



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

RONE APARECIDO DE GRANDIS

**Avaliação toxicogenética e estudo dos mecanismos de
resposta antiproliferativa de metalofármacos de rutênio
contendo bioligantes naftoquinônicos em modelos celulares
tumoriais convencionais e em 3D**

ARARAQUARA

2020

RONE APARECIDO DE GRANDIS

**Avaliação toxicogenética e estudo dos mecanismos de
resposta antiproliferativa de metalofármacos de rutênio
contendo bioligantes naftoquinônicos em modelos celulares
tumoriais convencionais e em 3D**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da UNESP, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação em
Biociências e Biotecnologia Aplicadas à
Farmácia, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

ARARAQUARA

2020

D321a

De Grandis, Rone Aparecido.

Avaliação toxicogenética e estudo dos mecanismos de resposta antiproliferativa de metalofármacos de rutênio contendo bioligantes naftoquinônicos em modelos celulares tumorais convencionais e em 3D / Rone Aparecido De Grandis. – Araraquara: [S.n.], 2020. 163 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Fernando Rogério Pavan.

1. Câncer. 2. Lapachol. 3. Complexo de rutênio. 4. Apoptose. 5. ERO. I. Pavan, Fernando Rogério, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7

Esta ficha não pode ser modificada

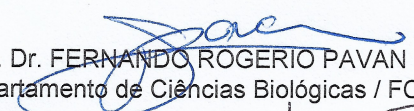
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

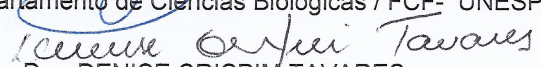
TÍTULO DA TESE: Avaliação toxicogenética e estudo dos mecanismos de resposta antiproliferativa de metalofármacos de rutênio contendo bioligantes naftoquinônicos em modelos celulares tumorais convencionais e em 3D

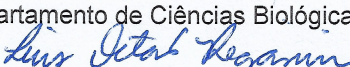
AUTOR: RONE APARECIDO DE GRANDIS

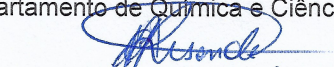
ORIENTADOR: FERNANDO ROGERIO PAVAN

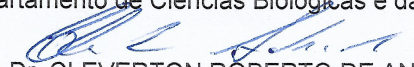
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FERNANDO ROGERIO PAVAN
Departamento de Ciências Biológicas / FCF- UNESP - Araraquara


Profa. Dra. DENISE CRISPIM TAVARES
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade de Franca


Prof. Dr. LUIS OCTÁVIO REGASINI
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Ibilce/ Unesp/ São José do Rio Preto


Profa. Dra. FLÁVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA
Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade de Araraquara - UNIARA


Prof. Dr. CLEVERTON ROBERTO DE ANDRADE
Departamento de Fisiologia e Patologia / FOAR- UNESP - Araraquara

Araraquara, 29 de janeiro de 2020

Dedico especialmente este trabalho aos meus pais e à minha irmã, por todo o amor, o apoio e o incentivo durante todas as etapas de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho finaliza um importante ciclo na minha vida profissional, um ciclo marcado por enriquecedores momentos vividos enquanto aluno de pós-graduação. Ao longo dos anos dedicados à pesquisa, em muitas situações contei com pessoas especiais que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho. À essas pessoas, deixo registrado meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador **Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan** pela orientação, pela amizade e pela oportunidade concedida ao abrir as portas de seu laboratório. Sou muito grato por ter me acolhido e caminhado ao meu lado durante as dificuldades desta trajetória.

À minha orientadora **Profa. Dra. Lusânia Maria Greggí Antunes**, pela orientação, pelo apoio, pelo respeito, pelo carinho e também pela imensa contribuição para meu amadurecimento profissional e pessoal.

Ao **Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista**, pelo apoio, pela simpatia, pelos momentos de descontração e de ensinamento que ultrapassaram os limites da universidade.

Às minhas orientadoras de iniciação científica e mestrado, professoras doutoras, **Ticiane Capote, Raquel Caminaga, Flávia Resende e Eliana Varanda**, pelas muitas oportunidades oferecidas e por me introduzirem ao fascinante campo da pesquisa científica.

Aos professores, **Dr. Adelino de Godoy Neto, Dra. Denise Tavares e Dra. Paula Barbugli**, pelas imprescindíveis colocações durante o exame geral de qualificação.

Aos **professores membros da banca examinadora**, pela disponibilidade e pelas contribuições para este trabalho.

À **FAPESP** pela concessão da bolsa de doutorado e pelo suporte financeiro oferecido para a realização deste trabalho.

À **CAPES** pelo suporte financeiro oferecido, bem como ao **CNPq** e à **FAEPA/HCFMRP**.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa de Fármacos contra Tuberculose da FCF/UNESP, **Débora, Camila M., Mari, Ana Carolina, Manu, Rachel, Giulia, Camila G., Gabi, Júlia e Mel**, pela recepção amigável, pelo excelente ambiente de trabalho, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos colegas do Laboratório de Nutrigenômica da FCFRP/USP, **Patrick, Ana Rita, Katiuska, Diego, Livia, Xandão e Joana D’Arc**, pela convivência harmoniosa, por todo auxílio prestado nas atividades de pesquisa, pela amizade e por fazerem os dias em Ribeirão Preto mais leves e agradáveis.

Aos funcionários do Departamento de Genética da FMRP/USP, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCFRP/USP e do Departamento de Ciências Biológicas da FCF/UNESP, por toda a atenção, o apoio, a dedicação e a simpatia.

A todos meus amigos, principalmente: **Jéssica, Larissa, Mariane, Flávia S., Roberta, Matheus, Marina, Maria Clara, Patrick** e minhas amigas de infância **Érica** e **Flávia**, minha gratidão pela verdadeira amizade, pelos conselhos, pelas conversas, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

Ao meu companheiro, **Wellington Marques**, por todos os momentos felizes que passamos juntos, pelo amor, pelo carinho, pelo respeito e pela cumplicidade. Obrigado por toda a compreensão, a paciência e o incentivo durante meu doutorado.

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

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra
alma humana.”* Carl Jung

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc. N° 2016/22429-7 e 2018/00168-0).
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Código de Financiamento 001).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.
- Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – FCF/UNESP.
- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP/USP

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Este documento foi elaborado de acordo com:

- Referências: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - NBR 6023/2018.
- Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do câmpus de Araraquara, UNESP. Diretrizes para apresentações de dissertações e teses, 2020.

RESUMO

DE GRANDIS, Rone Aparecido. **Avaliação toxicogenética e estudo dos mecanismos de resposta antiproliferativa de metalofármacos de rutênio contendo ligantes naftoquinônicos em modelos celulares tumorais convencionais e em 3D.** 163p, Tese - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2020.

Recentemente, complexos de rutênio têm ocupado lugar de destaque na busca por novas terapias anticâncer em razão de sua potencialidade de ação, seletividade em tecido tumoral e toxicidade inferior aos complexos de platina, atualmente utilizados na clínica. A diversidade de seus ligantes é fundamental para que esses metalofármacos atinjam múltiplos alvos biológicos e assim, superem as limitações das terapias existentes. Uma abordagem para moléculas multialvo é a combinação de ligantes bioativos com propriedades antitumorais comprovadas, como os derivados de naftoquinonas naturais. Baseados nisso, esse estudo propôs a avaliação e caracterização das propriedades toxicogenéticas e antitumorais de oito novos complexos de rutênio contendo os ligantes naturais lapachol e lausona. De maneira geral, a série de complexos fosfínicos apresentou satisfatória atividade antiproliferativa frente a diferentes linhagens celulares tumorais, em especial para células derivadas de carcinoma de próstata. Os valores de IC₅₀ desses complexos foram consideravelmente menores do que os valores encontrados para a cisplatina, no qual foi observada atividade até 28 vezes mais seletiva, em relação a esse fármaco. Além disso, os ensaios de eficiência clonogênica sugerem que a substituição do ligante bipy pela phen aumenta a atividade dos compostos, induzindo a perda da clonogenicidade das células tumorais de próstata DU-145. Os complexos fosfínicos também apresentaram atividade antiproliferativa em modelos celulares em três dimensões (3D). Nesses ensaios, os complexos contendo o ligante lapachol demonstraram atividade citotóxica independente do estado de hipóxia encontrado no interior dos esferoides. Ademais, os resultados indicam que o complexo DP-LP é capaz de permear através do esferoide tumoral e desestabilizar as agregações celulares, resultando na perturbação das interações célula-matriz. De fato, o complexo DP-LP desencadeia apoptose em células DU-145 acompanhado de um acúmulo de células na fase G2/M, o que é consistente com a inibição da atividade da proteína AURORA-B. O mecanismo central relacionado com esses efeitos é de que a presença do lapachol no complexo DP-LP promova a geração de espécies reativas intracelulares que podem causar danos ao DNA. A fragmentação do DNA, evidenciada pelo ensaio do cometa pode ativar sistemas de reparos de DNA que mantém as células no *checkpoint* G2/M devido a diminuição da expressão do gene *AURKB*. Além disso, os danos ao DNA configuram o estímulo que desencadeia a ativação de caspases que conduz as células DU-145 à apoptose. Em suma, os resultados encontrados neste estudo contribuem para a seleção e elucidação das propriedades antiproliferativas e citotóxicas de novos compostos, demonstrando que a coordenação do lapachol em complexos fosfínicos de rutênio(II) possibilita a formação de complexos com potencial de impacto na área de saúde tendo como alvo o tratamento do câncer.

Palavras-chave: câncer, lapachol, complexo de rutênio, apoptose, ERO.

ABSTRACT

DE GRANDIS, Rone Aparecido. **Toxicogenetic evaluation and study of antiproliferative response mechanisms of ruthenium-based metallodrugs containing naphthoquinones ligands in tumor cells growing in conventional and 3D systems**. 163p, Thesis – School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, 2020.

Recently, ruthenium complexes have occupied a leading position in the search for new anti-cancer therapies due to their potential of action, selectivity in tumor tissues and less toxicity compared to current platinum complexes. The diversity of ligands is crucial for these complexes to reach multiple biological targets and thus, overcome the limitation of contemporary therapies. One approach for multi-target molecules is the combination of bioactive ligands with recognized antitumor properties, such as natural naphthoquinones. Based on this, this study had proposed the evaluation and characterization of toxicogenetics and antitumor properties of eight new ruthenium complexes containing the natural ligands lapachol and lawsone. In general, the phosphinic series showed satisfactory antiproliferative activity against different cell lines, especially prostate carcinoma-derived cells. The IC₅₀ values of these complexes were considerably lower than the values found for cisplatin. Furthermore, it was observed up to 28-fold selective for the complexes than cisplatin. Also, clonogenic assay suggests that the replacement of bipy ligand for phen increases the compound activity, inducing loss of DU-145 cells clonogenicity. Phosphinic complexes also described antiproliferative activities in three-dimensional (3D) cell models. In these assays, the lapachol-complexes have demonstrated cytotoxic activity independent of the hypoxia found in the spheroids. Besides, the results suggest that the DP-LP complex goes through the spheroid and destabilizes the cell aggregates, resulting in disruption of matrix-cell interactions. The DP-LP complex triggers apoptosis in DU-145 cells accompanied by an increase of cells in the G2 / M phase, which is consistent with the inhibition of AURORA-B protein activity. The central mechanism related to these effects is the presence of lapachol in DP-LP, which promotes the generation of intracellular reactive species that can cause DNA damage. DNA fragmentation, evidenced by comet assay, could activate the DNA repair systems that maintain the cells in the G2 / M checkpoint, due to a decrease of the AURKB gene expression. Also, DNA damage could activate caspases that conducted the DU-145 cells to apoptosis. In summary, the results found in this study contributed to the selection and elucidation of antiproliferative and cytotoxic properties of new compounds. We demonstrate the coordination of lapachol in a phosphinic ruthenium complex allowed the formation of compounds with potential impact in health targeting cancer treatment.

Keywords: cancer, lapachol, ruthenium complex, apoptosis, ROS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. As 10 marcas registradas do câncer e seus possíveis alvos terapêuticos.	18
Figura 2. Principais adutos formados por meio da interação do cisplatina com o DNA.	22
Figura 3. Distribuição seletiva preferencial de íons de rutênio por meio da transferrina.	25
Figura 4. Fórmulas estruturais dos complexos de rutênio NAMI-A, KP1019 e RAPTA-C.	26
Figura 5. Fórmulas estruturais dos principais grupos de quinonas.	28
Figura 6. Ipê-roxo (<i>Tabebuia avellanedae</i> Lor, Bignoniaceae) do Instituto de Química de Araraquara - UNESP e a fórmula estrutural do lapachol	29
Figura 7. Henna (<i>Lawsonia inermis</i> L.) e a fórmula estrutural da lausona	31
Figura 8. Células tumorais cultivadas em microambientes em 3D expressam diferentes sinais celulares que alteram suas respostas ao meio.	35
Figura 9. Representação esquemática da microplaca de 96 poços no ensaio de citotoxicidade da resazurina	42
Figura 10. Viabilidade celular (%) da linhagem não-tumoral FGH após o tratamento de 24 horas com os complexos de rutênio	59
Figura 11. Viabilidade celular (%) da linhagem não-tumoral PNT-2 após o tratamento de 24 horas com os complexos de rutênio.	60
Figura 12. Viabilidade celular (%) da linhagem tumoral A549 após o tratamento de 24 horas com os complexos de rutênio.	60
Figura 13. Viabilidade celular (%) da linhagem tumoral Caco-2 após o tratamento de 24 horas com os complexos de rutênio.	61
Figura 14. Viabilidade celular (%) da linhagem tumoral DU-145 após o tratamento de 24 horas com os complexos de rutênio.	61

Figura 15. Viabilidade celular (%) da linhagem tumoral HepG2 após o tratamento de 24 horas com os complexos de rutênio.	62
Figura 16. Viabilidade celular (%) da linhagem tumoral MDA-MB-231 após o tratamento de 24 horas com os complexos de rutênio.	62
Figura 17. Viabilidade celular (%) da linhagem tumoral PC-3 após o tratamento de 24 horas com os complexos de rutênio.	63
Figura 18. Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de sobrevivência clonogênica em células DU-145.	68
Figura 19. Efeitos dos complexos na viabilidade de esferoides multicelulares tumorais (EMT) de células DU-145.....	71
Figura 20. Efeito do complexo DP-LP no crescimento de esferoides multicelulares tumorais (EMT) de células DU-145.....	72
Figura 21. Efeito dos complexos DB-LP e DP-LP na possível indução da apoptose em células tumorais de próstata DU-145.....	75
Figura 22. Imagens representativas dos núcleos de células DU-145 duplamente marcadas com Hoechst 33342 e PI.....	77
Figura 23. Efeito do complexo DP-LP sobre a cinética de ciclo celular de células DU-145.....	78
Figura 24. Efeito do complexo DP-LP nos níveis de espécies reativas intracelulares	81
Figura 25. (A) Níveis de ERO após 24 horas de tratamento com complexo DP-LP nas concentrações de 0,5, 1 e 2 μ M na ausência (-) ou na presença (+) do antioxidante NAC (5 mM). (B) Viabilidade celular de células DU-145 avaliadas pelo ensaio de Alamar blue após 24 horas de incubação com diferentes concentrações do complexo DP-LP na ausência (-) ou na presença (+) do antioxidante NAC.	82
Figura 26. (A) Imagens representativas dos tratamentos de 24 horas durante a análise do ensaio do cometa das células DU-145. Aumento de 200x. (B) <i>Tail Intensity</i> (% de DNA na cauda) dos 300 nucleoides avaliados da linhagem tumoral DU-145, após o tratamento com o complexo DP-LP.....	87
Figura 27. Imagem representativa do tratamento com 1,0 μ M do complexo por 24 horas em células DU-145 do ensaio do cometa.	88

Figura 28. (A) Imagens representativas dos tratamentos de 24 horas durante a análise do ensaio do cometa das células PNT-2. Aumento de 200x. (B) <i>Tail Intensity</i> (% de DNA na cauda) dos 300 nucleoides avaliados da linhagem não-tumoral PNT-2, após o tratamento com o complexo DP-LP	90
Figura 29. Imagens representativas de células DU-145 marcadas com Hoechst 33342 (núcleo) e FITC (citoplasma).	94
Figura 30. Espectros de emissão de fluorescência dos complexos BB-LP (A), BP-LP (B), DB-LP (C) e DP-LP (D), na presença de quantidades crescentes de CT-DNA .	98
Figura 31. Mobilidade por eletroforese de DNA do plasmídeo pBR322 com quantidades crescentes de complexos BB-LP e BP-LP (A), e os complexos DB-LP e DP-LP (B), após 18 horas de incubação a 37 ° C.....	100
Figura 32. Espectros de emissão do Hoechst, CT-DNA, contendo diferentes relações molares [complexo]/[CT-DNA].....	101
Figura 33. Gel de eletroforese capilar e número de integridade de RNA (RIN) do RNA total extraído das células DU-145.	103
Figura 34. Expressão das proteínas PARP, PARP-clivada, caspase-3 clivada, caspase-9 clivada, caspase-8 clivada, AURORA-B e do controle endógeno β -actina em células DU-145 analisada por western blot.....	112
Figura 35. Valores obtidos na análise pelo programa Scion Image, referentes às médias dos valores de expressão proteica e seu desvio padrão.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Complexo de Ru-naftoquinonas sintetizados pelo Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).	38
Tabela 2. Média dos valores de log P e da IC ₅₀ (μM) dos complexos de Ru-naftoquinonas, precursores e ligantes nas linhagens celulares tumorais A549, Caco-2, DU-145, HepG2, MDA-MB-231, PC-3 e nas linhagens não-tumorais FGH e PNT-2.	64
Tabela 3. Índices de seletividade dos complexos de Ru-naftoquinonas e da cisplatina calculados pela razão dos valores de IC ₅₀ em células não-tumorais e tumorais.....	66
Tabela 4. Frequência de micronúcleos (MNI) e índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese (CBPI) em cultura de células DU-145 após 24 horas de tratamento com o complexo DP-LP.	93
Tabela 5. Frequência de micronúcleos (MNI) e índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese (CBPI) em cultura de células PNT-2 após 24 horas de tratamento com o complexo DP-LP.....	96
Tabela 6. Quantidade de RNA total dos grupos controle, dos grupos de células tratadas com o complexo DP-LP e razões A ₂₆₀ /A ₂₈₀ e A ₂₆₀ /A ₂₈₀	102
Tabela 7. Efeito do complexo de rutênio DP-LP sobre a expressão gênica de células DU-145.	105

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 O Câncer	17
1.2 Quimioterapia anticâncer	20
1.3 Complexos de Rutênio	24
1.4 Ligantes naftoquinônicos	27
1.5 Busca por novos candidatos anticâncer	32
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Síntese dos complexos	38
3.1.1 Determinação do Coeficiente de Partição ($\log P$)	40
3.2. Linhagens Celulares	40
3.3 Avaliação da viabilidade celular e atividade citotóxica	41
3.3.1 Ensaio redox da resazurina (Alamar blue)	41
3.3.2 Ensaio de sobrevivência clonogênica	43
3.3.3 Inibição do crescimento de esferoides tumorais cultivados em 3D	44
3.4 Avaliação dos mecanismos de morte celular	45
3.4.1 Ensaio de marcação com Anexina V / Iodeto de propídeo	45
3.4.2 Análise da cinética de ciclo celular	46
3.4.3 Determinação dos níveis de espécies reativas intracelulares	46
3.5 Avaliação da instabilidade genômica e interação com o DNA	49
3.5.1 Atividade genotóxica	49
3.5.2 Atividade mutagênica	50
3.5.3 Estudos de interação com o DNA	52
3.6 Análise da expressão transcricional e traducional de genes envolvidos com a atividade antiproliferativa	53
3.7 Análise dos resultados	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 Avaliação da viabilidade celular e atividade citotóxica	59
4.2 Avaliação dos mecanismos de morte celular	74
4.3 Avaliação da instabilidade genômica e interação com o DNA	85
4.4 Análise da expressão transcricional e traducional de genes envolvidos com a atividade antiproliferativa	101
5. CONCLUSÃO	118
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

CAPÍTULO 2

1. PUBLICAÇÕES REFERENTES À TESE	142
2. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA NO PERÍODO DO DOUTORADO	157

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer

O câncer atinge a humanidade desde os tempos pré-históricos, embora sua prevalência tenha aumentado acentuadamente nas últimas décadas. O registro escrito considerado como o primeiro relato da doença aparece em manuscritos egípcios, como no papiro de Edwin Smith, possivelmente escrito por Imhotep, médico-arquiteto egípcio, do ano de 1600 a.C. (FAGUET, 2015). Após o declínio das civilizações egípcia e grega, a medicina romana tornou-se hegemônica, especialmente com Hipócrates, considerado o pai da medicina (460-360 a.C.). Em seus escritos, são retratadas doenças produtoras de massas (“*onkos*”) e nódulos úlcerantes e não cicatrizantes que variavam de processos benignos a malignos (“*karkinos*”) (FAGUET, 2015). No entanto, apenas no início do século 20, a introdução de novas ferramentas científicas permitiu que médicos e pesquisadores explorassem antigas e novas hipóteses sobre a natureza do câncer, levando a um progresso significativo no estudo oncológico (BLACKADAR, 2016).

