 2015)

No entanto, ainda bem antes da descoberta da cisplatina, há quase 3500 anos atrás, os metais têm sido utilizados para fins terapêuticos pela medicina chinesa e árabe. Há relatos da utilização do cobre para esterilizar a água, do zinco para a cicatrização de feridas e de bebidas com ouro conhecidas como elixir da longa vida (Orvig & Abrams, 1999).

Muito depois, no século 19, Roberto Kock demonstrou os efeitos de sais de ouro contra o *Mycobacterium tuberculosis*, sendo amplamente utilizados para o tratamento da tuberculose até o início do século 20. Em 1930, a aurofina, foi popularizada para o tratamento da artrite reumatóide (Berners-Price & Filipovska, 2011; Shaw, 1999)

Na terapia contra *Helicobacter pylori*, os complexos de bismuto (De-nol[®] e Pylorid[®]) representam um dos principais protocolos contra a gastrite, assim como o lítio (Carbolitium[®]) é indicado no tratamento de episódios maníacos nos transtornos bipolares e o nitroprussiato de sódio, um complexo de ferro(III) (Nipride[®]), é eficaz no tratamento da hipertensão (Aime et al., 2006; Baldessarini & Tondo, 2000).

Outros exemplos importantes são utilizados no diagnóstico patológico, como o uso de radiofármacos de tecnésio para a detecção de traumatismo cerebral e perfusão prostática (Ceretec[®]) e complexos de gadolínio(III) para o diagnóstico de

anormalidades no cérebro (Abele et al., 2015).

Mesmo fármacos de molécula orgânica podem ter sua eficiência melhorada quando complexados com metais. Por exemplo, o ibuprofeno, coordenado ao zinco é mais efetivo como anti-inflamatório do que o ligante isolado, e acredita-se que o antitumoral bleomicina leve a quebra do DNA, devido à ação do complexo de ferro(III) via ativação do oxigênio (Bincoletto et al., 2005).

Enfim, os elementos inorgânicos desempenham um papel crucial nos processos biológicos e biomédicos.

Outros metais, como por exemplo: cobre, ferro e zinco, além de serem essenciais para funções vitais, também podem modificar a ação de alguns fármacos, alterando a sua ação devido à geração de um complexo metálico que é formado no meio biológico (Ronconi & Sadler, 2007).

Outros, considerados não essenciais, como o ouro, platina e rutênio, são metais de transição extremamente importantes na química medicinal.

Destes, os complexos de platina e rutênio possuem atividades biológicas semelhantes, isto é, podem se ligar ao DNA (preferencialmente a resíduos de guanina), e dependendo do seu estado de oxidação e da atividade dos ligantes, tornarem-se candidatos promissores para a terapia anticâncer (Broderick & Coucouvanis, 2003).

A interação que complexos de platina possuem com o DNA, leva a distorção da molécula e conseqüentemente quebra. Assim chamados agentes alquilantes, são capazes de substituir em outra molécula, um átomo de hidrogênio por um radical alquil e dessa forma, se ligam ao DNA de modo a impedir a separação das fitas, fenômeno este indispensável para a replicação (Figura 1) (Kelland, 2007; Sikov, 2015)

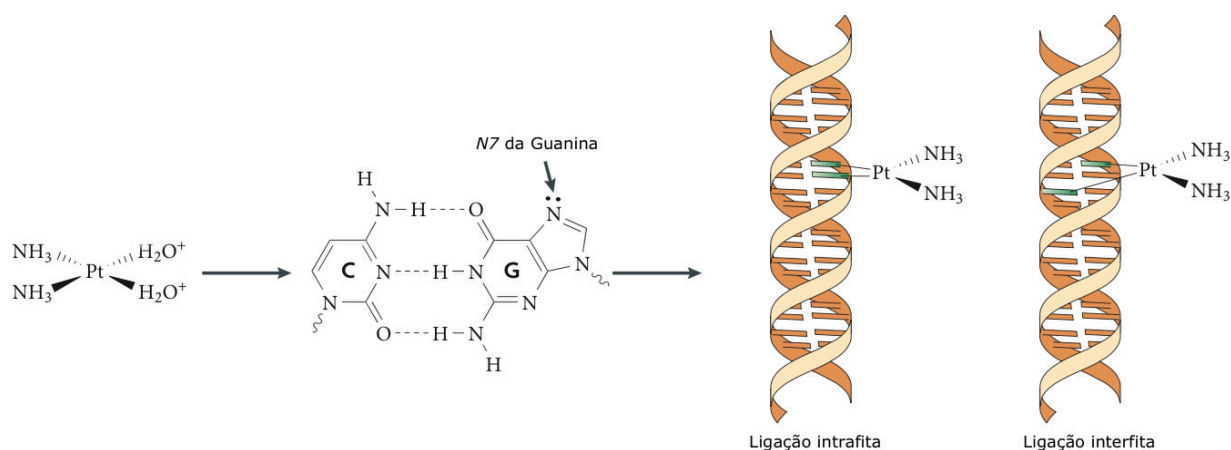


Figura 1. Principais adutos formados através da interação da cisplatina com o DNA. A molécula hidrolisada pode causar interação 1,2-intrafita ou 1,3-interfitas. Adaptados de Kelland, 2007.

Contudo, sua inespecificidade se dá por afetar as células em todas as fases do ciclo celular (Van Rijt & Sadler, 2009; INCA, 2014)

Na busca por fármacos mais seletivos, outros centros metálicos, em substituição à platina, têm atraído o interesse de pesquisadores (Muhammad & Guo, 2014; Ott & Gust, 2007; Zhang & Lippard, 2003)

Algumas características têm sido investigadas, com o intuito de se alcançar efeitos farmacológicos mais eficazes e efeitos toxicológicos mais seguros. Dentre elas, pode-se destacar a presença de sítios de coordenação adicionais, mudanças no estado de oxidação, alterações na afinidade do ligante pelo metal e a possibilidade de utilização da terapia fotodinâmica (Albani et al., 2014; Presa et al., 2015).

Nessas circunstâncias, deu-se início ao estudo de complexos de rutênio como possíveis agentes antitumorais.

1.2. Complexos de Rutênio

O rutênio como a maioria dos metais, pode formar cátions deficientes de elétrons, os quais tendem a interagir com moléculas que possuem pares de elétrons

disponíveis a serem compartilhados (Benit et al., 2007). Por outro lado, a maioria das moléculas biológicas, tais como proteínas e ácidos nucleicos são ricos em elétrons, e a atração destas cargas opostas leva a uma tendência geral dos íons metálicos em se ligar e interagir com essas moléculas (Bernhardt et al., 2008). Destaca-se ainda, dentre os metais de transição, pela sua capacidade de assumir diferentes estados de oxidação (Muhammad & Guo, 2014).

Esta variedade de estados de oxidação, principalmente +II e +III, confere ao rutênio uma química bastante diversificada, o que permite formar ligações químicas com uma gama de diferentes ligantes e se estabilizar na forma de complexos penta ou hexa-coordenados, o que garante ao rutênio dois ligantes a mais em comparação com a platina (Page, 2012).

Geralmente, os complexos de rutênio(III) não possuem atividade biológica, precisam ser ativados (reduzidos) no interior das células, onde normalmente encontra-se um teor reduzido de oxigênio e baixo pH, devido ao metabolismo. A redução do centro metálico de rutênio(III) para rutênio(II), torna o complexo biologicamente ativo no interior das células (Clarke, 2002; Hartinger et al., 2006).

A baixa toxicidade se deve à sua semelhança química com o ferro. Ambos os metais pertencem ao grupo VIII dos metais de transição; isso garante ao rutênio benefícios importantes de transporte nos sistemas biológicos (Allardyce & Dyson, 2001).

A semelhança entre esses dois metais pode explicar a capacidade do rutênio de se ligar à transferrina e à albumina. Essas proteínas são as responsáveis por transportar o ferro do plasma para os tecidos, principalmente os que estão em maior divisão e que por isso, possuem necessidades aumentadas do elemento (Antonarakis & Emadi, 2010).

Devido a alta taxa de divisão celular nos tumores, e consequente expressão de receptores para transferrina, estudos *in vivo* observaram aumento de 2 a 12 vezes na concentração de rutênio em células tumorais em comparação com as células normais (Sava & Bergamo, 2000).

Esta deposição seletiva é facilitada pelo transporte via transferrina pelo sangue, conforme sugerido por Sava et al. (1990), que baseou-se na necessidade exacerbada de ferro por células tumorais. Considera-se então, que uma vez absorvido, o rutênio liga-se à transferrina presente no plasma e seja disponibilizado aos tecidos na forma de um complexo rutênio-transferrina (Figura 2).

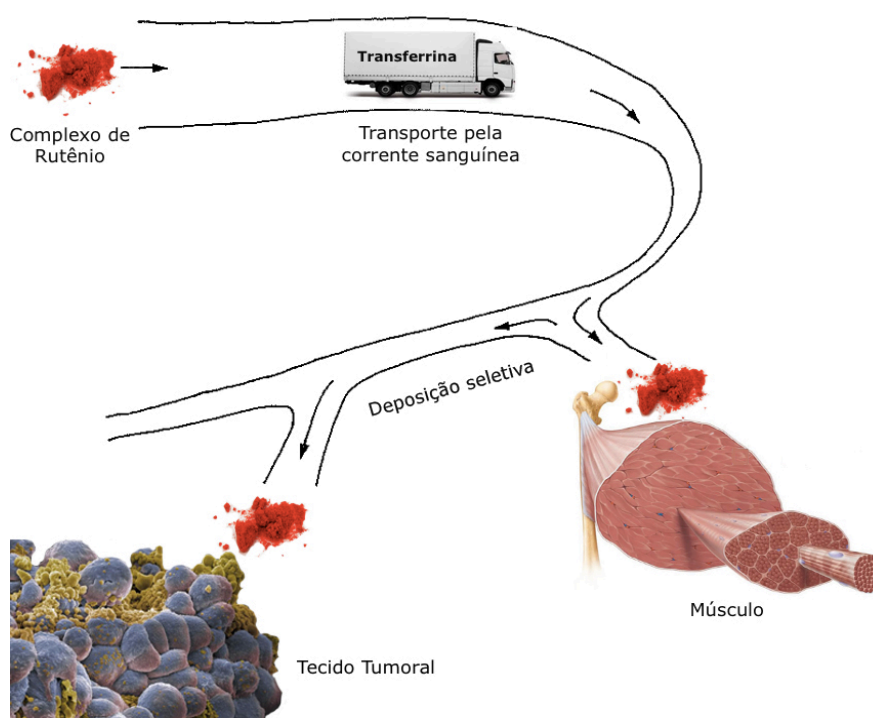


Figura 2. Distribuição seletiva preferencial de íons de rutênio por meio da transferrina. Adaptado de Sava et al. (1990).

Mesmo se ferro e rutênio não fossem semelhantes o suficiente para serem intercambiáveis, uma vez que a ligação entre ferro-transferrina é mais estável, sugere-se também que o rutênio possa se ligar a outros sítios da transferrina, sendo assim,

levado para o interior da célula, num transporte combinado com o ferro, do tipo “*piggy-back*” (Hartinger et al., 2011; Page, 2012; Strohfeldt, 2015).

1.3. Pesquisa de novos agentes terapêuticos com Rutênio

Devido às convenientes características químicas supracitadas, o Rutênio tem se mostrado um alvo promissor na pesquisa e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. A partir dos anos 50, ele desponta-se como um importante metal de uso na medicina (Dwyer et al., 1965) e, desde então, recebe destaque dentro da classe dos metalofármacos, devido a suas diversas aplicações clínicas (Allardyce & Dyson, 2001; Clarke, 2002; Kostova, 2006; Meggers, 2007; Tfouni et al., 2012).

Vários trabalhos têm focado sua notável atividade antitumoral (Keppler & Hartmann, 1994; Kostova, 2006; Côte-Real et al., 2014; Sun et al., 2015; Cao et al., 2015). Contudo, na literatura, encontram-se ainda, resultados relevantes no tratamento da doença de Alzheimer (Messori et al., 2013) no tratamento de doenças cardiovasculares como doador de óxido nítrico (Marmion et al., 2004; Marchesi et al., 2012; Lima et al., 2014), como agente imunoregulador (Silveira-Lacerda et al., 2010) e em diferentes usos da terapia fotodinâmica (Albani et al., 2014; Mari et al., 2015), além de apresentar propriedades antiparasitárias (Da Silva et al., 2012; Sarniguet et al., 2014), antimicrobianas (Gorle et al., 2014; Li et al., 2015) e antimicobacterianas, com destaque no tratamento da tuberculose (Pavan et al., 2010).

Neste contexto atual, percebe-se que é de grande importância o estudo do perfil de segurança de novos complexos de rutênio, com possível utilização terapêutica.

1.3.1. Terapia contra a Tuberculose

A TB, é o maior problema de saúde mundial, elencada ao lado da AIDS como a maior causa de mortes por doença infecciosa em todo o mundo. As últimas estimativas da OMS apontaram 9,6 milhões de novos casos em 2014, sendo detectadas 1,5 milhões de mortes. Desse número, 26% dos casos tem co-infecção com HIV (WHO, 2015).

Ainda que a terapia padrão para a TB seja ativa, tratamentos mais eficazes se tornam necessários para reduzir a carga de processos infecciosos (Zumla et al., 2015).

Além disso, é crescente o número de novos casos de TB-MDR, onde as cepas de *M. tuberculosis* apresentam resistência a pelo menos rifampicina e isoniazida e outro fármaco que não seja uma fluoroquinolona, e TB-XDR, definida pela resistência à rifampicina, isoniazida, qualquer fluoroquinolona e pelo menos um dos fármacos de segunda linha, ou seja, praticamente sem qualquer alternativa farmacológica (Soman et al., 2014; WHO, 2015).

Os protocolos para a TB-MDR envolvem meses de tratamento e combinação de diversos medicamentos. Esses regimes estão associados a efeitos adversos graves e comorbidade psicológica, em razão do isolamento social (Brown et al., 2015).

Depois de 50 anos, dois novos medicamentos contra TB foram aprovados pelo FDA e pela EMA (Zumla et al., 2015). A bedaquilina e delamanida foram autorizadas a entrar no mercado, com uso racional, ainda em estudos clínicos, vista a carência de novos fármacos mais eficazes contra a TB-MDR (Skripconoka et al., 2013; Gouloze et al., 2015).

Embora novas moléculas estejam em fase clínica de desenvolvimento, não existem medicamentos totalmente eficazes contra cepas resistentes.

Dentro da busca por novas moléculas mais seguras e eficazes, os complexos de rutênio têm apresentado resultados promissores, com MIC menores ou equivalentes aos fármacos de primeira linha (Pavan et al., 2013).

Em particular importância, os complexos de rutênio(II) contendo ligantes como picolinatos, diiminas e fosfinas (SCAR), sintetizados pelo Departamento de Química Inorgânica da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, apresentaram atividade promissora frente à cepas dormentes e MDR de *M. tuberculosis* (Pavan et al., 2010, 2011).

Esses resultados levaram os complexos SCAR a ocuparem uma importante posição no *pipeline* global de fármacos anti-TB em pesquisa e fases de aprovação (Figura 3).

Vista a importante atividade dos complexos de Rutênio(II) SCAR frente às cepas MDR de TB, nosso grupo têm buscado elucidar o perfil de segurança desses complexos, como parte dos estudos pré-clínicos recomendados, a fim de dar subsídios e garantir o desenvolvimento seguro, como possíveis candidatos na terapia anti-TB (Pavan et al., 2013).

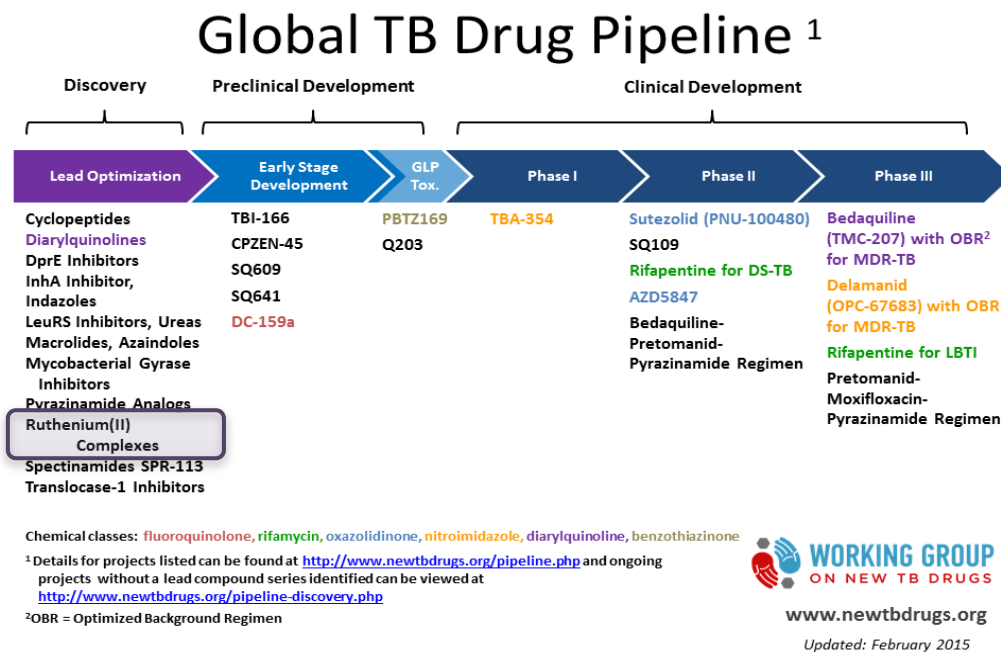


Figura 3. Pipeline de desenvolvimento de fármacos anti-TB. Working Group on new TB Drugs 2015 (www.newtbdrugs.org)

1.3.2. Terapia contra o Câncer

É evidente o empenho atual da comunidade científica na busca por novas alternativas de prevenção e cura do câncer. Mesmo assim, com o aumento da expectativa de vida mundial, é esperado que o número de novos cânceres aumente ainda mais nos próximos anos (INCA, 2014). Em paralelo, o número de medicamentos contra o câncer aprovados por órgãos como o FDA têm crescido de forma constante nos últimos anos (Butler et al., 2015).

Esses medicamentos atuam diminuindo a viabilidade dos tumores por causarem desbalanço no ciclo celular, principalmente durante a divisão das células (Arnon et al., 2001). Os mecanismos de ação estão majoritariamente relacionados com a interrupção da síntese de DNA ou sua quebra.

Dessa forma, muitos agentes mutagênicos podem ser utilizados como possíveis

agentes anticâncer, preferencialmente se tiverem predileção por células tumorais. Na verdade, grande parte dos agentes anticâncer utilizados na quimioterapia possuem mecanismos de ação e efeitos tóxicos diretos, sendo a maioria mutagênica e/ou carcinogênica (Glen & Dubrova, 2012).

Assim, na busca por novos candidatos na terapia anticâncer, deve-se buscar moléculas que possam interromper a proliferação celular indesejada de forma mais eficaz que a terapia atual.

Tradicionalmente, os agentes anticâncer podem ser divididos em sete diferentes grupos de acordo com seu mecanismo de ação; agentes alquilantes, antimetabólitos, antibióticos antineoplásicos, inibidores mitóticos, inibidores da topoisomerase, corticosteróides e outros tipos (ACS, 2013).

Nos últimos 30 anos, os complexos de rutênio têm recebido destaque como possíveis agentes anticâncer (Kostova, 2006).

Estudos recentes apontam uma variedade de complexos de rutênio, sintetizados e avaliados pela sua promissora atividade antitumoral, apresentando mecanismos de intercalação com o DNA (Ramadevi et al., 2015), como inibidores da DNA-topoisomerase I e II (He et al., 2015), inibidores da viabilidade de células tumorais em estudos *in vitro* (Vijaya et al., 2014) e também atividade antitumoral *in vivo* (Weiss et al., 2014).

Assim, percebe-se que os complexos de rutênio têm potencial destaque na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer, contudo, ainda que apresentem resultados promissores, é essencial avaliar sua segurança, com vistas ao maior nível de seletividade, essencial para pacientes submetidos à quimioterapia.

1.4. Desenvolvimento de novos agentes terapêuticos de rutênio:

Interação com biomoléculas

Como descrito acima, muito complexos de rutênio, de fato, têm se mostrado altamente ativos em modelos celulares de diversas doenças. No entanto, as condições experimentais aplicadas (p.e. o solvente, incubação, meio de cultura, pH, etc.) podem diferir consideravelmente daquelas existentes nos sistemas vivos, onde eles estão destinados a exercer seus efeitos biológicos. Na verdade, as diferenças em sistemas *in vivo* incluem a presença de várias moléculas que podem ter alta afinidade pelos íons metálicos e, por conseguinte, deslocar a ligação com os ligantes durante (i) o processo de absorção no trato gastrointestinal (em caso de complexos administrados por via oral), (ii) processos de transporte na corrente sanguínea e (iii), em reações com moléculas intracelulares (Pessoa & Tomaz, 2010).

Portanto, o uso clínico dependerá da biodisponibilidade e farmacocinética, bem como outros fatores, por exemplo, a capacidade de permear membranas celulares. Neste contexto, um dos aspectos mais importantes para se entender a eficiência terapêutica de complexos metálicos é conhecendo a interação que eles possam ter com membranas biológicas, bem como macromoléculas, as quais são de relevância no seu transporte pela corrente sanguínea.

No intestino, uma camada de células epiteliais reveste a parede interior intestinal, formando uma barreira limitante para a absorção de medicamentos. Como consequência, a reconstituição correta da monocamada de células epiteliais humanas *in vitro* permite a previsão de absorção oral do fármaco, em humanos, uma vez que a via oral é a via preferida para a administração de fármacos devido à sua conveniência, baixo custo e alta adesão, quando comparada com outras vias de administração (Artursson et al., 2001; Fernandes et al., 2012).

A linhagem celular de carcinoma do cólon humano, Caco-2, foi encontrada para servir bem a esta finalidade. Em cultura, estas células diferenciam-se lentamente em monocamadas expressando muitas características fenotípicas e funções do epitélio do intestino delgado (Hubatsch et al., 2007). Quando mantidas em condições adequadas de cultivo em filtros permeáveis, as células Caco-2 tornam-se um modelo padrão ouro para previsão *in vitro* da permeabilidade intestinal e absorção de fármacos (Hubatsch et al., 2007; Stenberg et al., 2001)

Por isso, a permeabilidade de uma molécula determinada por estas células, denominada permeabilidade aparente (*P_{app}*), é um fator valioso para se estimar a absorção de fármacos administrados por via oral. Os valores de *P_{app}* podem ainda classificar um fármaco como mal absorvido (0-20%) quando seu valor é inferior a 1×10^{-6} cm/s, moderadamente absorvido (20-70%) quando seu valor está entre 1 e 10×10^{-6} cm/s e bem absorvido (70-100%) quando o valor de *P_{app}* é maior que 10×10^{-6} cm/s (Yee, 1997).

Outro fator importante a ser considerado na farmacocinética e farmacodinâmica de novos fármacos, é a sua ligação às proteínas do soro, uma vez que o tipo e intensidade de ligação pode determinar o seu desempenho *in vivo*, quer seja aumentando ou diminuindo o efeito (Gomme & McCann, 2005)

Até agora, mesmo apresentando atividades biológicas promissoras, os complexos de Rutênio(II) SCAR não possuem dados na literatura sobre sua permeabilidade, bem como sobre a interação com proteínas do soro. Sendo assim, torna-se necessária a avaliação destes parâmetros como próximo estágio no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos baseados em rutênio.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Elucidar o perfil genotóxico, a atividade antitumoral e a permeabilidade *in vitro* dos complexos heteroléticos de Rutênio(II) fosfinas/diiminas/picolinato: [Ru(pic)(dppe)(phen)]PF₆ (SCAR 4), *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (SCAR 5) e *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (SCAR 6).

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliação Toxicogenética

- a) Avaliar a atividade mutagênica, em nível gênico, dos complexos SCAR 4, 5 e 6, por meio de ensaios de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium*, utilizando as cepas TA1535, TA98, TA97a, TA100 e TA102, na ausência e presença de metabolização.
- b) Avaliar a viabilidade celular das linhagens CHO-K1 e HepG2 mediante o tratamento com os complexos SCAR 4, 5 e 6.
- c) Avaliar a atividade mutagênica, em nível cromossômico, dos complexos SCAR 4, 5 e 6, por meio do ensaio do micronúcleo citoma com bloqueio da citocinese (CBMN-cit), utilizando as linhagens celulares CHO-K1 e HepG2.

2.2.2. Avaliação Antitumoral

- a) Determinar o IC₅₀ dos complexos SCAR 4, 5 e 6 em 5 linhagens celulares tumorais Caco-2, DU-145, HeLa, HepG2 e MDA-MB-231 e na linhagem celular normal MRC-5 e o índice de seletividade dos tratamentos.

- b) Avaliar a capacidade dos complexos SCAR 4, 5 e 6 em inibir a atividade da enzima Top IB pelo ensaio do relaxamento do DNA.
- c) Investigar por meio de ensaios físico-químicos a interação dos complexos SCAR 4, 5 e 6 com o ct-DNA.

2.2.3. Avaliação da Permeabilidade *in vitro*

- a) Determinar o Log P dos complexos SCAR 4, 5 e 6 por meio do método cromatográfico.
- b) Investigar por meio de ensaios físico-químicos a interação dos complexos SCAR 4, 5 e 6 com a BSA
- c) Avaliar a permeabilidade *in vitro* dos complexos SCAR 4, 5 e 6, utilizando o modelo de monocamada de enterócito humano Caco-2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Síntese dos complexos

Os complexos SCAR 4, 5 e 6 (Figura 4), foram sintetizados e caracterizados no Departamento de Química Inorgânica da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, sob responsabilidade do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista. Os procedimentos de síntese e os ensaios de caracterização estão descritos nas publicações de Pavan et al. (2010), (2011) e Queiroz et al. (1998)

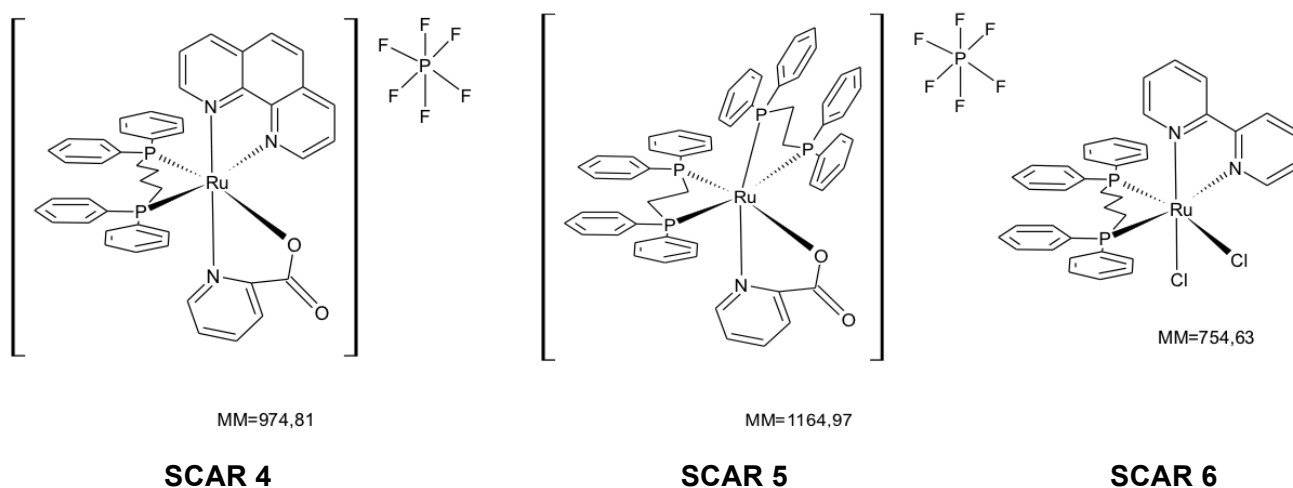


Figura 4. Estrutura dos complexos SCAR

3.2. Avaliação do potencial toxicogenético *in vitro*

Ver capítulo 2 (página 91)

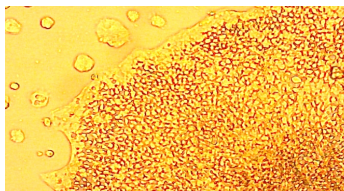
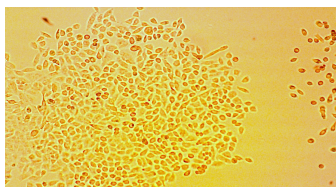
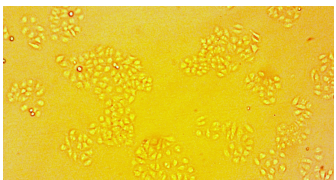
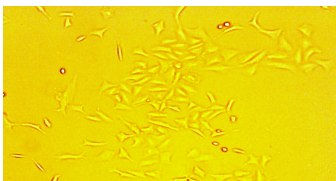
3.3. Avaliação da atividade antitumoral *in vitro*

3.3.1. Ensaios de citotoxicidade frente a linhagens tumorais

Os ensaios foram realizados utilizando-se como substância reveladora o cloridrato de resazurina (Sigma), que possui potencial REDOX (óxido-redução), com mudança colorimétrica e indicador de fluorescência em resposta ao metabolismo celular.

3.3.1.1. Linhagens Celulares

Para realização dos ensaios foram utilizadas cinco linhagens celulares tumorais e uma linhagem celular normal, a fim de se calcular o IS dos complexos. As linhagens foram obtidas no Laboratório de Micobacteriologia e no Laboratório de Mutagênese da FCF - UNESP, Araraquara (Figura 5).

Caco-2 (BCRJ nº 0059)		adenocarcinoma colorectal humano
DU-145 (ATCC® HTB-81™)		carcinoma de próstata humano
HeLa (ATCC® CCL-2™)		adenocarcinoma cervical humano
HepG2 (ATCC® HB-8065™)		carcinoma hepatocelular humano

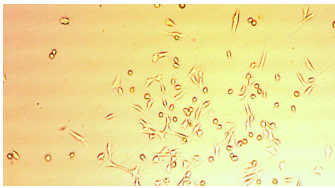
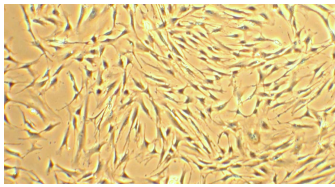
MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)		adenocarcinoma mamário humano
MRC-5 (ATCC® CCI-171™)		fibroblastos normais de pulmão humano

Figura 5. Fotomicrografia das diferentes linhagens celulares humanas utilizadas para avaliar a atividade citotóxica dos complexos SCAR. Microscópio invertido em aumento de 20x, sem corantes. Laboratório de Mutagênese, FCF-UNESP, Araraquara. Fonte: arquivo pessoal

3.3.1.2. Ensaio de viabilidade celular pela resazurina

A viabilidade celular das linhagens HepG2, HeLa, MDA-MB-231, DU-145, Caco-2 e MRC-5 foi determinada pelo método Redox da resazurina de acordo com McMillian et al. (2002) com modificações. As células foram incubadas sob condições padronizadas de cultivo celular (37° C, 5% CO₂, 95% de umidade), em garrafas de cultivo de 75 cm², contendo meio de cultura apropriado para seu crescimento, suplementado com SFB (Gibco).

As células foram recolhidas das garrafas de cultivo utilizando 3 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco), centrifugadas a 200 g por 5 minutos e contadas em câmara Neubauer, utilizando o método de exclusão pela solução azul de trypan a 0,004% (Sigma), que cora as células inviáveis, em seguida, ajustou-se a concentração para $7,5 \times 10^4$ células/mL

As células foram semeadas em microplacas de 96 poços (TPP) obtendo uma concentração celular de $1,5 \times 10^4$ células/poço, e incubadas sob as condições padronizadas de cultivo, durante 24 horas para permitir a aderência celular.

Para o tratamento, foram preparadas soluções dos complexos SCAR 4, 5 e 6 e do fármaco referência, cisplatina (Sigma), em concentração inicial de 1000 μM , de forma que pode-se realizar 9 diluições na microplaca, a fim de se obter concentrações de 1,95 a 500 μM . As células também foram tratadas com DMSO (1%) como controle do solvente. O controle positivo para resazurina constituiu-se dos poços com células sem qualquer tratamento e o controle negativo foi composto pelos poços apenas com meio de cultura sem células presentes. Ainda foi realizado um controle de esterilidade, apenas com os complexos e meio de cultura. Novamente as células foram incubadas por 24 h.

Após esse período, o meio de cultura foi removido, e logo em seguida foram adicionados 50 μL de cloridrato de resazurina 0,01% (Sigma). As placas foram novamente incubadas entre 2 a 6 horas, de acordo com a linhagem celular (Figura 6).

Em seguida, procedeu-se a leitura da fluorescência em leitor de microplacas Synergy H1 (BioTek®) em filtros de excitação e de emissão nos comprimentos de onda de 530 e 590 nm, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em três ensaios independentes. Os resultados foram expressos pelo IC_{50} que representa a concentração requerida do fármaco capaz de inibir 50% do crescimento celular.

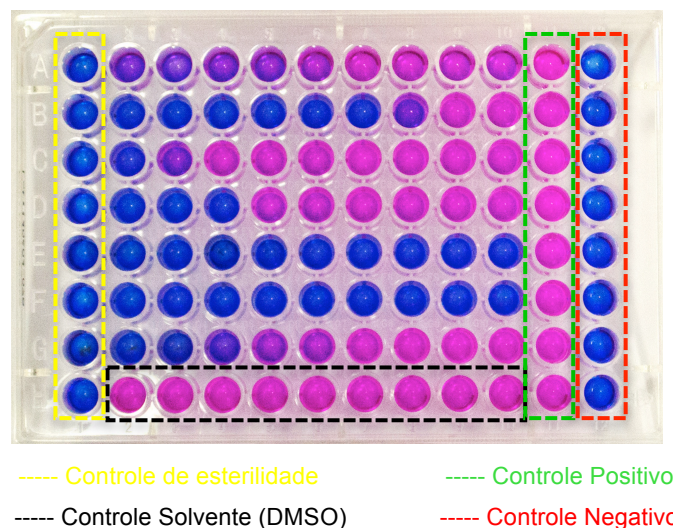


Figura 6. Representação esquemática da microplaca de 96 poços no ensaio de citotoxicidade da resazurina. Os poços em azul apresentam a cor característica da resazurina, a qual não foi reduzida, ou seja, as células apresentam-se inviáveis, enquanto que os poços em rosa representam a resorufina, forma reduzida, indicando viabilidade celular. Laboratório de Mutagênese, FCF - UNESP Araraquara. Fonte: arquivo pessoal.

3.3.1.3. Determinação do Índice de Seletividade

O IS dos complexos foi calculado a partir da razão dos valores de IC_{50} encontrado para células normais (MRC-5) sobre o IC_{50} das células tumorais. Quanto maior o valor de IS, o agente analisado é mais ativo contra a linhagem tumoral e menos citotóxico para a linhagem normal. Considera-se como um promissor candidato antitumoral, a substância que apresentar um $IS > 3$ (Chelopo et al., 2013).

3.3.2. Teste de inibição da topoisomerase I humana

Os experimentos sobre a capacidade dos complexos SCAR 4, 5 e 6 inibir a enzima Top IB, foram realizados em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular da Università Degli Studi di Roma Tor Vergata, Itália, sob responsabilidade da Dra. Mariana Santoro de Camargo e supervisão do Prof. Dr. Alessandro Desideri.

3.3.2.1. Purificação de Topoisomerase I humana

A Top IB foi expressa sob o promotor induzível galactose em um plasmídeo de cópias múltiplas, YEpGAL1-p-selvagem e YEpGAL1-e-Y723F, usado para a transformação de células de leveduras (EKY3), como descrito por (Chillemi et al., 2005). As construções marcadas com um epítipo FLAG contém a sequência N-terminal: DYKDDDY (indicado com "e"), reconhecido pelo anticorpo monoclonal M2.

A purificação foi realizada utilizando uma coluna de gel por afinidade ANTI-FLAG M2 (Sigma). A Top IB foi eluída por competição com cinco volumes de uma solução contendo 100 µg/ mL do peptídeo FLAG em 50 mM de Tris-HCl, 150 mM de KCl em pH 7,4. Foi adicionado glicerol (Sigma) em cada fração recolhida, até uma concentração final de 33%. Todas as frações foram armazenadas a -20°C. A integridade da proteína foi verificada por ensaio de *immunoblotting*.

A proteína purificada foi revelada por uma SDS-PAGE, transferidos para papel de nitrocelulose e marcadas com anticorpo monoclonal ANTI-FLAG® (Sigma). A banda marcada que é correspondente à Top IB, foi detectada com o substrato BCIP®/NBT (Sigma).

3.3.2.2. Atividade da Topoisomerase I humana *in vitro*: Ensaio de relaxamento do DNA

A atividade da Top IB foi avaliada através de alterações na sua capacidade em relaxar o DNA superenovelado, observada em gel de agarose. Reações contendo 0,5 µg de vetor plasmidial superenovelado de carga negativa pBlue Script KSII(+) e 1µL da fração da enzima Top IB em 30 µL de tampão Tris-HCl 20 mM, 0,1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 50 µg/mL de BSA e 150 mM de KCl em pH 7,5, foram incubadas a 37° C. Os efeitos dos complexos sobre a atividade da enzima foram analisados através da adição

de diferentes concentrações dos complexos (0,75 a 400 μ M) a esta reação. Também foi realizado um controle do solvente constituído por DMSO e DNA superenovelado.

As reações foram interrompidas através da adição de SDS em concentração final de 0,5% após 10 minutos de incubação a 37° C. As amostras foram sujeitas a eletroforese em gel de agarose (1%) em Tris 50 mM, ácido bórico 45 mM e EDTA 1 mM. O gel foi corado com brometo de etídio (5 μ g/mL), descorado com água e fotografado sob luz UV.

Para o composto com maior capacidade em inibir a atividade da enzima, foi realizado o teste de pré-incubação, incubando-se enzima e complexo durante 5 minutos, antes da adição do substrato de DNA. As reações foram paradas com SDS 1, 5, 10, 20 e 60 minutos após a adição da enzima com o objetivo de avaliar a capacidade da enzima em recuperar sua atividade em função do tempo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, mas apenas um gel é representado nos resultados.

3.3.3. Ensaios de interação com o *cal*-thymus DNA

Os experimentos de interação dos complexos SCAR 4, 5 e 6 com o ct-DNA, foram realizados em colaboração com o Laboratório de Química Inorgânica da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, sob supervisão do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista. As possíveis interações dos complexos SCAR com o ct-DNA, foram abordadas pelas técnicas de voltametria de onda quadrada e por viscosidade.

3.3.3.1. Voltametria de onda quadrada

Na SWV foi utilizado um sistema de três eletrodos, sendo: eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, Ag/AgCl como eletrodo de referência e eletrodo de placa de platina como contra eletrodo. Os estudos de interação foram realizados em

triplicata utilizando tampão Tris-HCl (pH 7,4) com 30% de DMSO. As titulações foram avaliadas adicionando-se alíquotas de 50 µL de ct-DNA (4,2 mM) na célula eletroquímica contendo 2 mL da solução do composto a $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

3.3.3.2. Viscosidade

As medições de viscosidade foram realizadas utilizando um viscosímetro Ostwald imerso num banho de água mantido a 25° C, em triplicata. A concentração de ct-DNA em tampão Tris - HCl foi mantida constante em todas as amostras, enquanto a concentração de composto foi aumentada. O tempo de fluxo foi medido 5 vezes com um cronômetro digital e o valor médio foi calculado. Os dados foram apresentados como $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ versus a razão [composto] / [DNA], onde η e η_0 são as viscosidades específicas de ct-DNA, na presença e ausência do composto, respectivamente. Os valores de η e η_0 foram calculados utilizando a expressão $(t - t_b) / t_b$, onde t é o tempo de escoamento observado e t_b é o tempo de escoamento de tampão sozinho (Cohen & Eisenberg, 1969; Anbu et al., 2012; Živec, et al., 2012)

3.4. Avaliação da Permeabilidade *in vitro*

3.4.1. Cultivo das células Caco-2

As células Caco-2 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ nº 0059) e cultivadas em meio DMEM (Gibco) com alta concentração de glicose (4,5 g/L), suplementado com 20% de SFB (Gibco).

O subcultivo foi realizado sempre que a cultura atingia, no mínimo, 80% de confluência, cerca de 4 a 8 dias. As células utilizadas nos experimentos estavam entre o 5º e 15º repiques. Para os experimentos de permeabilidade, as células foram

transferidas para placas Transwell® (Corning) contendo doze poços com suporte de policarbonato de 0,4 μm de poro, e área de 1,12 cm^2 , numa densidade de 5×10^4 cel/cm^2 (Figura 7). As culturas foram mantidas em incubadora sob as mesmas condições de cultivo já descritas.

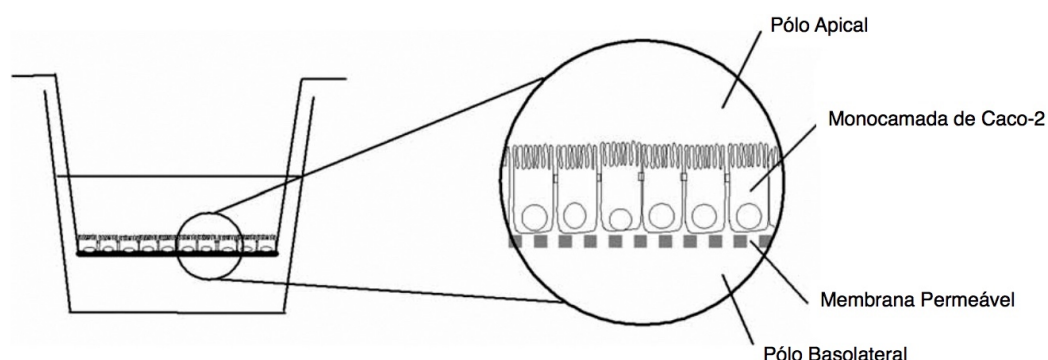


Figura 7. Esquema da monocamada de células Caco-2 cultivadas em suporte de membrana permeável, empregado em estudos de permeabilidade *in vitro*. Adaptado de Hubatsch et al., 2007.

3.4.2. Ensaio de permeabilidade *in vitro*

As monocamadas formadas com as células em cultivo, sob o sistema Transwell®, foram monitoradas quanto ao valor da resistividade elétrica utilizando o minivoltímetro Millicell ERS® - Millipore. A determinação do valor da resistência elétrica transepitelial ($\Omega \times \text{cm}^2$) foi realizada aos 10, 15 e 21 dias de cultivo (Yu & Huang, 2011). Previamente ao estudo de permeabilidade, as células foram lavadas com tampão de permeabilidade, constituído por tampão Hank's (Gibco) contendo 200 mM de HEPES (Sigma) com pH ajustado para 7,4.

As células foram mantidas neste tampão por 20 minutos a 37° C. A RET foi medida em cada membrana. Foram consideradas aptas para o início do experimento as membranas que apresentaram valor de RET acima de 200 $\Omega \times \text{cm}^2$ (Fernandes et al., 2012).

Os experimentos foram iniciados com a adição dos complexos solubilizados em tampão de permeabilidade a partir de soluções estoque (500 µg/mL) em DMSO na concentração de 10 µg/mL para SCAR 4, 1 µg/mL para SCAR 5 e 10 µg/mL para SCAR 6 nos compartimentos apicais (doador) das placas Transwell®, sendo que no compartimento basolateral (receptor) foram adicionados 1,5 mL de tampão de permeabilidade, pH 7,4, na ausência e na presença de 4,0% (m/v) de BSA.

Como controles de permeabilidade e da integridade da monocamada foram utilizadas soluções padronizadas de 10 µg/mL de cloridrato de verapamil (Sigma) e fluoresceína (Sigma), como marcadores padrões de transporte transcelular e paracelular, respectivamente. Todas as concentrações, dos complexos e controles foram determinadas em ensaios de citotoxicidade, garantindo a viabilidade da monocamada.

As placas foram mantidas sob agitação em agitador orbital a 37° C (25 rpm). Foram realizadas coletas de 200 µL das amostras a partir do compartimento basolateral aos 15, 30, 60, 120 e 180 minutos. Após cada amostragem, procedeu-se à reposição de 200 µL de tampão de permeabilidade fresco com ou sem 4,0% (m/v) de BSA, mantido a 37° C, com a finalidade de manutenção do volume do meio no compartimento.

3.4.3. Análise das amostras por CLUE

As amostras foram analisadas por CLUE no Laboratório de Toxicologia da FCF-UNESP, Araraquara, sob supervisão da Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini. Amostras, padrões de calibração ou brancos (tampão de permeabilidade) foram adicionadas de acetonitrila (1:1) e em seguida foram analisadas pelo sistema cromatográfico descrito abaixo.

3.4.3.1. Sistema cromatográfico

O sistema cromatográfico consistiu de um UPLC® Acquity® com detector UV-Vis. A separação foi feita por uma coluna CSH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm) protegida por pré-coluna CSH C18 (2,1 x 5 mm, 1,7 µm). O volume de injeção foi de 2 µL. As amostras foram mantidas a 10° C até a injeção. Outras condições específicas pode ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições cromatográficas utilizadas no método de quantificação.

Analito	Fase móvel (%)		Vazão (mL/min)	Temp. coluna	Detecção
	Acetonitrila	Ác. fórmico 0,1%			
SCAR 4	45	55	0,4	30° C	UV 254 nm
SCAR 5	59	41	0,5	40° C	UV 240 nm
SCAR 6	30	70	0,4	40° C	UV 254 nm

3.4.3.2. Linearidade do método

A linearidade foi avaliada em triplicata utilizando padrões de calibração preparados por diluição em tampão de permeabilidade a partir de soluções estoque dos complexos (500 µg/mL) em DMSO. As amostras foram consideradas aprovadas no critério de linearidade quando apresentaram coeficiente de correlação maior que 0,99 e exatidão entra 85-115% em pelo menos 4 de cada 6 níveis de concentração da curva. A menor concentração da curva de calibração foi considerada como limite de quantificação experimental, enquanto amostras foram consideradas detectáveis, mas não quantificáveis quando o sinal do pico no tempo de retenção do analito foi maior que 3 vezes o ruído da linha de base de amostras branco.

3.4.4. Coeficiente de Permeabilidade Aparente

A permeabilidade é baseada na detecção das amostras no compartimento basolateral (receptor) do sistema Transwel[®]. O P_{app} em cm/s foi estimado utilizando a seguinte equação (Grass & Sweetana, 1989):

$$P_{app} = VR / (A \times C_0) \times dC/dt$$

Em que:

VR = Volume do compartimento receptor (basolateral) em cm³

A = Área do suporte permeável de cultivo celular

C_0 = Concentração inicial adicionada no compartimento doador (apical)

dC/dt = Diferencial da concentração em relação ao tempo do experimento.

Para a análise estatística, os valores foram comparados empregando-se a análise de variância (ANOVA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de $p < 0,05$.

3.4.5. Determinação do log P

Foi utilizado para esse experimento um UPLC Acquity[®] com detector UV-Visível. A separação foi feita por uma coluna BEH 2,1 x 50 mm, 1,7 µm com pré-coluna BEH 2,1 x 5 mm, 1,7 µm, mantida a 30° C. A fase móvel foi Metanol:Ácido fórmico 0,1% (70:30) com vazão de 0,4 mL/min. O volume de injeção utilizado foi de 1 µL.

O ensaio foi realizado com base no *Guideline* 117 (2004) da OECD, que descreve o procedimento de obtenção de log P pelo método cromatográfico. A partir desse guia, foram selecionadas substâncias cuja curva de log k (log do fator de capacidade) versus o log P compreendesse valores entre 1 e 6,5 (Tabela 2).

Tabela 2. Substâncias utilizadas na curva para a determinação do log P

Substância	log P
acetanitrilida	1
nifedipino	2
probenecida	2,3
clorobenzeno	2,8
timol	3,3
fenantreno	4,5
trifenilamina	5,7
DDT	6,5

Para construção da curva de log k versus log P dos padrões de calibração foi necessário calcular seus respectivos fatores de capacidade k , que é determinado dividindo-se a diferença entre o tempo de retenção do composto e o tempo morto do sistema pelo próprio tempo morto do sistema. O tempo morto utilizado nessa equação foi calculado a partir das dimensões da coluna cromatográfica, resultando em 0,238 minutos. O log k das amostras (SCAR 4, 5 e 6) foi determinado a partir de seu tempo de retenção e interpolado na curva de linearidade de log k versus log P para obtenção do log P de cada substância teste pelo método cromatográfico.

3.4.6. Ensaio de interação com a Albumina do Soro Bovino

O estudo de interação dos complexos com a BSA, foi realizado por meio da medida de supressão da fluorescência dos resíduos de triptofano. Essa supressão refere-se a vários processos que diminuem a intensidade da fluorescência em uma amostra. Algumas interações moleculares podem resultar nessa supressão, das quais destacam-se reações de estado-excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia e colisão (Ding et al., 2009). A supressão de fluorescência da albumina pode ser realizada empregando-se a equação de Stern-Volmer, a qual é utilizada para

descrever a supressão de fluorescência e analisar os mecanismos pelos quais ela ocorre (Lakowicz, 1999).

Esses mecanismos podem ser classificados como dinâmico ou estático. A supressão dinâmica é resultado da colisão entre o fluoróforo com o supressor, enquanto que a supressão estática é devido à formação do complexo com estado de menor energia entre fluoróforo e o supressor.

Os experimentos foram realizados em triplicata empregando uma placa opaca de 96 poços utilizada para os ensaios de fluorescência. A solução de BSA ($2,5 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) foi preparada dissolvendo-se a proteína em Tris-HCl e os complexos foram dissolvidos em DMSO. Para as medições de fluorescência, a concentração de BSA no tampão Tris-HCl foi mantida constante em todas as amostras, enquanto a concentração dos complexos foi aumentada de 3,13 a 200 μM . A extinção da intensidade de emissão de resíduos triptofano da BSA a 344 nm (excitação de 295 nm) foi monitorizado a diferentes temperaturas (295, 300, 305 e 310 K). As medições de interação dos complexos com BSA foram feitas usando um fluorômetro SpectraMax M3.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do potencial toxicogenético *in vitro*

Ver capítulo 2 (página 91)

4.2. Avaliação da atividade antitumoral *in vitro*

4.2.1. Citotoxicidade frente a linhagens tumorais

Na Tabela 3 são apresentados os resultados da citotoxicidade dos complexos nas linhagens celulares tumorais Caco-2, DU-145, HeLa, HepG2 e MDA-MB-231. Também é apresentada a relação entre o IC_{50} das linhagens tumorais e o IC_{50} de uma linhagem celular derivada de tecido pulmonar normal (MRC-5). A partir desses resultados, pôde-se calcular o IS, que indica o quão seletivo o complexo é nos danos causados às linhagens tumorais em relação às células normais.

Os resultados mostraram uma diferença no perfil citotóxico entre os três complexos, sendo o SCAR 5 considerado o agente mais citotóxico em todas as linhagens testadas, seguido do SCAR 4. O SCAR 6 apresentou os maiores valores de IC_{50} nas linhagens testadas, demonstrando menor atividade citotóxica. No entanto, os três complexos apresentaram resultados significativos em relação a seletividade de ação nos diferentes tipos celulares.

Na Tabela 3, pode-se observar que todos os complexos estudados apresentaram promissora atividade antitumoral com seletividade maior que 3 em pelo menos dois tipos celulares.