Hoje, sabe-se que o processo de formação do câncer decorre de mudanças genéticas e epigenéticas que alteram o funcionamento interno da célula e a maneira como ela se relaciona com o meio externo (COOPER, 2000). As células tumorais podem se originar em diferentes tecidos, à medida que crescem e se dividem. Esse crescimento está habilmente regulado por centenas de genes que controlam sua proliferação. No entanto, quando essas células acumulam mutações nos vários genes que regulam o equilíbrio desses processos, dá-se início à carcinogênese (COOPER, 2000). As células tumorais apresentam ainda uma série de características que as diferem das células não-tumorais, como: autossuficiência em

sinais de crescimento, resistência a sinais inibitórios de crescimento, resistência à morte celular, permitindo a imortalidade replicativa e a indução de angiogênese. Essas características permitem o crescimento tumoral e são comuns tanto a tumores benignos quanto malignos. No entanto, somente os tumores malignos possuem a capacidade de invadir novos tecidos e órgãos distantes, promovendo a metástase (YOKOTA, 2000).

O desenvolvimento das várias características tipicamente associadas às células tumorais depende da aquisição de alterações nos seus genomas (HANAHAH; WEINBERG, 2011). As marcas registradas do câncer (Figura 1), descritas por Hanahan & Weinberg (2000), correspondem a essas capacidades funcionais adquiridas pelas células tumorais, que as permitem escapar dos mecanismos de defesa anticâncer existentes no interior das células e dos tecidos e, assim, se sobreporem às células saudáveis.

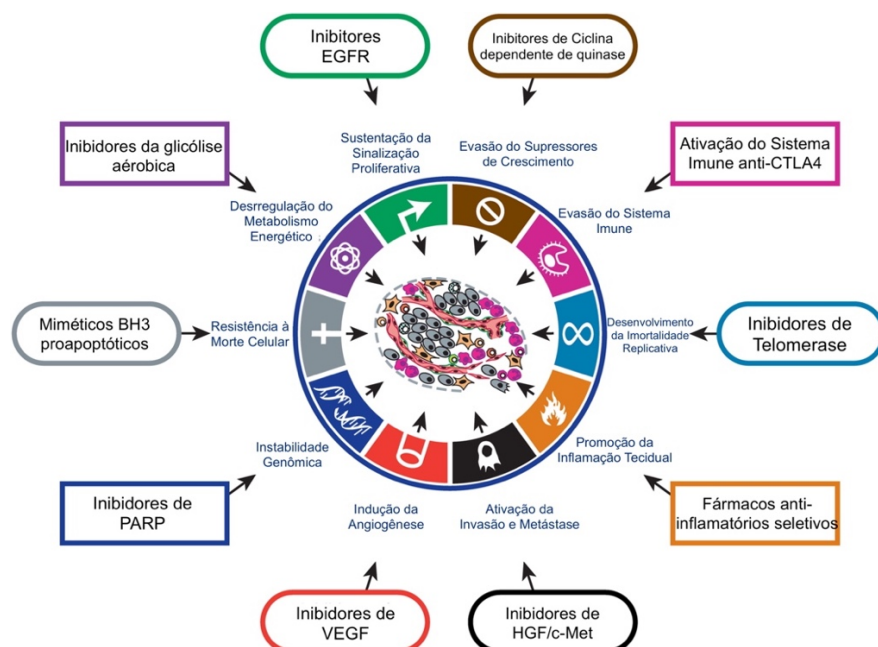


Figura 1. As 10 marcas registradas do câncer e seus possíveis alvos terapêuticos. Adaptado de Hanahan & Weinberg (2011).

A instabilidade genômica está presente na maioria dos cânceres humanos e em todos os seus estádios de desenvolvimento, desde lesões pré-cancerosas até cânceres em fases avançadas (HANAHA; WEINBERG, 2000). De acordo com os resultados da pesquisa do Projeto Genoma do Câncer, a maioria das células tumorais possuem cerca de 60 mutações acumuladas (FORBES et al., 2015). Logo, o câncer pode ser definido como doença genética, ou seja, causada por alterações em genes que controlam a funcionalidade das células, especialmente como elas crescem e se dividem (NCI, 2015; SIEGEL et al., 2016). Devido às suas características malignas e a alta taxa de incidência na população, o câncer é hoje considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial (SIEGEL et al., 2017).

De acordo com o último relatório da IARC, agência da Organização Mundial da Saúde (OMS) de pesquisa sobre o câncer, estima-se que em 2030 pode-se esperar 22 milhões de casos incidentes de câncer e quase 17 milhões de mortes, tornando-se, assim, a principal causa de mortes em todo o mundo (IARC, 2018). A incidência e mortalidade do câncer estão crescendo rapidamente em todo mundo. As razões são complexas, mas refletem o aumento da longevidade e crescimento da população, bem como as mudanças de hábitos associadas ao desenvolvimento econômico (BRAY et al., 2018). No Brasil, o risco de desenvolver a doença até os 75 anos é de cerca de 20%. Ou seja, em média, uma em cada cinco pessoas terá câncer até os 75 anos, excetuando-se os cânceres de pele não-melanoma, que costumam ser excluídos das estatísticas por terem uma alta incidência, mas bom prognóstico (INCA, 2018).

A partir da década de 1960, vários fatores produziram uma rápida transição epidemiológica, expondo cada vez mais a população ao risco de doenças crônicas.

Especificamente no Brasil, aspectos como o aumento da renda, industrialização, mecanização da produção, urbanização, novos estilos de vida, melhor acesso à alimentação em geral, incluindo alimentos processados e globalização de hábitos não saudáveis, favoreceram à exposição da população a fatores de risco que podem aumentar as chances de uma pessoa desenvolver câncer (JEMAL et al., 2010). Como resultado desse processo, no Brasil, o câncer é a segunda causa mais comum de mortes, após doenças cardíacas e cerebrovasculares (BARBOSA et al., 2015). O Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimou para o biênio 2018-2019 a ocorrência de cerca de 600.000 casos novos de câncer no país. Os tipos mais recorrentes são os de próstata nos homens (68.220 casos novos por ano), e os de mama nas mulheres (59.700 casos novos por ano) (INCA, 2018).

Tradicionalmente, a terapia de combate ao câncer tem sido baseada no princípio de que as células tumorais encontram-se frequentemente em divisão, sendo, portanto, mais sensíveis do que as células sadias à interferência na síntese de DNA e mitose. Assim, foram desenvolvidos ao longo dos anos múltiplas classes de agentes antineoplásicos destinados a interferir nas unidades formadoras na síntese do DNA e mitose, ou causar danos no DNA e instabilidade cromossômica, promovendo, portanto, a citotoxicidade e a morte celular programada (apoptose) (GOLAN, 2016).

1.2 Quimioterapia anticâncer

A quimioterapia é a forma de tratamento sistêmico do câncer que usa medicamentos denominados genericamente de quimioterápicos antineoplásicos - sejam eles quimioterápicos propriamente ditos, hormonioterápicos, bioterápicos, imunoterápicos, alvoterápicos - que são administrados continuamente ou a

intervalos regulares, que variam de acordo com os esquemas terapêuticos (LACERDA, 2001). Especificamente no tratamento anticâncer, a quimioterapia possui a capacidade de induzir a apoptose ou de abrandar o ritmo da divisão das células (LUNDQVIST et al., 2015). Ela é possivelmente a terapia oncológica que pode ser mais explorada, na medida em que podem ser testadas as capacidades de indução de morte celular de inúmeros compostos.

Atualmente, mais de 100 medicamentos são utilizados na quimioterapia de tratamento do câncer, seja isoladamente ou em combinação com outros fármacos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). No Sistema Único de Saúde (SUS) a área de oncologia é estruturada para atender de forma integral e integrada os pacientes que necessitam de tratamento. Logo, os hospitais oncológicos habilitados na alta complexidade em oncologia no SUS são os responsáveis pelo fornecimento de medicamentos antineoplásicos que eles, livremente, padronizam, adquirem e fornecem aos pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Os antineoplásicos podem ser classificados de acordo com suas diferentes atividades farmacológicas, sendo estes: (1) agentes alquilantes, que atuam por meio da formação de ligações covalentes com o DNA, impedindo sua replicação; (2) antimetabólicos, que interferem nas vias metabólicas envolvidas na síntese do DNA; (3) antagonistas de hormônios, que inibem o crescimento de células responsivas à esteroides; (4) imunoterápicos, que auxiliam o sistema imunológico a identificar e combater células tumorais; (5) inibidores mitóticos, que levam à paralisação da divisão celular; (6) inibidores de quinases, que impedem a proliferação e (7) agentes alvo-dirigidos, que atuam em receptores ou proteínas citoplasmáticas relacionadas com vias de proliferação ou sobrevivência celular (ESPINOSA et al., 2003; GOLAN, 2016).

Dentre as diversas opções quimioterapêuticas, o composto inorgânico *cis*-[diaminodicloroplatina(II)], denominado como cisplatina, é um dos fármacos citotóxicos mais utilizados devido à sua eficácia no tratamento de vários tipos de câncer (ALDOSSARY, 2019; DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014). A cisplatina foi o primeiro complexo de platina aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1978 para o tratamento do câncer e, junto com a carboplatina e oxaliplatina, representam os principais metalofármacos baseados em platina utilizados no tratamento do câncer (KELLAND, 2007).

A interação que complexos de platina possuem com o DNA, leva a distorção da molécula e consequentemente 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 2) (KELLAND, 2007; SIKOV, 2015).

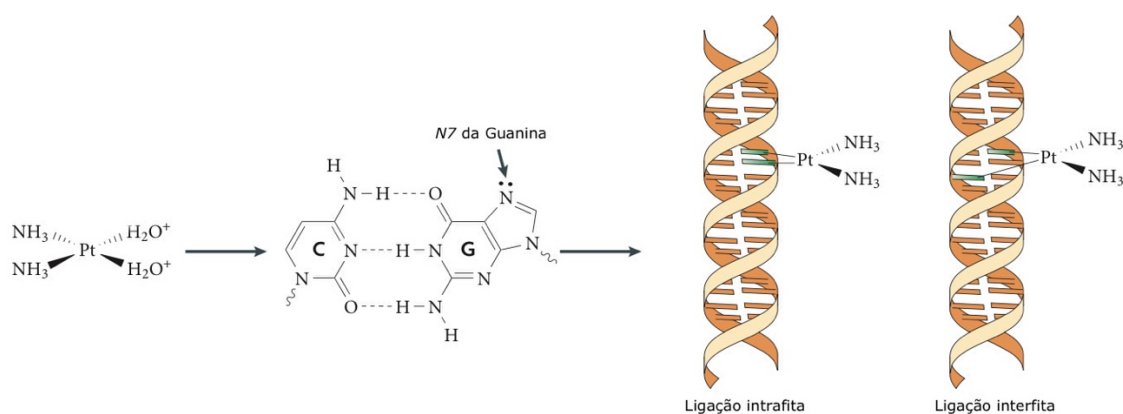


Figura 2. Principais adutos formados por meio da interação do cisplatina com o DNA. A molécula hidrolisada pode causar interação 1,2-intrafita ou 1,3-interfita. Adaptado de Kelland, 2007.

Contudo, sua inespecificidade dá-se por afetar as células em todas as fases do ciclo celular (INCA, 2016; VAN RIJT; SADLER, 2009). A resistência tumoral é uma limitação importante do tratamento medicamentoso à base de platina. A

resistência adquirida a esses fármacos pode ocorrer por meio de três mecanismos principais: aumento de sua degradação e desativação antes que ele atinja o DNA nuclear, diminuição de sua captação pelas células tumorais e aumento da proficiência do sistema de reparo de DNA dessas células (AMABLE, 2016).

Todos os medicamentos à base de platina, exibem uma série de efeitos adversos graves devido à sua baixa seletividade pelo tecido canceroso sobre o tecido normal. A baixa seletividade apresentada é devida aos altos requerimentos nutricionais das células em proliferação. Logo, enquanto esses fármacos são absorvidos pelas células tumorais de crescimento rápido, elas também são absorvidas em outros tecidos que estão crescendo rapidamente, como as membranas mucosas da boca, garganta, estômago e intestinos, o que leva à toxicidade gastrointestinal. Além disso, a medula óssea é afetada, o que pode resultar na redução da produção de glóbulos brancos e vermelhos, bem como os folículos capilares e pilosos, o que significa que o tratamento com esses fármacos pode resultar em alopecia e ototoxicidade (OUN et al., 2018).

Na busca por fármacos mais seletivos, outros centros metálicos em substituição à platina têm atraído o interesse dos 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 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 mais seguros (ALLARDYCE; DYSON, 2016).

1.3 Complexos de Rutênio

O rutênio (Ru) tem recebido destaque como centro metálico de novos complexos anticâncer devido as suas propriedades químicas. Sua variedade de estados de oxidação e estabilidade com diversos ligantes, tem atraído o interesse na busca de novos metalofármacos. O centro metálico é predominantemente hexacoordenado, de geometria octaédrica, o que permite a formação de uma enorme gama de complexos, cujo potencial redox pode ser modificado com a variação de seus ligantes e, com isso, ser modulado a fim de se atingir a eficácia desejada em potenciais novos medicamentos (ALLARDYCE; DYSON, 2001; BRABEC; KASPARKOVA, 2018).

Esse elemento possui baixa toxicidade quando comparado com outros metais, como a platina. Além disso, sua capacidade de mimetizar o ferro na ligação com proteínas plasmáticas 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 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* reportaram o aumento de 2 a 12 vezes na concentração de rutênio em células tumorais em comparação com as células não-tumorais (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 das 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 3). Essas características tornam os complexos de Ru bem aceitos para a aplicação medicinal.

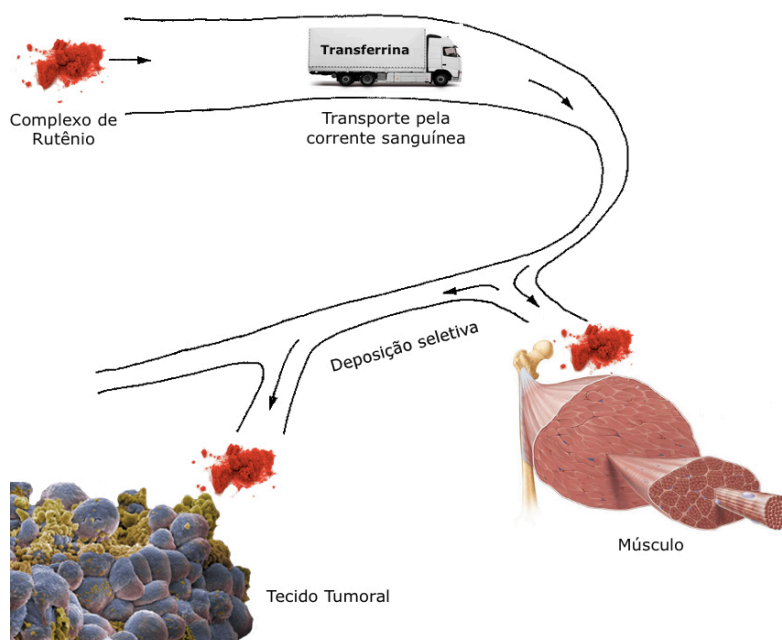


Figura 3. Distribuição seletiva preferencial de íons de rutênio por meio da transferrina. Adaptado de Sava et al. (1990).

Ao longo dos últimos anos, alguns complexos de Ru destacaram-se por apresentar significativas propriedades antitumorais e antimetastáticas (ALLARDYCE; DYSON, 2001; ZORZET et al., 2000). Por exemplo, alguns complexos de Ru como NAMI-A (*trans*-[RuCl₄(1H-imidazol)(DMSO-S)]), KP1019 (*trans*-[RuCl₄(1H-in-dazole)₂]) e RAPTA-C (Ru(η⁶-C₆H₅Me)(pta)Cl₂) (Figura 4) apresentaram resultados satisfatórios em ensaios pré-clínicos e clínicos de fase I ou II.

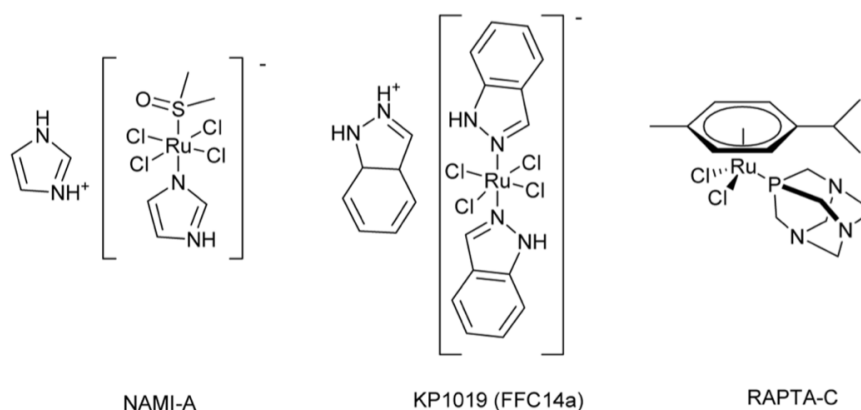


Figura 4. Fórmulas estruturais dos complexos de rutênio NAMI-A, KP1019 e RAPTA-C. (OTT; GUST, 2007).

O NAMI-A (acrônimo de *New Antitumor Metastasis Inhibitor*) foi primeiro complexo de Ru a entrar em ensaios clínicos. Esse complexo apresenta baixa citotoxicidade *in vitro*, no entanto, estudos *in vivo* evidenciaram seu potencial antitumoral. Sua principal característica é afetar a mobilidade das células tumorais, demonstrando, portanto, atividade antimetastática. Seu mecanismo de ação ainda não é conhecido, mas estudos têm indicado a capacidade do complexo em modificar a espessura da matriz extracelular e os processos de angiogênese, impedindo que as células tumorais invadam tecidos vizinhos e os vasos sanguíneos (RADEMAKER-LAKHAI et al., 2004). O NAMI-A completou em 2014 a fase II dos testes clínicos no Instituto de Câncer da Holanda (LEIJEN et al., 2015).

O complexo KP1019 apresentou em estudos pré-clínicos, promissora atividade contra tumores colorretais resistentes à quimioterapia padrão. Seu mecanismo de ação mostra-se semelhante ao do cisplatina, ou seja, interage com o DNA desestabilizando-o; no entanto, com menor intensidade que a do derivado de platina. Esse complexo é considerado um pró-fármaco, uma vez que inibe o crescimento tumoral após ativação por redução do seu centro metálico de Ru(III) para Ru(II), dadas as condições de hipóxia do tumor. Estudos farmacocinéticos em

humanos apresentaram resultados semelhantes daqueles verificados para o NAMI-A, ou seja, respostas satisfatórias em termos de ligação com proteínas plasmáticas e de eliminação (BERGAMO et al., 2015).

O RAPTA-C é um complexo de Ru(II) do tipo “*piano stool*”, ou seja, possui estrutura similar a um banco de piano, com a presença do ligante PTA (1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano). Esse ligante permite a ativação do complexo em ambiente hipóxico, o mesmo encontrado nos tumores sólidos. O complexo apresenta elevada seletividade para células tumorais e propriedades antimetastáticas promissoras. Estudos pré-clínicos demonstraram sua capacidade de modular o citoesqueleto celular diminuindo a capacidade das células invadirem e migrarem para outros tecidos (LEE et al., 2017).

Outros estudos apontam uma variedade de complexos de Ru com promissora atividade antitumoral, apresentando mecanismos de intercalação com o DNA (RAMADEVI et al., 2015), como inibidores das DNA-topoisomerasas I e II (He et al., 2015), inibidores da viabilidade de células tumorais *in vitro* (VIJAYAN et al., 2014) e também, atividade antitumoral *in vivo* (WEISS et al., 2014). Esses resultados provêm do desenho de complexos com variados ligantes que conferem à estrutura uma química bastante diversificada. A diversidade dos ligantes é fundamental para que esses complexos atinjam múltiplos alvos biológicos e, assim, superem as limitações das terapias existentes. Uma abordagem para moléculas multialvo é a combinação de ligantes bioativos com propriedades antitumorais comprovadas, como os derivados de quinonas.

1.4 Ligantes naftoquinônicos

As quinonas são um grupo de substâncias orgânicas consideradas pelo *U.S National Cancer Institute* (NCI) como uma classe importante, biologicamente validada, para o desenvolvimento de novas moléculas com atividade antitumoral (MARX et al., 2003). Muitos medicamentos anticâncer, indispensáveis clinicamente, possuem uma porção quinona em sua molécula. As antraciclinas (doxorubicina, daunorubicina e mitoxantrona), mitomicina-c e bleomicina, são alguns exemplos de fármacos chave na quimioterapia para tratamento de muitas neoplasias malignas (AVENDAÑO; MENÉNDEZ, 2008). Os efeitos citotóxicos das quinonas estão relacionados com diferentes mecanismos, tais como: intercalação e indução de quebras do DNA, inibição das enzimas topoisomerases e geração de radicais livres (KUBANIK et al., 2016).

As quinonas podem ser divididas em três grupos em razão de diferenças em suas estruturas moleculares, tomando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinônico. Assim, têm-se: as benzoquinonas – um anel benzênico, as naftoquinonas – um anel naftalênico e as antraquinonas – um anel antracênico, como mostrado na Figura 5.

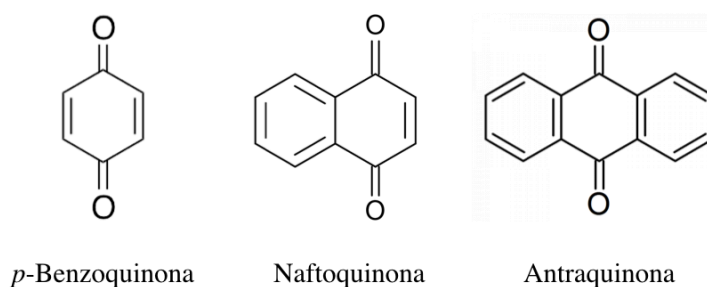


Figura 5. Fórmulas estruturais dos principais grupos de quinonas. Fonte: PubChem Compound.