O SCAR 5 apresentou $IS > 3$ para as linhagens DU-145 e MDA-MB-231. O SCAR 4 apresentou $IS > 3$ para as linhagens Caco-2, DU-145 e MDA-MB-231. Já o SCAR 6, foi o complexo que apresentou os melhores índices. Dentro das 5 linhagens estudadas, o complexo apresentou $IS > 3$ para quatro delas, com $IS > 10$ para linhagens DU-145 e MDA-MB-231.

Tabela 3. Média dos valores de IC₅₀ e IS dos complexos SCAR 4, 5 e 6 e da cisplatina nas linhagens celulares tumorais Caco-2, DU-145, HeLa, HepG2, MDA-MB-231 e na linhagem celular normal MRC-5, avaliada pelo ensaio redox da resazurina

	SCAR 4		SCAR 5		SCAR 6		cisplatina	
Células	IC ₅₀ (μM)	IS*	IC ₅₀ (μM)	IS*	IC ₅₀ (μM)	IS*	IC ₅₀ (μM)	IS*
MRC-5 ¹	47,4 ± 1,7	-	6,8 ± 0	-	551,7 ± 19,2	-	55,0 ± 1,5	-
Caco-2 ²	14,8 ± 2,1	3,2**	4,2 ± 0,9	1,6	130,4 ± 9,2	4,2**	140,0 ± 8,6	0,4
DU-145 ²	5,7 ± 1,5	8,3**	1,5 ± 0,5	4,5**	43,4 ± 4,7	12,7**	49,0 ± 3,5	1,1
HeLa ²	44,9 ± 7,4	1,0	8,7 ± 1,5	0,7	252,6 ± 12,2	2,2	85,0 ± 4,3	0,6
HepG2 ²	60,9 ± 6,7	0,8	3,5 ± 1,1	1,9	137,3 ± 11,7	4,0**	61,6 ± 3	0,9
MDA-MB-231 ²	4,0 ± 0,9	11,8**	1,5 ± 0,5	4,5**	42,3 ± 8,9	13,0**	140 ± 5,1	0,4

O IS* dos complexos foi calculado a partir da razão dos valores de IC₅₀ da linhagem de células normais¹ / IC₅₀ das linhagens de células tumorais². **É considerado um valor promissor, substâncias com IS>3 (Chelopo et al., 2013)

Para fins de comparação, também foi avaliada a atividade citotóxica da cisplatina, um complexo metálico com atividade antitumoral, utilizado na maioria dos protocolos de tratamento de câncer. Nas mesmas condições estudadas, pode-se observar que o fármaco testado não apresentou seletividade em nenhuma linhagem tumoral empregada (Tabela 3).

4.2.2. Inibição da topoisomerase I humana

O efeito dos complexos SCARs na inibição da atividade de relaxamento da Top IB foi avaliada pelo ensaio de relaxamento de DNA plasmidial superenovelado. As reações do plasmídeo superenovelado incubado com a enzima na ausência e na presença de diferentes concentrações dos complexos são demonstradas nas Figuras 8 e 9.

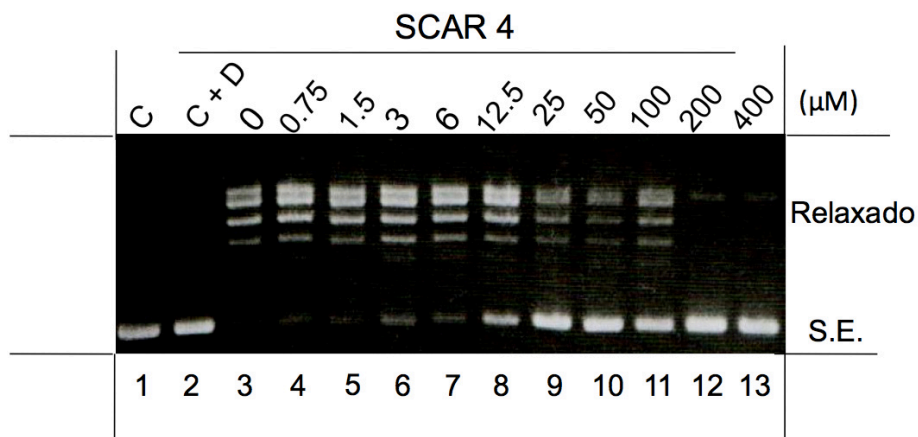


Figura 8. Relaxamento do DNA plasmidial superenovelado pela Top IB na presença de crescentes concentrações do complexo SCAR 4. O produto da reação foi revelado em gel de agarose e visualizado com brometo de etídio. Coluna 1, apenas DNA. Coluna 2, reação de controle (DMSO); DNA superenovelado (SE)

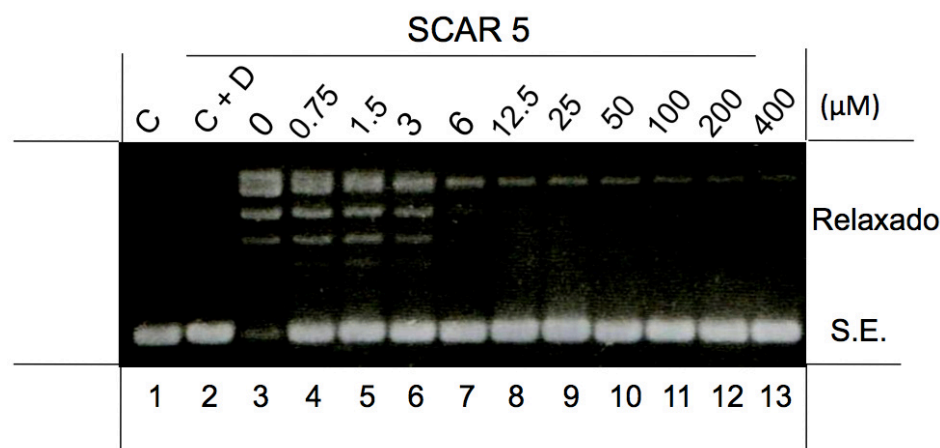


Figura 9. Relaxamento do DNA plasmidial superenovelado pela Top IB na presença de crescentes concentrações do complexo SCAR 5. O produto da reação foi revelado em gel de agarose e visualizado com brometo de etídio. Coluna 1, apenas DNA. Coluna 2, reação de controle (DMSO), DNA; DNA superenovelado (SE)

A atividade de relaxamento monitorada por 10 minutos indica que dos três compostos analisados, os complexos SCAR 4 e 5 inibem a atividade da Top IB de uma maneira dose-dependente, sendo que a inibição completa é atingida a 12,5 μM para o SCAR 5 e 200 μM para o SCAR 4. O ensaio de relaxamento para o complexo SCAR 6 não pode ser interpretado devido a visualização de um arraste das bandas de DNA + complexo, que pode ter ocorrido devido a uma interação entre composto e DNA (Figura 10).

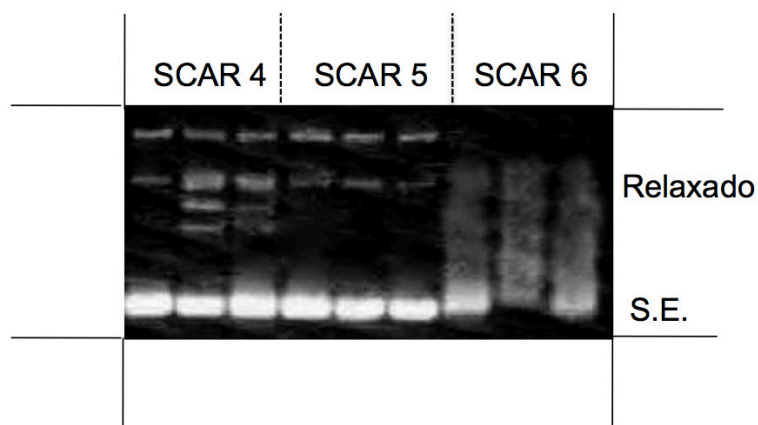


Figura 10. Ensaio de relaxamento da Top IB em contato com os complexos SCAR 4, 5 e 6 e com o DNA; DNA superenovelado (SE).

O complexo SCAR 5 foi avaliado, de acordo com a elevada capacidade de inibição no ensaio de relaxamento, quanto ao seu perfil de inibição após pré-incubação com a enzima.

Os resultados mostraram que a concentração de 1,25 μM de SCAR 5, que não foi capaz de inibir a atividade da enzima no ensaio de relaxamento, passou a inibir completamente a Top IB após sua pré-incubação com o complexo durante 5 minutos antes da adição do substrato (Figura 11). As reações foram paradas após 1, 5, 10, 20 e 60 minutos após a adição da enzima com o objetivo de avaliar a capacidade da enzima em recuperar sua atividade em função do tempo.

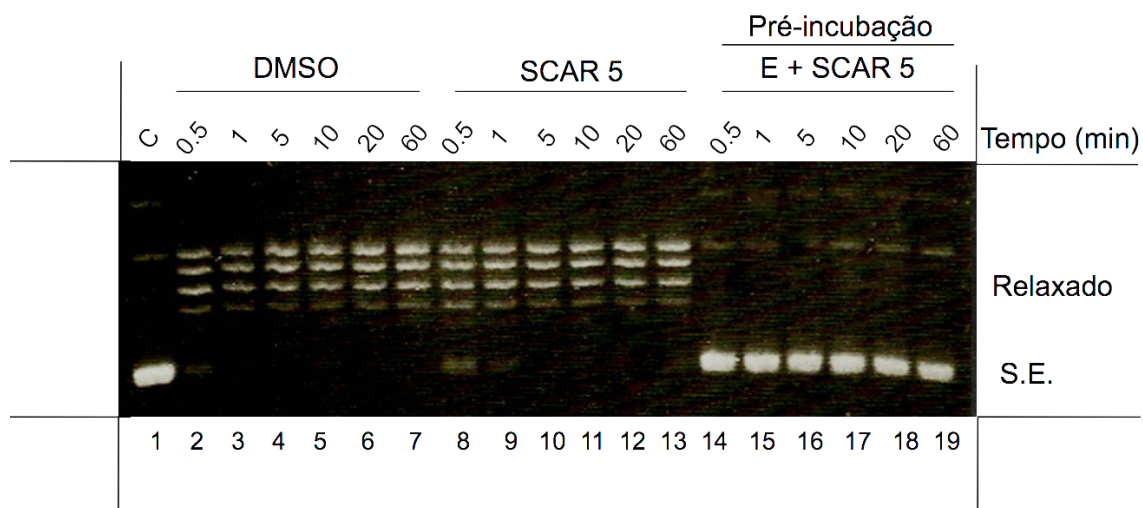


Figura 11. Relaxamento do DNA plasmidial superenovelado pela Top IB ao longo do tempo. Controle solvente com DMSO (colunas 2-7), presença de 1,25 μ M de SCAR 5 (colunas 8-13) e 1,25 μ M de SCAR 5 com a enzima, após pré-incubação durante 5 minutos a 37° C de (colunas 14-19). Coluna 1, apenas DNA

4.2.3. Interações com o *calif-thymus* DNA

Várias técnicas físico-químicas podem se utilizadas para avaliar a interação de complexos metálicos com o DNA. As principais são a espectroscopia de absorção UV-VIS, a espectroscopia de fluorescência, a voltametria de onda quadrada, a viscosidade, a eletroforese em gel de agarose, entre outras.

Neste estudo, as interações dos complexos SCAR com o ct-DNA, foram abordadas pelas técnicas de SWV e por viscosidade.

4.2.3.1. Voltametria de onda quadrada

A Figura 12 apresenta os resultados de interação com ct-DNA por SWV, onde é possível observar que a adição dos complexos SCAR 4 e 5 leva a um pequeno deslocamento para região de menor potencial (esquerda), característico de uma interação eletrostática entre os complexos e o DNA, possivelmente esta interação ocorra com o grupo fosfato do DNA, o qual é carregado negativamente, enquanto os

complexos possuem uma carga positiva (Da Silva et al., 2012). Já com o complexo SCAR 6 não é possível observar deslocamento de potencial, uma vez que este complexo precipita durante a titulação, o que é uma característica de interação covalente com o DNA. Para poder confirmar estes resultados foi realizado o ensaio de interação por viscosidade.

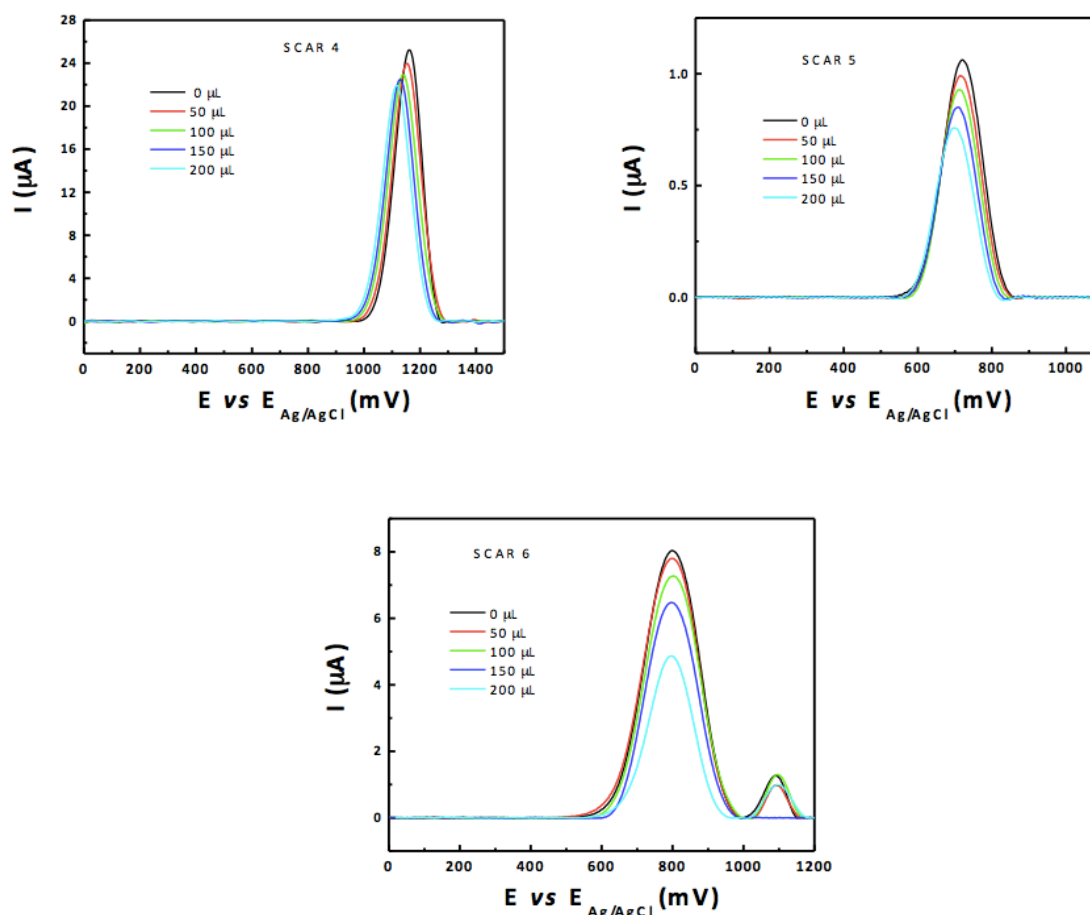


Figura 12. Voltagramas de onda quadrada de 1.0 mM dos complexos SCAR 4, 5 e 6 no eletrodo de carbono vítreo em tampão Tris-HCl (pH 7,4), 30% de DMSO foi usado como eletrólito de suporte, 4,2 mM de ct-DNA. Frequência = 50 Hz, pulso = 75 mV e potencial = 2 mV

4.2.3.2. Viscosidade

Na ensaio de viscosidade foi possível observar e confirmar que os complexos SCAR 4 e SCAR 5, apresentam interação eletrostática com o DNA, uma vez que estes não sofreram variação na viscosidade, enquanto que o SCAR 6, apresentou uma

diminuição da viscosidade, característico de interação covalente. Este resultado pode ainda ser comparado com o perfil de viscosidade apresentado pela cisplatina, a qual já é conhecida na literatura por apresentar uma interação covalente com o DNA (Suntharalingam et al., 2013). Como pode-se observar na Figura 13 o comportamento do SCAR 6 é bem semelhante ao da cisplatina.

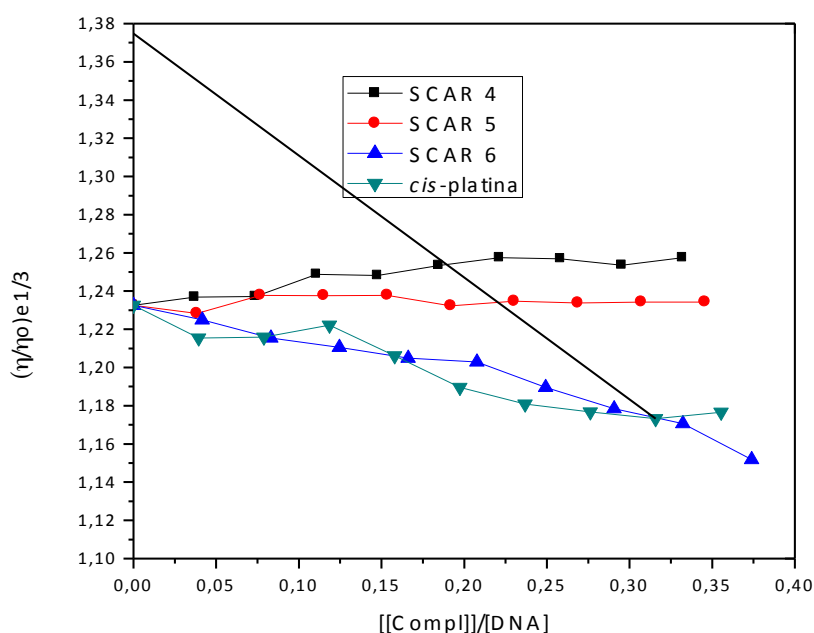


Figura 13. Efeito da concentração dos complexos SCAR e da cisplatina na viscosidade do ct-DNA a 298K

4.4. Avaliação da Permeabilidade *in vitro*

4.4.1. Validação dos métodos analíticos

4.4.1.1. Especificidade

Os métodos desenvolvidos demonstraram ser específicos para as amostras em estudo, não ocorrendo interferências perceptíveis em relação aos picos dos complexos SCAR e dos controles.

A Figura 14 representa os cromatogramas de injeções das soluções branco (tampão de permeabilidade) e dos complexos SCAR 4, 5 e 6.

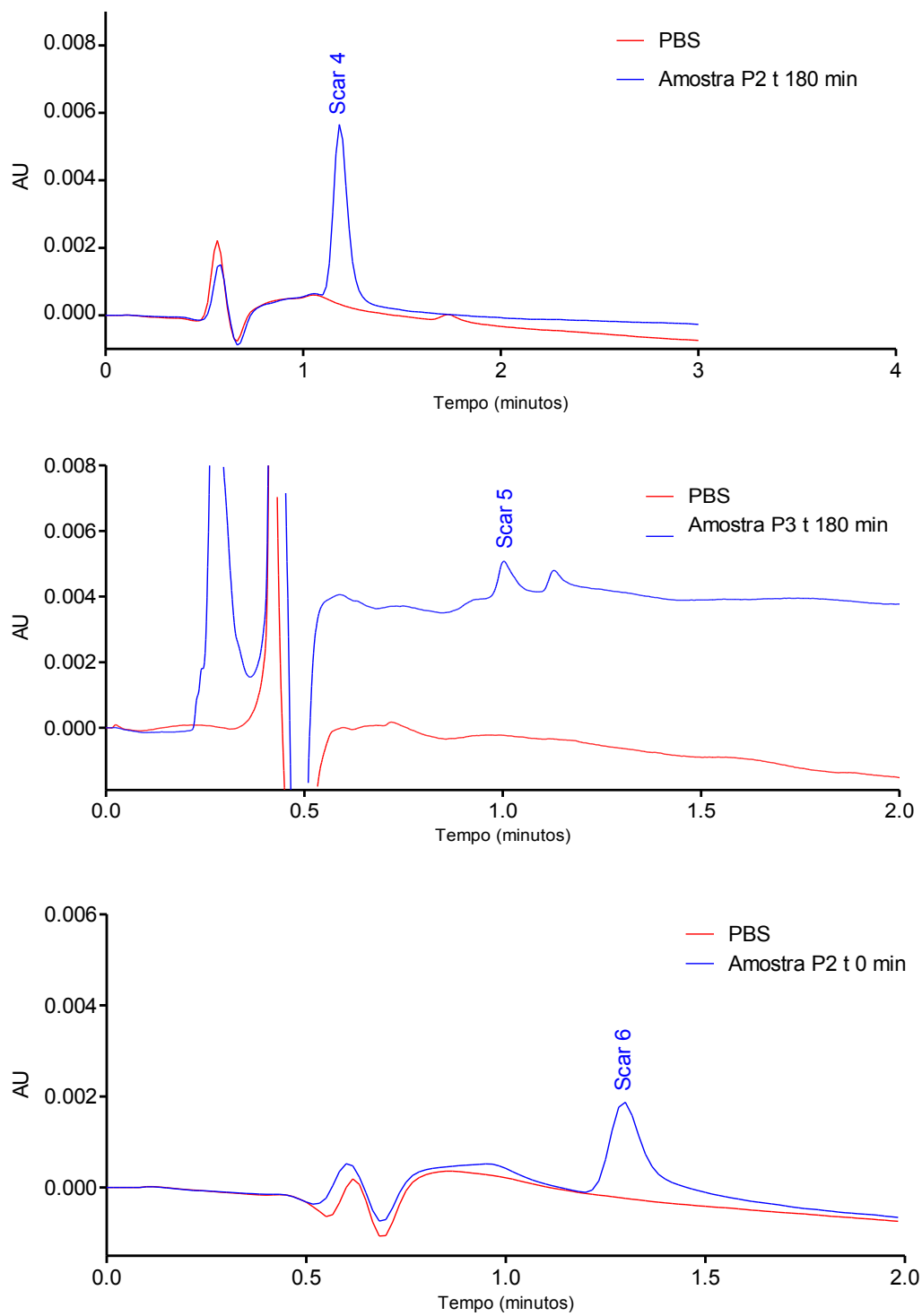


Figura 14. Cromatogramas de injeções de solução branco (tampão de permeabilidade) e das soluções dos complexos SCAR 4, 5 e 5 em tampão de permeabilidade no pH 7,4.

4.4.1.2. Linearidade

A linearidade foi avaliada pela injeção em triplicata de padrões de calibração dos complexos preparados por diluição em tampão de permeabilidade a partir de soluções estoque (500 µg/mL) em DMSO.

A linearidade do cloridrato de verapamil e da fluoresceína foi avaliada em triplicata utilizando padrões de calibração preparados por diluição em tampão de permeabilidade a partir de solução estoque de 10 mg/mL de cloridrato de verapamil em água e de 1 mg/mL de fluoresceína em DMSO.

Os resultados de exatidão avaliados permaneceram dentro do intervalo de 85-115% em pelo menos 4 de cada 6 níveis de concentração da curva. Os parâmetros relacionados à linearidade (coeficientes angular, linear e de determinação) estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Linearidade dos analitos avaliados

Analito	Intervalo (ng/mL)	r²	equação
SCAR 4	500 - 16000	0,99996	y=2228,42x-427,87
SCAR 5	500 - 32000	0,99994	y=5111,41x-896,58
SCAR 6	500 - 16000	0,99994	y=2111,72x-495,00
verapamil	312,5 - 20000	0,99997	y=4770,11x-1101,27
fluoresceína	39 - 20000	0,99994	y=2111,72x-495,00

4.4.2. Avaliação da integridade de membranas de células Caco-2 por meio da Resistência Elétrica Transepitelial

A integridade das membranas formadas pelas células Caco-2 cultivadas sob o sistema Transwell® foi avaliada por meio da determinação da RET. Foi utilizado um minivoltímetro Millicell ERS® - Millipore com eletrodos colocados nos compartimentos apical e basolateral da placa. Os resultados de RET obtidos aos 10, 15 e 21 dias de cultivo e durante o início e final dos experimentos de permeabilidade com os

complexos SCAR são apresentados na Figura 15.

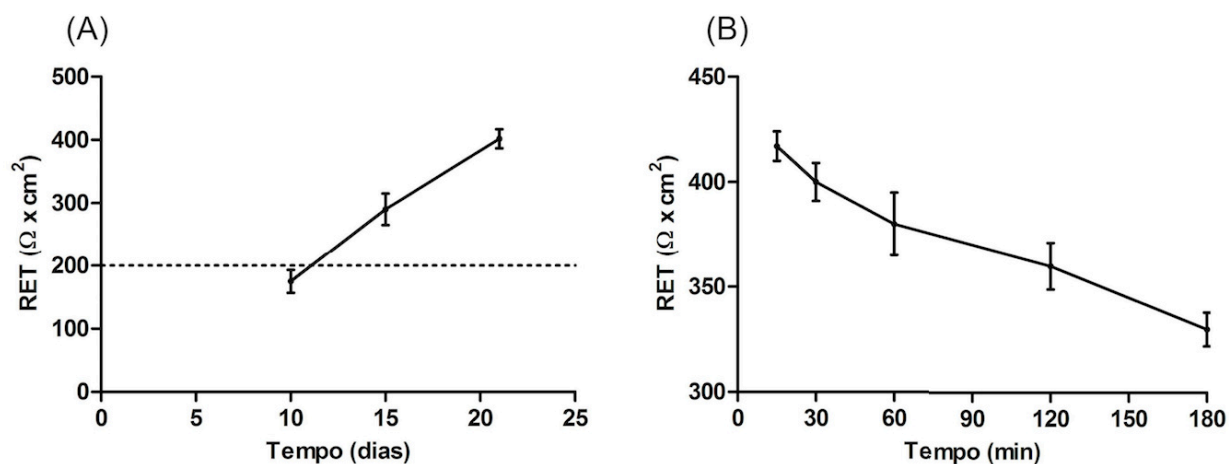


Figura 15. (A) Valores de RET obtidos com as membranas de células Caco-2 aos 10, 15 e 21 dias de cultivo em meio DMEM com pH 7,4 e (B) nas condições do ensaio de permeabilidade do complexo SCAR 5 no início (T15) e no fim (T180) do experimento. Média de seis determinações

A avaliação do RET durante o cultivo das células Caco-2 apresentou valores crescentes com média de 290 – 402 $\Omega \times \text{cm}^2$ entre o 15º e 21º dias de cultivo. Os valores de RET obtidos durante o ensaio de permeabilidade para o complexo SCAR 5, por exemplo, variaram de 417 – 330 $\Omega \times \text{cm}^2$. Apesar dos níveis diminuídos de RET, em nenhum ensaio os valores foram inferiores a 200 $\Omega \times \text{cm}^2$ (Fernandes et al., 2012).

Além disso, a formação da monocamada de Caco-2 foi acompanhada por análise microscópica de subcultivos independentes. Estas células foram subcultivadas em placas de 24 poços com 1,93 cm^2 de área de crescimento, nas mesmas condições que as células cultivadas sob o sistema Transwell® (tempo, concentração celular e meio de cultura) (Figura 16).

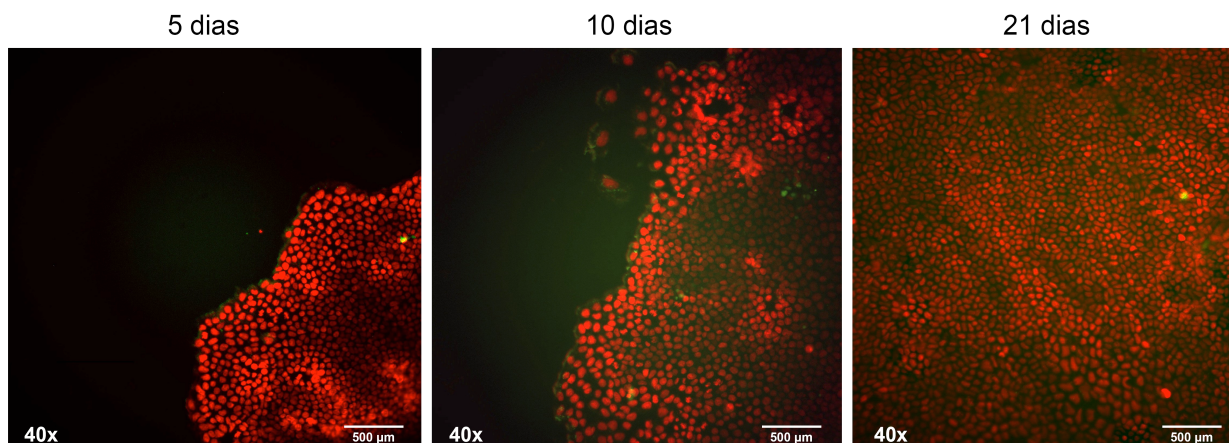


Figura 16. Fotomicrografia de células Caco-2 em diferentes pontos após o subcultivo a uma densidade de $5,0 \times 10^4$ células/cm². In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare), amplitude de 40x, coloração dos núcleos em Hoechst (vermelho) que mostra a densidade celular aos 5, 10 e 21 dias. Laboratório Multiusuário, FCF - UNESP Araraquara. Fonte: arquivo pessoal.

4.4.3. Permeabilidade dos complexos SCAR através das células Caco-2

Os valores do *Papp* dos complexos SCAR 4, 5 e 6, fluoresceína e verapamil foram determinados a partir da fração permeada no sentido apical - basolateral empregando membranas de células Caco-2. A Tabela 5 apresenta os valores do *Papp* calculados a partir da fração permeada dos complexos SCAR através das membranas de células Caco-2 depois de 21 dias de cultivo

A partir dos dados da fração permeada do verapamil e da fluoresceína foram obtidos os seguintes valores do *Papp*:

$$P_{app} \text{ verapamil} = 41,08 \pm 7,5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

$$P_{app} \text{ fluoresceína} = 0,11 \pm 0,03 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

Estes resultados estão de acordo com a literatura já que verapamil e fluoresceína foram utilizados neste estudo como padrões de alta e baixa permeabilidade, respectivamente, para avaliar a adequação e a integridade das condições de cultura das membranas das células Caco-2 (Fernandes et al., 2012).

Tabela 5. Valores de log P e P_{app} para o transporte apical-basal dos complexos SCAR em monocamadas de células Caco-2 na ausência (-) ou na presença (+) de 4% de BSA no compartimento basolateral^a

Complexo	log P ^b	P_{app} (10 ⁻⁶ cm/s) ^c	
		(-) BSA	(+) BSA
SCAR 4	1,7	9,07 ± 1,6	13,90 ± 2,8
SCAR 5	4,6	15,34 ± 1,81	24,71 ± 3,92*
SCAR 6	6,2	1,38 ± 0,07	0,15 ± 0,02*

^a* $P < 0,05$, diferença significativa entre os tratamentos (-) e (+) BSA

^b Coeficiente de partição determinado segundo o *Guideline* 117 (2004) da OECD.

^c Média ± D.P de n = 3

4.4.4. Cálculo do log P

A curva de linearidade curva de log k versus log P dos padrões utilizados permitiu o cálculo da equação $y=0,3153x - 0,3889$ e coeficiente de correlação, $r = 0,997$. O log P alcançado foi de 1,7 (0,58 min), 4,6 (2,95 min) e 6,2 (9,00 min) para SCAR 4, 5 e 6, respectivamente (Tabela 5).

4.4.5. Interação com a Albumina do Soro Bovino

A Tabela 6 apresenta os valores das constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), e da constante de velocidade de supressão biomolecular (K_q), calculadas levando em consideração o tempo de vida no estado excitado da BSA ($t_0 = 6,2 \times 10^{-9}$ s)

Tabela 6. Resultados obtidos para a constante K_{sv} e K_q dos complexos SCAR 4, 5 e 6

Complexos	T (K)	$K_{sv}(10^4 \text{ L.mol}^{-1})$	$K_q (10^{12} \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
SCAR 4	295	1,594 ± 0,076	2,571
	300	1,595 ± 0,059	2,573
	305	1,581 ± 0,065	2,550
	310	1,581 ± 0,069	2,550
SCAR 5	295	1,516 ± 0,077	2,445
	300	1,515 ± 0,073	2,444
	305	1,502 ± 0,055	2,422
	310	1,502 ± 0,050	2,422
SCAR 6	295	22,607 ± 1,759	36,462

300	22,923 ± 2,014	36,973
305	23,097 ± 1,789	37,253
310	23,880 ± 1,157	38,516

De acordo com os valores obtidos para K_{sv} e K_q para o SCAR 4 e SCAR 5 observa-se uma diminuição das constantes com o aumento da temperatura, o que é observado em casos de mecanismo estático. Já para o SCAR 6 observa um aumento dos valores de K_{sv} e K_q , o que sugere que o mecanismo tenha um caráter dinâmico além do estático, um vez que seu valor de K_q é maior do que o valor máximo possível para o mecanismo dinâmico (Ware, 1962).

Considerando então que a supressão da fluorescência da BSA ocorre pelo modo estático, ou seja, pela formação de uma espécie intermediária, o equilíbrio entre os reagentes (BSA e complexo) e o produto (BSA+complexo) pode ser representado em função da intensidade da fluorescência e desta forma os parâmetros de ligação podem ser determinados pela seguinte equação:

$$\log \frac{(F_0-F)}{F} = \log K_b + n \log [Q]$$

Onde K_b é a constante de ligação entre o complexo e a BSA, e n é o número de sítios de ligação por molécula de BSA. A constante K_b é obtida a partir do coeficiente linear da reta obtida por meio do gráfico de $\log [(F_0-F)/F]$ versus $\log [Q]$. O número de sítios de ligação do complexo (n) também pode ser calculado a partir do coeficiente angular desta mesma equação da reta. A Tabela 7 apresenta os valores obtidos para a constante de ligação K_b e valor de n para os complexos estudados.

Tabela 7. Valores obtidos de K_b e n para os complexos SCAR 4, 5 e 6

Complexos	T (K)	K_b	n
SCAR 4	295	$(1,345 \pm 0,691) \times 10^3$	0,735
	300	$(1,595 \pm 0,862) \times 10^3$	0,751
	305	$(1,592 \pm 0,851) \times 10^3$	0,754
	310	$(1,621 \pm 0,929) \times 10^3$	0,757
SCAR 5	295	$(1,501 \pm 0,256) \times 10^4$	1,031
	300	$(3,829 \pm 0,556) \times 10^4$	1,162
	305	$(3,946 \pm 0,918) \times 10^4$	1,162
	310	$(4,711 \pm 1,512) \times 10^4$	1,178
SCAR 6	295	$(1,912 \pm 0,309) \times 10^6$	1,308
	300	$(3,033 \pm 0,554) \times 10^6$	1,361
	305	$(2,998 \pm 0,430) \times 10^6$	1,362
	310	$(3,828 \pm 0,289) \times 10^6$	1,390

De acordo com os dados da Tabela 7, pode se observar que o complexo SCAR 6 apresenta maior valor de interação com BSA (K_b), enquanto o complexo SCAR 4 apresenta menor valor de interação. Além disso, podemos observar que todos os complexos se ligam à albumina por apenas um sítio de ligação, já que o valor de n é sempre próximo a 1.

A fim de avaliar o tipo de interação segundo as forças que atuam entre os complexos e a BSA, vários parâmetros termodinâmicos como energia de Gibbs (ΔG°), variação de entalpia (ΔH°) e variações de entropia (ΔS°) foram determinados. Estes parâmetros puderam ser determinados com base na seguinte equação:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$$

Onde R = constante dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e K é a constante de interação com a BSA (K_b). Através da seguinte equação foi possível obter os valores de ΔH° e ΔS° a partir de um gráfico de $\ln K_b$ versus $1/T$:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

Na Tabela 8 são apresentados os resultados obtidos para os três parâmetros termodinâmicos estudados.

Tabela 8. Valores encontrados para os parâmetros termodinâmicos apresentados pelos complexos SCAR 4, 5 e 6

Complexos	ΔH° (kJ.mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔS° (J.mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)			
			295K	300K	305K	310K
SCAR 4	8,249	88,278	-17,792	-18,234	-18,676	-19,117
SCAR 5	53,019	261,617	-24,158	-25,466	-26,774	-28,082
SCAR 6	31,607	227,280	-35,440	-36,577	-37,713	-38,849

Os tipos de interação que atuam entre os complexos e a BSA podem ser indicados a partir do sinal e da magnitude dos parâmetros termodinâmicos. Se os valores de ΔH° e ΔS° forem ambos positivos, forças hidrofóbicas atuam entre os complexos e a BSA, se ambos os valores de ΔH° e ΔS° forem negativos, as forças que atuam na complexação são as forças de van der Waals e interações por ligações de hidrogênio, enquanto que um valor negativo de ΔH° e positivo para ΔS° indica interação eletrostática (Ross & Subramanian, 1981).

Segundo os critérios apresentados acima e de acordo com os dados da Tabela 8, pode-se observar que todos os complexos apresentam interações por forças hidrofóbicas. Como visto, todos os complexos estudados interagem com a albumina em apenas um sítio de ligação, sendo assim, como todos os complexos apresentam forças de interação hidrofóbicas, provavelmente se ligam ao Trp-212 localizado em uma região hidrofílica da proteína. Além disso, é evidente que a interação dos complexos com a BSA é espontânea, uma vez que os valores de ΔG° são negativos.

5. DISCUSSÃO

5.1. Avaliação do potencial toxicogenético *in vitro*

Ver capítulo 2 (página 91)

5.2. Avaliação da atividade antitumoral *in vitro*

A quimioterapia baseada em metalofármacos está bem estabelecida desde a aplicação de complexos de platina no tratamento de diversos tipos de câncer (Wong & Giandomenico 1999; Ronconi & Sadler 2007). O sucesso desta terapia tem estimulado a busca de novos complexos em substituição a platina com perfis de toxicidade mais aceitáveis e atividades expandidas (Komor & Barton 2013; Pagoto et al., 2015).

O uso do rutênio como composto de coordenação desponta com uma alternativa eficaz e com baixa toxicidade em comparação a outros metais. Esses efeitos oportunos, fomentaram nos últimos anos a descoberta de uma série de complexos de rutênio com atividades antitumorais (Camargo et al., 2016; Lazić et al., 2016; Lopes et al., 2015; Peña et al., 2014).

Atualmente, pode-se destacar o estudo clínico de complexos de rutênio como: (i) NKP-1339 para segurança, tolerância farmacocinética e farmacodinâmica (Trondl et al., 2014); (ii) KP1019 em testes com pacientes portadores de tumores sólidos avançados sem outras opções terapêuticas (Hartinger et al., 2008) e (iii) NAMI-A com resultados importantes de baixa toxicidade e capacidade de diminuir a taxa de metástase de tumores (Leijen et al., 2015; Sava et al., 2002).

Diante dos convenientes resultados apresentados pelos complexos de rutênio(II) SCAR (De Grandis et al., 2016; Pavan et al., 2010, 2011, 2013) a nossa estratégia atual foi avaliar a atividade antitumoral dos complexos SCAR 4, 5 e 6 por meio de ensaios de citotoxicidade frente a linhagens tumorais humanas e o estudo dos

possíveis mecanismos funcionais, tais como a interação com o DNA e inibição da Top IB.

A citotoxicidade dos complexos SCAR 4, 5 e 6 foi avaliada nas células Caco-2, DU-145, HeLa, HepG2, MDA-MB-231 e MRC-5 pelo ensaio da resazurina. Para fins de comparação, também foi avaliada a citotoxicidade da cisplatina.

Os valores de IC_{50} estão listados na Tabela 3. SCAR 5, com valores de IC_{50} variando de 1,5 a 8,7 μM , apresentou a maior atividade frente as linhagens tumorais em comparação com os outros complexos, inclusive com citotoxicidade maior que a da cisplatina em todas as linhagens testadas.

O complexo SCAR 5 tem, em relação ao SCAR 4, a adição de um fosfina bidentada, o que pode explicar o aumento da citotoxicidade. Acredita-se que a atividade citotóxica pode ser reforçada pelo aumento da lipofilicidade devido a fosfina (Motswainyana & Ajibade, 2015). Estudos mostram que a adição de fosfinas em complexos de ouro(I) contribuem consideravelmente no efeito citotóxico em relação ao metal livre (Meyer et al., 2013). Também pôde ser demonstrado em estudos *in vitro* que complexos contendo ligantes piridil fosfina bidentados afetam a lipofilicidade da molécula e acredita-se que isso tenha uma estreita relação com a hepatotoxicidade *in vitro*, além de afetar consideravelmente a absorção por células tumorais e ligação a proteínas do plasma (Liu et al., 2008; McKeage et al., 2000).

Diferentemente dos complexos SCAR 4 e 5, o complexo 6 apresentou valores elevados de IC_{50} , no entanto, foi o complexo que apresentou maiores índices de seletividade, acima de 10 (dez) para a linhagem MDA-MB-231, enquanto a cisplatina apresenta para o mesmo tipo celular valores de IC_{50} três vezes maiores e sem seletividade quando comparado com o IC_{50} em células normais (MRC-5) (Tabela 3).

O complexo SCAR 6 também apresentou seletividade de ação em células HepG2 em períodos de tratamento de 48 h pelo ensaio de sobrevivência clonogênica. Nestes ensaios, SCAR 6, nas maiores concentrações testadas (50 e 100 μ M) diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a sobrevivência celular das células tumorais, enquanto, do mesmo modo, não alterou a sobrevivência das células normais (De Grandis et al., 2016).

Nas cinco linhagens tumorais empregadas neste estudo, SCAR 6 apresentou índices de seletividade notáveis para quatro delas, com destaque para a linhagens provenientes de câncer de próstata e mama (Tabela 3). O desenvolvimento de complexos de rutênio de baixa toxicidade é atraente para o desenvolvimento de futuras terapias anti-câncer (Clavel et al., 2014).

Vários trabalhos têm mostrado, recentemente, a promissora atividade antitumoral de complexos de rutênio frente a linhagens celulares humanas (Colina-Vegas et al., 2015; Corrêa et al., 2016; Lima et al., 2014; Liu et al., 2016; Zhang et al., 2016), embora poucos têm detalhado mecanismos moleculares subjacentes a esses efeitos. É geralmente aceito que a atividade antitumoral de complexos de rutênio surge da sua capacidade de interagir com o DNA, formando adutos com vários tipos de ligações cruzadas, assim como a cisplatina (Kelland, 2007).

Complexos de metais de transição são conhecidos por se ligarem ao DNA através de interações covalentes e/ou não covalentes (Turel & Kljun, 2011). No caso de ligação covalente, um ligante lábil pode ser substituído por uma base da molécula de DNA, tais como a guanina na posição N7, da mesma forma que a cisplatina desempenha seu mecanismo de ação (Kelland, 2007), já as ligações não covalentes, incluem eventos como intercalação, interações eletrostáticas e de superfície entre os

complexos com a porção externa da dupla hélice, ao longo dos sulcos maiores e menores do DNA (Drevensek et al., 2006; Vilfan et al., 2003).

A investigação da interação dos complexos SCAR com o ct-DNA através da SWV, indicou uma mudança do potencial redox para valores negativos (deslocamento para a esquerda) (Figura 12), com Δ de 39 mV para SCAR 4 e 19 mV para SCAR 5, indicativo de uma interação eletrostática entre estes complexos e o DNA, possivelmente esta interação ocorra com o grupo fosfato do DNA, o qual é carregado negativamente, enquanto os complexos possuem uma carga positiva (Da Silva et al., 2012; Sirajuddin et al., 2013). De forma interessante, nenhum deslocamento foi observado para complexo SCAR 6 ($\Delta = 0$), uma vez que o mesmo precipitava o ct-DNA durante a titulação.

Portanto, para esclarecer melhor o tipo de interação entre os complexos e o ct-DNA, foram realizadas medições da viscosidade na presença e ausência dos complexos. Esse método é sensível às alterações de comprimento do DNA e, portanto, a sua análise por meio da adição de concentrações crescentes dos complexos, é um método mais claro que evidencia de forma confiável o modo de ligação complexo-DNA (García-Gimenez et al., 2009; Li et al., 2010).

A Figura 13 mostra que o complexo SCAR 6 diminuiu de forma significativa a viscosidade relativa do DNA conforme o aumento da concentração do complexo no tampão de ct-DNA. Isto indica que esse complexo interage por intercalação não-clássica ou covalente o que pode provocar uma curvatura ou torção da hélice de DNA, reduzindo seu comprimento efetivo e, como resultado, a viscosidade da solução de DNA é diminuída (Kelly et al., 1885; Liu et al., 2002). Esse resultado apresenta o mesmo perfil da cisplatina (Figura 13), conhecida por causar no DNA um “efeito de

encurtamento” devido a ligação covalente que determina a diminuição da viscosidade (Kathiresan et al., 2015; Selvi & Palaniandavar, 2002).

A interação covalente sugerida para o complexo SCAR 6 pode ser explicada por uma possível hidrólise dos seus ligantes cloreto, gerando uma espécie “bis-aqua”, que pode se ligar irreversivelmente ao DNA, tal como a estrutura quadrado planar da cisplatina (Kelland, 2007; Page, 2012). Esse tipo de ligação pode causar quebra de DNA e, conseqüentemente, formação de micronúcleos, como evidenciado pelo ensaio do CBMN-cit em células HepG2 (De Grandis et al., 2016).

Este tipo de interação pode ainda explicar o arraste das bandas de DNA plasmidial superenovelado que impossibilitou a interpretação dos resultados do ensaio de relaxamento do DNA na avaliação da atividade inibitória de Top IB. Provavelmente, o complexo SCAR 6, nas concentrações testadas, interagiu preferencialmente com o DNA, sendo que a atividade da enzima não pôde ser avaliada.

Já a atividade dos complexos SCAR 4 e 5 na inibição da atividade de relaxamento da Top IB foi avaliada normalmente, incubando-se 0,5 µg de DNA plasmidial superenovelado com a enzima na presença ou ausência de diferentes concentrações dos complexos.

A atividade de relaxamento monitorada por 10 minutos mostrou que os complexos inibem a atividade da Top IB de uma forma dose-dependente, sendo SCAR 5 o mais ativo, uma vez que a inibição completa da Top IB é atingida a 12,5 µM (Figura 8), enquanto que SCAR 4 inibe completamente a enzima na concentração de 200 µM (Figura 9). A banda do DNA plasmidial superenovelado, na ausência da enzima, tem a mesma altura na ausência e na presença de uma grande concentração de SCAR 4 e 5, indicando que estes complexos não interagem com o substrato de DNA nas concentrações testadas (Figuras 8 e 9).

SCAR 5 pode ser mais ativo que SCAR 4 devido a fosfina bidentada adicional, dando ao complexo um volume molecular mais elevado que pode contribuir para a capacidade e inibição por ligação direta a Top IB ou complexo Top IB-DNA, como sugerido por Camargo et al. (2016).

A menor concentração de SCAR 5 testada, ainda foi suficiente para causar inibição completa da atividade da Top IB, quando o complexo foi pré-incubado com a enzima. Como observado na Figura 11, na concentração de 1,25 μ M, SCAR 5 inibe completamente a enzima quando pré-incubado por 5 minutos antes da adição do substrato de DNA, sugerindo que o composto interaja diretamente com a enzima.

Valores de IC₅₀ baixos e alta atividade de inibição de Top IB mostram que SCAR 5 representa um candidato promissor na terapia antitumoral. Sua elevada citotoxicidade em células tumorais, principalmente derivadas de carcinomas de próstata e mama, pode ser explicada pela sua também elevada atividade de inibição de Top IB, causando bloqueio do complexo de clivagem Top IB ou por inibição da atividade catalítica da enzima (Barros et al., 2013). Assim, Top IB inibida, não produz quebras em uma das cadeias do DNA que permitem o giro da cadeia intacta, regulando o número de ligações topológicas entre as cadeias de DNA (Roca, 1995). A inibição dessa atividade causa danos no DNA e, conseqüentemente, leva a célula a morte (Hong & Kreuzer, 2000; He et al. 2014).

Uma vez que células tumorais frequentemente, apresentam maiores quantidades de Top IB do que células normais, as primeiras devem ser mais sensíveis aos efeitos dos inibidores da enzima (Barros et al., 2013). Isto pode fundamentar os efeitos citotóxicos e seletivos dos complexos SCAR 4 e 5. No entanto, o mecanismo exato desta atividade precisa ser mais detalhado.

5.3. Avaliação da permeação *in vitro*

Os complexos de rutênio(II) SCAR 4, 5 e 6 apresentaram resultados promissores na avaliação do seu potencial antitumoral, na atividade contra isolados clínicos resistentes de *M. tuberculosis*, (Pavan et al., 2013), além de não terem apresentado atividade mutagênica (SCAR 4 e 5) (De Grandis et al., 2016), de modo que estes complexos têm um grande potencial para o uso terapêutico. No entanto, até agora na literatura, não há nenhuma evidência sobre a capacidade desses complexos permearem membranas celulares ou sobre possíveis interações com proteínas do soro, parâmetros que serão importantes na decisão do seu uso clínico.

Ao longo dos últimos anos, o uso de membranas de células Caco-2 têm se tornado uma ferramenta de rastreio rápido para o *screening* de novas moléculas, uma vez que o transporte de fármacos através das monocamadas de células Caco-2 mostrou correlação com a biodisponibilidade e absorção oral *in vivo* (Artursson & Karlsson 1991; Hubatsch et al., 2007).

Para se avaliar a integridade das membranas formadas pelas células Caco-2, foi estabelecido anteriormente aos testes de permeabilidade os valores de RET. A utilização desse parâmetro junto com os controles de verapamil e fluoresceína, marcadores de alta e baixa permeabilidade respectivamente, são amplamente utilizados como indicadores da integridade da membrana (Fernandes et al., 2014). Os valores obtidos neste estudo estão de acordo com a literatura (Chang et al., 2013; Fernandes et al., 2014) e demonstram que as membranas tinham sua integridade adequada.

De acordo com a classificação proposta por Yee (1997) em ensaios sem a adição de 4,0% (m/v) de BSA, SCAR 4, 5 e 6 podem ser classificados como fármacos de moderada, alta e baixa absorção, respectivamente.

O aumento do *Papp* do complexo SCAR 5 pode se resultado da sua alta lipofilicidade a qual favorece sua permeabilidade através das membranas de Caco-2, apresentado os maiores valores de *Papp* (Tabela 5).

O aumento dessa lipofilia e por consequente, permeabilidade, pode ser explicado pela presença do ligante fosfina adicional à molécula. Como demonstrado, o uso de difosfinas como ligantes, pode ajustar o equilíbrio lipofílico/hidrofílico em complexos de ouro, e, em geral, sua atividade é aumentada quando a lipofilicidade também é aumentada (Lima & Rodríguez, 2011). Além da correlação com a permeabilidade *in vivo*, estudos em monocamadas de Caco-2 mostraram que a permeabilidade de diferentes fármacos aumenta com o aumento de sua lipofilicidade, inclusive com acúmulo na mucosa do jejuno de ratos para os fármacos mais lipofílicos (Yamashita et al., 1997).

No entanto, mesmo apresentando um coeficiente de lipofilicidade alto, SCAR 6 apresenta baixa permeação através das membranas de Caco-2. Esse efeito pode ser apoiado pelo fato de que fármacos com altos valores de log P, ou seja, muito lipofílicos, tendem a se reter na membrana e por isso são pouco absorvidos. Na verdade, a relação entre log P e absorção oral requer a consideração do estado de carga dos grupamentos ionizáveis da molécula que certamente desempenham um papel fundamental na velocidade de permeação de membrana (Doak et al., 2014; Veber et al., 2002).