Um grupo representativo de compostos quinônicos naturais, amplamente encontrados em plantas, fungos e bactérias, são as 1,4-naftoquinonas. Tais

naftoquinonas, como lapachol e lausona, têm apresentado efeitos farmacológicos promissores em linhagens celulares tumorais (EPIFANO et al., 2014; ORAMAS-ROYO et al., 2013). O lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona) é uma alquil naftoquinona que ocorre em várias espécies de plantas da família Bignoniaceae, com destaque para o Ipê-roxo, também conhecido como 'Pau d'Aco' (Figura 6) (HUSSAIN; GREEN, 2017). Esse composto foi isolado pela primeira vez em 1882 pelo químico italiano Emanuele Paterno da espécie *Tabebuia avellanedae* Lor (Bignoniaceae) e posteriormente encontrado em vários outros gêneros pertencentes às famílias Plumbaginaceae, Verbenaceae, Caesalpiniaceae e Proteaceae (EPIFANO et al., 2014). O extrato do Ipê-roxo é utilizado por populações do interior do Brasil devido as suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antiparasitárias (GÓMEZ CASTELLANOS et al., 2009). O lapachol é, de fato, uma naftoquinona com estabelecida atividade antimicrobiana (SOUZA et al., 2013), antifúngica (MEDEIROS et al., 2010), antimalárica (BRANDÃO et al., 2018), antileishmanial (COSTA et al., 2017), anti-inflamatória (LIRA et al., 2008) e anticâncer (HUSSAIN; GREEN, 2017; HUSSAIN et al., 2007).

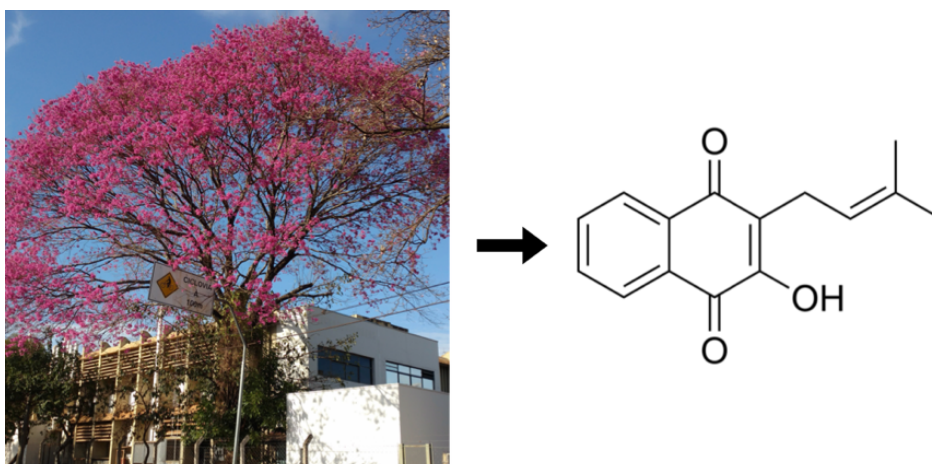


Figura 6. Ipê-roxo do Instituto de Química de Araraquara - UNESP e a fórmula estrutural do lapachol. Foto: José Luiz da Silva, 2018.

Os primeiros relatos anticâncer do lapachol foram reportados em 1968, em que esse composto apresentou efeitos promissores contra tumores murinos, fomentando, inclusive, estudos clínicos em humanos (ALMEIDA, 2009). No entanto, em 1974, o NCI descontinuou os ensaios devido à falta de atividade significativa mesmo em grandes doses orais (ARAÚJO et al., 2002; BLOCK et al., 1974). Apesar disso, o lapachol foi utilizado isoladamente em um pequeno estudo com 9 pacientes portadores de câncer, no qual o tratamento foi capaz de reduzir o tamanho dos tumores e a sensação de dor, além de alcançar a remissão completa do câncer em 3 desses pacientes (HUSSAIN; GREEN, 2017). Acredita-se que a atividade antitumoral do lapachol está relacionada com a interação do anel naftoquinônico com os ácidos nucleicos, o que leva à inibição da replicação do DNA (HUSSAIN et al., 2007). Devido a sua atividade antiproliferativa, o lapachol é um candidato de destaque para estudos de modificação estrutural e para o uso como ligante em complexos metálicos, promovendo, assim, novos compostos com atividade aprimorada. Recentemente, (OLIVEIRA et al., 2017a) reportaram a síntese de complexos metálicos de rutênio contendo lapachol, sendo observados resultados animadores, sugerindo que o uso do rutênio é relevante para melhorar a atividade do lapachol.

A lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) (Figura 7) é o principal constituinte da Henna, uma planta intrinsecamente ligada às culturas antigas do norte da África e da Ásia (BADONI et al., 2014). Seu extrato de cor intensa é utilizado para fins cosméticos e medicinais, sendo destacadas suas propriedades antifúngicas, antibacterianas, antiparasitárias e anticâncer (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2018). O extrato aquoso das folhas da Henna foi capaz de regredir tumores induzidos por potentes carcinógenos em ratos, bem como a administração oral do

mesmo promoveu efeitos supressores em tumores sólidos de Ehrlich em camundongos (RAJA et al., 2009; ZUMRUTDAL; OZASLAN, 2012). Diferentes tipos de extratos das folhas da Henna também apresentam citotoxicidade para uma série de linhagens celulares humanas como, carcinoma de cólon (Colo-205 e Caco-2), carcinoma hepatocelular (HepG2) e leucemia mielóide (HL60) (SINGH; LUQMAN, 2014). Esses estudos indicam que a atividade antiproliferativa dos extratos deve-se à lausona, seu componente majoritário.

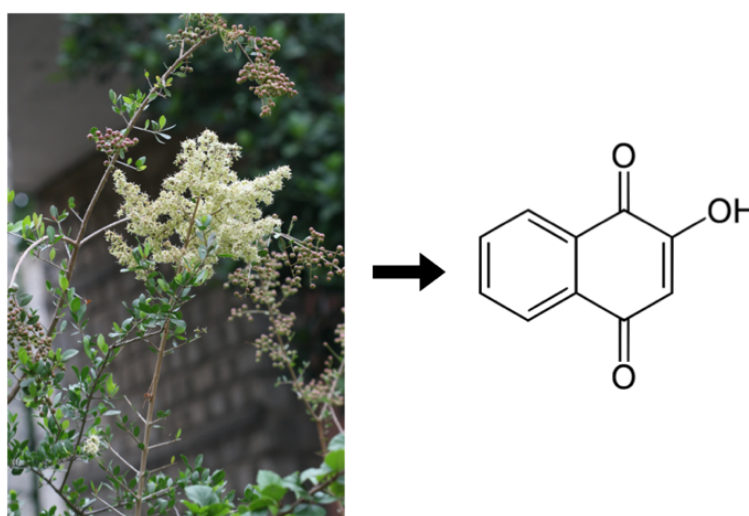


Figura 7. Henna e a fórmula estrutural da lausona. Foto: Herbarium of Indian Institute of Science, 2015.

Um dos principais mecanismos que confere à lausona essa atividade é sua capacidade de inibir a enzima DNA-topoisomerase II (COELHO-CERQUEIRA et al., 2014) e gerar radicais semiquinona que podem formar espécies reativas de oxigênio (ERO) no ambiente intracelular (CASTRO et al., 2008). Tem se observado que quinonas são eficientes geradoras de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), entre outras formas de ERO (OURIQUE et al., 2015; RAJENDRAN, 2015) que podem causar danos oxidativos nas bases do DNA. No entanto, os derivados de naftoquinonas, lapachol e lausona apresentam resultados ainda pouco claros sobre sua atividade genotóxica (COELHO-CERQUEIRA et al., 2014). O grupo hidroxila vizinho à carbonila permite

que o lapachol e a lausona sejam capazes de se ligar potencialmente a íons metálicos em diferentes estados de oxidação, coordenando metais de uma forma bidentada, o que lhes permite desempenhar um papel essencial em sistemas biológicos (PRADHAN et al., 2012). De fato, alguns complexos metálicos contendo essas naftoquinonas como ligantes têm apresentado atividade biológica promissora contra linhagens tumorais (OLIVEIRA et al., 2017b; ORAMAS-ROYO et al., 2013). Estudos de Spoerlein-Guettler et al. (2014) apresentaram a síntese de complexos de Ru(II) com plumbagina, uma naftoquinona extraída de plantas do gênero *Plumbago*, que se mostraram eficazes em células tumorais resistentes a cisplatina. Recentemente, Kosiha et al. (2017) apresentaram novos complexos de Cobre(II), Zinco(II), Níquel(II) e Cobalto(II) contendo naftoquinonas, que induziram a morte de células tumorais, por meio de mecanismos envolvendo estresse oxidativo e clivagem do DNA.

1.5 Busca por novos candidatos anticâncer

À medida que o câncer se torna uma doença mais recorrente na população, a demanda por novas terapias aumenta. Nas últimas décadas, grandes investimentos foram feitos na pesquisa e desenvolvimento (P&D) de medicamentos oncológicos (AVORN, 2015). Entretanto, em comparação com outras classes de medicamentos, os candidatos anticâncer apresentam mais falhas quando chegam aos estágios finais dos estudos clínicos, o que torna o investimento bastante dispendioso (DIMASI; GRABOWSKI, 2007). Uma das razões que justificam esses desacertos é a de que os estudos pré-clínicos carecem de eficiência quando se trata de identificar compostos que podem alterar os estágios de desenvolvimento e progressão do câncer (OCANA et al., 2011).

Geralmente, os estudos de triagem pré-clínica para agentes anticâncer envolvem a identificação de compostos citotóxicos em linhagens celulares imortalizadas cultivadas em monocamada. De fato, a P&D de fármacos anticâncer tem se focado em agentes citotóxicos. O NCI desenvolveu no final nos anos 80 um painel de *screening in vitro* para fármacos anticâncer contendo 60 linhagens celulares tumorais humanas (NCI60), destinado a substituir o uso de tumores animais transplantáveis, até então muito utilizado (SHOEMAKER, 2006). Esse *screening* atualmente utiliza 60 linhagens tumorais diferentes, derivadas de cânceres de pulmão, cólon, sistema nervoso central, ovário, mama, próstata e rim, além de leucemia e melanoma (NCI, 2015). Esse painel contribuiu significativamente para a descoberta de novos agentes antitumorais como o bortezomibe aprovado pelo FDA em 2003 (SHOEMAKER, 2006), e o mesilato de eribulina, aprovado em 2010 para o tratamento do câncer de mama (CORTES et al., 2011). Em vista disso, a avaliação da citotoxicidade *in vitro* mostra-se uma ferramenta importante para a seleção de novas moléculas que interagem com alvos celulares tumorais específicos. No entanto, sabe-se que as respostas celulares baseadas em culturas convencionais, em duas-dimensões (2D), não podem reproduzir as funções teciduais *in vivo*, particularmente nos microambientes heterotípicos de tumores sólidos (LABARBERA et al., 2012).

A cultura de células convencional ocorre em superfícies tratadas de poliestireno que permitem a adesão celular ao substrato plástico. Essa configuração representa inadequadamente o complexo ambiente fisiológico em três-dimensões (3D), em que as células interagem umas com as outras e com a matriz extracelular (MEC) (EDMONDSON et al., 2014). Portanto, os sistemas convencionais não reproduzem a heterogeneidade dos tumores *in vivo*, e, como consequência, as

culturas em monocamadas podem perder a capacidade de responder aos fármacos anticâncer de maneira relevante (FANG; EGLIN, 2017). Uma abordagem promissora para lidar com altas taxas de falhas dos estudos pré-clínicos é o desenvolvimento de culturas de células em 3D, que refletem com maior fidelidade o comportamento celular em tecidos vivos (ANTONI et al., 2015).

A formação de esferoides celulares tumorais em 3D possibilita a reprodução de muitas características fisiologicamente relevantes dos tumores *in vivo*, incluindo os processos de interações célula-célula e MEC-célula, hipóxia e necrose central do tumor (LAMHAMED-CHERRADI et al., 2014). Além da resistência celular aos fármacos, as culturas de esferoides em 3D podem ajudar a prever a penetração dos agentes, que é uma importante causa de resistência em tumores, frequentemente negligenciada nos estudos pré-clínicos (VERJANS et al., 2018).

A importância do uso de modelos tumorais em 3D foi destacada por um estudo de Tung et al. (2011), em que os autores observaram respostas distintas dos fármacos anticâncer, 5-fluorouracil (5-FU) e tirapazamina, nos diferentes modelos de cultura de células de carcinoma epitelial humano (A-431). Os esferoides 3D das células A-431 mostraram-se viáveis mesmo após o tratamento com 5-FLU, que é um fármaco bem caracterizado por inibir a proliferação celular, enquanto as células cultivadas em 2D não sobreviveram após o tratamento. Esse resultado decorre do fato de que as culturas de células cultivadas em monocamadas proliferam-se a uma taxa relativamente uniforme aderidas ao substrato plástico, favorecendo a captação e a ação da 5-FLU. Por outro lado, os esferoides têm uma menor taxa de proliferação, tornando-os menos suscetíveis ao efeito genotóxico do quimioterápico. Em paralelo, observou-se que a tirapazamina foi extremamente eficiente em impedir o crescimento dos esferoides, ao passo que ela apresentou pouca atividade nas

células cultivadas em modelo convencional. Esse efeito deve-se ao mecanismo de ação desse pro-fármaco que é ativado em baixos níveis de oxigênio. Os esferoides exibem regiões de hipóxia no seu interior (Figura 8), tal como ocorre em tumores sólidos *in vivo*, onde a tirapazamina pode ser ativada e desempenhar sua atividade citotóxica.

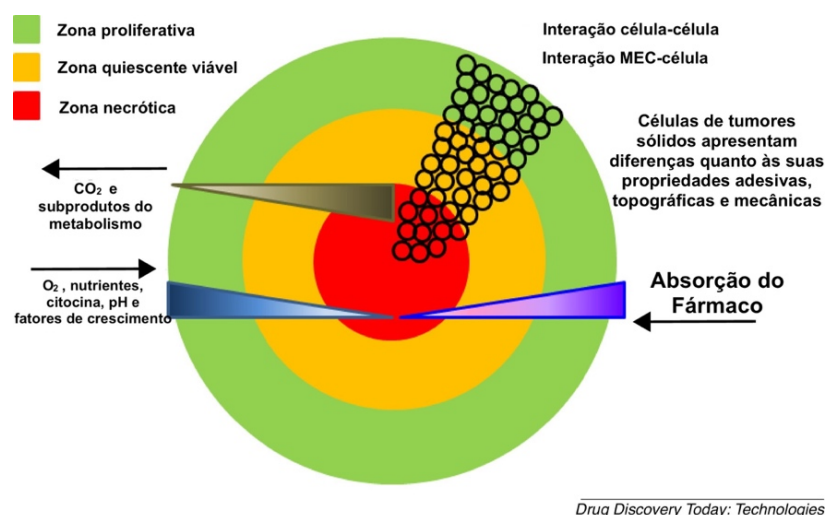


Figura 8. Células tumorais cultivadas em microambientes em 3D expressam diferentes sinais celulares que alteram suas respostas ao meio. Adaptado de Sant & Johnston (2017).

As repostas dos fármacos às células cultivadas em 2D ou 3D não estão somente relacionadas com as zonas diferenciais de proliferação ou disponibilidade de oxigênio. Vários estudos relatam diferenças significativas nos perfis de expressão de genes e proteínas, no metabolismo, e na comunicação celular entre os dois modelos (EDMONDSON et al., 2014; LUCKERT et al., 2016; VANTANGOLI et al., 2016). De fato, o uso de esferoides multicelulares tumorais tem representado um excelente modelo *in vitro* para *screening* de novos fármacos anticâncer, por permitir um estudo mais acurado sobre interações com proteínas, sinalização celular e expressão gênica (THEODORAKI et al., 2015).

Uma estratégia explorada por nosso grupo de pesquisa que contribui para o rastreio de novos candidatos anticâncer, consiste no uso de compostos com

atividade biológica conhecida e que possam ser combinados por meio da coordenação com metais, a fim de atingir múltiplos alvos biológicos da célula tumoral. Neste sentido, a complexação de ligantes com propriedades anticâncer ao metal rutênio pode favorecer a atividade do complexo formado, além de reduzir seus efeitos colaterais indesejados. Isto posto, nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa em parceria com o Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos da Universidade Federal de São Carlos (LERCI/UFSCAr), encontrou uma série de complexos fosfínicos e bipyridínicos, com resultados bastante satisfatórios contra uma série de doenças e, em especial, contra o câncer (CUNHA et al., 2018; DE CAMARGO et al., 2016; DE GRANDIS et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017a; PIRES et al., 2018). A atividade de alguns compostos foi mais de 100 vezes superior à cisplatina para algumas linhagens tumorais humanas, demonstrando atuar por diferentes mecanismos de ação. Diante desses resultados, buscamos neste trabalho, caracterizar as atividades citotóxicas, genotóxicas e os possíveis mecanismos de resposta antiproliferativa de novos complexos de rutênio contendo ligantes fosfínicos, bipyridínicos e os ligantes lapachol e lausona, a fim de definir seu potencial como candidatos à terapia anticâncer.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo estimar a atividade citotóxica e antiproliferativa, caracterizar os mecanismos de morte celular e os efeitos de interação com o DNA de novos complexos de rutênio contendo ligantes naftoquinônicos em modelos celulares tumorais convencionais e em 3D.

2.2 Objetivos específicos

- 1 - Estimar a atividade antiproliferativa dos complexos e seleção dos candidatos com propriedades citotóxicas promissoras em diferentes linhagens celulares tumorais;
- 2 – Determinar a atividade dos complexos sobre a viabilidade celular de esferoides multicelulares tumorais 3D;
- 3 – Caracterizar os mecanismos de morte celular (apoptose/necrose) das células sensíveis aos complexos;
- 4 - Avaliar a cinética de ciclo celular após o tratamento com os complexos;
- 5 – Quantificar as espécies reativas intracelulares induzidas pelos complexos;
- 5 – Investigar a atividade genotóxica induzida pelos tratamentos;
- 6 – Determinar a atividade mutagênica dos complexos com demonstrado potencial genotóxico.
- 7 – Determinar os mecanismos de interação dos complexos com o DNA;
- 8 – Elucidar o perfil de expressão de genes envolvidos com a progressão do câncer, em nível de mRNA, por meio da técnica de RT2 Profiler PCR™ Array.
- 9 – Determinar a expressão de proteínas envolvidas em vias de proliferação celular por meio da técnica de *Western blotting*.

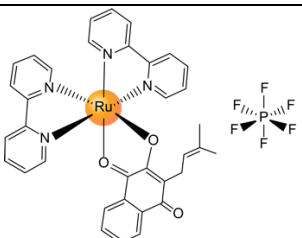
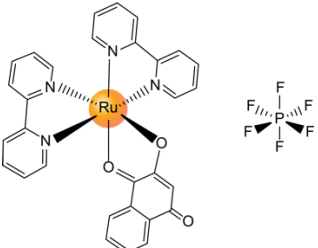
3. MATERIAL E MÉTODOS

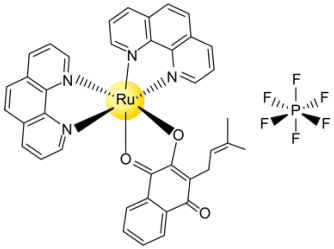
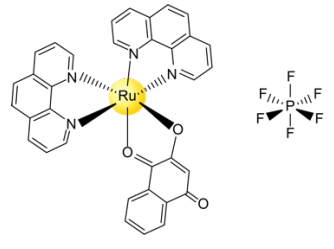
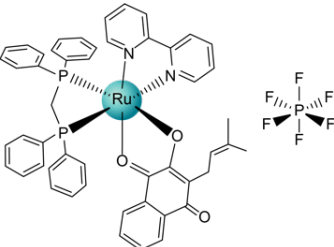
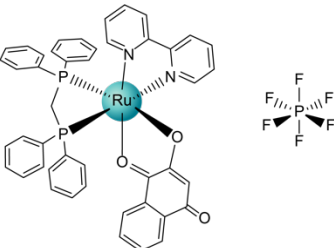
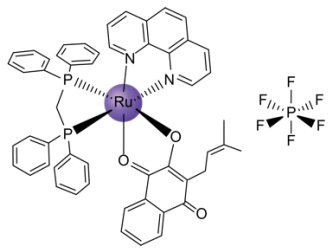
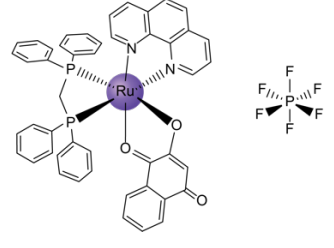
3.1 Síntese dos complexos

Os complexos de Ru contendo os ligantes naturais lapachol e lausona foram sintetizados e caracterizados no LERCI/UFSCar sob supervisão do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista. Foram obtidas duas séries de complexos de rutênio contendo como ligantes difenilfosfinometano, piridina, fenantrolina e naftoquinonas de acordo com a Tabela 1.

- Série 1: Complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{L})(\text{N-N})_2]\text{PF}_6$ (N-N = 2,2-bipiridina ou 1,10-fenantrolina; L = lapachol ou lausona);
- Série 2: Complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{L})(\text{dppm})(\text{N-N})]\text{PF}_6$ (N-N = 2,2-bipiridina ou 1,10-fenantrolina; L = lapachol ou lausona).