De acordo com as cinco regras propostas por Lipinski et al. (1997, 2001), aproximadamente 90% dos fármacos seguem, entre outros parâmetros, que o aumento da absorção passiva através de membranas celulares está relacionado com o aumento da lipofilia, com log P dentro da faixa ≤ 5 e ≥ 0 . Desse modo, o log P de 6,2 apresentado pelo complexo SCAR 6 pode dificultar sua permeação em monocamadas

de Caco-2, explicando seus baixos valores de *Papp* (Tabela 5). A alta lipofilicidade de SCAR 6 em relação aos outros complexos pode ser devido a ausência do ligante picolinato que apresenta um grupamento éster ligado ao centro metálico, esta substituição por dois ligantes cloreto, que não conjugam bem elétrons, pode tornar a molécula menos solúvel em água.

O efeito da BSA na permeação dos complexos também foi avaliada uma vez que a adição da proteína no compartimento basolateral é uma estratégia para a otimização da determinação de permeabilidade para fármacos lipofílicos que tendem a se acumular no interior das células ou mesmo, adsorver no material plástico dos filtros (Fossati et al., 2008; Krishna et al., 2001). Nestes ensaios, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na permeação do complexo SCAR 5, com *Papp* de $24,71 \times 10^{-6}$ cm/s, enquanto que SCAR 6 reduziu significativamente ($p < 0,05$) sua permeação através da monocamada de Caco-2, apresentando *Papp* de $0,15 \times 10^{-6}$ cm/s (Tabela 5).

O complexo SCAR 4 apresentou aumento discreto nos valores de *Papp* no ensaio com adição de BSA, mas suficiente para classificá-lo como fármaco de alta absorção oral segundo a classificação proposta por Yee (1997). A BSA foi utilizada neste estudo como modelo de proteína globular solúvel no plasma. A estrutura primária da BSA é bastante semelhante à albumina do soro humano (HSA), com 75% da sequência de aminoácidos conservados, o que faz da BSA um bom modelo de confiança *in vitro* (Gomme & McCann, 2005).

É esperado para complexos altamente lipofílicos, como SCAR 6, que a presença de BSA no compartimento receptor favoreça o *Papp*, uma vez que a presença da proteína no tampão pode impedir o retorno no sentido inverso da absorção, ou mesmo que o fármaco se acumule no interior da célula (Krishna et al., 2001). No entanto,

nossos resultados vão de encontro com essa observação.

Observando os resultados dos ensaios de interação com BSA podemos sugerir que SCAR 6, devido a sua alta afinidade com a proteína, não apresenta-se disponível para quantificação no tampão de permeabilidade no ensaio de permeação através de monocamadas de Caco-2.

A albumina é a proteína mais abundante no plasma e é por meio da ligação com essas biomoléculas que os fármacos, íons metálicos e outras moléculas são transportadas através da corrente sanguínea (Das et al., 2015). Os valores das constantes de Stern-Volmer (K_{sv}), e da constante de velocidade de supressão biomolecular (K_q) para os complexos SCAR 4 e 5 apresentados na Tabela 6, sugerem uma boa interação com a albumina, enquanto SCAR 6 apresenta uma interação forte com a proteína, já que a intensidade da fluorescência dos resíduos da BSA diminui consideravelmente conforme a concentração de SCAR 6 é aumentada.

Para diferenciar o mecanismo pelo qual a interação entre os complexos SCAR interagem com a BSA pode-se avaliar o comportamento das constantes K_{sv} e K_q em diferentes temperaturas (Tabela 6). A supressão dinâmica depende das colisões entre o fluoróforo e supressor, e estas colisões aumentam com o aumento da temperatura, quando ocorre uma diminuição da viscosidade do meio, como observado para o complexo SCAR 6. Assim, o aumento da temperatura conduz a um aumento da constante no caso do mecanismo dinâmico. Por outro lado, para os complexos SCAR 4 e 5, observa-se um mecanismo de supressão estático, que ocorre devido à formação de um complexo com estado de menor energia entre fluoróforo e o supressor, sendo que a formação do complexo albumina-SCARs diminui com o aumento de temperatura (Ganeshpandian et al., 2014).

Os valores de K_q ($> 10^{12} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para SCAR 4 e 5 são maiores do que o de

outros complexos de rutênio(II) relatados recentemente (Camargo et al., 2016; Corrêa et al., 2015; Vijayan et al., 2014), além disso, verifica-se que os resultados obtidos para K_q são muito maiores do que o valor máximo possível para o mecanismo dinâmico ($2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Sharma et al., 2014), podendo sugerir, desta forma, que a supressão da BSA pelos complexos SCAR 4 e 5 não ocorre por uma colisão dinâmica, mas sim pela formação de uma espécie intermediária, ou seja, de modo estático (Ramadevi et al., 2015).

A interação entre os complexos SCAR e a BSA pode ocorrer por meio de diferentes tipos de interações moleculares, como ligações de hidrogênio, de van der Waals, e interações eletrostáticas e hidrofóbicas. A magnitude dos parâmetros termodinâmicos como ΔG° (variação de energia livre), ΔH° (variação de entalpia) e ΔS° (variação de entropia) são importantes para avaliar as interações moleculares envolvidas (Corrêa et al., 2015).

Os parâmetros termodinâmicos mostrados na Tabela 8 propõem que todos os complexos apresentam interações por forças hidrofóbicas uma vez que SCAR 4, 5 e 6 apresentam valores positivos de ΔH° e ΔS° como proposto por Ross & Subramanian (1981)

A forma com a qual os complexos SCAR se ligam às proteínas do soro tem um papel fundamental no seu desempenho *in vivo*, uma vez que o tipo e a intensidade de ligação pode determinar se o efeito biológico será reduzido ou aumentado (Gomme & McCann, 2005)

Outra função importante da albumina é sua capacidade de solubilizar fármacos pouco hidrossolúveis. Assim, fármacos muito lipofílicos podem ser transportados pela corrente sanguínea até alcançar seus tecidos alvo de forma eficaz. Além disso, a ligação à albumina do soro pode impedir a depuração metabólica, que leva ao aumento

da meia-vida dos fármacos no sangue, principalmente para moléculas que se ligam fortemente às proteínas do soro (Colmenarejo, 2003).

De acordo com a Tabela 7, em geral, os valores das constantes de ligação entre o complexo SCAR 6 e a BSA (K_b) são mais elevados, em comparação com os complexos 4 e 5 ($10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1}$), indicando que a presença dos ligantes cloreto em substituição ao picolinato, aumenta a afinidade de ligação do complexo com a BSA na ordem de 10^6 M^{-1} . É desejado que ocorra a interação entre os complexos e a BSA, porém esta interação deve ser reversível, ou seja, deve ser fraca a ponto de que o complexo seja liberado para atingir o alvo desejado, o que não ocorrerá se a interação for muito forte, de forma que o complexo permaneça indefinidamente ligado à albumina (Elsadek & Kratz, 2012; Hu et al.; 2005).

A ligação às proteínas do plasma influencia fortemente as concentrações do fármaco livre e pode ter um grande impacto na sua disponibilidade nos tecidos (Gomme & McCann, 2005).

A hidrólise dos ligantes cloreto do complexo SCAR 6 pode favorecer a formação da espécie “bis-aqua”. Essa espécie, resultante da hidratação em meios biológicos, tende a se ligar com alta afinidade aos resíduos das proteínas (Smith et al., 1996). A elevada constante de ligação (K_b) apresentada pelo complexo SCAR 6 nos ensaios de supressão da fluorescência dos resíduos de triptofano da BSA comprovam que este complexo liga-se tão fortemente à albumina que a presença da proteína no compartimento basolateral no ensaio de permeação com células Caco-2 diminui significativamente ($p < 0,05$) os valores de *Papp* nos ensaios (Tabela 5). Sugere-se, portanto, que o complexo uma vez ligado à BSA não pode ser quantificado pelo método cromatográfico, ou seja, SCAR 6 estaria menos disponível no tampão de permeabilidade.

Baseados no fato de que células tumorais expressam mais receptores para proteínas do plasma, como a transferrina (Calzolari et al., 2010; Sava & Bergamo, 2000), pode se sugerir que os promissores valores de seletividade do complexo SCAR 6 alcançados frente às linhagens Caco-2, DU-145, HepG2 e MDA-MB-231 podem ter relação a absorção preferencial dessa molécula por células tumorais. Por outro lado, sua baixa citotoxicidade nas células em geral, utilizadas neste estudo, pode estar relacionada com a dificuldade da molécula estar disponível uma vez que todos os ensaios foram realizados em meio D-MEM suplementado com SFB, rico em proteínas.

No desenvolvimento de novos fármacos, os problemas relacionados com permeabilidade e absorção oral podem ser minimizados pela utilização de conhecimentos farmacotécnicos. A pesquisa de novos sistemas de administração de fármacos têm sido muito relevante na busca por alternativas terapêuticas mais eficazes que entreguem os fármacos de forma mais segura e com efeitos colaterais minimizados. Em estudos anteriores, a incorporação dos complexos SCAR em sistemas nanoestruturados, foi capaz de diminuir a toxicidade dos complexos, sem afetar seu efeito contra cepas de *M. tuberculosis* (Freitas et al. 2014).

Como próximo passo no desenvolvimento de novos fármacos a partir dos complexos SCAR, é necessário aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos relacionados a absorção dessas moléculas, como a elucidação da prevalência de transporte ativo ou passivo e da influência do sistema de efluxo.

6. CONCLUSÃO

O estudo de uma série de atividades possibilitou verificar a riqueza das propriedades biológicas dos complexos do tipo $\text{Ru}[(\text{pic})(\text{dppe})(\text{phen})]\text{PF}_6$ (SCAR 4), *cis*- $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$ (SCAR 5) e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$ (SCAR 6).

Em relação a aplicação farmacológica desses complexos de Rutênio, e diante da importância do estudo toxicogenético de novos fármacos, pode-se afirmar que os complexos SCAR 4 e 5, não induzem mutações gênicas ou cromossômicas de acordo com os ensaios e as concentrações utilizadas neste estudo. Este resultado é conveniente já que esses complexos apresentaram, em estudos anteriores, atividade promissora contra cepas de TB-MDR.

SCAR 5, especialmente, atuou como um potente inibidor da atividade de relaxamento da Top IB, assim, pode também ser considerado um complexo não-mutagênico promissor, que deve ser mais explorado como possível fármaco anti-câncer. Enquanto SCAR 4 e 5 apresentaram comportamento semelhante na maioria dos ensaios realizados, o complexo SCAR 6, no entanto, apresenta estruturalmente uma diferença química que pode ser a razão pela qual a molécula interagiu covalentemente com o DNA nos ensaios apresentados neste trabalho.

Acreditamos ainda, que a atividade mutagênica apresentada pelo complexo SCAR 6 seja causada pela sua molécula hidrolizada que, ao substituir seus ligantes cloreto, forma uma espécie intermediária que pode se ligar covalentemente ao DNA levando à formação de adutos. Essa ação poderia ser melhor caracterizada através de técnicas como espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear (RMN). O efeito mutagênico, todavia, não é desanimador, uma vez que conhecer os possíveis danos que substâncias químicas causam no DNA é uma informação importante para o direcionamento da terapia. Como visto, SCAR 6, mesmo pouco citotóxico apresenta-se seletivo para a maioria das linhagens tumorais testadas. Esse comportamento, pode ainda, ser reflexo da atividade preferencial de complexos de rutênio em células tumorais, onde a lipofilia e a afinidade por proteínas do soro, podem tornar o complexo mais ativo.

Acreditados, baseados na literatura, que a técnica de avaliação da permeabilidade *in vitro* através de monocamadas de células Caco-2 pode correlacionar-se com a absorção oral de fármacos. Dessa forma, apresentamos os complexos SCAR 4 e 5 como candidatos de alta absorção oral com possível aplicação via enteral, ou seja, de forma mais conveniente, segura e econômica. Mesmo com baixa permeação *in vitro*, provavelmente devido a alta lipofilicidade, SCAR 6 pode ainda ter os problemas de absorção oral melhorados com o uso de ferramentas farmacotécnicas, tais como a utilização de sistemas nanoestruturados, como, por exemplo, incorporação em nanopartículas e nanocápsulas.

Em suma, este trabalho permitiu explorar variados aspectos biológicos dos complexos de rutênio(II) SCAR, sendo que os estudos aqui presentes poderão dar subsídio na elucidação dos mecanismos de ação desses complexos como possíveis fármacos antimicobacterianos e antitumorais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aardema, M. A. (2013). The Holy Grail in Genetic Toxicology: Follow-Up Approaches for Positive Results in the Ames Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 54 (August), 617–620.

Abele, J. T., Moore, R., Tymchak, W., & Owen, R. J. (2015). Prostate Perfusion Mapped by Technetium-99 Macroaggregated Albumin after Selective Arterial Injection. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 26, 418–425.

Aime, S., Crich, S. G., Gianolio, E., Giovenzana, G. B., Tei, L., & Terreno, E. (2006). High sensitivity lanthanide(III) based probes for MR-medical imaging. *Coordination Chemistry Reviews*, 250, 1562–1579.

Albani, B. A., Peña, B., Leed, N. A., De Paula, N. A. B. G., Pavani, C., Baptista, M. S., Turro, C. (2014). Marked improvement in photoinduced cell death by a new tris-heteroleptic complex with dual action: Singlet oxygen sensitization and ligand dissociation. *Journal of the American Chemical Society*, 136(49), 17055–17101.

Allardyce, C. S., Dyson, P. J. (2001). Ruthenium in medicine: Current clinical uses and future prospects. *Platinum Metals Review*, 45(2), 62–69.

American Cancer Society, ACS. (2013). Chemotherapy Principles. *American Cancer Society*, 1–29. Retrieved from www.cancer.org

Anbu, S., Ravishankaran, R., Karande, A. A., Kandaswamy, M. (2012). DNA targeting polyaza macrobicyclic dizinc(II) complexes promoting high in vitro caspase dependent anti-proliferative activity against human carcinoma cancer cells. *Dalton Transactions*, 41(41), 12970.

Antonarakis, E. S., Emadi, A. (2010). Ruthenium-based chemotherapeutics: Are they ready for prime time? *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 66, 1–9.

Arnon, J., Meirow, D., Lewis-Roness, H., Ornoy, A. (2001). Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Human Reproduction Update*, 7(4), 394–403.

Artursson, P., Karlsson, J. (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 175(3), 880–885.

Artursson, P., Palm, K., Luthman, K. (2001). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical drug transport predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(96), 27–43.

Baldessarini, R. J., Tondo, L. (2000). Does Lithium Treatment Still Work? *Archives of General Psychiatry*, 57, 187.

Barros, F. W. A., Bezerra, D. P., Ferreira, P. M. P., Cavalcanti, B. C., Silva, T. G., Pitta, M. G. R., Pessoa, C. (2013). Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(1), 37–46.

Benite, A. M. C., Machado, S. D. P., Barreiro, E. J. (2007). Uma visão da química bioinorgânica medicinal. *Química Nova*, 30(8), 2062–2067.

Berners-Price, S. J., Filipovska, A. (2011). Gold compounds as therapeutic agents for human diseases. *Metallomics : Integrated Biometal Science*, 3(9), 863–873.

Bernhardt, P. V, Wilson, G. J., Sharpe, P. C., Kalinowski, D. S., Richardson, D. R. (2008). Tuning the antiproliferative activity of biologically active iron chelators: Characterization of the coordination chemistry and biological efficacy of 2-acetylpyridine and 2-benzoylpyridine hydrazone ligands. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13(1), 107–119.

Bincoletto, C., Tersariol, I. L. S., Oliveira, C. R., Dreher, S., Fausto, D. M., Soufen, M. A., Caires, A. C. F. (2005). Chiral cyclopalladated complexes derived from N,N-dimethyl-1-phenethylamine with bridging bis(diphenylphosphine)ferrocene ligand as inhibitors of the cathepsin B activity and as antitumoral agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13(8), 3047–3055.

Broderick, J. B., Coucouvanis, D. (2003). Bioinorganic chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(2), 157–159.

Brown, J., Capocci, S., Smith, C., Morris, S., Abubakar, I., Lipman, M. (2015). Health status and quality of life in tuberculosis. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 32, 68–75.

Butler, T., Maravent, S., Boisselle, J., Valdes, J., & Fellner, C. (2015). A Review of 2014 Cancer Drug Approvals, With a Look at 2015 and Beyond. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(3), 191–205.

Calzolari, A., Larocca, L. M., Deaglio, S., Finisguerra, V., Boe, A., Raggi, C., Pallini, R. (2010). Transferrin receptor 2 is frequently and highly expressed in glioblastomas. *Translational Oncology*, 3(2), 123–134.

Camargo, M. S., Silva, M. M., Corrêa, R. S., Vieira, S. D., Castelli, S., D'Anessa, I., De Grandis, R. A., Varanda, E. A., Batista, A. A. (2016). Inhibition of human DNA topoisomerase IB by nonmutagenic ruthenium(II)-based compounds with antitumoral activity. *Metallomics*, 8, 179–192.

Cao, W., Zheng, W., Chen, T. (2015). Ruthenium Polypyridyl Complex Inhibits Growth and Metastasis of Breast Cancer Cells by Suppressing FAK signaling with Enhancement of TRAIL-induced Apoptosis. *Scientific Reports*, 5, 9157.

Chang, M., Li, X., Sun, Y., Cheng, F., Li, Y., Zhao, W., Wang, Q. (2013). A potential mechanism of a cationic cyclopeptide for enhancing insulin delivery across Caco-2 cell monolayers. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 36(10), 1602–7.

Chelopo, M. P., Pawar, S. a., Sokhela, M. K., Govender, T., Kruger, H. G., & Maguire, G. E. M. (2013). Anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes bearing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline amino alcohol ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 66, 407–414.

Chillemi, G., Fiorani, P., Castelli, S., Bruselles, A., Benedetti, P., Desideri, A. (2005). Effect on DNA relaxation of the single Thr718Ala mutation in human topoisomerase I: A functional and molecular dynamics study. *Nucleic Acids Research*, 33(10), 3339–3350.

Clarke, M. J. (2002). Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coordination Chemistry Reviews*, 232, 69–93.

Clavel, C. M., Păunescu, E., Nowak-Sliwinska, P., Griffioen, A. W., Scopelliti, R., Dyson, P. J. (2014). Discovery of a highly tumor-selective organometallic ruthenium(II)-arene complex. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(8), 3546–3558.

Claxton, L. D., Houk, V. S., Hughes, T. J. (1998). Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 410(3), 237–243.

Cohen, G., Eisenberg, H. (1969). Viscosity and Sedimentation Study of Sonicated DNA-Proflavine Complexes. *Biopolymers*, 8(1), 45–55.

Colina-Vegas, L., Villarreal, W., Navarro, M., De Oliveira, C. R., Graminha, A. E., Maia, P. I. D. S., Batista, A. A. (2015). Cytotoxicity of Ru(II) piano-stool complexes with chloroquine and chelating ligands against breast and lung tumor cells: Interactions with DNA and BSA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 153, 150–161.

Colmenarejo, G. (2003). *In silico* prediction of drug-binding strengths to human serum albumin. *Medicinal Research Reviews*, 23(3), 275–301.

Corrêa, R. S., da Silva, M. M., Graminha, A. E., Meira, C. S., Santos, J. A. F., Moreira, D. R. M., Batista, A. A. (2016). Ruthenium(II) complexes of 1,3-thiazolidine-2-thione: cytotoxicity against tumor cells and anti-*Trypanosoma cruzi* activity enhanced upon combination with benznidazole. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 156(II), 153–163.

Corrêa, R. S., Oliveira, K. M., Pérez, H., Plutín, A. M., Ramos, R., Mocelo, R., Batista, A. A. (2015). *cis-bis*(N-benzoyl-N',N'-dibenzylthioureido)platinum(II): Synthesis, molecular structure and its interaction with human and bovine serum albumin. *Arabian Journal of Chemistry*, in press. doi:10.1016/j.arabjc.2015.10.006

Côrte-Real, L., Mendes, F., Coimbra, J., Morais, T. S., Tomaz, A. I., Valente, A., Marques, F. (2014). Anticancer activity of structurally related ruthenium(II) cyclopentadienyl complexes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 19, 853–867.

Custer, L. L., Sweder, K. S. (2008). The role of genetic toxicology in drug discovery and optimization. *Current Drug Metabolism*, 9, 978–985.

Da Silva, L. L., Donnici, C. L., Lopes, J. C. D., Goulart, M. O. F., De Abreu, F. C., De Paula, F. S., Montanari, C. A. (2012). Investigação eletroquímica e calorimétrica da interação de novos agentes antitumorais biscatiônicos com DNA. *Química Nova*, 35(7), 1318–1324.

Das, M., Nasani, R., Saha, M., Mobin, S. M., Mukhopadhyay, S. (2015). Nickel(II) complexes with a flexible piperazinyl moiety: studies on DNA and protein binding and catecholase like properties. *Dalton Trans.*, 44, 2299–2310.

De Grandis, R. A., Resende, F. A., Da Silva, M. M., Pavan, F. R., Batista, A. A., Varanda, E. A. (2016). *In vitro* evaluation of cyto-genotoxic potential of ruthenium(II) SCAR complexes: a promising class of antituberculosis agents. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 798, 11-18.

De Lima, R. G., Silva, B. R., Da Silva, R. S., & Bendhack, L. M. (2014). Ruthenium complexes as NO donors for vascular relaxation induction. *Molecules*, 19(7), 9628-54.

Ding, F., Huang, J., Lin, J., Li, Z., Liu, F., Jiang, Z., Sun, Y. (2009). A study of the binding of C.I. Mordant Red 3 with bovine serum albumin using fluorescence spectroscopy. *Dyes and Pigments*, 82(1), 65–70.

Doak, B. C., Over, B., Giordanetto, F., Kihlberg, J. (2014). Oral druggable space beyond the rule of 5: Insights from drugs and clinical candidates. *Chemistry and Biology*, 21(9), 1115–1142.

Drevensek, P., Kosmrlj, J., Giester, G., Skauge, T., Sletten, E., Sepcic, K., & Turel, I. (2006). X-Ray crystallographic, NMR and antimicrobial activity studies of magnesium complexes of fluoroquinolones - racemic ofloxacin and its S-form, levofloxacin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(11), 1755–1763.

Dueñas-Gonzalez, A., Alatorre, B., Gonzalez-Fierro, A. (2014). The impact of DNA methylation technologies on drug toxicology. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 10(5), 637–46.

Dwyer, F. P., Mayhew, E., Roe, E. M., Shulman, A. (1965). Inhibition of Landschuetz Ascites Tumour Growth By Metal Chelates Derived From 3,4,7,8-Tetramethyl-1,10-Phenanthroline. *British Journal of Cancer*, 19, 195–199.

Elsadek, B., Kratz, F. (2012). Impact of albumin on drug delivery - New applications on the horizon. *Journal of Controlled Release*, 157(1), 4–28.

Ferguson, L. R., Pearson, A. E. (1996). The clinical use of mutagenic anticancer drugs. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 355(96), 1–12.

Fernandes, M. B., Gonçalves, J. E., Scotti, M. T., De Oliveira, A. A., Tavares, L. C., Storpirtis, S. (2012). Caco-2 cells cytotoxicity of nifuroxazide derivatives with potential activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Toxicology in Vitro*, 26, 535–540.

Fernandes, M. B., Goncalves, J. E., Tavares, L. C., Storpirtis, S. (2014). Caco-2 cells permeability evaluation of nifuroxazide derivatives with potential activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 9045, 1–7.

Fossati, L., Dechaume, R., Hardillier, E., Chevillon, D., Prevost, C., Bolze, S., Maubon, N.

(2008). Use of simulated intestinal fluid for Caco-2 permeability assay of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 360(1-2), 148–155.

Freitas, E. S., Da Silva, P. B., Chorilli, M., Batista, A. A., Lopes, E. O., Da Silva, M. M., Pavan, F. R. (2014). Nanostructured lipid systems as a strategy to improve the *In Vitro* cytotoxicity of ruthenium(II) compounds. *Molecules*, 19(5), 5999–6008.

Ganeshpandian, M., Loganathan, R., Suresh, E., Riyasdeen, A., Akbarsha, M. A., Palaniandavar, M. (2014). New ruthenium(II) arene complexes of anthracenyl-appended diazacycloalkanes: effect of ligand intercalation and hydrophobicity on DNA and protein binding and cleavage and cytotoxicity. *Dalton Transactions (Cambridge, England : 2003)*, 43, 1203–19.

García-Gimenez, J. L., González-Álvarez, M., Liu-González, M., Macías, B., Borrás, J., Alzuet, G. (2009). Toward the development of metal-based synthetic nucleases: DNA binding and oxidative DNA cleavage of a mixed copper(II) complex with N-(9H-purin-6-yl)benzenesulfonamide and 1,10-phenantroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocy. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(6), 923–934.

Giaccone, G. (2000). Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs*, 59(4), 9–17.

Glen, C., Dubrova, Y. (2012). Exposure to anticancer drugs can result in transgenerational genomic instability in mice., 2012.

Gómez-Ruiz, S., Maksimović-Ivanić, D., Mijatović, S., Kaluderović, G. N. (2012). On the discovery, biological effects, and use of cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2012, 15–17.

Gomme, P. T., McCann, K. B. (2005). Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discovery Today*, 10(4), 267–273.

Gorle, A. K., Feterl, M., Warner, J. M., Wallace, L., Keene, F. R., Collins, J. G. (2014). Tri- and tetra-nuclear polypyridyl ruthenium(II) complexes as antimicrobial agents. *Dalton Trans.*, 43, 16713–16725.

Goulouze, S. C., Cohen, A. F., Rissmann, R. (2015). Bedaquiline. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 80(2), 182-184.