Tabela 1. Complexo de Ru-naftoquinonas sintetizados pelo Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos da Universidade Federal de São Carlos.

Fórmula estrutural	Formula molecular	Acrônimo
	$[\text{Ru}(\text{lap})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$	BB-LP
	$[\text{Ru}(\text{law})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$	BB-LW

	$[\text{Ru}(\text{lap})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$	BP-LP
	$[\text{Ru}(\text{law})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$	BP-LW
	$[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	DB-LP
	$[\text{Ru}(\text{law})(\text{dppm})(\text{bipy})]\text{PF}_6$	DB-LW
	$[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppm})(\text{phen})]\text{PF}_6$	DP-LP
	$[\text{Ru}(\text{law})(\text{dppm})(\text{phen})]\text{PF}_6$	DP-LW

Os procedimentos de síntese e os ensaios de caracterização dos complexos contendo o ligante lausona estão descritos na publicação de De Grandis et al. (2019). Os complexos que contém o ligante lapachol possuem rota de síntese semelhante, entretanto, esses dados ainda não foram publicados.

3.1.1 Determinação do Coeficiente de Partição ($\log P$)

Os coeficientes de partição octanol-água foram determinados usando o método shake flask (BAKA et al., 2008). Cada composto foi testado em uma mistura de volumes iguais (750 μL) de água e (750 μL) *n*-octanol, com agitação contínua durante 24 horas a 112 g a 37 °C. Em seguida as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 10 g e as fases orgânicas e aquosas foram separadas. A concentração do composto foi determinada na fase orgânica (*n*-octanol) por espectrofotometria de UV/Vis utilizando uma curva de calibração preparada para o composto em *n*-octanol. Os valores de $\log P$ foram calculados utilizando a equação:

$$\log P = \log [\text{composto}](n\text{-octanol})/[\text{composto}](\text{água}).$$

A concentração na fase aquosa é encontrada por meio da subtração da concentração inicial pela concentração na fase orgânica. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2. Linhagens Celulares

Para a realização da triagem *in vitro* foram selecionadas as linhagens celulares humanas derivadas de carcinoma pulmonar (A549, ATCC® CCL-185™), adenocarcinoma colorretal (Caco-2, BCRJ 0059), carcinoma da próstata (DU-145, ATCC® HTB-81™), carcinoma hepatocelular (HepG2, ATCC® HB-8065™), adenocarcinoma da próstata (PC-3, ATCC® CRL-1435™), adenocarcinoma de mama

(MDA-MB-231, ATCC® HTB-26™), fibroblastos normais de gengiva (FGH, BCRJ 0089) e epitélio normal de próstata (PNT-2, BCRJ 0366). As células A549, Caco-2, DU-145, FGH, HepG2 e MDA-MB-231 foram cultivadas em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e as células PC-3 e PNT-2 foram cultivadas em meio de cultura do Instituto Roswell Park Memorial (RPMI 1640). Ambos os meios foram suplementados de acordo com as necessidades de cada linhagem, conforme recomendado pelos seus bancos com, L-glutamina 2 mM, 10% ou 20% de soro fetal bovino (SFB), 1% de solução antimicótica-antibiótica (10000 unidades/mL penicilina, 10000 µg/mL estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B), 4,5 g/L de glicose e 3,7 g/L de NaHCO₃. Todas as linhagens celulares foram manipuladas em capela de fluxo laminar classe II tipo A1 (Veco®, Campinas, Brasil) e mantidas em estufa Forma Series II, Water Jacket CO₂ Incubator (ThermoFisher Scientific - Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) com 5% de CO₂ a 37 °C e 95% de umidade, de acordo com os procedimentos para manutenção de linhagens celulares propostos por Bal-Price & Coecke, (2011). Os experimentos foram conduzidos entre a terceira e a oitava passagem, após o descongelamento, com subcultivos a cada 3-4 dias para manter o seu crescimento exponencial. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de exclusão por azul de tripan e apenas as culturas com viabilidade superior ou igual a 90% foram utilizadas nos experimentos.

3.3 Avaliação da viabilidade celular e atividade citotóxica

3.3.1 Ensaio redox da resazurina (Alamar blue)

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

metabolismo celular de acordo com o protocolo de Page et al. (1993). As células A549, Caco-2, DU-145, FGH, HepG2, MDA-MB-23, PC-3 e PNT-2 foram semeadas em microplacas de 96 poços obtendo uma concentração celular de $1,5 \times 10^4$ células/poço, e incubadas sob as condições padronizadas de cultivo (5% de CO₂ a 37 °C e 95% de umidade), durante 24 horas para permitir a aderência celular. Para o tratamento, foram preparadas soluções dos complexos, precursores, ligantes e de fármacos referência, cisplatina (Fauldcispla®, Libbs) e doxorrubicina (Fauldoxo®, Libbs), de forma que pôde-se realizar nove diluições na microplaca, a fim de se obter concentrações de 0,391 a 100 µM. As células também foram tratadas com dimetilsulfóxido (DMSO 0,1% (v/v)) para controle do solvente dos complexos e metilmetanosulfonato (MMS, 300 µM) para o controle positivo. As células sem qualquer tratamento foram utilizadas para controle negativo dos experimentos. Novamente as células foram incubadas por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi removido e, logo em seguida, foram adicionados 50 µL de cloridrato de resazurina 0,01% (m/v). As placas foram novamente incubadas entre 2 a 4 horas, de acordo com a linhagem celular (Figura 9).

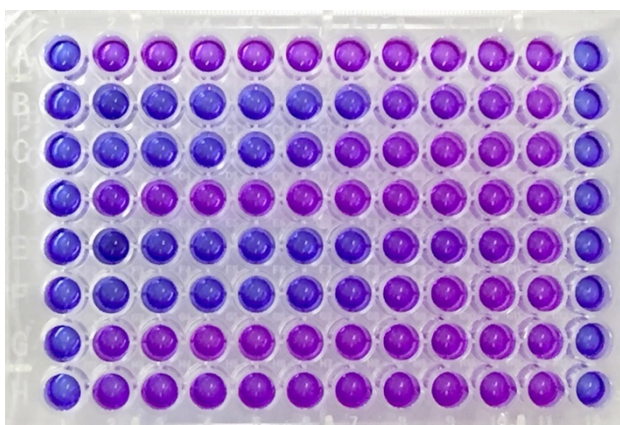


Figura 9. Representação esquemática da microplaca de 96 poços no ensaio de citotoxicidade da resazurina. Os poços em azul apresentam a cor característica da resazurina, a qual não foi reduzida, ou seja, as células apresentam-se inviáveis, enquanto que os poços em lilás representam a resorufina, forma reduzida, indicando viabilidade celular. Fonte: Rone A. De Grandis, 2016.

Em seguida, procedeu-se a leitura da fluorescência em um espectrofluorímetro CaryEclipse (Agilent Technologies - Santa Clara, EUA) nos comprimentos de excitação e emissão de 560 e 590 nm, respectivamente. A concentração requerida do composto capaz de inibir 50% do crescimento celular (IC_{50}) foi determinada pelo software CompuSyn 1.0 (Paramus, NJ, EUA) por análise de regressão não-linear dos resultados de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata

O índice de seletividade (IS) dos complexos foi calculado a partir da razão dos valores de IC_{50} encontrado para as células não-tumorais (FGH e PNT-2) sobre a IC_{50} das células tumorais de acordo com Luo et al., (2017). Quanto maior o valor do IS, o agente analisado é mais ativo contra a linhagem tumoral e menos citotóxico para a linhagem não-tumoral.

3.3.2 Ensaio de sobrevivência clonogênica

O ensaio clonogênico foi realizado de acordo com as diretrizes de Franken et al. (2006) com a finalidade de se confirmar os efeitos antiproliferativo dos complexos. As células DU-145 (1×10^6 células/poço) foram inseridas em placas de 6 poços e, após a adesão, foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações dos complexos DB-LW, DB-LP, DP-LW e DP-LP, variando de 0,125 a 1 μ M. O controle negativo recebeu o veículo (DMSO 0,1% (v/v)), o controle positivo foi constituído por metilmetanosulfonato (MMS, 50 μ M) e a cisplatina (Fauldcispla®, Libbs) foi utilizada como fármaco referência. No final dos tratamentos, as células foram lavadas com PBS e colhidas por dissociação com tripsina. As células foram contadas utilizando uma câmara de Neubauer e novamente semeadas em placas de cultura Nunclon® de 21,5 cm² contendo meio DMEM com 10% de SFB em uma

densidade de duzentas células por placa para cada tratamento, em triplicata. Após sete dias de incubação as células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol:ácido acético:água destilada (1: 1: 8) durante 20 minutos, secas ao ar e coradas com cristal violeta (0,5% (p/v)) diluído em PBS por 20 minutos. A eficiência de plaqueamento (EP) das células foi calculada pela razão entre o número de colônias observadas após o tempo de incubação e o número de células semeadas (duzentas). A média de colônias no controle foi considerada como 100% e o número de colônias observadas após o tratamento foi utilizado para o cálculo da fração de sobrevivência (FS), obtido pela seguinte fórmula:

$$FS = \frac{\text{Número de colônias contadas em cada tratamento}}{\text{Número de colônias contadas no controle} \times EP} \times 100$$

3.3.3 Inibição do crescimento de esferoides tumorais cultivados em 3D

Os esferoides multicelulares tumorais (EMT) foram obtidos de acordo com o método desenvolvido por Friedrich et al. (2009). Resumidamente, 200 µL de uma suspensão de células DU-145 (2×10^3 células) foram inseridos em placas de 96 poços revestidos com agarose (1,5% (p/v)) e cultivadas em meio completo acrescido de 3% (p/v) de Matrigel®. Os EMT com estruturas estáveis se formaram depois de cinco dias de cultivo. Em seguida, os esferoides foram expostos aos complexos DB-LW, DB-LP, DP-LW e DP-LP em cinco diferentes concentrações, variando de 1 a 10 µM por 24 horas. A cisplatina (Fauldcispla®) a 25 µM foi usada como fármaco citotóxico de referência. O controle negativo recebeu o veículo (DMSO 0,1% (v/v)) que foi utilizado para diluir os compostos testados. No final do tratamento, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de Alamar blue como descrito acima. Para investigar as alterações morfológicas após o tratamento, outros EMT foram

examinados por microscopia ao longo de sete dias usando o software AxioVision LE (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

3.4 Avaliação dos mecanismos de morte celular

3.4.1 Ensaio de marcação com Anexina V / Iodeto de propídeo

Os ensaios de morte celular foram realizados de acordo com os métodos propostos por Cummings et al. (2004). Inicialmente, a morfologia nuclear das células DU-145 foi avaliada por ensaio de dupla coloração com iodeto de propídeo (PI)/Hoechst. Resumidamente, as células foram semeadas (5×10^3 células/poço) em placas pretas de 96 poços com fundo transparente e mantidas sob cultivo por 24 horas para a adesão celular. Após esse período, as células foram tratadas com os complexos DB-LW, DB-LP, DP-LW e DP-LP em concentrações previamente selecionadas pelos ensaios de viabilidade celular. O controle negativo recebeu o veículo (DMSO 0,1% (v/v)) e os controles positivos foram constituídos por cisplatina (Fauldcispla[®], 25 μ M) e doxorrubicina (Fauldoxo[®], 1 μ M). As células foram incubadas com Hoechst 33342 (10 μ M) e PI (10 μ M) por 10 minutos em temperatura ambiente. As células foram então observadas pelo sistema ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices, CA, EUA). A detecção de células apoptóticas/necróticas foi determinada por citometria de fluxo utilizando o kit Alexa Fluor[®] 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis (Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA, USA) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A anexina foi utilizada em conjunto com o corante iodeto de propídeo para distinguir as células apoptóticas. A classificação das populações celulares de acordo com a marcação foi baseada em estudos que consideraram: células necróticas: anexina negativa, PI positivo (Q1); células apoptóticas: anexina positiva, PI negativo + anexina positiva, PI positivo (Q2 + Q4);

células viáveis: anexina negativa, PI negativo (Q3) (LEGESSE-MILLER et al., 2012). Resumidamente, as células DU-145 foram semeadas ($5,5 \times 10^4$ células/poço) em placas de 12 poços e mantidas sob cultivo por 24 horas para a adesão celular. Após esse período, as células foram tratadas como descrito acima. Em seguida, as células foram coletadas com StemPro™ Accutase™, lavadas com PBS, centrifugadas a 220 g por 3 minutos, ressuspensas em 90 µL 1X annexin-binding buffer e, por fim, movidas para os tubos de citometria (Corning – Corning, NY, USA). Em seguida, foram adicionados 10 µL de Alexa Fluor® 488 Anexina V (50 µL/mL), e a mistura foi incubada no escuro a 4°C por 15 minutos. Previamente antes da análise, as células receberam 100 µL de PI (2 µg/mL) e, em seguida, as células foram avaliadas em um citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences – San Jose, CA, EUA) por meio do software BD FACSDiva™ 6.1. Diva. Dez mil eventos foram avaliados por experimento, em triplicata.

3.4.2 Análise da cinética do ciclo celular

Análise do ciclo celular foi realizada de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante do kit CycleTEST™ Plus DNA Reagent Kit (Becton Dickinson - Franklin Lakes, USA). Inicialmente, as células DU-145 (1×10^6 células/poço) foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas por 24 horas. Após, realizou-se o tratamento com o complexo DP-LP em concentrações previamente determinadas pelos ensaios de viabilidade celular, controle negativo (DMSO 0,1%) e controle positivo (1 µM de doxorubicina) e posteriormente as placas foram incubadas novamente por 24 horas. Após esse período, as células foram colhidas e fixadas em etanol 70% à 4 °C por 2 horas. Em seguida os tubos foram centrifugados a 200x g por 5 minutos e o etanol completamente descartado. As células foram ressuspensas em 5 mL de PBS e

centrifugadas a 200x *g* por 5 minutos. O pellet de células foi ressuspenso em 1 mL da solução de coloração (0.1% (v/v) Triton X-100, PI (5 µg/mL) e 100 µg/mL DNase-free RNase A) e as amostras mantidas no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. A leitura dos tubos foi realizada em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (BD Biosciences – San Jose, CA, USA) e analisada pelo software ModFit LT (Verity Software House – Topsham, ME, USA). Os resultados são expressos como a porcentagem (%) de células em cada fase do ciclo celular.

3.4.3 Determinação dos níveis de espécies reativas intracelulares

Os níveis de espécies reativas totais foram determinados por meio do marcador H₂DCFDA (2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato), como descrito por Wang & Joseph, (1999). As células DU-145 foram semeadas (1,5 x 10⁴ células / poço) em placas pretas de 96 poços e mantidas sob cultivo por 24 horas para a adesão celular. Após esse período, as células foram tratadas com a IC₅₀ dos complexos DP-LW e DP-LP por 1, 6, 12 e 24 horas. Depois disso, as células foram marcadas com 100 µL de H₂DCFDA a 5 µM em dimetilformamida (DMF) por 30 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, e as células foram lavadas duas vezes com 100 µL de PBS. Nessa etapa, os poços de tratamento receberam 100 µL de PBS e aos poços de controle positivo foram adicionados 100 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 0,5 µM). A intensidade de fluorescência foi medida em um espectrofotômetro de fluorescência Synergy H1 (BioTek®), nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 e 527 nm, respectivamente. Os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e superóxido foram determinados por meio do kit Cellular ROS/Superoxide Detection Assay Kit (Abcam®). As células foram semeadas (1,5 x 10⁴ células/poço) em placas pretas de 96 poços e mantidas sob

cultivo por 24 horas para a adesão celular. Após esse período, as células foram tratadas com os complexos DP-LW e DP-LP em concentrações previamente selecionadas pelos ensaios de viabilidade celular. O controle negativo recebeu o veículo (DMSO 0,1% (v/v)) e o controle positivo recebeu piocianina (250 mM). Em seguida, as células foram marcadas com os reagentes de detecção de ERO totais e superóxido de acordo com as instruções do fabricante. A intensidade de fluorescência foi medida em um espectrofotômetro de fluorescência Synergy H1 (BioTek®), nos filtros padrões para fluoresceína (Ex = 488 nm, Em = 520 nm) e rodamina (Ex = 550 nm, Em = 610 nm) para determinação de ERO totais e superóxido, respectivamente.

Para determinar o papel das espécies reativas de oxigênio nos processos de morte celular, foram realizados ensaios de proteção com o antioxidante NAC. Neste ensaio, as células foram semeadas ($1,5 \times 10^4$ células / poço) em placas pretas de 96 poços e, após as 24 horas de incubação, elas foram tratadas com NAC (5 mM) em associação com concentrações previamente selecionadas dos complexos DP-LW e DP-LP por 24 horas. As células foram então marcadas com solução de H2DCFDA (5 μ M), e os níveis de ERO foram determinados como descrito acima. Paralelamente, células derivadas do mesmo subcultivo foram semeadas ($1,5 \times 10^4$ células / poço) em placas de 96 poços e, após as 24 horas de incubação, foram tratadas com NAC (5 mM) em associação com concentrações citotóxicas dos complexos DP-LW e DP-LP. Após 24 horas de tratamento, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de Alamar blue como descrito acima.

3.5 Avaliação da instabilidade genômica e interação com o DNA

3.5.1 Atividade genotóxica

Esta avaliação foi realizada com base na versão alcalina do ensaio do cometa que se baseia na avaliação da migração do DNA em um gel de agarose, de acordo com o método proposto por TICE et al. (2000). As células DU-145 e PNT-2 foram cultivadas em placas de 12 poços (1×10^5 células/poço) e tratadas por 4 e 24 horas com diferentes concentrações do complexo DP-LP. Além disso, foram incluídos em ambos os ensaios controles experimentais constituídos por: meio de cultura (controle negativo), DMSO 0,1% (v/v) (controle de veículo) e metilmetanosulfonato (MMS 150 μ M) (controle positivo). Após os devidos períodos de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pela técnica de exclusão por azul de tripan. Apenas os grupos que apresentaram viabilidade celular superior a 70% foram submetidas ao ensaio do cometa. As células foram recolhidas dos poços, em tubos de 2 mL, centrifugadas a 112 g por 3 minutos e lavadas com PBS por duas vezes. O pellet de células foi homogeneizado com 200 μ L de agarose de baixo ponto de fusão a (0,5% (m/v)). Cada 100 μ L dessa suspensão celular foi aplicada em uma lâmina pré-revestida com agarose de ponto de fusão normal (1,5% (m/v)). As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas a 4 °C por 10 minutos. Após a solidificação da agarose, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução de lise recém preparada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, 1% de Triton X-100 v/v e 10% de DMSO, pH 10), e mantidas por 18 horas (*overnight*), protegidas da luz em geladeira. Após esse procedimento as lâminas foram lavadas em banhos de água destilada gelada por duas vezes e, logo em seguida, elas foram imersas em tampão de eletroforese alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1mM, pH 13) em banho de gelo por

20 minutos para desnaturação do DNA. A eletroforese foi conduzida nessa mesma solução a 4 °C por 20 minutos, com voltagem (0,87 V/cm) e amperagem (300 mA) constantes. Posteriormente, as lâminas foram imersas em tampão de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) por 15 minutos e fixadas em etanol absoluto por 5 minutos. Imediatamente antes da análise, as lâminas foram coradas com o agente DNA GelRed™ (1:10.000 (v/v), Uniscience) e examinadas em microscópio de fluorescência (Zeiss - AxioStar Plus), acoplado a uma câmera usando filtro 515-560 nm e barreira de filtro de 590 nm, em objetiva de 20 x. Para cada tratamento foram analisadas 2 lâminas por experimento, perfazendo um total de 100 nucleoides que foram analisados pelo software CometAssay IV™ (Perceptive Instruments®, Bury St. Edmunds, Suffolk, Inglaterra). O parâmetro utilizado na análise foi o *Tail intensity* (porcentagem de DNA na cauda).

3.5.2 Atividade mutagênica

A atividade mutagênica foi avaliada pelo ensaio do micronúcleo (MN) de acordo com os protocolos descritos por Fenech (2000) e Shibai-ogata et al. (2011). Para esse ensaio, as células DU-145 e PNT-2 foram semeadas em placas pretas de 96 poços com fundo transparente em uma concentração de 5×10^3 células por poço e mantidas sob cultivo por 24 horas para a adesão celular. Após esse período, as células foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações do complexo DP-LP. Os controles experimentais foram constituídos por DMSO 0,1% (v/v) (controle de veículo), mitomicina C (100 ng/mL) (controle positivo) e meio de cultura (controle negativo). Após o período de tratamento, foi adicionado a cada poço 100 µL de meio de cultura contendo 4,5 µg/mL de citocalasina B e as células foram incubadas por mais 28 ou 32 horas (DU-145 e PNT-2, respectivamente) nas mesmas condições.

Após esse período, as células foram lavadas com PBS, fixadas com etanol absoluto por 30 minutos e marcadas com os agentes fluorescentes isotiocianato de fluoresceína (FITC 1 µg/mL) por 30 minutos e Hoechst 33342 (5 µM) por 15 minutos, ambos em temperatura ambiente protegidos da luz. O equipamento INCell Analyzer 2000 (GE HealthCare, Pittsburgh, PA, EUA) foi programado para capturar 12 campos de imagem por poço, em cada um dos filtros, utilizando a objetiva de 20x. Em seguida, as imagens foram analisadas utilizando o software INCell Analyzer 1000 Workstation 3.7 (GE HealthCare, Pittsburgh, PA, EUA). A contagem automática foi realizada em um processo de três etapas, as quais compreendem o reconhecimento do núcleos celulares marcados com Hoechst, reconhecimento do citoplasma marcado com FITC e o reconhecimento e contagem de micronúcleos também marcados com Hoechst. Os critérios utilizados para identificação dos micronúcleos foram baseados em Fenech (2000) e Shibai-ogata et al. (2011) e a análise foi conduzida de acordo com as diretrizes do GUIDELINE FOR TESTING OS CHEMICALS, (OECD N°. 487, 2014). Um total de 2000 células binucleadas viáveis foram analisadas por tratamento em cada uma das três diferentes replicatas (n=3). Nessa mesma análise foram contadas 1000 células totais por tratamento, entre mononucleadas, binucleadas e multinucleadas (mais do que três núcleos) para o cálculo do índice de proliferação por bloqueio de citocinese (CBPI). O CBPI foi calculado utilizando a fórmula:

$$\text{CBPI} = [M1 + 2(M2) + 3(M3)] / N$$

Onde M1 – M3 é o número de células com 1, 2, 3 ou mais núcleos, respectivamente; e N é o número total de células viáveis.

3.5.3 Estudos de interação com o DNA

Solução de CT-DNA (*Calf Thymus*) foi preparada em tampão Tris-HCl (4,5 mM Tris-HCl, 0,5 mM Tris-base, 50 mM NaCl, pH = 7,4) para os estudos de interação com os complexos. A concentração do CT-DNA foi determinada por espectroscopia de absorção usando a absorvidade molar 6600 mol/dm³/cm (MARMUR, 1961).

3.5.3.1 Dicroísmo circular

Espectros de dicroísmo circular (CD) foram obtidos em solução de CT-DNA (50 µM) na presença e ausência dos complexos em diferentes concentrações (5-25 µM). As amostras foram incubadas por 18 horas à 37 °C, posteriormente analisadas no espectropolarímetro JASCO J720 na faixa de 240–450 nm, à 25 °C, no modo de varredura contínua (200 nm/min), sob fluxo constante de nitrogênio.

3.5.3.2 Interação com DNA plasmidial superenovelado

Para realização deste experimento foi utilizado o DNA plasmidial pBR322 (Sigma-Aldrich). Primeiramente, os complexos foram incubados com o DNA pBR322 (40 µM) em diferentes relações molares ($R_i=0,125, 0,25, 0,5$ e $1,0$), por 18 horas à 37°C. Após o período de incubação, as amostras foram corridas em um gel de agarose a 1% com TAE (0,45 M Tris-HCl, 0,45 M ácido acético, 10 mM de EDTA, pH 7,4). Após a corrida, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio. As imagens foram capturadas utilizando o Chemi Doc MP Imager (BioRad).

3.5.3.3 Deslocamento competitivo de Hoechst

Este ensaio baseou-se na avaliação da competição entre os complexos e o Hoechst (HO) pelo CT-DNA, conforme descrito na literatura (SARWAR et al., 2015).

Para isso empregou-se uma placa opaca de 96 poços, em que foi adicionado 200 µL (volume final) de solução contendo CT-DNA (125 µM), HO (2,7 µM) e os complexos em diferentes relações molares CT-DNA/complexo (0,1 – 1,0), em tampão Tris-HCl (4,5 mM de Tris HCl, 0,5 mM de Tris base e 50 mM de NaCl) num pH 7,4, mantendo uma porcentagem de DMSO de 10%. As amostras foram analisadas em um fluorímetro Synergy/H1-Biotek, a 37 °C, realizando a excitação em 340 nm. A banda de emissão observada para CT-DNA e Hoechst (HO) foi em 455 nm, a qual foi monitorada a supressão da fluorescência na presença de diferentes concentrações dos complexos. Os espectros foram registrados de 400 a 650 nm.

3.6 Análise da expressão transcricional e traducional de genes envolvidos com a atividade antiproliferativa

3.6.1 PCR quantitativa em tempo real

Para análise da expressão gênica transcricional, as células DU-145 foram semeadas (1×10^5 células/poço) em placas de 6 poços e mantidas sob cultivo por 24 horas para a adesão celular. Após esse período, as células foram tratadas, em triplicata, com 1,0 µM do complexo DP-LP por 24 horas. O controle negativo recebeu o veículo do complexo (DMSO 0,1% (v/v)). As células do grupo controle e do tratamento foram recolhidas, em cada triplicata de poços, e misturadas em um *pool* de células. Essas células foram submetidas à extração do RNA, síntese de cDNA e então realizada a técnica de RT-qPCR. Esse procedimento foi repetido em três diferentes momentos, configurando as três repetições independentes.

3.6.1.1 Extração do RNA

As células foram submetidas ao procedimento de extração de RNA total segundo o protocolo do fabricante do RNeasy Mini Kit (QIAGEN; Frederick, Maryland, USA) que inclui os passos de lise das células, purificação do RNA, tratamento com DNase e eluição do RNA com água livre de nuclease fornecido pelo fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas por espectrometria a 260 nm em NanoDrop ND-2000 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). A pureza das amostras foi avaliada pela razão A_{260}/A_{280} , que mostra possíveis contaminações por proteínas e DNA; e pela razão A_{260}/A_{230} , que mostra possíveis contaminações por sais e compostos orgânicos, como a guanidina ou o fenol. Amostras de RNA total com aceitável grau de pureza apresentam razões A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} próximas a 2,0 (BUSTIN et al., 2009). A integridade do RNA extraído foi determinada após corrida eletroforética no aparelho Bioanalyzer-Agilent 2100 a 6,5 V/cm durante 20 minutos. A integridade do RNA foi avaliada pelo RIN (RNA Integrity Number).

3.6.1.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, a partir de 1 µg de RNA, foi utilizado o Kit RT2 First Strand cDNA Synthesis (QIAGEN; Frederick, Maryland, USA), seguindo as instruções do fabricante. Antes da realização do procedimento de síntese de cDNA, todas as amostras foram tratadas com o DNase I, Amplification Grade (Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA, USA), a fim de eliminar a presença de qualquer DNA genômico.

3.6.1.3 RT2 Profiler PCR Arrays

As reações de PCR Array foram realizadas com o kit RT2 Profiler™ PCR

Array Human Cancer Drug Targets (PAHS-507Z) (QIAGEN; Frederick, Maryland, USA) para 84 genes de acordo com o protocolo do fabricante. O mix para as reações de PCR Array foi preparado com RT2 SYRB Green/ROX qPCR Master Mix (QIAGEN; Frederick, Maryland, USA) suficiente para uma microplaca, água duplamente destilada e cDNA de cada amostra. O mix foi homogeneizado e 25 µL da solução distribuída em cada um dos 96 orifícios da placa de PCR Array que já continham os iniciadores de interesse. Além dos 84 genes alvos de novos fármacos, as placas continham cinco diferentes controles endógenos, um controle para contaminação por DNA genômico, controle da transcriptase reversa e controle positivo para PCR. O equipamento utilizado para as reações de RT-qPCR foi o StepOnePlus® PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA) e as condições de ciclagem foram: 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Em seguida foi realizada a curva de dissociação elevando-se a temperatura de 65 a 95 °C, com variação de 2 °C por minuto. Após a amplificação das amostras, os cálculos da expressão diferencial, em relação ao controle negativo (DMSO 0,1% (v/v)), foram realizados pelo programa RT2 Profiler PCR Array Data Analysis (<http://www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>). Os genes endógenos que apresentaram menor variação entre as replicatas dos testes e controles, foram utilizados como normalizadores da análise. As quantidades relativas (QR) da expressão da expressão gênica foram calculadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (PFAFFL, 2001), seguido do Teste *t* de *Student* para avaliar a significância das diferenças na expressão gênica entre controle e teste. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados estão representados como diferença (*fold regulation*) na expressão gênica, que foi normalizada pela média geométrica dos controles endógenos.

3.6.2 Western blot

3.6.2.1 Extração das proteínas

Para análise da expressão gênica traducional, as células DU-145 foram semeadas (1×10^6 células/poço) em placas de 6 poços e mantidas sob cultivo por 24 horas para a adesão celular. Após esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações (0,25; 0,5; 1,0 e 1,5) do complexo DP-LP por 24 horas. O controle negativo recebeu o veículo do complexo (DMSO 0,1% (v/v)). Essas células foram submetidas à extração de proteínas utilizando-se o reagente Trizol (Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A precipitação foi realizada pela adição de 1,5 mL de isopropanol para cada 1 mL de Trizol usado na homogeneização inicial. Em seguida, as proteínas foram incubadas por 10 minutos a 25 °C e centrifugadas a 4000 g por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, as proteínas foram dissolvidas em SDS 1% e quantificadas em um espectrofotômetro, pela comparação com uma curva-padrão construída para a proteína soroalbumina bovina.

3.6.2.2 Separação das proteínas

O perfil das proteínas foi analisado utilizando-se géis de Bis-Tris com 10% de poliacrilamida e de dimensões de 8 x 8 x 0,1 cm (Bolt Bis-Tris Plus Gels® - Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA, USA). As amostras foram preparadas com 40 µg de proteína. Em seguida, as proteínas foram desnaturadas a 70 °C por 10 minutos e posteriormente aplicadas ao gel. A eletroforese foi realizada em cubas XCell SureLock™ contendo tampão de corrida SDS (Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA, USA), sendo aplicados 200 V por 35 minutos. Após a eletroforese, as proteínas

foram transferidas do gel para membranas Invitrolon™ PVDF utilizando-se o sistema XCell II™ Blot Module (Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA, USA). Os componentes da transferência foram previamente imersos em tampão de transferência antes de serem colocados na cuba. A voltagem aplicada foi 30 V por cerca de 90 minutos, sendo que esse tempo variou dependendo do peso molecular da proteína a ser analisada. Para a confirmação da transferência das proteínas, as membranas foram coradas por 5 minutos com o corante SimplyBlue™ SafeStain (Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA, USA). Posteriormente, as mesmas foram lavadas e submetidas à imunodeteção.

3.6.2.3 Imunodeteção e visualização das proteínas

A imunodeteção e a visualização das proteínas foi realizada com o auxílio do kit WesternBreeze® Chromogenic (Thermo Fisher Scientific - Waltham, MA, USA). As membranas foram imersas em solução bloqueadora (Tris 20 mM, NaCl 0,5 M pH 7,4) com 1% de caseína (Bio-Rad) e incubadas durante 30 minutos em um shaker rotatório. Em seguida, as membranas foram lavadas com água deionizada durante 5 minutos e incubadas com os anticorpos primários por 1 hora. Os anticorpos empregados neste trabalho foram os seguintes: anti-β Actina (abcam 8226) na diluição de 1:1000, anti-PARP (abcam 74290) na diluição de 1:1000, anti-cleaved PARP1 (abcam 32064) na diluição de 1:1000, anti-cleaved caspase-3 (abcam 2302) na diluição de 1:1000, anti-cleaved caspase-8 (Thermo Fisher MA5-15054), na diluição de 1:500, anti-cleaved caspase-9 (abcam 2324), na diluição de 1:1000 e anti-aurora B (abcam 2254) na diluição 1:1000. Após esse passo, foram realizadas 4 lavagens de 5 minutos com solução de lavagem para anticorpos TBS (Bio-Rad) e incubadas com os anticorpos secundários conjugados com HRP (Novus Biologicals)

por 30 minutos, sendo em seguida, novamente lavada 4 vezes por 5 minutos com solução de lavagem para anticorpos. Posteriormente, foram realizados 3 enxágues de água deionizada. Em seguida, as membranas foram incubadas com substrato cromogênico Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) até o aparecimento de bandas roxas em sua superfície. Finalmente, as membranas foram lavadas em água deionizada, sendo posteriormente secas em papel de filtro. A quantificação das bandas foi realizada pelo software Scion Imaging (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA) (<http://www.scioncorp.com/index.htm>). A proteína β -actina foi utilizada como controle endógeno. As bandas específicas foram visualizadas e escaneadas utilizando-se o equipamento ChemiDoc™ MP Image System (Bio-Rad). A quantificação da densidade de cada banda foi realizada no programa Scion Image.

3.7 Análise dos resultados

Os resultados são apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão da triplicata ou quadruplicata de três experimentos independentes. Para todos os ensaios, os dados foram verificados quanto à normalidade pelo Teste K-S (Teste Kolmogorov-Smirnov) e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Tukey ou Dunnet. Os dados do controle positivo foram submetidos ao teste t de *Student*, comparando-os com o controle negativo, para a validação do experimento. A análise estatística e elaboração dos gráficos foi realizada no programa GraphPad Prism 7 para Mac OS X (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA). O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para os parâmetros avaliados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da viabilidade celular e atividade citotóxica

Os efeitos dos complexos de rutênio na viabilidade celular foi avaliada em um painel de diferentes tipos histológicos de linhagens tumorais (A549, Caco-2, DU-145, HepG2, MDA-MB-231 e PC-3) e não-tumorais (FGH e PNT-2) em cultura bidimensional (2D) pelo ensaio de Alamar blue. Por meio dos valores adquiridos na leitura da fluorescência foi possível obter os resultados de viabilidade celular que indica a porcentagem de células viáveis após o tratamento por 24 horas com diferentes concentrações dos complexos (Figuras 10–17).

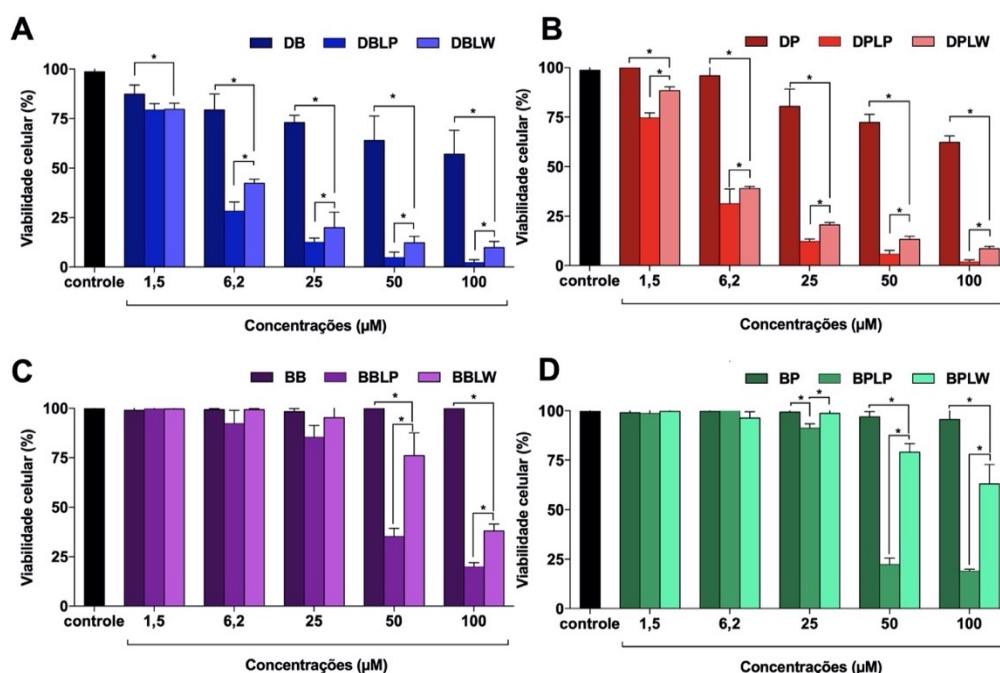


Figura 10. Viabilidade celular (%) da linhagem não-tumoral FGH após o tratamento de 24 horas com os complexos de rutênio. (A) Complexos do precursor [Ru(X)(dppm)(bipy)]PF₆. (B) Complexos do precursor [Ru(X)(dppm)(phen)]PF₆. (C) Complexos do precursor [Ru(X)(bipy)₂]PF₆. (D) Complexos do precursor [Ru(X)(phen)₂]PF₆. Onde X = lapachol (LP) ou lausona (LW). Os dados estão expressos pela média ± desvio padrão de três experimentos independentes. * Significativamente diferente (Teste *t* de Student, *p* < 0,05).

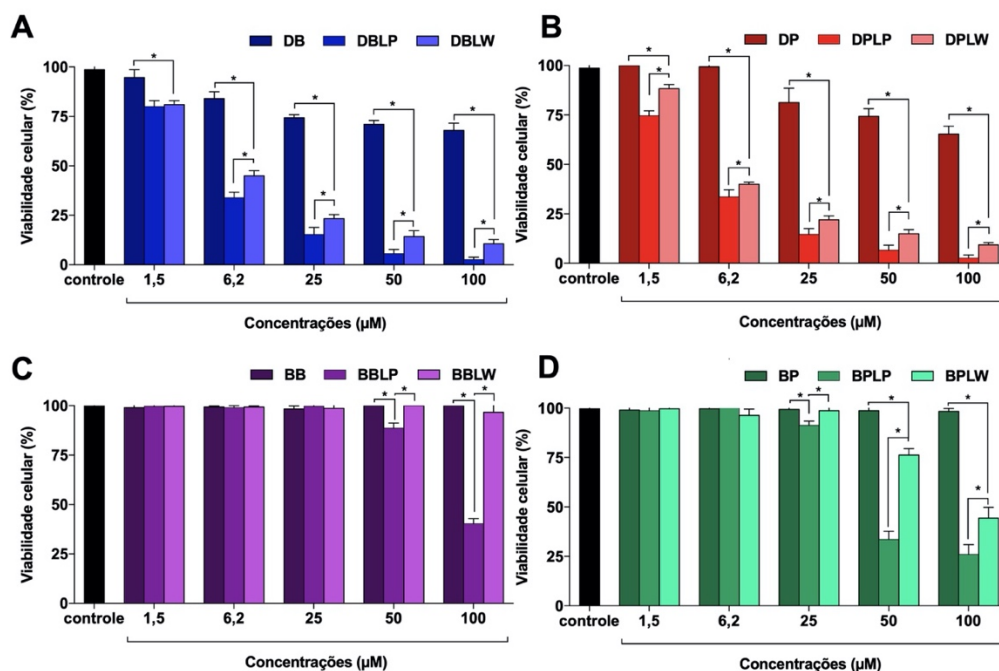


Figura 11. Viabilidade celular (%) da linhagem não-tumoral PNT-2 após o tratamento de 24 horas com os complexos de rutênio. (A) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{dppm})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. (B) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{dppm})(\text{phen})]\text{PF}_6$. (C) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$. (D) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$. Onde X = lapachol (LP) ou lausona (LW). Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * Significativamente diferente (Teste *t* de Student, $p < 0,05$).

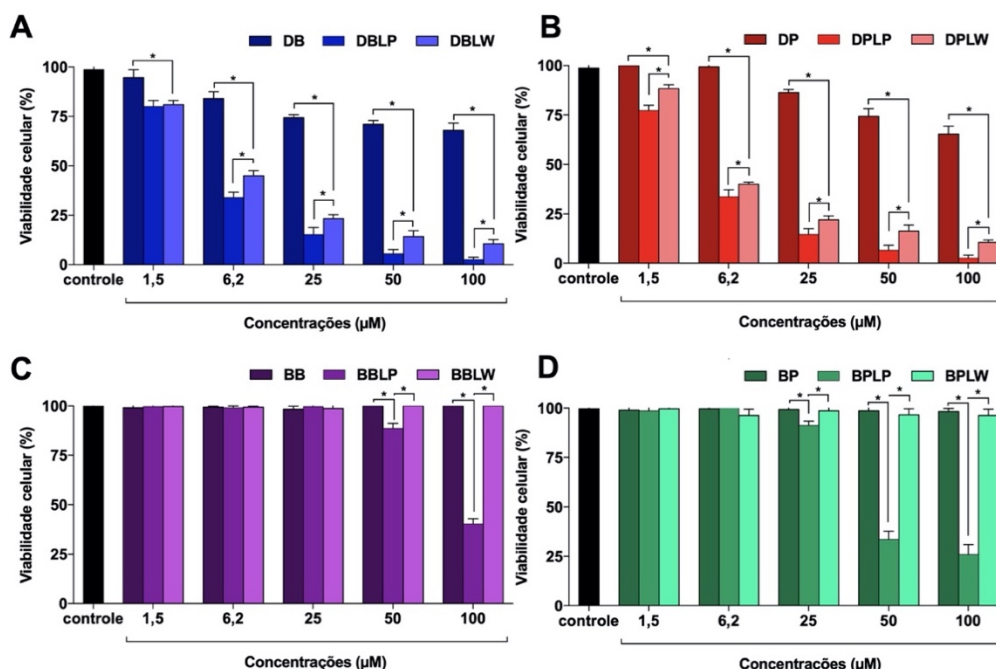


Figura 12. Viabilidade celular (%) da linhagem tumoral A549 após o tratamento de 24 horas com os complexos de rutênio. (A) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{dppm})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. (B) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{dppm})(\text{phen})]\text{PF}_6$. (C) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$. (D) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$. Onde X = lapachol (LP) ou lausona (LW). Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * Significativamente diferente (Teste *t* de Student, $p < 0,05$).