Grass, G. M., Sweetana, S. A. (1989). A correlation of permeabilities for passively transported compounds in monkey and rabbit jejunum. *Pharmaceutical Research*, 6(10), 857–62.

Guideline for testing of chemicals, OECD. (1997). Bacterial Reverse Mutation Test, (July), 1–18.

Guideline for testing of chemicals, OECD. (2004). Partition coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method, (April), 1–11.

Guideline for testing of chemicals, OECD. (2014). *In vitro* mammalian cell micronucleus test. No. 487, (September), 1–26.

Hartertinger, C. G., Jakupiec, M. a, Zorbas-Seifried, S., Groessl, M., Egger, A., Berger, W., Keppler, B. K. (2008). KP1019, a new redox-active anticancer agent preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chemistry & Biodiversity*, 5(10), 2140–2155.

Hartertinger, C. G., Phillips, A. D., Nazarov, A. A. (2011). Polynuclear ruthenium, osmium and gold complexes. The quest for innovative anticancer chemotherapeutics. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(21), 2688–702. doi:10.2174/156802611798040769

Hartertinger, C. G., Zorbas-Seifried, S., Jakupiec, M. A., Kynast, B., Zorbas, H., & Keppler, B. K. (2006). From bench to bedside - preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *Journal of Inorganic Biochemistry*.

He, X., Jin, L., Tan, L. (2014). DNA-binding, topoisomerases I and II inhibition and *in vitro* cytotoxicity of ruthenium(II) polypyridyl complexes: [Ru(dppz)₂L](2+) (L=dppz-11-CO₂Me and dppz). *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 135C, 101–109.

Hong, G., Kreuzer, K. N. (2000). An antitumor drug-induced topoisomerase cleavage complex blocks a bacteriophage T4 replication fork *in vivo*. *Molecular and Cellular Biology*, 20(2), 594–603.

Hu, Y. J., Liu, Y., Zhao, R. M., Qu, S. S. (2005). Interaction of colchicine with human serum albumin investigated by spectroscopic methods. *International Journal of Biological*

Macromolecules, 37(3), 122–126.

Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. E., Artursson, P. (2007). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, 2(9), 2111–9.

Instituto Nacional do Câncer, INCA. (2014). *Estimativa Incidência de câncer no Brasil. Estimativa | 2014 Incidência de Câncer no Brasil* (Vol. 1).

International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, ICPEMC. (1988). Testing for mutagens and carcinogens; the role of short-term genotoxicity assays. *Mutation Research*, 205, 3–12.

Kathiresan, S., Dhivya, R., Vigneshwar, M., Rajasekaran, M., Ranjani, J., Rajendhran, J., Annaraj, J. (2015). Biological evaluation of redox stable cisplatin/Cu(II)-DNA adducts as potential anticancer agents. *Journal of Coordination Chemistry*, 8972(December), 1–15.

Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 7(July), 573–584.

Kelly, J. M., Tossi, A. B., MacConnell, D. J., OhUigin, C. (1885). A study of the interactions of some polypyridylruthenium(II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. *Nucleic Acids Research*, 13(7), 6017–6034.

Keppler, B. K., Hartmann, M. (1994). New tumor-inhibiting metal complexes. Chemistry and antitumor properties. *Metal-Based Drugs*, 1(2-3), 145–149.

Komor, A. C., Barton, J. K. (2013). The path for metal complexes to a DNA target. *Chemical Communications*, 49(35), 3617–3630.

Kostova, I. (2006). Ruthenium complexes as anticancer agents. *Curr. Med. Chem.*, 13(9), 1085.

Krishna, G., Chen, K. J., Lin, C. C., Nomeir, A. A. (2001). Permeability of lipophilic compounds in drug discovery using *in vitro* human absorption model, Caco-2. *International Journal of Pharmaceutics*, 222(1), 77–89.

Lakowicz, J. R. (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy. In *Kluwer Academic/Plenum*

Lazić, D., Arsenijević, A., Puchta, R., Bugarčić, Ž. D., Rilak, A. (2016). DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium(II) terpyridine complexes. *Dalton Trans. In press*. doi:10.1039/C5DT04132E

Leijen, S., Burgers, S. A., Baas, P., Pluim, D., Tibben, M., Van Werkhoven, E., Schellens, J. H. M. (2015). Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. *Investigational New Drugs*, 33(1), 201–214.

Li, D. D., Tian, J. L., Gu, W., Liu, X., Yan, S.-P. (2010). A novel 1,2,4-triazole-based copper(II) complex: synthesis, characterization, magnetic property and nuclease activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104(2), 171–9.

Li, F., Collins, J. G., Keene, F. R. (2015). Ruthenium complexes as antimicrobial agents. *Chem Soc Rev*, 44, 2529–2542.

Lima, A. P., Pereira, F. C., Almeida, M. A. P., Mello, F. M. S., Pires, W. C., Pinto, T. M., Silveira-Lacerda, E. P. (2014). Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium(II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. *PLoS ONE*, 9(10).

Lima, C. J., Rodríguez, L. (2011). Phosphine-Gold (I) Compounds as Anticancer Agents : General Description and Mechanisms of Action. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 11(1), 921–928.

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and developmental settings. *Advanced Drug Deliv. Rev.*, 23, 3–25.

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 4–17.

Liu, J. J., Galettis, P., Farr, A., Maharaj, L., Samarasinha, H., McGeachan, A. C., McKeage, M. J. (2008). *In vitro* antitumour and hepatotoxicity profiles of Au(I) and Ag(I) bidentate pyridyl phosphine complexes and relationships to cellular uptake. *Journal of Inorganic Biochemistry*,

102(2), 303–310.

Liu, J., Zhang, T., Lu, T., Qu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Ji, L. (2002). DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper (II) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91, 269–276.

Liu, P., Wu, B. Y., Liu, J., Dai, Y. C., Wang, Y. J., Wang, K. Z. (2016). DNA Binding and Photocleavage Properties, Cellular Uptake and Localization, and *in-Vitro* Cytotoxicity of Dinuclear Ruthenium(II) Complexes with Varying Lengths in Bridging Alkyl Linkers. *Inorganic Chemistry, (II)*, 55(4), 1412-22

Lopes, J. C. S., Damasceno, J. L., Oliveira, P. F., Tavares, D. C., Deflon, V. M., Lopes, N. P., Poelhsitz, G. Von. (2015). Ruthenium(II) Complexes Containing Anti-Inflammatory Drugs as Ligands: Synthesis, Characterization and. *Journal Brazilian Chemical Society*, 26(9), 1838–1847.

Marchesi, M. S. P., Cicillini, S. A., Prazias, A. C. L., Bendhack, L. M., Batista, A. A., Da Silva, R. S. (2012). Chemical mechanism of controlled nitric oxide release from trans-[RuCl([15]aneN4)NO](PF6)2 as a vasorelaxant agent. *Transition Metal Chemistry*, 37(5), 475–479.

Mari, C., Pierroz, V., Ferrari, S., Gasser, G. (2015). Combination of Ru(II) complexes and light: new frontiers in cancer therapy. *Chem. Sci.*, 6(5), 2660–2686.

Marmion, C. J., Cameron, B., Mulcahy, C., Fricker, S. P. (2004). Ruthenium as an effective nitric oxide scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 4(15), 1585–1603.

McKeage, M. J., Berners-Price, S. J., Galettis, P., Bowen, R. J., Brouwer, W., Ding, L., Baguley, B. C. (2000). Role of lipophilicity in determining cellular uptake and antitumour activity of gold phosphine complexes. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 46(5), 343–350.

McMillian, M.K., Li, L., Parker, J.B., Patel, L., Zhong, Z., Gunnett, J.W., Powers, W.J., Johnson, M.D. (2002). An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biology and Toxicology*, 18, 157-173.

Meggers, E. (2007). Exploring biologically relevant chemical space with metal complexes. *Current Opinion in Chemical Biology*.

Messori, L., Camarri, M., Ferraro, T., Gabbiani, C., Franceschini, D. (2013). Promising *in Vitro* anti-alzheimer properties for a ruthenium(III) complex. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 4(3), 329–332.

Meyer, A., Gutiérrez, A., Ott, I., Rodríguez, L. (2013). Phosphine-bridged dinuclear gold(I) alkynyl complexes: Thioredoxin reductase inhibition and cytotoxicity. *Inorganica Chimica Acta*, 398, 72–76.

Motswainyana, W. M., Ajibade, P. A. (2015). Anticancer Activities of Mononuclear Ruthenium(II) Coordination Complexes. *Advances in Chemistry*, 2015, 1–21.

Muhammad, N., Guo, Z. (2014). Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Current Opinion in Chemical Biology*. doi:10.1016/j.cbpa.2014.02.003

Orvig, C., Abrams, M. J. (1999). Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. *Chemical Reviews*, 99(9), 2201–2204.

Ott, I., Gust, R. (2007). Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. *Archiv Der Pharmazie*.

Page, S. (2012). Ruthenium compounds as anticancer agents. *Education in Chemistry*, (January), 26–29.

Pagoto, T. M. P., Sobrinho, L. L. G., Graminha, A. E., Guedes, A. P. M., Carroccia, M. C., de Oliveira, P. F., Von Poelhsitz, G. (2015). A ruthenium(II) complex with the propionate ion: Synthesis, characterization and cytotoxic activity. *Comptes Rendus Chimie*, 18(12), 1313–1319.

Pavan, F. R., Poelhsitz, G. V, Barbosa, M. I. F., Leite, S. R. A., Batista, A. A., Ellena, J., Leite, C. Q. F. (2011). Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10), 5099–5107.

Pavan, F. R., Poelhsitz, G. V, da Cunha, L. V. P., Barbosa, M. I. F., Resende, F. A., Camargo, M. S., Varanda, E. A., Leite, S. R. A., Batista, A. A., Leite, C. Q. F. (2013). *In Vitro* and *In Vivo* Activities of Ruthenium(II) Phosphine/Diimine/Picolinate Complexes (SCAR) against *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*, 8(5), 1–10.

Pavan, F. R., Poelhsitz, G. V, Nascimento, F. B., Leite, S. R. A., Batista, A. A., Deflon, V. M., Leite, C. Q. F. (2010). Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(2), 598–601.

Peña, B., David, A., Pavani, C., Baptista, M. S., Pellois, J. P., Turro, C., Dunbar, K. R. (2014). Cytotoxicity studies of cyclometallated ruthenium(II) compounds: New applications for ruthenium dyes. *Organometallics*, 33(5), 1100–1103.

Pessoa, J. C., Tomaz, I. (2010). Transport of therapeutic vanadium and ruthenium complexes by blood plasma components. *Current Medicinal Chemistry*, 17(31), 3701–3738.

Presa, A., Brissos, R. F., Caballero, A. B., Borilovic, I., Korrodi-Gregório, L., Pérez-Tomás, R., Gamez, P. (2015). Photoswitching the Cytotoxic Properties of Platinum(II) Compounds. *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(15), 4561–4565.

Queiroz, S. L., Batista, A. A., Oliva, G., Gambardella, M. T., Santos, R. H. A., MacFarlane, K. S., James, B. R. (1998). The reactivity of five-coordinate Ru(II) (1,4-bis(diphenylphosphino)butane) complexes with the N-donor ligands: ammonia, pyridine, 4-substituted pyridines, 2,2'-bipyridine, bis(o-pyridyl)amine, 1,10-phenanthroline, 4,7-diphenylphenanthroline and ethylened. *Inorganica Chimica Acta*, 267(2), 209–221.

Ramadevi, P., Singh, R., Jana, S. S., Devkar, R., Chakraborty, D. (2015). Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry Ruthenium complexes of ferrocene mannich bases: DNA / BSA interactions and cytotoxicity against A549 cell line. *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry*, 305, 1–10.

Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F., Marques, E. K. (2003). *Mutagênese Ambiental*. Editora ULBRA.

Roca, J. (1995). The mechanisms of DNA topoisomerases. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(4), 156–160.

Ronconi, L., Sadler, P. J. (2007). Using coordination chemistry to design new medicines. *Coordination Chemistry Reviews*.

Ross, P. D., Subramanian, S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20(11), 3096–3102.

Sarniguet, C., Toloza, J., Cipriani, M., Lapier, M., Vieites, M., Toledano-Magaña, Y., Otero, L. (2014). Water-soluble ruthenium complexes bearing activity against protozoan parasites. *Biological Trace Element Research*, 159(1-3), 379–392.

Sava, G., Bergamo, A. (2000). Ruthenium-based compounds and tumour growth control (review). *International Journal of Oncology*, 17(2), 353–365.

Sava, G., Bergamo, A., Zorzet, S., Gava, B., Casarsa, C., Cocchietto, M., Mestroni, G. (2002). Influence of chemical stability on the activity of the antimetastasis ruthenium compound NAMI-A. *European Journal of Cancer*, 38(3), 427–435.

Sava, G., Pacor, S., Bregant, F., Ceschia, V., Mestroni, G. (1990). Metal complexes of ruthenium: antineoplastic properties and perspectives. *Anticancer Drugs*, 1(2), 99–108.

Selvi, P. T., Palaniandavar, M. (2002). Spectral, viscometric and electrochemical studies on mixed ligand cobalt(III) complexes of certain diimine ligands bound to calf thymus DNA. *Inorganica Chimica Acta*, 337, 420–428.

Sharma, A. S., Anandakumar, S., Ianchelian, M. (2014). *In vitro* investigation of domain specific interactions of phenothiazine dye with serum proteins by spectroscopic and molecular docking approaches. *RSC Advances*, 4(68), 36267.

Sikov, W. M. (2015). Assessing the Role of Platinum Agents in Aggressive Breast Cancers. *Current Oncology Reports*.

Silveira-Lacerda, E. P., Vilanova-Costa, C. A. S. T., Pereira, F. D. C., Hamaguchi, A., Pavanin, L. A., Goulart, L. R., Nomizo, A. (2010). The ruthenium complex cis-(Dichloro)Tetraammineruthenium(III) chloride presents immune stimulatory activity on human peripheral blood mononuclear cells. *Biological Trace Element Research*, 133(3), 270–283.

Sirajuddin, M., Ali, S., Badshah, A. (2013). Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124, 1–19.

Skipconoka, V., Danilovits, M., Pehme, L., Tomson, T., Skenders, G., Kummik, T., Wells, C. D. (2013). Delamanid improves outcomes and reduces mortality in multidrug-resistant tuberculosis. *European Respiratory Journal*, 41(6), 1393–1400.

Smith, C. A., Sutherland-Smith, A. J., Kratz, F., Baker, E. N., Keppler, B. H. (1996). Binding of ruthenium(III) anti-tumor drugs to human lactoferrin probed by high resolution X-ray crystallographic structure analyses. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1(5), 424–431.

Soman, R., Pillai, P., Madan, S., Shetty, A., Rodrigues, C. (2014). Successful Management of Highly Drug Resistant Tuberculosis with Individualised Drug Susceptibility Testing. *Journal of the Association of Physicians of India*, 62, 567–570.

Stenberg, P., Norinder, U., Luthman, K., Artursson, P. (2001). Experimental and computational screening models for the prediction of intestinal drug absorption. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(12), 1927–1937.

Strohfeltdt, K. A. (2015). Essential of Inorganic Chemistry: For Students of Pharmacy, *Pharmaceutical Sciences and Medicinal Chemistry*.

Sun, J., Huang, Y., Zheng, C. (2015). Ruthenium (II) Complexes Interact with Human Serum Albumin and Induce Apoptosis of Tumor Cells. *Biological Trace Element Research*, 163, 266–274.

Suntharalingam, K., Mendoza, O., Duarte, A. A., Mann, D. J., Vilar, R. (2013). A platinum complex that binds non-covalently to DNA and induces cell death via a different mechanism than cisplatin. *Metallomics : Integrated Biometal Science*, 5(5), 514–23.

Tfouni, E., Truzzi, D. R., Tavares, A., Gomes, A. J., Figueiredo, L. E., Franco, D. W. (2012). Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. Elsevier Inc.

Tilmant, K., Gerets, H. H. J., De Ron, P., Cossu-Leguille, C., Vasseur, P., Dhalluin, S., Atienzar, F. A. (2013). The automated micronucleus assay for early assessment of genotoxicity in drug discovery. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 751(1), 1–11.

Trondl, R., Heffeter, P., Kowol, C. R., Jakupec, M. a., Berger, W., Keppler, B. K. (2014). NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. *Chemical Science*, 5(8), 2925–2932.

Turel, I., Kljun, J. (2011). Interactions of Metal Ions with DNA, Its Constituents and Derivatives, which may be Relevant for Anticancer Research. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(21), 2661–2687.

U.S. Department of Health and Human Services, FDA. (2012). S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. *Guidance for Industry*, 2(June), 1–31.

van Rijt, S. H., Sadler, P. J. (2009). Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discovery Today*.

Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H., Smith, B. R., Ward, K. W., Kopple, K. D. (2002). Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 2615–2623.

Vijayan, P., Viswanathamurthi, P., Silambarasan, V., Velmurugan, D., Velmurugan, K., Nandhakumar, R., Dhandapani, R. (2014). Dissymmetric thiosemicarbazone ligands containing substituted aldehyde arm and their ruthenium(II) carbonyl complexes with PPh₃/AsPh₃ as ancillary ligands: Synthesis, structural characterization, DNA/BSA interaction and *in vitro* anticancer activity. *Journal of Organometallic Chemistry*, 768, 163–177.

Vilfan, I. D., Drevenek, P., Turel, I., Poklar Ulrih, N. (2003). Characterization of ciprofloxacin binding to the linear single- and double-stranded DNA. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1628(2), 111–122.

Ware, W. R. (1962). Oxygen quenching of fluorescence in solution: An experimental study of the diffusion process. *Journal of Physics and Chemistry*, 66(3), 455–458.

Weiss, A., Berndsen, R. H., Dubois, M., Müller, C., Schibli, R., Griffioen, A. W., Nowak-Sliwinska, P. (2014). *In vivo* anti-tumor activity of the organometallic ruthenium(II)-arene complex [Ru(η^6 -p-cymene)-Cl₂(pta)] (RAPTA-C) in human ovarian and colorectal carcinomas.

Chem. Sci., 5(12), 4742–4748.

Wong, E., Giandomenico, C. M. (1999). Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chemical Reviews*, 99, 2451–2466.

World Health Organization, WHO. (2015). Global Tuberculosis Report. *Available on-line*.

Yamashita, S., Tanaka, Y., Endoh, Y., Taki, Y., Sakane, T., Nadai, T., Sezaki, H. (1997). Analysis of drug permeation across Caco-2 monolayers - implications for predicting *in vivo* drug absorption. *Pharmaceutical Research*, 14(4), 486–491.

Yee, S. (1997). *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man - Fact or myth. *Pharmaceutical Research*.

Yu, H., Huang, Q. (2011). Investigation of the absorption mechanism of solubilized curcumin using caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9120–9126.

Zhang, C., Han, B. J., Zeng, C. C., Lai, S. H., Li, W., Tang, B., Liu, Y. J. (2016). Synthesis, characterization, *in vitro* cytotoxicity and anticancer effects of ruthenium(II) complexes on BEL-7402 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 157, 62–72.

Zhang, C. X., Lippard, S. J. (2003). New metal complexes as potential therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology*.

Živec, P., Perdih, F., Turel, I., Giester, G., Psomas, G. (2012). Different types of copper complexes with the quinolone antimicrobial drugs ofloxacin and norfloxacin: Structure, DNA- and albumin-binding. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117, 35–47.

Zumla, A., Chakaya, J., Centis, R., D'Ambrosio, L., Mwaba, P., Bates, M., Migliori, G. B. (2015). Tuberculosis treatment and management-an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(3), 220-234.

Capítulo 2



In vitro evaluation of the cyto-genotoxic potential of Ruthenium(II) SCAR complexes: a promising class of antituberculosis agents



Rone Aparecido De Grandis^a, Flávia Aparecida Resende^{b,*}, Monize Martins da Silva^c,
 Fernando Rogério Pavan^a, Alzir Azevedo Batista^c, Eliana Aparecida Varanda^a

^a Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, São Paulo State University, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil

^b Department of Biological Sciences and Health, Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, São Paulo, Brazil

^c Department of Inorganic Chemistry, Federal University of São Carlos, UFSCAR, São Carlos, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 September 2015

Received in revised form 18 January 2016

Accepted 27 January 2016

Available online 1 February 2016

Keywords:

Ruthenium(II) complexes

Tuberculosis

Cytotoxicity

Mutagenicity

Cisplatin

ABSTRACT

Tuberculosis is a top infectious disease killer worldwide, caused by the bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Increasing incidences of multiple drug-resistance (MDR) strains are emerging as one of the major public health threats. However, the drugs in use are still incapable of controlling the appalling upsurge of MDR. In recent years a marked number of research groups have devoted their attention toward the development of specific and cost-effective antimicrobial agents against targeted MDR-Tuberculosis. In previous studies, ruthenium(II) complexes (SCAR) have shown a promising activity against MDR-Tuberculosis although few studies have indeed considered ruthenium toxicity. Therefore, within the preclinical requirements, we have sought to determine the cyto-genotoxicity of three SCAR complexes in this present study. The treatment with the SCARs induced a concentration-dependent decrease in cell viability in CHO-K1 and HepG2 cells. Based on the clonogenic survival, SCAR 5 was found to be more cytotoxic while SCAR 6 exhibited selectivity action on tumor cells. Although SCAR 4 and 5 did not indicate any mutagenic activity as evidenced by the Ames and Cytokinesis block micronucleus cytome assays, the complex SCAR 6 was found to engender a frameshift mutation detected by *Salmonella typhimurium* in the presence of S9. Similarly, we observed a chromosomal damage in HepG2 cells with significant increases of micronuclei and nucleoplasmic bridges. These data indicate that SCAR 4 and 5 complexes did not show genotoxicity in our models while SCAR 6 was considered mutagenic. This study presented a comprehensive genotoxic evaluation of SCAR complexes were shown to be genotoxic *in vitro*. All in all, further studies are required to fully elucidate how the properties can affect human health.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is a major global health problem, ranks alongside the human immunodeficiency virus (HIV) as a leading cause of death from infectious disease worldwide. The latest estimate of the World Health Organization (WHO) recorded 9.6 million new cases in 2014, and has claimed the lives of over 1.5 million people. Out of that number, 26% of the patients infected by TB had co-infection with HIV [1].

In spite of the fact that the standard therapy for TB is still active, more effective treatments have become essentially necessary if

we are to reduce the burden imposed by infectious processes [2]. In addition, it is noteworthy to point out that there has been a rise in the number of new cases involving multi-drug resistant TB (MDR-TB), where the *Mycobacterium tuberculosis* strains are found to be resistant to at least rifampicin and isoniazid and other drugs other than a fluoroquinolone, and extensively-drug resistant TB (XDR-TB) defined by the resistance to rifampicin, isoniazid, any fluoroquinolone and at least one of the second line drugs, in other words rendering us (the patients infected) practically without any pharmacological alternative [1,3].

The protocols for MDR-TB involve months of treatment alongside a combination of several drugs. These regimes are associated with significant adverse effects and psychological comorbidity, as a result of social isolation [4]. After 50 years, bedaquiline and delamanid have now been allowed into the market with rational use though they are still under clinical trials, given the lack of new and more effective drugs against TB-MDR [5,6]. Although new

* Corresponding author at: Department of Biological Sciences and Health, Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, 14801-340 Araraquara, São Paulo, Brazil. Fax: +55 16 33016940.

E-mail address: flaviabiomed@yahoo.com.br (F.A. Resende).

molecules are in clinical development phase, fully effective drugs against resistant strains are yet out of sight.

In the search for new safer and more effective molecules, the ruthenium complexes have exhibited promising results, with minimum inhibitory concentrations (MIC), which are less than or equal to first-line drugs [7]. Ruthenium likewise most metals can form electron deficient cations, which tend to interact with molecules that have electron pairs available to be shared [8]. Ruthenium stands out among the transition metals thanks to its ability to assume different oxidation states [9] and it is this variety of states that gives ruthenium a very diversified chemistry [10]. In particular importance, the ruthenium(II) complexes containing ligands such as phosphine/diimine/picolinate (SCAR), synthesized by the Inorganic Chemistry group of the Federal University of São Carlos (UFSCar, Brazil), showed promising activity against the MDR strains of *Mycobacterium tuberculosis* [11,12].

Given the important activity of the ruthenium(II) complexes SCAR as far as MDR-TB strains are concerned, this study investigated the genetic toxicology profile of three ruthenium(II) complexes, SCAR 4, 5 and 6 (Fig. 1) as part of the recommended pre-clinical studies with the aim of giving subsidies and ensuring their safe development as possible candidates in anti-TB therapy.

The mutagenicity was investigated by Ames test with and without exogenous activation (S9) in different strains of *Salmonella typhimurium* (TA1535, TA98, TA100, TA97a and TA102) capable of identifying agents that cause gene mutations. To assess the mutagenicity in mammalian cells, cytokinesis-block micronucleus cytome assay (CBMN-cyt) was carried out in HepG2 (human hepatocellular carcinoma) and CHO-K1 (chinese hamster ovary) cells, where the effect of *in vitro* metabolism of the complexes was compared. For cytotoxicity detection and the determination of a suitable concentration range for the CBMN-cyt test, the clonogenic survival assay was used to determine the viability of cell lines after 48 h of incubation.

2. Material and methods

The ruthenium complexes [Ru(pic)(dppb)(phen)]PF₆ (SCAR 4), *cis*-[Ru(pic)(dppe)₂]PF₆ (SCAR 5) and *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] (SCAR 6) were synthesized at Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil. The synthesis procedures and characterization tests are described in [13] and [11,12].

2.1. Cell culture

CHO-K1 and HepG2 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO) containing 10% of fetal bovine serum (FBS, GIBCO), 100 IU/mL penicillin and 100 streptomycin µg/mL (Sigma–Aldrich) in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. The highest DMSO (Sigma–Aldrich) concentration used was 1.0%.