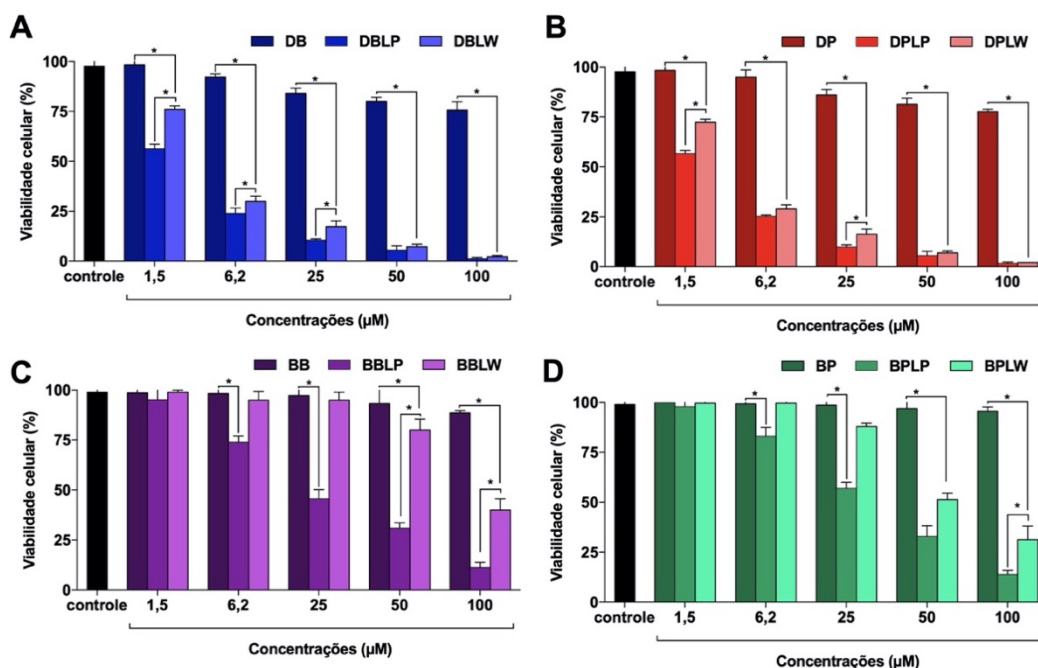


Figura 13. Viabilidade celular (%) da linhagem tumoral Caco-2 após o tratamento de 24 horas com os complexos de rutênio. (A) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{dppm})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. (B) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{dppm})(\text{phen})]\text{PF}_6$. (C) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$. (D) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$. Onde X = lapachol (LP) ou lausona (LW). Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * Significativamente diferente (Teste *t* de Student, $p < 0,05$).

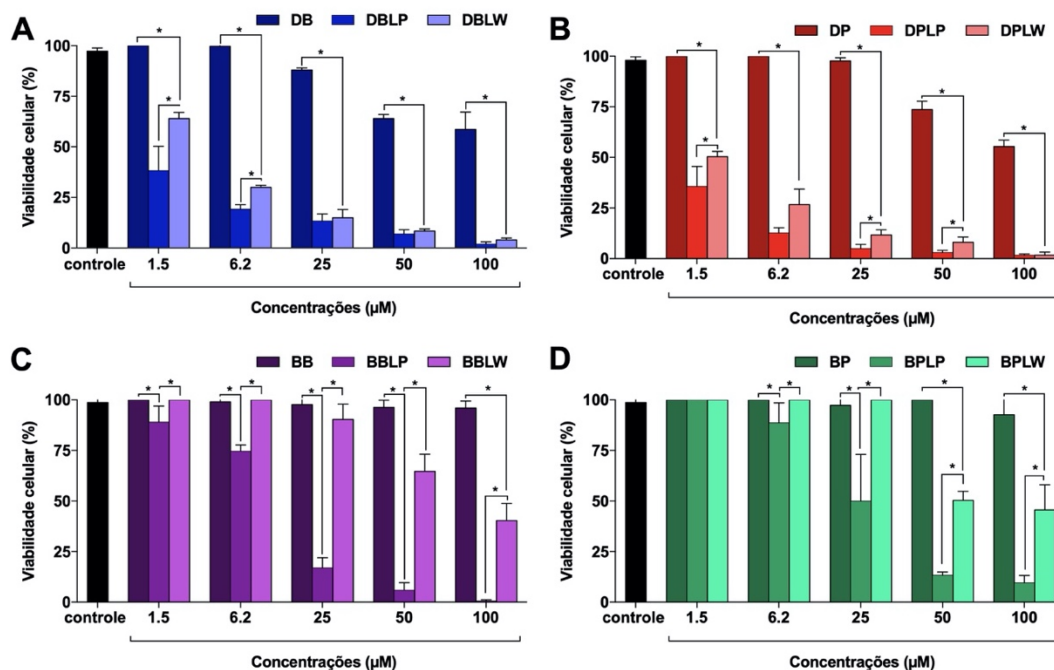


Figura 14. Viabilidade celular (%) da linhagem tumoral DU-145 após o tratamento de 24 horas com os complexos de rutênio. (A) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{dppm})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. (B) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{dppm})(\text{phen})]\text{PF}_6$. (C) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$. (D) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$. Onde X = lapachol (LP) ou lausona (LW). Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * Significativamente diferente (Teste *t* de Student, $p < 0,05$).

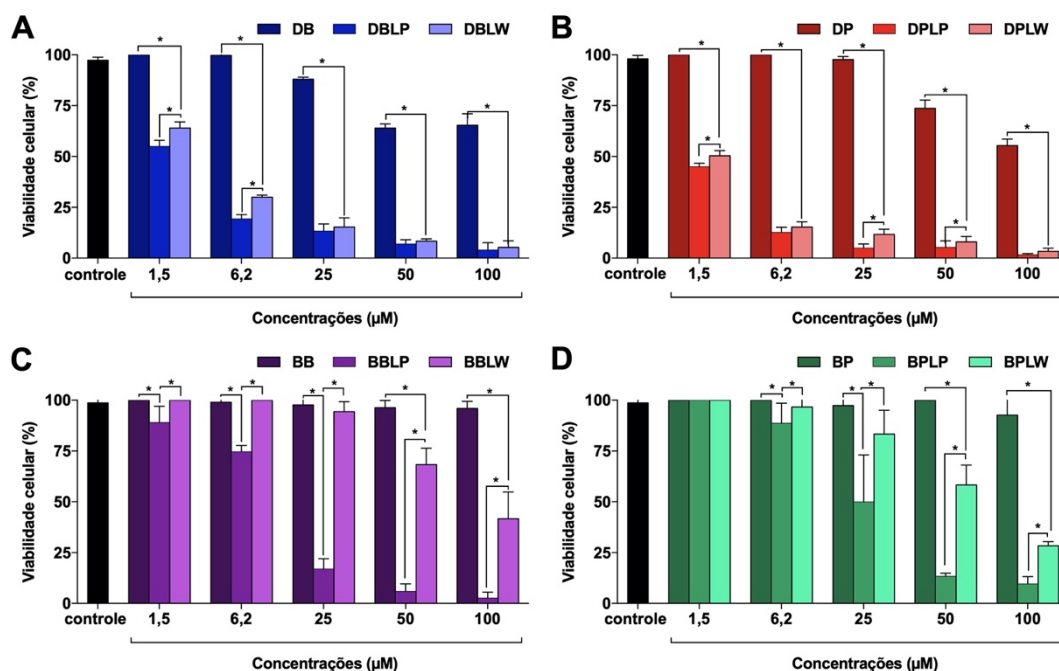


Figura 15. Viabilidade celular (%) da linhagem tumoral HepG2 após o tratamento de 24 horas com os complexos de rutênio. (A) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{dppm})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. (B) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{dppm})(\text{phen})]\text{PF}_6$. (C) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$. (D) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$. Onde X = lapachol (LP) ou lausona (LW). Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * Significativamente diferente (Teste *t* de Student, $p < 0,05$).

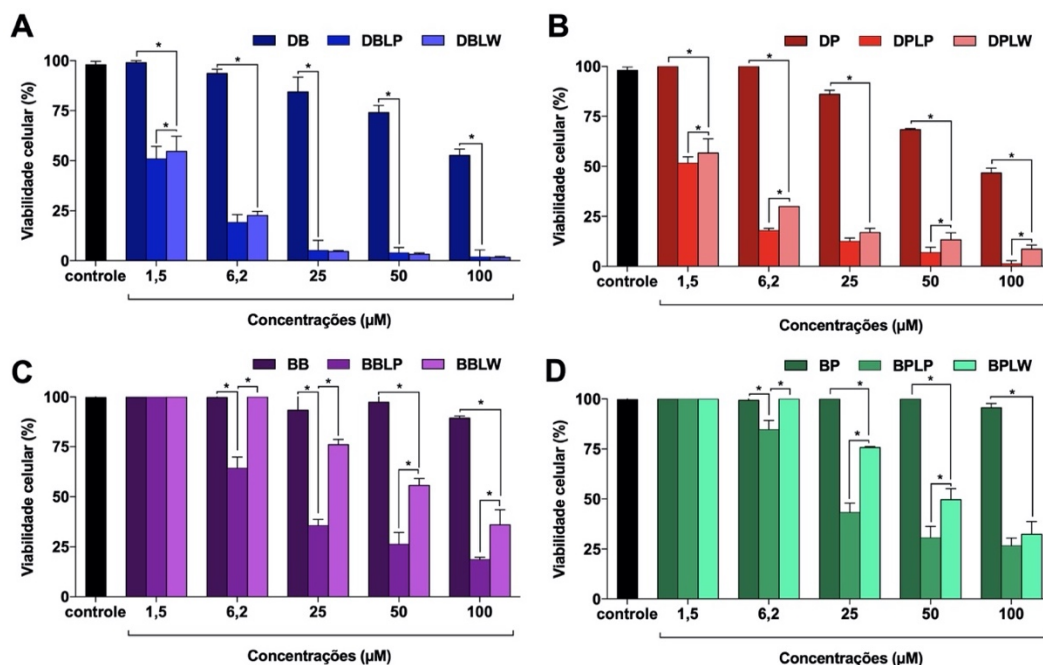
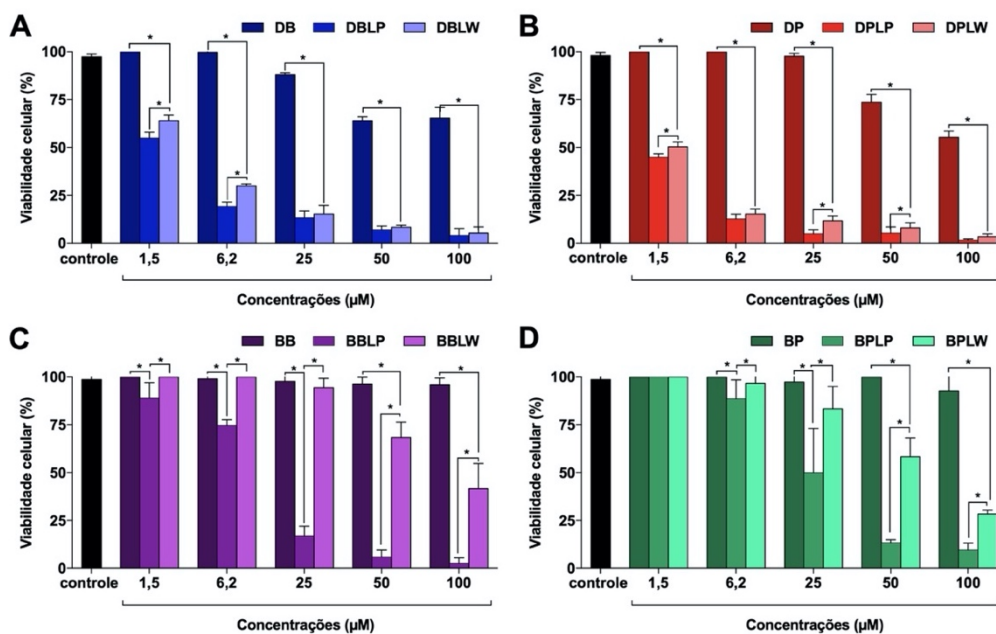


Figura 16. Viabilidade celular (%) da linhagem tumoral MDA-MB-231 após o tratamento de 24 horas com os complexos de rutênio. (A) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{dppm})(\text{bipy})]\text{PF}_6$. (B) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{dppm})(\text{phen})]\text{PF}_6$. (C) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$. (D) Complexos do precursor $[\text{Ru}(\text{X})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$. Onde X = lapachol (LP) ou lausona (LW). Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * Significativamente diferente (Teste *t* de Student, $p < 0,05$).



Os resultados mostraram uma diferença entre as duas séries de complexos, sendo que a segunda série de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{L})(\text{dppm})(\text{N-N})]\text{PF}_6$ apresentou diminuição mais significativa da viabilidade de todas as linhagens celulares testadas (Tabela 2). Além disso, todos os complexos apresentaram maior atividade inibitória do que os seus respectivos precursores e ligantes. A coordenação do lapachol ou da lausona aos precursores BB, BP, DB e DP aumentou em até 125 vezes sua citotoxicidade. Os complexos fosfínicos (segunda série) diminuíram consideravelmente a viabilidade celular, apresentando menores valores de IC_{50} do que os antineoplásicos cisplatina e doxorrubicina, utilizados nos ensaios como fármacos referência. Como esperado, o ligante de coordenação difenilfosfinometano melhorou não apenas a lipofilicidade dos compostos de rutênio, mas também sua atividade biológica. Acredita-se que a atividade de interferir na viabilidade celular pode ser reforçada pelo aumento da lipofilicidade devido à adição da fosfina (MOTSWAINYANA; AJIBADE, 2015).

Tabela 2. Média dos valores de log P e da IC₅₀ (μM) dos complexos de Ru-naftoquinonas, precursores e ligantes nas linhagens celulares tumorais A549, Caco-2, DU-145, HepG2, MDA-MB-231, PC-3 e nas linhagens não-tumorais FGH e PNT-2.

	log <i>P</i>	IC ₅₀ (μM)							
		FGH	PNT-2	A549	Caco-2	DU-145	HepG2	MDA-MB-231	PC-3
1ª Série									
BB	nd	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
BB-LP	0,31 ± 0,5	36,8 ± 0,1	68,6 ± 6,2	93,5 ± 2,7	20,8 ± 1,5	14,7 ± 2,1	13,8 ± 2,7	17,5 ± 0,6	15,7 ± 0,1
BB-LW	0,22 ± 0,01	74,3 ± 1,4	93,1 ± 7,4	99,1 ± 0,2	60,3 ± 5,3	41,4 ± 4,5	53,9 ± 3,8	63,1 ± 5,7	61,9 ± 2,3
BP	nd	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
BP-LP	0,61 ± 0,01	23,1 ± 0,9	49,3 ± 3,1	46,1 ± 1,1	25,4 ± 4,0	23,8 ± 2,4	24,2 ± 2,1	31,4 ± 1,5	22,1 ± 0,5
BP-LW	0,57 ± 0,02	80,7 ± 6,6	69,3 ± 4,1	69,1 ± 5,2	58,1 ± 2,9	37,2 ± 2,1	49,0 ± 3,6	69,4 ± 4,5	52,1 ± 1,0
2ª Série									
DB	nd	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
DB-LP	0,61 ± 0,11	3,1 ±0,2	5,9 ± 2,1	3,3 ± 0,4	2,0 ± 0,6	0,9 ± 0,2	1,7 ± 0,5	2,1 ± 0,4	1,3 ± 0,4
DB-LW	0,43 ± 0,02	4,3 ± 0,6	7,5 ± 0,8	4,8 ± 0,4	2,6 ± 0,2	1,9 ± 0,6	1,8 ± 0,3	3,6 ± 0,5	3,3 ± 0,9
DP	nd	>100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
DP-LP	0,83 ± 0,07	2,5 ± 0,3	6,8 ± 1,5	2,6 ± 0,1	2,0 ± 0,3	0,8 ± 0,1	1,5 ± 0,2	2,0 ± 0,0	1,1 ± 0,3
DP-LW	0,79 ± 0,03	3,2 ± 0,4	7,6 ± 0,9	4,2 ± 0,2	2,4 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,3	3,0 ± 0,3	2,2 ± 1,8
LP	nd	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
LW	nd	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
CIS	nd	11,2 ± 0,5	9,5 ± 0,1	16,5 ± 1,0	19,9 ± 0,9	24,5 ± 2,8	11,4 ± 1,6	37,4 ± 6,2	21,3 ± 0,1
DXR	nd	1,9 ± 0,2	3,2 ± 0,5	2,3 ± 1,8	1,8 ± 0,3	2,5 ± 1,3	3,8 ± 1,6	2,5 ± 0,3	4,5 ± 0,1

Os dados são apresentados como as médias ± D.P de valores de IC₅₀ em μM obtidos por regressão não linear de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Os complexos precursores *bis*-bipiridina (BB), *bis*-fenantrolina (BP), *bis*-difenílfosfinometano:bipiridina (DB), difenílfosfinometano:fenantrolina (DP) e os ligantes lapachol (LP) e lausona (LW) foram utilizados como controle. A cisplatina (CIS, Fauldcispla®) e a doxorubicina (DXR, Fauldoxo®) foram utilizadas como controles positivos. nd: não determinado.

Os valores de $\log P$ (o/a), calculados pelo método *shake-flask*, foram positivos para todos os complexos e, como demonstrado na Tabela 2, a maior lipofilicidade dos complexos pode ser atribuída à presença do ligante 1,10-fenantrolina (phen) e dppm. Outros estudos estabeleceram que a presença da phen atua melhorando a lipofilia de complexos de prata quando comparados aos seus análogos com ligantes bipyridínicos (bipy) (SEGURA et al., 2014). Nossos achados também sugerem que o uso da dppm pode ajustar o equilíbrio lipofílico/hidrofílico em complexos metálicos, onde, em geral, sua atividade biológica aumenta, graças ao aumento da lipofilia (LIMA et al., 2011). Assim, o $\log P$ indica que a coordenação de ligantes quelantes phen e dppm em uma única estrutura molecular aumenta a lipofilicidade e, como consequência, pode contribuir para o aumento de sua permeabilidade e, portanto, de sua atividade biológica. Também foi calculada a relação entre a IC_{50} encontrada nas linhagens tumorais e a IC_{50} das linhagens não-tumorais. A partir desses resultados, pôde-se calcular o índice de seletividade (IS) de cada complexo por meio da seguinte fórmula:

$$IS = IC_{50} [\text{célula não-tumoral}] / IC_{50} [\text{célula tumoral}]$$

O IS é uma maneira clara de estimar o intervalo terapêutico de um fármaco e identificar candidatos promissores à terapia (D'SOUSA et al., 2017). Na Tabela 3, pode-se observar que os complexos DB-LP, DB-LW, DP-LP e DP-LW apresentaram promissora capacidade de interferir na viabilidade celular combinada com seletividade em células tumorais, principalmente derivadas dos cânceres de próstata (DU-145 e PC-3) e fígado (HepG2).

Tabela 3. Índices de seletividade dos complexos de Ru-naftoquinonas e da cisplatina calculados pela razão dos valores de IC50 em células não-tumorais e tumorais.

		Células tumorais					
Células não-tumorais		A549	Caco-2	DU-145	HepG2	MDA-MB-231	PC-3
FGH	BB-LP	0,4	1,7	2,5	2,6	2,1	2,3
	BB-LW	0,7	1,2	1,8	1,4	1,2	1,2
	BP-LP	0,5	0,9	0,9	0,9	0,7	1,0
	BP-LW	1,1	1,4	2,2	1,6	1,2	1,5
	DB-LP	0,9	1,5	3,4	1,8	1,5	2,3
	DBLW	0,9	1,6	2,3	2,4	0,8	1,3
	DP-LP	0,9	1,2	3,1	1,6	1,2	2,2
	DP-LW	0,8	1,3	2,5	1,8	1,0	1,4
	CIS	0,7	0,6	0,4	1,0	0,3	0,5
	DXR	0,8	1,0	0,3	0,3	0,7	0,4
PNT-2	BB-LP	0,7	3,2	4,6	4,9	3,9	4,3
	BB-LW	0,9	1,5	2,2	1,7	1,4	1,5
	BP-LP	1,0	1,9	2,0	2,0	1,5	2,2
	BP-LW	1,1	1,1	1,8	1,4	0,9	1,3
	DB-LP	1,7	2,9	6,5	3,4	2,8	4,5
	DB-LW	1,5	2,8	3,9	3,9	2,0	2,2
	DP-LP	2,6	3,4	8,5	4,5	3,4	6,1
	DP-LW	1,8	3,1	5,8	4,2	2,5	3,4
	CIS	0,5	0,4	0,3	0,8	0,2	0,4
	DXR	1,3	1,7	1,2	0,8	1,2	0,7

Além disso, esses complexos exibem um IS maior do que o exibido pelos fármacos cisplatina e doxorubicina, agentes clinicamente importantes no tratamento do câncer. O complexo DP-LP, por exemplo, foi mais seletivo que a cisplatina nas linhagens DU-145 e PC-3 em 28 vezes e 15 vezes, respectivamente. De fato, outros estudos já relataram a ausência de seletividade de fármacos como a cisplatina em experimentos *in vitro*, o que justifica, em parte, os efeitos adversos da terapia com esse agente (LOZANO-PÉREZ et al., 2015).

A partir desses resultados, os complexos da segunda série (DB-LP, DB-LW, DP-LP e DP-LW) foram selecionados para uma investigação mais detalhada de seus

efeitos biológicos. Em um novo conjunto de experimentos, a linhagem DU-145 foi selecionada como modelo celular, uma vez que se mostrou mais sensível ao tratamento com os complexos testados. Portanto, a citotoxicidade da série de complexos fosfínicos foi confirmada pelo ensaio de sobrevivência clonogênica que é extremamente sensível para determinar os efeitos citotóxicos de agentes antineoplásicos.

O ensaio de eficiência clonogênica é um método considerado padrão-ouro para estudar o efeito citotóxico a longo prazo na proliferação celular (FRANKEN et al., 2006). Os resultados revelaram que, após sete dias de cultivo, os complexos selecionados inibiram a formação de colônias das células DU-145 de maneira dose-dependente, como mostrado na Figura 18. A eficiência de plaqueamento de células não tratadas foi superior a 70% em todos os ensaios. Além disso, o efeito citotóxico do complexo DP-LP foi maior que a dos demais nas mesmas concentrações. Nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 1,5 μM , o complexo DP-LP apresentou frações de sobrevivência (FS) formadoras de colônia de 58,4; 17,5; 4,1; 0 e 0%, respectivamente. Não houve redução significativa ($p > 0,05$) no número de colônias no controle (DMSO 0,1% v/v).

A citotoxicidade exibida pelos complexos, principalmente pelo DP-LP, sugere a substituição do ligante bipy pela phen aumenta a atividade dos compostos, além disso, a coordenação do ligante dppm e do lapachol em uma única estrutura possibilita a formação de complexos com maior atividade antiproliferativa. Os ensaios de sobrevivência clonogênica permitiram concluir que, de fato, os complexos induzem a perda da clonogenicidade das células DU-145 após os tratamentos. Essa resposta é importante para se distinguir os efeitos citostáticos dos efeitos citotóxicos de novos compostos a fim de se predizer seus efeitos antiproliferativos (GALLUZZI et al., 2009).

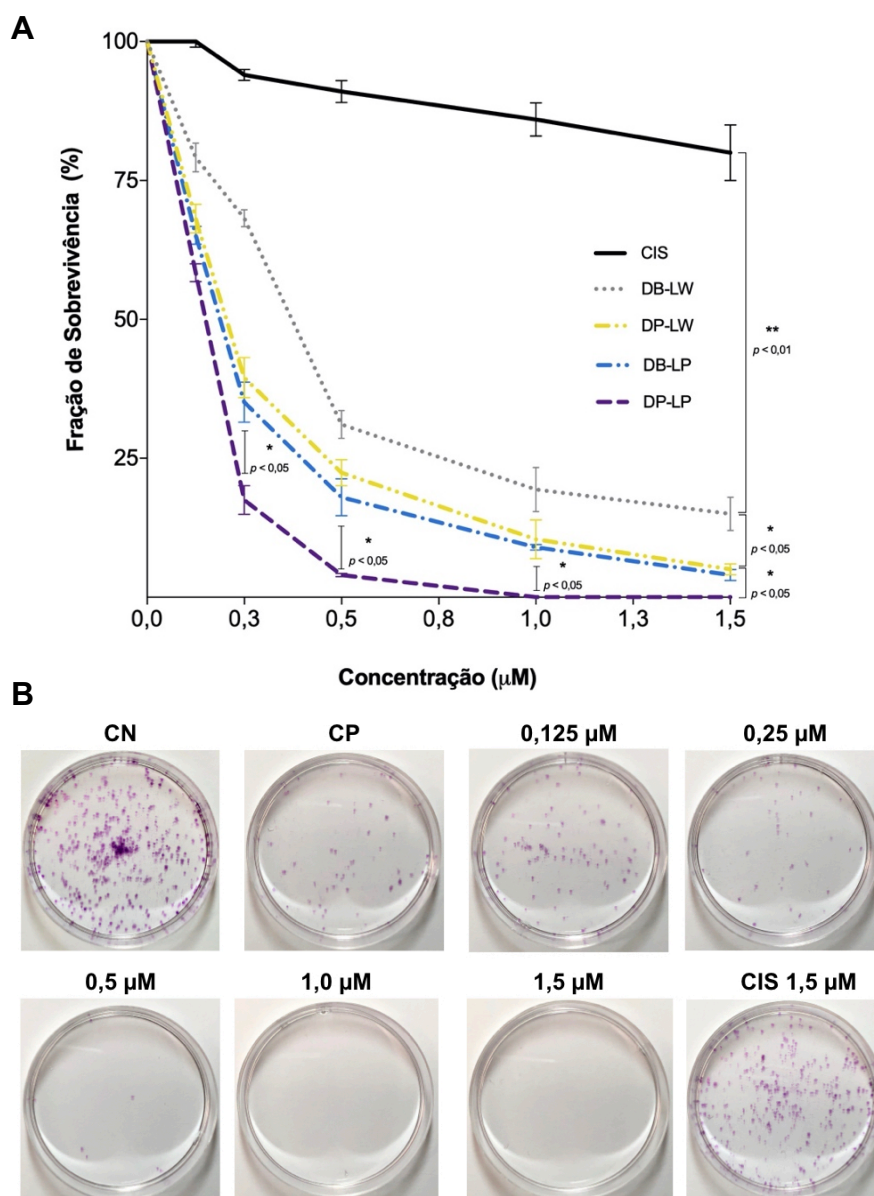


Figura 18. Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de sobrevivência clonogênica em células DU-145. (A) Frações de sobrevivência após tratamentos de 24 horas com os complexos DB-LP, DB-LW, DP-LP e DP-LW nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 μM. O controle negativo (CN) recebeu o veículo dos complexos (DMSO 0,1% (v/v)), o controle positivo (CP) foi tratado com metilmetanosulfonato (MMS 50 μM) e a cisplatina (CIS, Fauldcispla[®]) foi utilizada como fármaco controle. Os dados são apresentados como as médias $\pm$ D.P de três experimentos independentes realizadas em triplicata. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ pela análise de variância *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Dunnet. (B) Imagens representativas da formação das colônias de células DU-145 coradas com cristal violeta (0,5% (p/v)) após o tratamento com o complexo DP-LP e os controles. Fonte: Rone A. De Grandis, 2017.

Os ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade *in vitro* são amplamente utilizados para avaliação de compostos bioativos com possível aplicação na área biomédica, ou mesmo para determinação do risco a sua exposição (ASLANTÜRK, 2018). A combinação desses ensaios fornece informações adicionais quando se busca

entender os mecanismos pelos quais um xenobiótico atua a nível celular, podendo relacioná-los com os processos fisiológicos *in vivo* (MENYHART et al., 2016). Por meio dos resultados obtidos nestes testes, observa-se que aproximadamente 1,0 μM do complexo DP-LP foi capaz de diminuir em 50% a viabilidade de uma cultura de células DU-145, após 24 horas de exposição.

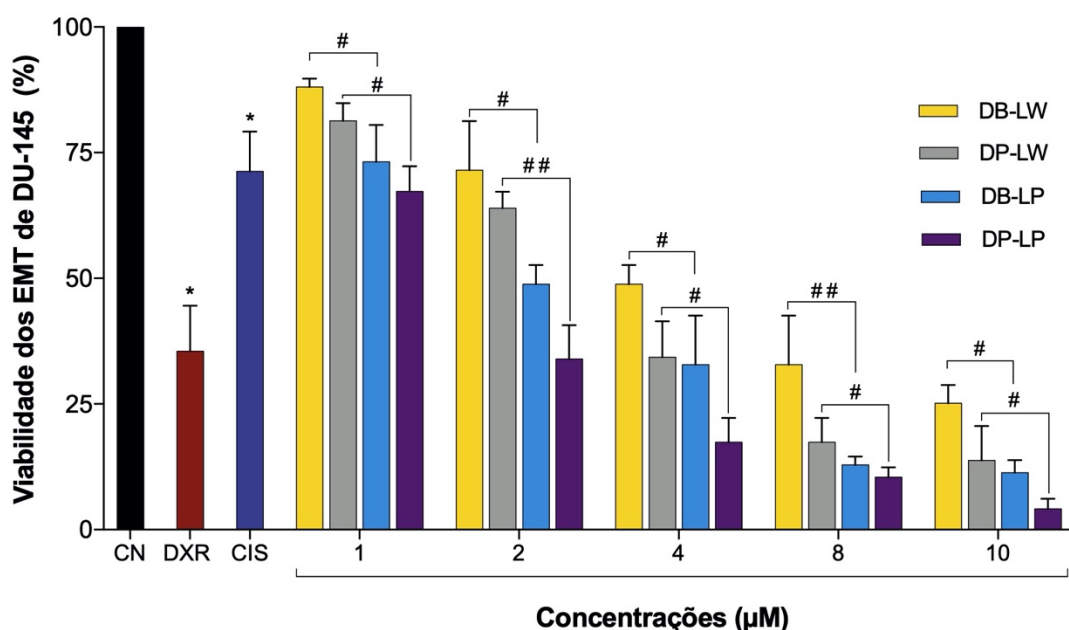
Células cancerosas regulam seu metabolismo energético de forma que possam sustentar sua proliferação. Ao aumentar a taxa de glicólise enquanto limita a fosforilação oxidativa, as células entram em um estado denominado glicólise aeróbica, também conhecida como efeito Warburg (KOPPENOL; BOUNDS; DANG, 2011). Logo, o aumento da glicólise possibilita o desvio de intermediários glicolíticos para a biossíntese de nucleotídeos, aminoácidos e NADPH que são utilizados na proliferação celular e manutenção de sobrevivência (LIBERTI; LOCASALE, 2016). De tal modo, alterar o metabolismo energético da célula tumoral pode ser explorado como um possível alvo terapêutico contra o câncer (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Nesse sentido, destacamos que os complexos fosfínicos de rutênio foram capazes de perturbar o metabolismo, demonstrando profícua diminuição da viabilidade celular, principalmente para células derivadas de câncer de próstata. Entretanto, alterações no metabolismo celular nem sempre podem desencadear uma resposta citotóxica, ou seja, de morte celular.

Sabe-se que há um limiar que deve ser superado para que os estímulos induzam permeabilização da membrana mitocondrial e liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma, desencadeando a morte celular programada (MÁRQUEZ-JURADO et al., 2018). Portanto, é importante distinguir se a diminuição da viabilidade celular pode desencadear efeitos na inibição do crescimento celular (citostático) ou se, de fato, induzem as células à apoptose (citotóxico). Nos ensaios de sobrevivência clonogênica, observou-se que células expostas por 24 horas a 1,0 μM de

DP-LP, perderam sua capacidade reprodutiva, ou seja, suprimem a capacidade de se proliferar suficientemente para formar uma colônia. Este ensaio é especialmente útil para avaliar efeitos a longo prazo, como sobrevida após tratamentos agudos com fármacos ou após a radiação (ADAN; BARAN, 2016). Portanto, conclui-se que os tratamentos com os complexos fosfínicos de rutênio causam danos irreversíveis às células, de tal maneira que elas reduzem sua capacidade proliferativa.

Em complemento aos ensaios de citotoxicidade em monocamada (2D), também foi avaliada a capacidade dos complexos em interferir na viabilidade de celulares cultivadas em três dimensões (3D). Nesse estudo, as células DU-145 foram cultivadas em sistemas específicos para a obtenção de esferoides multicelulares tumorais (EMT) de acordo com o modelo descrito por Friedrich et al. (2009) que propõe uma abordagem prática para a triagem de novos fármacos em modelos em 3D. Os modelos *in vitro* de cultivo celular em 3D estão bem estabelecidos por refletir de maneira mais fiel o microambiente tumoral *in vivo* (LANGHANS, 2018). Portanto, os EMT foram utilizados para mimetizar tumores prostáticos *in vitro* e estudar a atividade dos complexos frente a esse modelo. A viabilidade dos EMT foi determinada após tratamentos de 24 horas e os esferoides foram analisados por microscopia óptica após 7 dias ocorrido o tratamento. Os resultados do ensaio de Alamar blue demonstraram que todos os complexos reduziram a viabilidade dos EMT de células DU-145 de maneira dependente da concentração (Figura 19). Entretanto, os complexos formados com o ligante lapachol mostraram-se mais ativos, com valores diferentes ($p < 0,05$) dos apresentados pelos complexos de lausona nas mesmas concentrações.

A IC_{50} dos complexos DB-LW e DP-LW foi de 4,1 μM (3,3 $\mu g/mL$) e 3,4 μM (3,8 $\mu g/mL$), respectivamente, enquanto os complexos DB-LP e DP-LP apresentaram valores de 2,4 μM (2,1 $\mu g/mL$) e 1,9 μM (1,7 $\mu g/mL$), respectivamente, e a cisplatina apresentou IC_{50} de 62,6 μM (18,7 $\mu g/mL$). A hipóxia no centro do esferoide impede sua proliferação exacerbada, favorecendo a formação de uma zona necrótica o que torna os esferoides menos sensíveis a fármacos citotóxicos, como a cisplatina (MEHTA et al., 2012). Os complexos contendo o lapachol como ligante foram mais potentes que a cisplatina em pelo menos 32 vezes, demonstrando que sua atividade é eficaz no microambiente tumoral, independente da hipóxia.



Esferoides	IC_{50} (μM)				
	DB-LW	DP-LW	DB-LP	DP-LP	CIS
DU-145	4,1 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,6	62,6 $\pm$ 3,2

Figura 19. Efeitos dos complexos na viabilidade de esferoides multicelulares tumorais (EMT) de células DU-145. A viabilidade foi determinada pelo ensaio de Alamar blue após 24 horas de tratamento e os valores de IC_{50} (μM) foram obtidos por regressão não-linear a partir dos resultados de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. O controle negativo (CN) recebeu o veículo dos complexos (DMSO 0,1% (v/v)), o controle positivo (CP) foi tratado com doxorubicina (Fauldoso[®] 5 μM) e a cisplatina (CIS, Fauldcispla[®] 25 μM) foi utilizada como fármaco controle. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ diferente do controle negativo

(Teste *t* de Student,) e # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ estatisticamente diferente entre os complexos. ANOVA, *one-way* e pós-teste de Dunnet.

Na avaliação do efeito dos complexos de lapachol sobre o crescimento e morfologia dos esferoides, cinco concentrações diferentes foram testadas (0,25 - 2 μM). O crescimento dos esferoides foi avaliado a cada 24 ou 48 horas, conforme recomendado por Vinci et al. (2012). Os dados da Figura 20A mostram que o tratamento de 24 horas com o complexo DP-LP foi eficiente na indução de alterações na área de crescimento do esferoide.

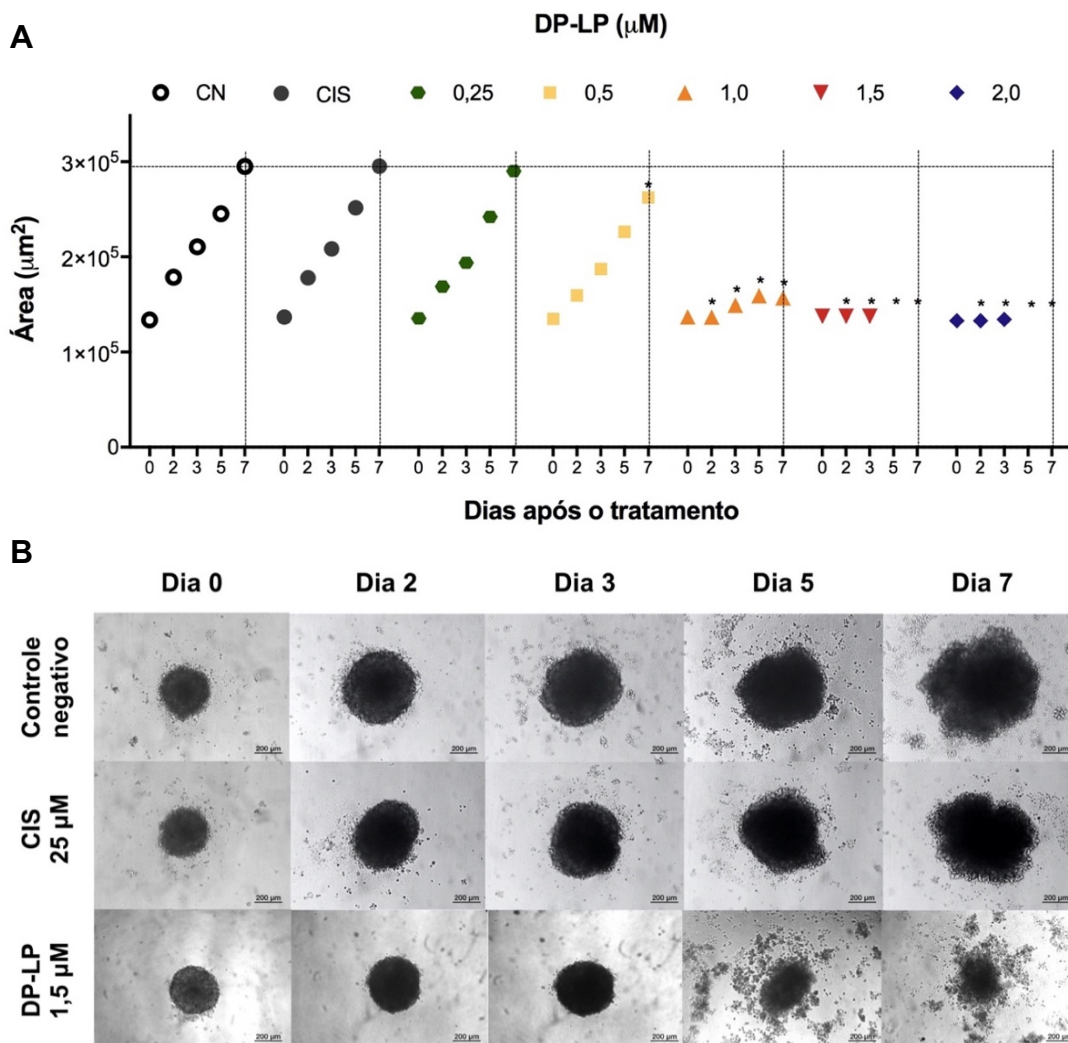


Figura 20. Efeito do complexo DP-LP no crescimento de esferoides multicelulares tumorais (EMT) de células DU-145. (A) Área dos esferoides avaliada a cada 24 ou 48 horas depois do tratamento com diferentes concentrações do complexo DP-LP (0,25 - 2 μM). Os valores representam a área coberta pelo esferoide ($n=8$). * $p < 0,05$ estatisticamente diferente do controle negativo. ANOVA, *one-way* e pós-teste de Dunnet. (B) Fotomicrografias dos

esferoides após o tratamento com o complexo DP-LP (1,5 μM). Microscópio invertido em aumento de 100x, sem corantes, em escala de 200 μm . Fonte: Rone A. De Grandis, 2017.

Na Figura 20A é possível observar que, após 24 horas de tratamento, as menores concentrações (0,25 e 0,5 μM) não inibiram o crescimento dos esferoides em relação ao grupo não tratado (CN), quando avaliados por até 7 dias após os tratamentos. No entanto, a partir do segundo dia após o tratamento, as concentrações de 1,0; 1,5 e 2,0 μM inibiram o crescimento dos esferoides, em comparação com o controle negativo ($p < 0,05$).

Além disso, os EMT apresentaram alterações morfológicas após 5 dias ocorridos os tratamentos. A Figura 20B mostra imagens do crescimento dos esferoides, avaliados nos tempos de 0, 2, 3, 5 e 7 dias após o tratamento com 1,5 μM do complexo DP-LP, cisplatina (CIS, Fauldcispla® 25 μM) e o controle negativo (DMSO 0,1% v/v). Além de alterar a área de cobertura dos esferoides, podemos observar que o complexo DP-LP alterou a estrutura do esferoide, efeito evidenciado pela desagregação do aglomerado celular que pode ser observado cinco dias após o tratamento. Já a cisplatina, não promoveu essas alterações, sendo que a área dos esferoides foi semelhante ao crescimento do controle negativo. Essa resposta indica que o complexo DP-LP é capaz de permear através do esferoide e desestabilizar as agregações celulares, resultando na perturbação das interações célula-matriz e, por fim, na morte celular. Outra hipótese, é de que as células afetadas pelo tratamento desagreguem-se pelo fato de estarem inviáveis. Este efeito na estrutura do esferoide também foi induzido pelo complexo DB-LP nas concentrações de 1,5 e 2,0 μM (fotomicrografias não mostradas).

De maneira geral, os complexos avaliados apresentaram capacidade de inibir a viabilidade de células tumorais de próstata DU-145. Além disso, os resultados obtidos comprovam que, de fato, as células DU-145 respondem de forma diferente de acordo

com a forma de cultivo, evidenciando a importância de estudos em esferoides multicelulares tumorais e comprovando a relevância dos objetivos propostos neste projeto de pesquisa. Esses resultados corroboram com os dados de Duval et al. (2017) que relataram que o arranjo das células em 3D permite a melhor interação célula-célula e, conseqüentemente, a reprodutibilidade dos ensaios *in vitro* para triagem de agentes anticâncer. Em virtude dos efeitos promissores dos complexos fosfínicos de lapachol, eles foram selecionados para um estudo mais detalhado a respeito dos mecanismos pelos quais eles podem conduzir à morte celular.

4.2 Avaliação dos mecanismos de morte celular

A apoptose é caracterizada com um processo fisiológico essencial para a homeostase tecidual. No entanto, algumas células podem adaptar-se a altos níveis de sinalização oncogênica, inativando seus circuitos indutores de senescência (GIANCOTTI, 2014). Tal situação leva à proliferação celular desenfreada e à formação de tumores que, quando malignos, evoluem até o surgimento das primeiras manifestações clínicas do câncer. A apoptose é o tipo de morte celular mais visada pelos tratamentos anticâncer, pois, seus processos não envolvem extravasamento de conteúdos celulares, o que evita uma resposta inflamatória local e, portanto, danos teciduais (SU et al., 2015). Logo, o uso de fármacos que induzem apoptose em células tumorais é uma estratégia bastante explorada na terapêutica. Para avaliar se os complexos DB-LW, DB-LP, DP-LW e DP-LP possuem atividade pró-apoptótica em células DU-145, foram realizados estudos de citometria de fluxo após a marcação com anexina V-FITC / PI. Em células viáveis, a fosfatidilserina (Ptd-L-Ser) é predominantemente observada na superfície interna da membrana celular, voltada para o citoplasma. Porém, no início do processo apoptótico, a Ptd-L-Ser é translocada para a superfície exterior da membrana para sinalização celular e reconhecimento por

fagócitos. Desse modo, a Ptd-L-Ser pode ser marcada com a anexina V e quantificar-se o número de células possivelmente apoptóticas por citometria de fluxo (VERMES et al., 1995). Na Figura 21 é possível observar os gráficos de pontos obtidos nos ensaios de citometria de fluxo. Os gráficos apresentam a fluorescência do FITC-anexina V no eixo x e do PI no eixo y. Os resultados provenientes dos complexos contendo lausona são apresentados no Capítulo 2.