2.2. Clonogenic survival assay

To determine the cytotoxicity, the Clonogenic Survival Assay was performed in accordance with the guidelines of Ballal et al [14], with modifications. 1 × 10⁶ cells of CHO-K1 and HepG2 were seeded in cell culture bottles of 25 cm² in 5 mL of complete culture medium and incubated at 37 °C in CO₂. Following 24 h of cultivation, the treatment was proceeded with 1.5, 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 and 100 µM of SCAR complexes at stock solutions (500 µg/mL). 10% of DMSO (v/v) was used as positive control (PC) (Sigma–Aldrich) and 1.0% of DMSO (v/v) was used as negative control (NC) in the culture medium. All the treatments were performed for 48 h.

At the end of the treatments, the cells were washed and trypsinized, and replated into 6-well plates (Corning) at a concentration of 150 cells per well for each treatment in triplicate.

After 7 days of culture, the cells were washed and fixed with methanol: acetic acid: distilled water (1:1:8) for 30 min. The colonies were stained with 2.5 mL of Giemsa for 20 min. After staining, the cells were washed with distilled water, and the colonies were subsequently counted.

The average of colonies in the NC was regarded as 100%. Based on that, the calculations of survival fractions were performed (SF) for each treatment:

$$SF = \frac{\text{Number of colonies counted in each treatment}}{\text{Number of colonies counted in NC}} \times 100$$

The SF percentage of each treatment of three independent experiments was subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's pair-wise comparison and by Dunnett's multiple comparisons. All the tests were carried out taking into account a significance level of 5% ($p < 0.05$).

2.3. Cytokinesis block micronucleus cytome (CBMN-cyt) assay

The CBMN-cyt was performed in HepG2 and CHO-K1 cells previously described by Fenech [15], with modifications. A total of 5.0 × 10⁵ cells were incubated in 25 cm² culture flasks for 24 h before being treated with 3 varying concentrations of the SCAR complexes, which were selected from the clonogenic survival assays. In the treatment period, CHO-K1 cells received 5.1, 10.2 and 20.5 µM of SCAR 4, 0.64, 1.3 and 2.6 µM of SCAR 5 and 25.0, 50.0 and 100.0 µM of SCAR 6, while the HepG2 cells received 3.8, 7.6 and 15.5 µM of SCAR 4, 0.32, 0.64 and 1.3 µM of SCAR 5 and 7.5, 15.0 and 30.0 µM of SCAR 6. Doxorubicin chloride (Sigma–Aldrich) at a concentration of 0.05 µM was used as an inducing agent (PC). Another PC was composed of 5 µM of aflatoxin B₁ (AFB₁) (Sigma–Aldrich), which was used as a model of indirect mutagen. DMSO (1.0%) as negative control and the control medium (MC) was composed of DMEM, without the action of any treatment. After 24 h of treatment, the cells were washed with PBS, the culture medium was changed, and the cells were incubated with cytochalasin B (3 µg/mL in culture medium - Sigma–Aldrich).

The cells were then incubated for 24 h, harvested using 0.25% of trypsin-EDTA (GIBCO), treated with 1% (v/v) cold potassium chloride (Sigma–Aldrich) and fixed with formaldehyde and methanol:acetic acid (3:1) solution for 5 min. Immediately prior to the analysis, the slides were stained using 40 µg/mL of Acridine Orange (Sigma–Aldrich), and the frequencies of binucleated cells with micronuclei (MNi) were determined at 1000x magnification.

The frequency of nucleoplasmic bridges (NPBs, biomarkers of dicentric chromosomes resulting from telomere end fusions or DNA mis-repair) and nuclear buds (NBUDs, biomarkers for gene amplification and altered gene dosage events) were also evaluated according to the methods described by [15]. In addition, the cytostatic effects were assessed using the Nuclear Division Index (NDI). A total of 500 viable cells per experimental point were scored to determine the percentage of cells with one, two, three and four nuclei, and the NDI was calculated in accordance with [16]: $NDI = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/N$, where M1–M4 represent the numbers of cells with 1–4 nuclei, respectively, and N representing the total number of cells scored.

This index provides a measure of the proliferative status of viable cells. Thus, the smallest possible value of NDI is 1.0, which occurs when all the cells are neither divided nor have had the cytokinesis blocked and thus are all mononuclear. If all the cells are able to complete a division cycle and are therefore by their entirety binucleated, then the NDI is 2.0.

For each treatment the mean and standard deviations were calculated. The MNi, NPB and NBUD frequencies were evaluated in a total of 1000 binucleated cells. The NDI calculation was measured in 500 cells per treatment. Three independent experiments were per-

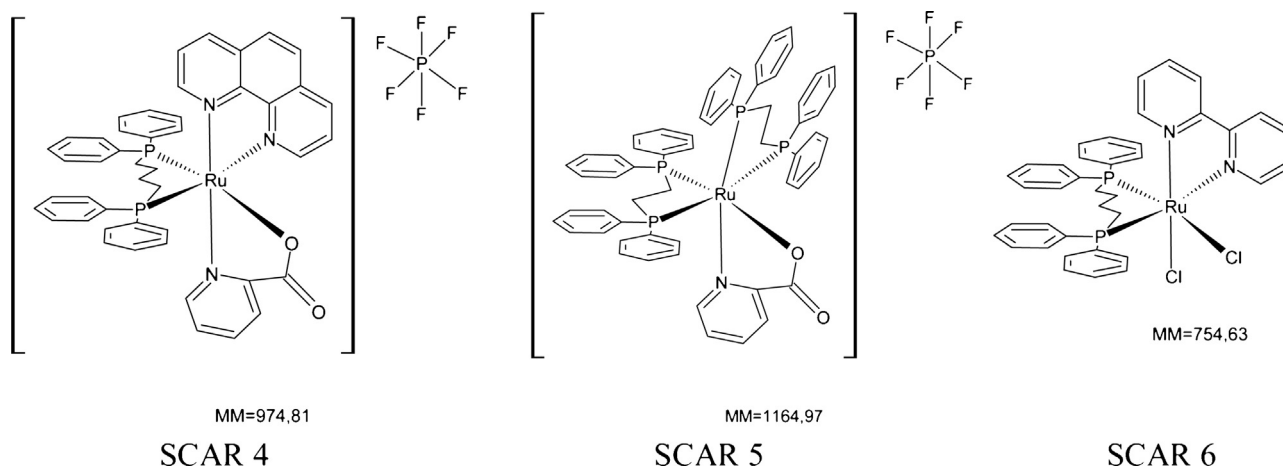


Fig. 1. SCARs structures.

formed. The results were subjected to ANOVA (assuming $p < 0.05$) followed by Dunnett's post-test for comparison with the negative control.

2.4. Ames test

The *S. typhimurium* tester strains TA1535, TA98, TA100, TA97a and TA102, were kindly provided upon request by Dr. B.N. Ames (Berkeley, CA, USA) and used in line with the preincubation methodology developed by Maron and Ames [17].

These strains were grown overnight from frozen cultures for 16 h in Oxoid Nutrient Broth No.2. The metabolic activation mixture (S9 fraction) prepared from the livers of Sprague Dawley rats treated with the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 (500 mg/kg), was purchased from Molecular Toxicology Inc. (Boone, NC, USA) and freshly prepared prior to each test. The metabolic activation system consisted of 4% S9 fraction, 1% of 0.4 M MgCl_2 , 1% of 1.65 M KCl, 0.5% of 1 M D-glucose-6-phosphate disodium and 4% of 0.1 M NADP, 50% of 0.2 M phosphate buffer and 39.5% of sterile distilled water.

For the mutagenic activity assay, varying concentrations of each complex (3.2–102.6 $\mu\text{M}/\text{plate}$ for SCAR 4, 0.67–85.8 $\mu\text{M}/\text{plate}$ for SCAR 5 and 4.14–265.3 $\mu\text{M}/\text{plate}$ for SCAR 6) dissolved in DMSO were tested. The SCAR concentrations were selected on the basis of a preliminary toxicity test. In all the subsequent assays, the upper limit of the dose range tested was either the highest non-toxic dose or the lowest toxic dose determined in the preliminary assay. Toxicity was detected either as a reduction in the number of histidine revertants (His^+) or as a thinning of the auxotrophic background lawn.

The various amounts of the complexes to be tested, dissolved in DMSO, were added to 0.5 mL of 0.2 M phosphate buffer or 0.5 mL of 4% S9 mixture, plus 0.1 mL of bacterial culture and then incubated at 37°C for 20 min. Thereafter, 2 mL of top agar were added, and the mixture was poured on to a plate containing minimal agar. The plates were incubated for 48 h at 37°C and the His^+ revertant colonies were counted with the aid of colonies counter Synbiosis Protocol.

The results were analyzed with the statistical software package Salanal 1.0 (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, from Research Triangle Institute, RTP, NC, USA), adopting the [18] model. The data (revertants/plate) were assessed using the analysis of variance (ANOVA), followed by linear regression. The mutagenic index (MI) was also calculated for each concentration tested, this being the average number of revertants per test plate divided by the average number of rever-

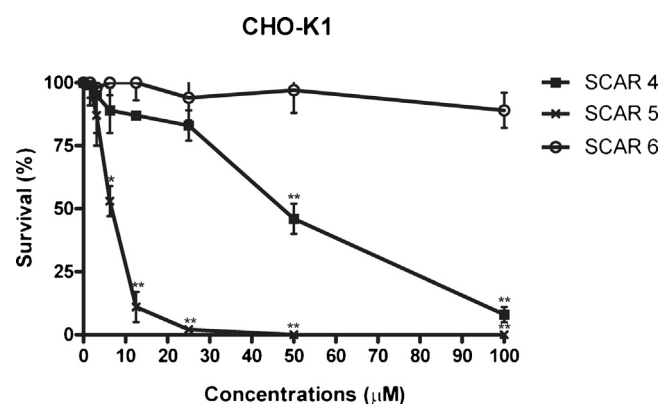


Fig. 2. Clonogenic survival assay of CHO-K1 cell lines after treatment with the complexes SCAR 4, 5 and 6 (1.5; 3.1; 6.2; 12.5; 25; 50 and 100 μM) for 48 h. Each value represents the mean derived from at least three individual experiments in triplicate (mean $\pm$ SD). (*) Statistically significant difference compared to vehicle control ($p < 0.05$); (**) Statistically significant difference compared to the control and between treatments ($p < 0.05$).

tants per negative (solvent) control plate. A sample was considered mutagenic when a dose–response relationship was detected and $\text{MI} > 2$, at one or more concentrations [19]. The standard mutagens used as positive controls in experiments without S9 mix were NPQ (10 $\mu\text{g}/\text{plate}$) for TA98 and TA97a, SA (1.25 $\mu\text{g}/\text{plate}$) for TA1535 and TA100 and MMC (0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$) for TA102. In experiments with S9 activation, 2-AA (1.25 $\mu\text{g}/\text{plate}$) was used with TA1535, TA98, TA97a and TA100 and 2-AF (10 $\mu\text{g}/\text{plate}$) with TA102. DMSO served as the negative (solvent) control (100 $\mu\text{L}/\text{plate}$).

3. Results

3.1. Cytotoxicity

This experiment was conducted to assess the cell viability after 48 h of treatment with SCAR 4, 5 and 6 in CHO-K1 and HepG2 cell lines.

In this test, the colonies were counted, to determine cell reproductive death after treatment with the complexes. Fig. 2 shows the SF of CHO-K1 cells, which was calculated [$\text{SF} = \text{number of colonies counted in the treatment}/(\text{number colonies counted in negative control}) \times 100$], and the mean values obtained ranging from 99.0% to 7.7% in the treatment with SCAR 4, 99.3% to 0% when treated with the SCAR 5 and average values ranging between 99.8% and 89.5% in the treatment with SCAR 6.

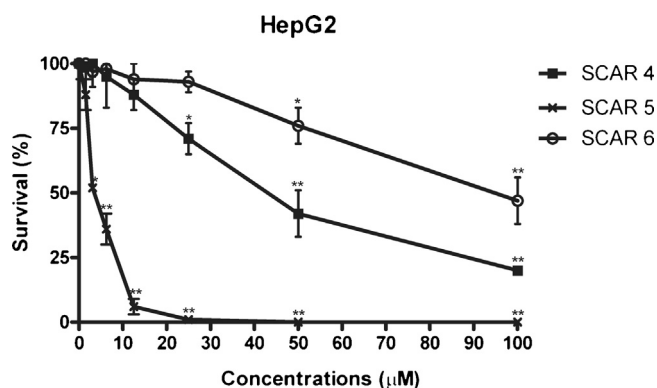


Fig. 3. Clonogenic survival assay of HepG2 cell lines after treatment with the complexes SCAR 4, 5 and 6 (1.5; 3.1; 6.2; 12.5; 25; 50 and 100 μM) for 48 h. Each value represents the mean derived from at least three individual experiments in triplicate (mean $\pm$ SD). (*)Statistically significant difference relative to the vehicle control ($p < 0.05$); (**)Statistically significant difference relative to the control and between treatments ($p < 0.05$).

Similarly, the SF was calculated for HepG2 cells treated with the complexes (Fig. 3). The mean values ranged from 99.1% to 20.4% in the treatment with SCAR 4, 88.43% to 0% when treated with SCAR 5 and 99.8% to 46.5% in the treatment with SCAR 6.

Statistically significant differences were observed ($p < 0.05$) in the treatment with SCAR 4 relative to the control for concentrations of 50 and 100 μM , and 6.2; 12.5; 25; 50 and 100 for SCAR 5 in the culture with CHO-K1 cells.

In HepG2 cells, statistically significant differences were observed ($p < 0.05$) at concentrations 25, 50 and 100 μM of SCAR 4, 3.1; 6.2; 12.5; 25; 50 and 100 μM in the treatment with SCAR 5 and concentrations of 50 and 100 μM for SCAR 6.

3.2. CBMN-cyt assay

The CBMN-cyt assay was performed in triplicate using CHO-K1 and HepG2 cell lines where the following parameters were analyzed: micronuclei frequency (MNI), nucleoplasmic bridges (NPBs) and nuclear buds formation (NBUDs) in 1000 binucleated cells. We also calculated the proportion of mono-, bi-, tri or multinucleated cells, which was used to calculate the NDI. The maximum concentrations were based on cytotoxicity previously selected from clonogenic survival assay. In this study, no statistically significant difference was found in the proliferative state of CHO-K1 cells and HepG2 cultures treated with the complexes as compared to the negative control.

Table 1 shows the MNI, NPBs and NBUDs induced by the treatment with the complexes SCAR 4, 5 and 6 in CHO-K1 cells culture. The experiments were performed in triplicate and the mean and standard deviation of the results are presented in Table 1.

In the CHO-K1 cells, the complexes did not lead to a statistically significant increase in the MNI, NPBs and NBUDs frequencies as compared to the vehicle control ($p < 0.05$), demonstrating the absence of mutagenic activity under the experimental conditions used in this study. On the other hand, the results showed a significant increase of MNs and NPBs frequencies in HepG2 cells after treatment with SCAR 6 ($p < 0.05$) (Table 2).

3.3. Ames test

Tables 3–5 show the mean number of revertants/plate (M), the standard deviation (SD) and the mutagenicity index (MI) following the treatments with SCAR 4, 5 and 6 complexes, observed in *S. typhimurium* strains TA1535, TA98, TA100, TA102 and TA97a, in the presence (+S9) and absence (–S9) of metabolic activation.

Table 1

Assessment of mutagenic effects of SCAR 4, 5 and 6 on CHO-K1 cells using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay (CBMN-cyt).

Treatments	MNI	NPBs	NBUDs	NDI
Vehicle control	3.66 $\pm$ 1.52	4.00 $\pm$ 1.00	6.66 $\pm$ 4.16	1.85 $\pm$ 0.18
Positive control ^a	55.33 $\pm$ 7.55*	14.33 $\pm$ 4.58*	17.33 $\pm$ 6.02*	1.81 $\pm$ 0.05
Positive control ^b	4.66 $\pm$ 2.08	2.33 $\pm$ 2.51	6.66 $\pm$ 4.04	1.78 $\pm$ 0.83
SCAR 4				
5.1 μM	3.67 $\pm$ 0.89	1.33 $\pm$ 0.44	4.00 $\pm$ 0.67	1.82 $\pm$ 0.04
10.2 μM	3.33 $\pm$ 1.56	3.00 $\pm$ 0.67	3.67 $\pm$ 2.89	1.81 $\pm$ 0.02
20.5 μM	2.33 $\pm$ 1.11	3.33 $\pm$ 0.89	3.67 $\pm$ 2.22	1.85 $\pm$ 0.26
SCAR 5				
0.64 μM	1.33 $\pm$ 0.44	1.67 $\pm$ 1.11	2.00 $\pm$ 0.00	1.80 $\pm$ 0.09
1.3 μM	0.67 $\pm$ 0.89	1.33 $\pm$ 1.11	2.00 $\pm$ 0.67	1.80 $\pm$ 0.57
2.6 μM	2.00 $\pm$ 0.67	1.67 $\pm$ 0.44	3.00 $\pm$ 0.67	1.78 $\pm$ 0.45
SCAR 6				
25.0 μM	2.66 $\pm$ 1.52	3.00 $\pm$ 1.73	5.66 $\pm$ 2.08	1.78 $\pm$ 0.42
50.0 μM	4.33 $\pm$ 0.57	5.33 $\pm$ 2.08	5.33 $\pm$ 1.05	1.81 $\pm$ 0.04
100.0 μM	4.00 $\pm$ 1.73	6.66 $\pm$ 2.64	5.00 $\pm$ 3.46	1.82 $\pm$ 0.11

Values shown are the mean $\pm$ SD; BN: binucleated cell; MNI: micronuclei; NPBs: nucleoplasmic bridges; NBUDs: nuclear buds and NDI: nuclear division index. The data shown are based on three independent experiments. Vehicle control, 1.0% dimethylsulfoxide; Positive control^a, 0.05 μM doxorubicin; Positive control^b, 5 μM aflatoxin B1. *: Significantly different from the vehicle control ($p < 0.05$).

Table 2

Assessment of mutagenic effects of SCAR 4, 5 and 6 on HepG2 cells using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay (CBMN-cyt).

Treatments	MNI	NPBs	NBUDs	NDI
Vehicle control	2.67 $\pm$ 1.53	1.00 $\pm$ 1.00	7.33 $\pm$ 1.53	1.84 $\pm$ 0.50
Positive control ^a	72.33 $\pm$ 6.66*	12.67 $\pm$ 2.08*	25.00 $\pm$ 14.93*	1.81 $\pm$ 0.17
Positive control ^b	41.14 $\pm$ 17.03*	16.67 $\pm$ 5.51*	19.33 $\pm$ 6.78*	1.78 $\pm$ 0.15
SCAR 4				
3.8 μM	1.67 $\pm$ 0.44	2.33 $\pm$ 0.89	3.00 $\pm$ 1.33	1.83 $\pm$ 0.20
7.6 μM	4.33 $\pm$ 1.11	2.33 $\pm$ 1.11	1.67 $\pm$ 0.89	1.75 $\pm$ 0.80
15.5 μM	2.00 $\pm$ 0.67	1.67 $\pm$ 0.44	1.67 $\pm$ 1.11	1.87 $\pm$ 0.20
SCAR 5				
0.32 μM	3.33 $\pm$ 1.11	2.33 $\pm$ 0.44	3.00 $\pm$ 1.33	1.77 $\pm$ 0.50
0.64 μM	6.00 $\pm$ 2.00	3.00 $\pm$ 1.11	2.67 $\pm$ 1.11	1.89 $\pm$ 0.70
1.3 μM	4.67 $\pm$ 1.78	2.00 $\pm$ 0.67	3.67 $\pm$ 1.11	1.85 $\pm$ 0.30
SCAR 6				
7.5 μM	9.60 $\pm$ 3.06	3.33 $\pm$ 1.53	12.67 $\pm$ 2.08	1.85 $\pm$ 0.21
15.0 μM	14.33 $\pm$ 3.06*	3.00 $\pm$ 1.00	11.00 $\pm$ 4.36	1.85 $\pm$ 0.18
30.0 μM	22.67 $\pm$ 8.33*	8.67 $\pm$ 4.04*	13.33 $\pm$ 4.93	1.88 $\pm$ 0.53

Values shown are the mean $\pm$ SD; BN, binucleated cell; MNI, micronuclei; NPBs, nucleoplasmic bridges; NBUDs, nuclear buds and NDI, nuclear division index. The data shown are based on three independent experiments. Vehicle control, 1.0% dimethylsulfoxide; Positive control^a, 0.05 μM doxorubicin; Positive control^b, 5 μM aflatoxin B1. *: Significantly different from the vehicle control ($p < 0.05$).

Table 3

Revertants/plate, standard deviation and mutagenicity index (in brackets) in the strains TA1535, of *S. typhimurium* after treatment with various doses of SCAR 4, with (+S9) and without (–S9) metabolic activation.

Treatments	Number of revertants (M $\pm$ SD)/plate and MI	
	TA 1535	
	–S9	+S9
0.00 ^a	6 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1
3.2	7 $\pm$ 2 (1.2)	6 $\pm$ 2 (0.8)
6.4	6 $\pm$ 2 (1.0)	7 $\pm$ 1 (1.0)
12.8	6 $\pm$ 1 (1.0)	7 $\pm$ 2 (1.0)
25.6	6 $\pm$ 1 (0.9)	8 $\pm$ 1 (1.1)
51.3	5 $\pm$ 2 (0.8)	6 $\pm$ 2 (0.8)
102.6	Toxic	Toxic
C+	140 $\pm$ 22 ^b	234 $\pm$ 75 ^c

C+: Positive control.

^a Negative control: dimethylsulfoxide (100 μL /plate).

^b sodium azide (1.25 μg /plate) in the absence of S9.

^c 2-anthramine in the presence of S9.

Table 4

Revertants/plate, standard deviation and mutagenicity index (in brackets) in the strains TA1535, TA98, TA100, TA102 and TA97a of *S. typhimurium* after treatment with various doses of SCAR 5, with (+S9) and without (–S9) metabolic activation.

Treatments μM	Number of revertants (M $\pm$ SD)/plate and MI									
	TA 1535		TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
	–S9	+S9	–S9	+S9	–S9	+S9	–S9	+S9	–S9	+S9
0.00 ^a	6 $\pm$ 0	5 $\pm$ 1	20 $\pm$ 6	15 $\pm$ 4	184 $\pm$ 1	180 $\pm$ 60	297 $\pm$ 73	333 $\pm$ 26	125 $\pm$ 4	121 $\pm$ 8
0.67	8 $\pm$ 5 (1.3)	8 $\pm$ 1 (1.3)	24 $\pm$ 1 (1.2)	21 $\pm$ 2 (1.4)	201 $\pm$ 39 (1.1)	178 $\pm$ 26 (1.0)	316 $\pm$ 8 (1.1)	389 $\pm$ 3 (1.2)	186 $\pm$ 26 (1.5)	126 $\pm$ 1 (1.0)
1.34	8 $\pm$ 1 (1.2)	6 $\pm$ 1 (1.2)	19 $\pm$ 4 (0.9)	20 $\pm$ 3 (1.3)	170 $\pm$ 7 (1.0)	200 $\pm$ 69 (1.1)	293 $\pm$ 40 (1.0)	359 $\pm$ 50 (1.1)	171 $\pm$ 8 (1.4)	122 $\pm$ 7 (1.0)
2.68	7 $\pm$ 4 (1.2)	7 $\pm$ 1 (1.4)	22 $\pm$ 4 (1.1)	20 $\pm$ 2 (1.3)	209 $\pm$ 26 (1.1)	176 $\pm$ 21 (1.0)	319 $\pm$ 15 (1.1)	351 $\pm$ 84 (1.0)	151 $\pm$ 40 (1.2)	128 $\pm$ 21 (1.0)
5.36	7 $\pm$ 1 (1.2)	7 $\pm$ 1 (1.4)	18 $\pm$ 5 (0.9)	15 $\pm$ 3 (1.0)	176 $\pm$ 10 (1.0)	196 $\pm$ 28 (1.1)	312 $\pm$ 22 (1.0)	424 $\pm$ 17 (1.2)	162 $\pm$ 27 (1.3)	119 $\pm$ 16 (1.0)
10.7	5 $\pm$ 3 (0.8)	6 $\pm$ 2 (1.2)	17 $\pm$ 7 (0.8)	13 $\pm$ 1 (0.9)	162 $\pm$ 6 (0.9)	162 $\pm$ 10 (0.9)	300 $\pm$ 22 (1.0)	414 $\pm$ 35 (1.2)	155 $\pm$ 27 (1.2)	124 $\pm$ 9 (1.0)
21.4	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic
42.9	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic
85.8	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic
C+	462 $\pm$ 22 ^c	570 $\pm$ 33 ^e	883 $\pm$ 71 ^b	904 $\pm$ 80 ^e	801 $\pm$ 38 ^c	1020 $\pm$ 22 ^e	970 $\pm$ 114 ^d	1106 $\pm$ 51 ^f	749 $\pm$ 71 ^b	940 $\pm$ 115 ^e

C+: Positive control.

^a Negative control: dimethylsulfoxide (100 μL /plate).

^b 4-nitro-o-phenylenediamine (10.0 μg /plate – TA98, TA97a).

^c sodium azide (1.25 μg /plate – TA100, TA1535).

^d mitomycin (0.5 μg /plate – TA102), in the absence of S9.

^e 2-anthramine (1.25 μg /plate – TA97a, TA98, TA100 and TA 1535).

^f 2-aminofluorene (10.0 μg /plate – TA102), in the presence of S9.

Table 5

Revertants/plate, standard deviation and mutagenicity index (in brackets) in the strains TA1535, TA98, TA100, TA102 and TA97a of *S. typhimurium* after treatment with various doses of SCAR 6, with (+S9) and without (–S9) metabolic activation.

Treatments μM	Number of revertants (M $\pm$ SD)/plate and MI									
	TA 1535		TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
	–S9	+S9	–S9	+S9	–S9	+S9	–S9	+S9	–S9	+S9
0.0 ^a	6 $\pm$ 1	7 $\pm$ 3	23 $\pm$ 6	24 $\pm$ 4	85 $\pm$ 8	95 $\pm$ 12	398 $\pm$ 12	474 $\pm$ 26	102 $\pm$ 4	86 $\pm$ 10
4.14	8 $\pm$ 1.5 (1.3)	9 $\pm$ 2 (1.2)	26 $\pm$ 8 (1.1)	27 $\pm$ 6 (1.1)	100 $\pm$ 15 (1.2)	122 $\pm$ 13 (1.3)	402 $\pm$ 7 (1.0)	542 $\pm$ 39 (1.1)	119 $\pm$ 19 (1.2)	106 $\pm$ 22 (1.2)
8.29	7 $\pm$ 0 (1.2)	10 $\pm$ 3 (1.4)	27 $\pm$ 5 (1.1)	27 $\pm$ 3 (1.1)	99 $\pm$ 17 (1.2)	115 $\pm$ 20 (1.2)	400 $\pm$ 36 (1.0)	554 $\pm$ 32 (1.2)	120 $\pm$ 20 (1.2)	110 $\pm$ 14 (1.3)
15.5	7 $\pm$ 1 (1.1)	7 $\pm$ 0 (1.0)	27 $\pm$ 3 (1.1)	24 $\pm$ 1 (1.0)	101 $\pm$ 33 (1.2)	107 $\pm$ 22 (1.1)	403 $\pm$ 40 (1.0)	466 $\pm$ 25 (1.0)	119 $\pm$ 20 (1.2)	132 $\pm$ 9 (1.5)
33.1	6 $\pm$ 1 (1.0)	8 $\pm$ 0 (1.1)	26 $\pm$ 4 (1.1)	28 $\pm$ 2 (1.1)	105 $\pm$ 45 (1.2)	110 $\pm$ 5 (1.1)	400 $\pm$ 33 (1.0)	474 $\pm$ 12 (1.0)	121 $\pm$ 10 (1.2)	172 $\pm$ 11* (2.0)
66.3	6 $\pm$ 2 (1.0)	7 $\pm$ 3 (1.0)	26 $\pm$ 2 (1.1)	34 $\pm$ 12 (1.4)	83 $\pm$ 22 (1.0)	109 $\pm$ 9 (1.1)	326 $\pm$ 18 (0.8)	415 $\pm$ 12 (0.9)	124 $\pm$ 16 (1.2)	210 $\pm$ 16** (2.4)
132.6	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	156 $\pm$ 15 (1.5)	253 $\pm$ 15** (2.9)
199.0	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	54 $\pm$ 26 (1.5)	204 $\pm$ 19* (2.3)
265.3	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	Toxic	84 $\pm$ 13 (0.8)	88 $\pm$ 15 (1.0)
C+	463 $\pm$ 48 ^c	523 $\pm$ 107 ^e	912 $\pm$ 43 ^b	1010 $\pm$ 94 ^e	1021 $\pm$ 38 ^c	1200 $\pm$ 29 ^e	1067 $\pm$ 74 ^d	1126 $\pm$ 90 ^f	824 $\pm$ 54 ^b	904 $\pm$ 75 ^e

Bernstein model * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (ANOVA); C+: Positive control.

^a Negative control: dimethylsulfoxide (100 μL /plate).

^b 4-nitro-o-phenylenediamine (10.0 μg /plate – TA98, TA97a).

^c sodium azide (1.25 μg /plate – TA100, TA1535).

^d mitomycin (0.5 μg /plate – TA102), in the absence of S9.

^e 2-anthramine (1.25 μg /plate – TA97a, TA98, TA100 and TA 1535).

^f 2-aminofluorene (10.0 μg /plate – TA102), in the presence of S9.

The results of the SCAR 4 complex obtained from the study conducted by our research group [7] showed no mutagenic activity in the strains TA98, TA100, TA102 and TA97 of *S. typhimurium*. However, to complement these results, the mutagenic activity in the TA1535 strain was also evaluated and no increase was observed in the number of revertant colonies in any concentrations of SCAR 4, in the absence and presence of metabolic activation (Table 3).

The SCAR 5 complex did not induce an increase in revertant colonies in any concentrations, in the absence and presence of metabolic activation (Table 4). These results lead to the conclusion that the SCAR 5 complex is not capable of causing genetic mutations, as evidenced by the Ames test.

In the absence of metabolization, SCAR 6 complex was not considered mutagenic in any concentration, and in none of the strains of *S. typhimurium* studied.

Nonetheless, in the experiments with metabolic activation (+S9), it was observed that the SCAR 6 complex after the metabolization process led to an increase in the number of revertant colonies, with mutagenic effect in the TA97a strain ($p < 0.05$). The mutagenicity index in the TA97a strain was equal/greater than 2.0

from the concentration of 33.1 μM to 199 μM /plate (Table 5). Thus, it can be inferred that after metabolic activation, the complex SCAR 6 induces frameshift mutations by adding C:G pairs, detectable through the TA97a strain of *S. typhimurium*. This outcome suggests that SCAR 6 reacts with DNA indirectly with bioactivation, and that bioactivation fosters DNA damage.

4. Discussion

The assessment that is required to be undertaken regarding the toxic effects of chemicals such as the candidates for new drugs, environmental and industrial compounds, among other agents, is an increasingly recurring challenge in our modern world. Contact with newly discovered molecules, even without knowledge of their biological activities, can cause harm to the human health in both short and long terms [20].

The absence of new drugs for TB treatment, despite the indisputably myriad efforts that have been made in this regard, is conceivably worrying, especially when dealing with MDR-TB [7]. Many research groups have been toiling in quest for new molecules

so as to enable them replace or supplement the standard therapy [21,22]. In the drug discovery field, for instance, the one can highlight the role of medicinal chemistry and inorganic metal complexes in the design of therapies that target different biochemical pathways [12].

Studies have brought into the limelight the vital role of the complex of gold, palladium, cobalt, copper and ruthenium with a promising activity against *M. tuberculosis*, with extra and intracellular targets, thus making them potential candidates for future applications in therapy [23–26].

Encouraged by the promising results, our group has been seeking new candidates against MDR-TB. In previous studies, the complexes of ruthenium(II) SCAR 4, 5 and 6 showed MIC better or perhaps equivalent to the drugs used in first-line treatments, including activity against resistant clinical isolates of *M. tuberculosis* [7].

These promising results paved the way for the SCAR complexes to represent a new alternative therapy against TB, listed in the global pipeline of anti-TB drugs in research and stages of approval [27].

In this study, the clonogenic survival assay was conducted to determine the cell viability of HepG2 and CHO-K1 cells treated with seven different concentrations of SCAR 4, 5 and 6 complexes to set the concentrations to be used in subsequent *in vitro* assays.

Following 48 h of treatment and 7 days of subculture, SCAR 5 was found to have lower survival rates, presenting five statistically varying concentrations ($p < 0.05$) of control (1% DMSO), with SCAR 4 presenting only two cytotoxic concentrations. (Fig. 2).

Interestingly, we observed the same antiproliferative activity for the complexes in the tumor cell line HepG2, though with quite more pronounced effects. The SCAR 5 complex continued to have a major cytotoxic effect, followed by SCAR 4 and SCAR 6 that has also shown cytotoxic concentrations (50 and 100 μ M) (Fig. 3).

The clonogenic survival assay is considered a more accurate test owing to the fact it takes into account the reproductive death, which is an important parameter to be analyzed and used in defining non-cytotoxic concentrations for *in vitro* assays [28].

The number of colony forming cells was reduced in a dependent manner as far as the complexes concentration is concerned. It is observed, moreover, that the number of HepG2 tumor cells colonies treated with the SCAR complexes was smaller compared to the same concentrations in the normal cells (CHO-K1). It is worth considering the anti-proliferative effect of ruthenium complexes in tumor cells rather than in normal cells, suggesting a selectivity action mechanism and corroborating with recent studies that show a variety of ruthenium complexes with antitumor activity *in vitro* [29,30].

Our results showed that SCAR 6 complex in the highest concentration presents a SF of 46.5% in tumor cells, whereas in normal cells it is found to have a much less evident anti-proliferative, with 89.5% of survival cells in the same concentration.

These values reflect the selective nature of the complex, thus making them promising anticancer agents. Studies such as those published by [31] show comparative results among the antiproliferative action of ruthenium complexes in normal and tumor models, where in general, these complexes exhibit selectivity values that make them promising candidates for a safer therapy.

The mutagenic effect of complexes in a chromosomal level was evaluated using three selected concentrations for each complex that did not affect the viability of CHO-K1 and HepG2 cells that were considered adequate tools for the analysis of direct and indirect mutagens [32].

According to Fenech [33], in micronuclei analyses, cultures must present a percentage of binucleated cells above 35%. In this study, all the treatments as well as the controls the proportion of binucleated cells was greater than 65%, thereby rendering all the treatments

feasible of being analyzed. The results obtained showed that none of the concentrations of the SCAR 4 and 5 complexes led to a statistically significant increase in the total number of micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds compared to the control (DMSO 1%), thus indicating that these ruthenium complexes are not capable of provoking chromosomal mutations in cellular systems assessed under the conditions used in this study (Table 1).

It is worth pointing out, nevertheless, that SCAR 6 was capable of propelling a significant increase in the number of MN and NPBs in HepG2 cells (Table 2). The fact that mutagenic effect has only been observed in HepG2 cells may be related to the mechanism of action of the SCAR 6 molecule.

Its structure which is known to be similar to cisplatin has two chloride ligands complexed to the metal.

The action mechanism of cisplatin is undoubtedly well known, its chloride ligands are removed due to the hydrolysis that takes place inside the cell, and as such its hydrolyzed molecule generates a species that binds irreversibly to the DNA, usually the two adjacent guanine bases [10]. This interaction leads to the distortion of the molecule and a consequent break up of the DNA [34]. These mechanisms can lead to chromosomal aberrations as well as cell viability decrease in mammals [35].

As a result of the chemical similarity, because of square planar structure, that the SCAR 6 complex bears with cisplatin, it is suggested that it can interact with the DNA in a similar fashion, leading to the chromosomal breakage and a consequent formation of micronuclei in metabolizing cells.

The use of metabolizing cell lines, such as those derived from human liver, best reflects the sensitivity to detection of various classes of genotoxic chemical compounds [36]. HepG2 cells derived from human hepatocellular carcinoma, kept phase I and II enzymes active, as we know these enzymes play a crucial role in the activation of indirect mutagens and represent the *in vivo* metabolism in a more predictive way than experimental models with metabolically incompetent cells like CHO-K1. It is owing to the aforementioned reason that some chemicals may present negative results for mutagenicity in CHO-K1 cells, while exhibiting positive results in HepG2 cells under the same conditions [37,38].

In the CBMN-cyt assay, AFB₁ was additionally used as positive control, which once activated by CYP3A4, known to be not highly expressive in rats as in humans, can form various adducts in DNA [38]. Our results confirm the ability of our HepG2 cell lines to potentially metabolize genotoxic xenobiotics in the sense that the increase observed in MNs, NPBs and NBUDs were statistically significant in HepG2 cells (Table 2). Contrary to that, however, the mutagenic effect was not observed in CHO-K1 cells (Table 1).

These results can be compared with those found in the reverse mutation assay (Ames test), where the same complex, SCAR 6, showed mutagenic activity after undergoing metabolism. The Ames test was performed according to the OECD guideline N^o. 471 [39] with 5 different strains of *S. typhimurium* (TA 1535, TA 98, TA 100, TA 102 and TA 97a).

No duplication was observed in the number of revertant colonies in any of the concentrations of SCAR 4 and 5 as compared to the negative control. Furthermore, there was not any dose-response relationship in any of these strains and as such, it can be concluded that the SCAR 4 and 5 do not have mutagenic effect.

In previous studies, [7] assessed, among other things, the mutagenic activity of some ruthenium complexes (SCAR) by the Ames test. Their results showed that the complexes studied did not show a statistically significant increase in the number of revertant colonies compared to the negative control, thereby indicating no mutagenic effect [7].

SCAR 6 complex was also not able to increase the number of revertants in the absence of metabolism experiments. However,

when S9 was added mutagenic effect was observed in the TA97a strain.

According to the strain involved, we can assume that the main genotoxic action mechanism of this compound is a frameshift mutation, a condition that occurs upon adding C:G pairs after undergoing metabolism [17].

The suggested mechanism of mutagenicity involves metabolic activation, causing the formation of metabolites that interact with bacterial DNA and leading to the reversion of mutations installed in *S. typhimurium* strains (TA97a). Thus, the results lead us to deduce that the SCAR 6 complex acts as an indirect mutagenic agent, in other words, the complex becomes mutagenic when metabolized.

This result confirms the effect observed in CBMN-cyt assay, suggesting that SCAR 6 complex may give rise to mutagenic products after being metabolized by cytochrome P-450 system.

In vitro studies have confirmed the ability of ruthenium complexes to bind to DNA [40]. The cytotoxicity in cell cultures and genotoxicity in *in vitro* and *in vivo* models indicate a direct correlation of this capacity [41–43].

It has evidently become clear the importance of the study of the mutagenic potential of new compounds to which organisms can be exposed. Obviously, a mutagenic event does not necessarily lead to the development of cancer, however, the detection of mutagenic activity is an important indicator for assessing the risk of the disease [44].

In summary, this study showed that two of the three ruthenium complexes do not have mutagenic activities *in vitro*. By some fortunate stroke of coincidence, these complexes are the ones that showed the most promising results against MDR *M. tuberculosis* strains in previous studies [7]. However, the SCAR 5 complex presented cytotoxicity in CHO-K1 and HepG2 cells at concentrations greater than 3.0 μ M.

Cytotoxicity was investigated in this study with the aim of determining optimal concentrations for the CBMN-cyt assay. Oddly enough though, a possible selective cytotoxicity activity was observed for tumor cells. Further investigation into this issue is required using different models of human tumor and normal cells.

Our study makes a meaningful contribution in the sense that it helps to clarify a wide range of activities attributed to these complexes in biological systems providing valuable elucidations regarding the safety profile in the therapeutic use of these molecules.

It is noteworthy to point out that only one of the analyzed complexes (SCAR 6) was considered mutagenic in standard systems for the determination of *in vitro* mutagenicity. This effect, nonetheless, cannot be in the least bit considered discouraging owing to the fact that knowing the possible damage that chemical substances cause the DNA is indeed an essentially important information for the direction of appropriate therapy. This effect can be further explored given the known antitumor potential that ruthenium complexes have been known to have contributing to a novel and rational approach to developing a new metal-based drug. Other studies on the mechanisms of action of these complexes are underway and preliminary results have suggested mechanisms of interaction with DNA.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)” and “Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)”, Brazilian state and federal agencies.

References

- [1] Health World Organization, Global Tuberculosis Report 2015, Available Line. (2015).
- [2] A. Zumla, P. Nahid, S.T. Cole, Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens, *Nat. Rev. Drug Discov.* 12 (2013) 388–404, <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4001>.
- [3] R. Soman, P. Pillai, S. Madan, A. Shetty, C. Rodrigues, Successful management of highly drug resistant tuberculosis with individualised drug susceptibility testing, *J. Assoc. Physicians India* 62 (2014) 567–570.
- [4] J. Brown, S. Capocci, C. Smith, S. Morris, I. Abubakar, M. Lipman, International journal of Infectious diseases health status and quality of life in tuberculosis, *Int. J. Infect. Dis.* 32 (2015) 68–75, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.12.045>.
- [5] V. Skripconoka, M. Danilovits, L. Pehme, T. Tomson, G. Skenders, T. Kummik, et al., Delamanid improves outcomes and reduces mortality in multidrug-resistant tuberculosis, *Eur. Respir. J.* 41 (2013) 1393–1400, <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00125812>.
- [6] S.C. Gouloze, A.F. Cohen, R. Rissmann, Bedaquiline, *Br. J. Clin. Pharmacol.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1111/bcp.12613>, n/a–n/a.
- [7] F.R. Pavan, G.V. Poelhsitz, L.V.P. da Cunha, M.I.F. Barbosa, S.R.A. Leite, A.A. Batista, et al., *In vitro* and *in vivo* activities of Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes (SCAR) against mycobacterium tuberculosis, *PLoS One* 8 (2013) 1–10, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064242>.
- [8] A.M.C. Benite, S.D.P. Machado, E.J. Barreiro, Uma visão da química bioinorgânica medicinal, *Quim. Nova* 30 (2007) 2062–2067, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000800045>.
- [9] N. Muhammad, Z. Guo, Metal-based anticancer chemotherapeutic agents, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19 (2014) 144–153, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.02.003>.
- [10] S. Page, Ruthenium compounds as anticancer agents, *Educ. Chem.* 1 (2012) 26–29, Available at: <http://www.rsc.org/eic>.
- [11] F.R. Pavan, G. Von Poelhsitz, F.B. do Nascimento, S.R.A. Leite, A.A. Batista, V.M. Defflon, et al., Ruthenium(II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 598–601, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.10.049>.
- [12] F.R. Pavan, G.V. Poelhsitz, M.I.F. Barbosa, S.R.A. Leite, A.A. Batista, J. Ellena, et al., European journal of medicinal chemistry Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: inorganic compounds as agents against tuberculosis, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 5099–5107, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.08.023>.
- [13] S.L. Queiroz, A.A. Batista, G. Oliva, M.T. do Pi Gambardella, R.H.a. Santos, K.S. MacFarlane, et al., The reactivity of five-coordinate Ru(II) (1,4-bis(diphenylphosphino) butane) complexes with the N-donor ligands: ammonia, pyridine, 4-substituted pyridines, 2,2'-bipyridine, bis(o-pyridyl) amine, 1,10-phenanthroline, 4,7-diphenylphenanthroline and ethylened, *Inorg. Chim. Acta* 267 (1998) 209–221, [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-1693\(97\)05615-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-1693(97)05615-6).
- [14] N.V. Ballal, M. Kundabala, S. Bhat, N. Rao, B.S.S. Rao, A comparative *in vitro* evaluation of cytotoxic effects of EDTA and maleic acid: root canal irrigants, oral surgery, *Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontol.* 108 (2009) 633–638, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.05.039>.
- [15] M. Fenech, Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature* 682 (2007) 217–234, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-409-8_16.
- [16] D.A. Eastmond, J.D. Tucker, Kinetochores localization in micronucleated cytokinesis-blocked Chinese hamster ovary cells: a new and rapid assay for identifying aneuploidy-inducing agents, *Mutat. Res.* 224 (1989) 517–525, [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218\(89\)90079-7](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218(89)90079-7).
- [17] D.M. Maron, B.N. Ames, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.* 113 (1983) 173–215, [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9).
- [18] L. Bernstein, J. Kaldor, J. McCann, M.C. Pike, An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test, *Mutat. Res.* 97 (1982) 267–281, [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161\(82\)90026-7](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161(82)90026-7).
- [19] F.V. Santos, I.M.S. Colus, M. a. Silva, W. Vilegas, E. a. Varanda, Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity, *Food Chem. Toxicol.* 44 (2006) 1585–1589, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2006.03.012>.
- [20] A.Y. Maslov, W. Quispe-Tintaya, T. Gorbacheva, R.R. White, J. Vijg, High-throughput sequencing in mutation detection: a new generation of genotoxicity tests? *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* (2015) 1–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.03.014>.
- [21] K. Gobis, H. Foks, M. Seroeki, E. Augustynowicz-Kopec, A. Napiórkowska, Synthesis and evaluation of *in vitro* antimycobacterial activity of novel ¹H-benzodimidazole derivatives and analogues, *Eur. J. Med. Chem.* 89 (2015) 13–20, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.031>.
- [22] D.U. Ganihigama, S. Sureram, S. Sangher, P. Hongmanee, T. Aree, C. Mahidol, et al., Antimycobacterial activity of natural products and synthetic agents: pyrrolodiquinolines and vermillion as anti-tubercular leads against clinical multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, *Eur. J. Med. Chem.* 89 (2015) 1–12, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.026>.

- [23] B. Đ. Glišić, M.I. Djuran, Gold complexes as antimicrobial agents: an overview of different biological activities in relation to the oxidation state of the gold ion and the ligand structure, *Dalton Trans.* 43 (2014) 5950–5969, <http://dx.doi.org/10.1039/c4dt00022f>.
- [24] I. De Aguiar, A. Tavares, A.C. Roveda, C.H. Augusto, L.B. Marino, É.O. Lopes, et al., European journal of pharmaceutical sciences antitubercular activity of Ru(II) isoniazid complexes, *Eur. J. Pharm. Sci.* 70 (2015) 45–54, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.01.008>.
- [25] C.J. Hoffmann, E. Variava, M. Rakgokong, K. Masonoke, M. van der Watt, R.E. Chaisson, et al., High prevalence of pulmonary tuberculosis but low sensitivity of symptom screening among HIV-infected pregnant women in south africa, *PLoS One* 8 (2013) 8–12, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0062211>.
- [26] S. Giovagnoli, M.L. Marenzoni, M. Nocchetti, C. Santi, P. Blasi, A. Schoubben, et al., Synthesis, characterization and *in vitro* extracellular and intracellular activity against *Mycobacterium tuberculosis* infection of new second-line antitubercular drug-palladium complexes, *J. Pharm. Pharmacol.* 66 (2014) 106–121, <http://dx.doi.org/10.1111/jphp.12162>.
- [27] Working Group on new TB Drugs, The global TB drug pipeline, <http://www.newtbdrugs.org/project.php?id=144>. (2014).
- [28] N.A.P. Franken, H.M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C. Van Bree, Clonogenic assay of cells in vitro, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 2315–2319, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- [29] B. Demoro, R.F.M. de Almeida, F. Marques, C.P. Matos, L. Otero, J. Costa Pessoa, et al., Screening organometallic binuclear thiosemicarbazone ruthenium complexes as potential anti-tumour agents: cytotoxic activity and human serum albumin binding mechanism, *Dalton Trans.* 42 (2013) 7131–7146, <http://dx.doi.org/10.1039/c3dt00028a>.
- [30] A. Weiss, R.H. Berndsen, M. Dubois, C. Müller, R. Schibli, A.W. Griffioen, et al., *In vivo* anti-tumor activity of the organometallic ruthenium(II)-arene complex [Ru(6-p-cymene)-Cl₂(pta)] (RAPTA-C) in human ovarian and colorectal carcinomas, *Chem. Sci.* 5 (2014) 4742–4748, <http://dx.doi.org/10.1039/C4SC01255K>.
- [31] M.P. Chelopo, S. a. Pawar, M.K. Sokhela, T. Govender, H.G. Kruger, G.E.M. Maguire, Anticancer activity of ruthenium(II) arene complexes bearing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline amino alcohol ligands, *Eur. J. Med. Chem.* 66 (2013) 407–414, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.05.048>.
- [32] I. Valentin-Severin, L. Le Hegarat, J.C. Lhuguenot, A.M. Le Bon, M.C. Chagnon, Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 536 (2003) 79–90, [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00031-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00031-7).
- [33] M. Fenech, The *in vitro* micronucleus technique, *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 455 (2000) 81–95, [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8).
- [34] L. Kelland, The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy, *Nat. Rev. Cancer* 7 (2007) 573–584, <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2167>.
- [35] G. Krishnaswamy, W.C. Dewey, Cell killing and chromosomal aberrations induced in Chinese hamster ovary cells by treating with cisplatin at 41.5 degrees C during the G1 or late S phase, *Cancer Res.* 53 (1993) 1239–1243, [http://dx.doi.org/10.1016/0921-8777\(93\)90067-Q](http://dx.doi.org/10.1016/0921-8777(93)90067-Q).
- [36] B.J. Majer, V. Mersch-Sundermann, F. Darroudi, B. Laky, K. De Wit, S. Knasmüller, Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells, *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 551 (2004) 153–166, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.02.022>.
- [37] S. Knasmüller, W. Parzefall, R. Sanyal, S. Ecker, C. Schwab, M. Uhl, et al., Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens, *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 402 (1998) 185–202, [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00297-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00297-2).
- [38] W.M.A. Westerink, T.J.J. Schirris, G.J. Horbach, W.G.E.J. Schoonen, Development and validation of a high-content screening *in vitro* micronucleus assay in CHO-k1 and HepG2 cells, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* 724 (2011) 7–21, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.05.007>.
- [39] O. Guideline, F.O.R., Testing, O.F. Chemicals, Oecd guideline for testing of chemicals, (1997) 1–11.
- [40] M.J. Clarke, Ruthenium metallopharmaceuticals, *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 69–93, [http://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00025-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00025-5).
- [41] A.P. De Lima, F. De Castro Pereira, C. a, S.T. Vilanova-Costa, A. De Santana Braga Barbosa Ribeiro, L.A. Pavanin, W.B. Dos Santos, et al., The ruthenium complex *cis*-(dichloro) tetrammineruthenium(III) chloride induces apoptosis and damages DNA in murine sarcoma 180 cells, *J. Biosci.* 35 (2010) 371–378, <http://dx.doi.org/10.1007/s12038-010-0042-2>.
- [42] F.S. Alanyali, E. Ergin, O. Artagan, K. Benkli, Investigation of genotoxic effects of some ruthenium complexes according to *Cis*-platinum, *Int. J. Pharmacol.* 7 (2011) 96–105, <http://dx.doi.org/10.3923/ijp.2011.96.105>.
- [43] N. Busto, J. Valladolí, M. Martínez-Alonso, H.J. Lozano, F.A. Jalón, B.R. Manzano, et al., Anticancer activity and DNA binding of a bifunctional Ru(II) arene aqua-complex with the 2,4-diamino-6-(2-pyridyl)-1,3,5-triazine ligand, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 9962–9974, <http://dx.doi.org/10.1021/ic401197a>.
- [44] P. Thomas, M. Fenech, Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes, *Methods Mol. Biol.* 682 (2011) 217–234.