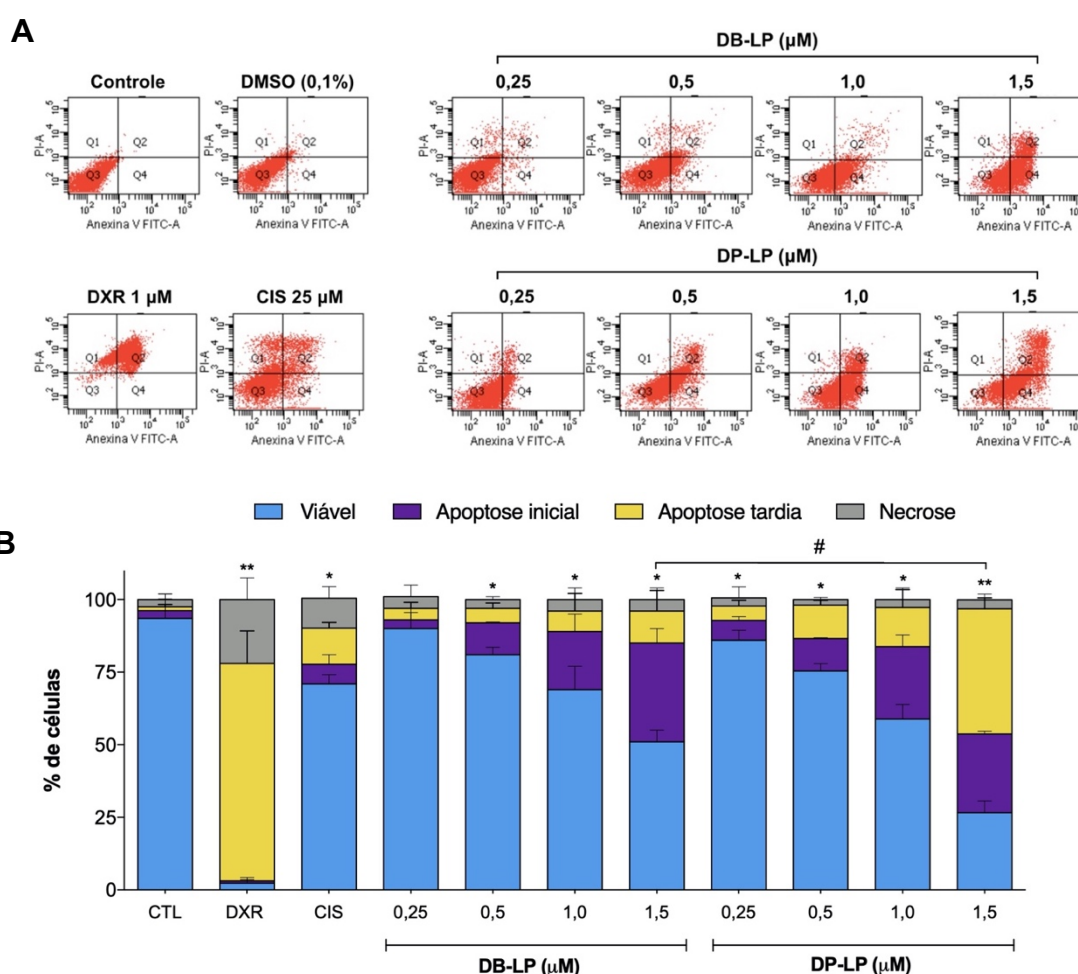


Figura 21. Efeito dos complexos DB-LP e DP-LP na possível indução da apoptose em células tumorais de próstata DU-145. (A) Distribuição das células marcadas com anexina V-FITC/PI. Q1: Anexina -/PI +, Q2: Anexina +/PI+, Q3: Anexina -/PI -, Q4: Anexina +/PI-. Dez mil eventos foram avaliados por experimento. (B) Porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia e necróticas. O controle negativo (CTL) recebeu o veículo dos complexos (DMSO 0,1% (v/v)), o controle positivo foi tratado com doxorrubicina (DXR 1 μM) e a cisplatina (CIS 25 μM) foi utilizada como fármaco controle. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ número de células em apoptose tardia (Q2) estatisticamente diferente do controle negativo. # $p < 0,05$ número de células em apoptose tardia (Q2) estatisticamente diferente entre os tratamentos. ANOVA, one-way e pós-teste de Dunnet.

Nota-se que houve um aumento gradual no número de células anexina + proporcional ao aumento da concentração dos complexos DB-LP e DP-LP. A população de células anexina +/ PI+ e anexina +/ PI- (quadrantes Q2 e Q4) encontradas nos tratamentos com o complexo DB-LP aumentou em relação ao controle não-tratado (5,9% para o grupo controle; 9,8% para 0,25 μ M; 16,3% para 0,50 μ M; 27,9% para 1,0 μ M e 45,7% para 1,5 μ M). Um perfil semelhante foi observado nos tratamentos com o complexos DP-LP (5,9% para o grupo controle; 11,8% para 0,25 μ M; 22,7% para 0,50 μ M; 41,4% para 1,0 μ M e 70,2% para 1,5 μ M).

O gráfico de barras com a porcentagem das células em cada um dos estágios analisados (Fig. 21B) demonstra o aumento significativo e gradual de células marcadas anexina +/ PI+ após 24 horas de tratamento, indicando que os complexos são possíveis indutores de apoptose em células DU-145. Observa-se, contudo, que o complexo DP-LP foi mais citotóxico, apresentando na concentração de 1,5 μ M mais de 70% de células apoptóticas, frente a pouco menos de 46% de células apoptóticas em concentração equivalente do complexo DB-LP ($p < 0,05$).

O tratamento com cisplatina na concentração fixa de 25 μ M (IC_{50}) apresentou 19,5% de anexina +/ PI+ e anexina +/ PI- (quadrantes Q2 e Q4). Portanto, uma concentração 100 vezes menor do complexo DP-LP foi necessária para exercer o mesmo efeito da cisplatina nas células DU-145. Nenhuma das concentrações dos complexos induziu um aumento significativo de células marcadas anexina -/PI +, indicativo de células necróticas. No entanto, a cisplatina, bem como a doxorrubicina, aumentaram consideravelmente ($p < 0,05$) a população de células necróticas (anexina -/PI +), após os respectivos tratamentos.

Além disso, a marcação celular com Hoesch/PI revelou que, de fato, o tratamento com os complexos resultou em um aumento de células apoptóticas (Fig. 22). O PI é

uma molécula que se intercala no DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. Nos estágios finais da apoptose, a membrana perde sua seletividade permitindo que ele permeie e marque o núcleo celular de vermelho, sendo facilmente diferenciado das células viáveis, que possuem membrana intacta e, por essa razão, são marcadas apenas pelo fluoróforo Hoesch 33342, em azul.

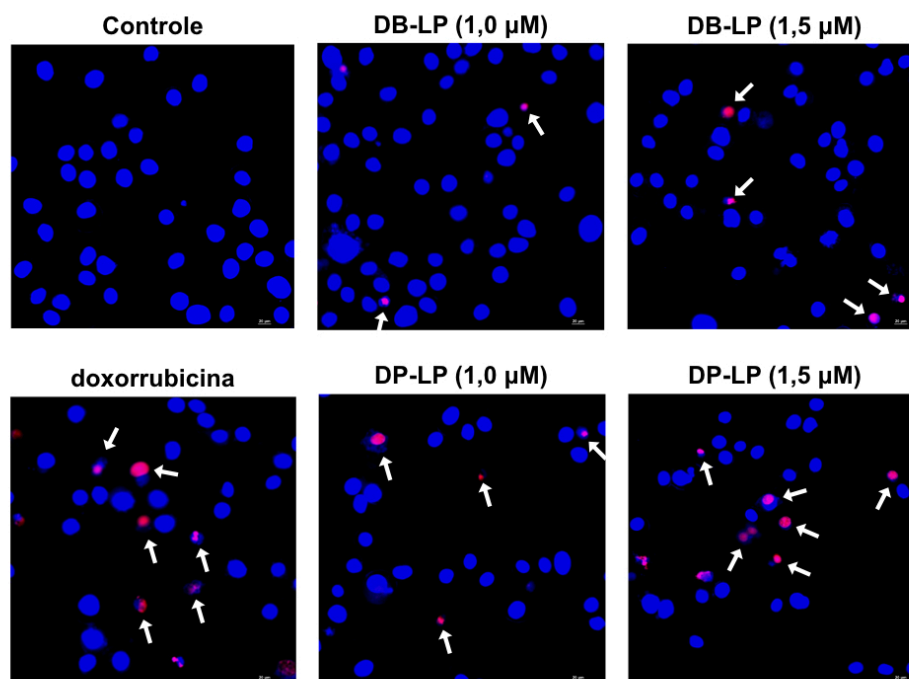


Figura 22. Imagens representativas dos núcleos de células DU-145 duplamente marcadas com Hoechst 33342 e PI. As imagens correspondem a uma das triplicatas capturadas no aparelho ImageXpress micro em escala de 20 µm. O controle recebeu o veículo dos complexos (DMSO 0,1% (v/v)), o controle positivo foi tratado com doxorubicina (1 µM). Fotos: Rone A. De Grandis, 2017.

Nossos resultados demonstram que o complexo DP-LP é um efetivo indutor de apoptose em células de câncer de próstata DU-145. Diversos estudos demonstraram que complexos de rutênio podem causar parada do ciclo celular em G1/S e principalmente em G2/M em vários tipos de câncer, por exemplo em hepatocarcinoma (DE CARVALHO et al., 2018), adenocarcinoma de mama (DE SOUSA et al., 2020) e pâncreas (SIMPSON et al., 2017) e neuroblastoma (ZHAO et al., 2019). A progressão do ciclo celular passa por quatro fases, G1, S, G2 e M, e é controlada por ciclinas e

quinases dependentes de ciclinas (CDKs). Para verificar se alterações no ciclo celular estavam envolvidas com os efeitos citotóxicos do complexo DP-LP, a distribuição das células DU-145 nas diferentes fases do ciclo foi determinada por citometria de fluxo. A exposição a 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 μM de DP-LP por 24 horas resultou em um acúmulo de células na fase G2/M de $33,2 \pm 4,1$; $41,3 \pm 4,9$, $60,6 \pm 6,4$ e $72,5 \pm 2,7$ %, respectivamente (Fig. 23)

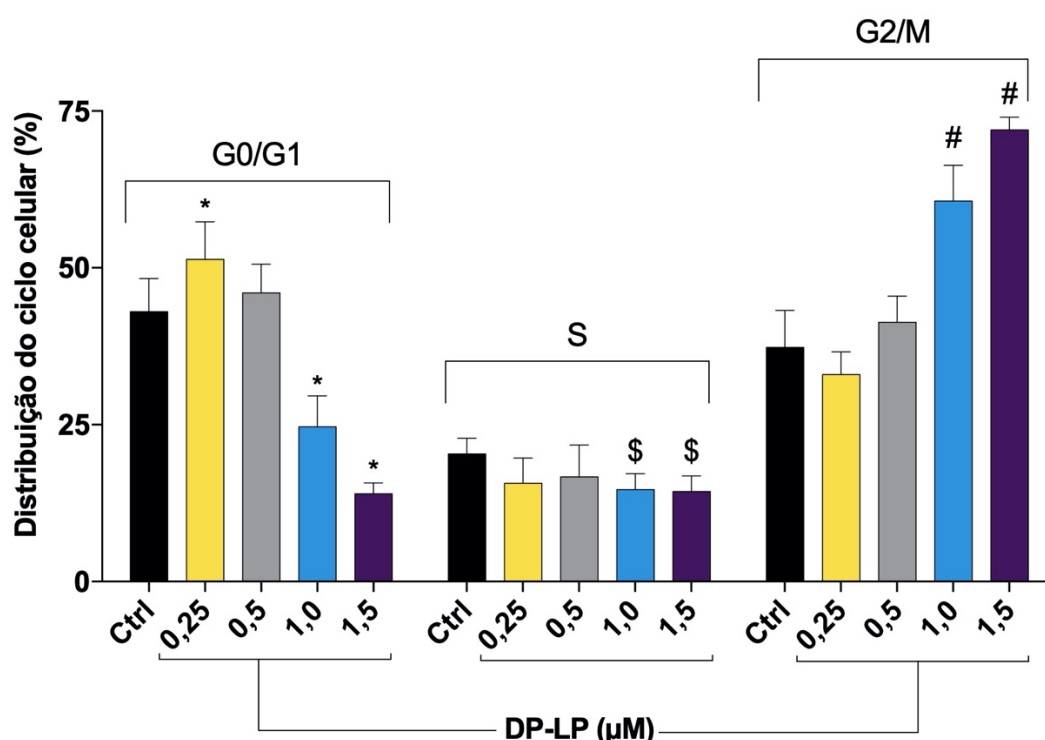


Figura 23. Efeito do complexo DP-LP sobre a cinética de ciclo celular de células DU-145. População celular relativa (%) representada pela média $\pm$ D.P de três experimentos independentes realizados em triplicata. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,1% (v/v)) utilizado para solubilizar o complexo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo na fase G0/G1, \$ $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo na fase S, # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo na fase G2/M por ANOVA, *one-way* e pós-teste de Dunnet.

Os resultados de citometria de fluxo mostraram que o complexo promoveu parada do ciclo celular na fase G2/M de maneira concentração-dependente, acompanhada pela diminuição do número de células nas fases S e G0/G1. Exceto na concentração de 0,25 μM , em que observou-se um aumento do número de células na

fase G0/G1. Esses resultados propõem que o complexo DP-LP é capaz de influenciar as vias de sinalização das CDKs e de genes ou proteínas associadas a formação dos microtúbulos, enfatizando sua importância como um agente anticâncer. Considerando que as vias de sobrevivência e morte celular estão intrinsicamente relacionadas, além de induzir parada do ciclo celular e morte por apoptose, o complexo DP-LP, por consequência de sua influência nesses mecanismos, pode inibir a proliferação celular como demonstrado pelos ensaios e sobrevivência clonogênica.

De fato, complexos de rutênio têm sido reportados como agentes indutores de apoptose, agindo por meio da via intrínseca ou mitocondrial, ou pela via extrínseca a partir da ativação de receptores de membrana (DE CARVALHO et al., 2018; DENG et al., 2017; MELLO-ANDRADE et al., 2017). Mello-Andrade et al. (2017) reportaram que complexos de rutênio contendo fosfinas e bipyridinas induziram apoptose em células de câncer de cólon HCT116 por meio da via mitocondrial dependente de caspases.

Predominantemente, a mitocôndria age como o principal mediador intracelular do processo apoptótico. Quando sinais estressores alcançam a organela, ocorre, entre outras perturbações, o colapso do potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$) e consequente permeabilização da membrana (GRIVICICH et al., 2007). Com isso, proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo c, são liberadas para o citoplasma, desencadeando o processo apoptótico. Além disso, o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do $\Delta\psi$ (NITA; GRZYBOWSKI, 2016).

Como mencionado, o lapachol é uma naftoquinona capaz de induzir o estresse oxidativo por meio da formação intracelular de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($HO\cdot$) (KLOTZ et al., 2014). Recentemente, complexos metálicos de Ru(II), Co(III), Ni(II) e Cu(II) com naftoquinonas foram descritos como agentes antitumorais que aumentaram

o níveis intracelulares de ERO, promovendo danos no DNA e, subsequentemente, à morte celular (CORREA et al., 2015; TABRIZI; CHINIFOROSHAN, 2016; TABRIZI et al., 2017).

Para investigar se o estresse oxidativo está relacionado com a já comprovada atividade antiproliferativa do complexo DP-LP, os níveis intracelulares de ERO nas células DU-145 foram analisados por meio do Kit Cellular ROS/Superoxide Detection Assay (ab139476). Previamente, os níveis de espécies reativas totais foram avaliados em 1, 6, 12 e 24 horas após o tratamento com o complexo DP-LP por meio da sonda fluorescente H₂DCFDA (2'-7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato).

Como apresentado na Figura 24A, após o tratamento das células com uma única concentração (IC₅₀) do complexo DP-LP, foi observado um aumento acentuado nos níveis de ERO no tempo de 24 horas. Em posse desses resultados, a determinação dos níveis de ERO e superóxido foi realizada após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações do complexo DP-LP. Os tratamentos mostraram que as células DU-145 exibiram um aumento de espécies reativas, com emissão de fluorescência verde a 525 nm, indicativo da produção de diferentes tipos de ERO (Fig. 24B). Além disso, nas menores concentrações observou-se a produção de superóxido, detectado pela fluorescência laranja captada a 620 nm. Ademais, na concentração 2,0 µM foi observado um decréscimo significativo nos níveis de espécies reativas, provavelmente porque nessa concentração grande parte das células já estavam mortas após 24 horas de tratamento. Os resultados provenientes dos complexos contendo lausona são apresentados no Capítulo 2.

Tal efeito pode estar relacionado, principalmente, com o uso do lapachol como ligante. Acredita-se que em condições aeróbicas, o oxigênio carbonílico do lapachol é reduzido, gerando o intermediário semiquinona (WELLINGTON, 2015). No entanto, em ambiente intracelular, ocorre a oxidação da semiquinona e redução do oxigênio

molecular para a espécie superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que, mediada pela enzima superóxido dismutase, se reduz para formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Numa reação conhecida como reação de Fenton, as espécies $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 reagem para formar o radical $\cdot OH$, responsável por desencadear o estresse oxidativo intracelular (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2014).

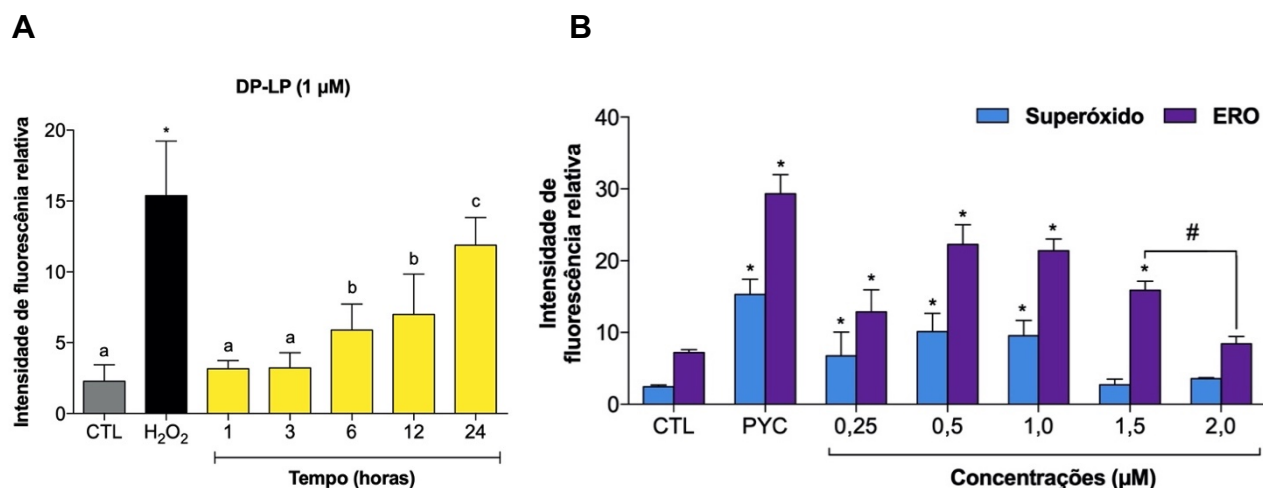


Figura 24. Efeito do complexo DP-LP nos níveis de espécies reativas intracelulares. (A) Níveis totais de espécies reativas em células DU-145 após 1, 3, 6, 12 e 24 horas de tratamento com o complexo DP-LP (1 µM). (B) Avaliação dos níveis de ERO e Superóxido após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações do complexo DP-LP. O controle negativo (CTL) recebeu o veículo dos complexos (DMSO 0,1% (v/v)). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 200 µM) e piocianina (PYC, 250 µM) foram utilizados como controles positivos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata ou quadruplicata. Os valores que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes entre si por ANOVA, *on-way* e pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ estatisticamente diferente do controle negativo e # $p < 0,05$ estatisticamente diferente entre os tratamentos por ANOVA, *one-way* e pós-teste de Dunnet.

Portanto, a fim de se verificar se o aumento na geração de espécies reativas está relacionado à citotoxicidade induzida pelo complexo DP-LP, novos tratamentos foram realizados. Nesses experimentos, foi adicionado o antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC), um agente citoprotetor que impede a morte celular induzida por ERO (HALASI et al., 2013). Os resultados desses testes mostraram que o cotratamento com NAC sequestrou as ERO induzidas pelo complexo DP-LP (Fig. 25A) e, além disso, preveniu a redução da viabilidade celular, avaliada pelo ensaio Alamar blue (Fig. 25B).

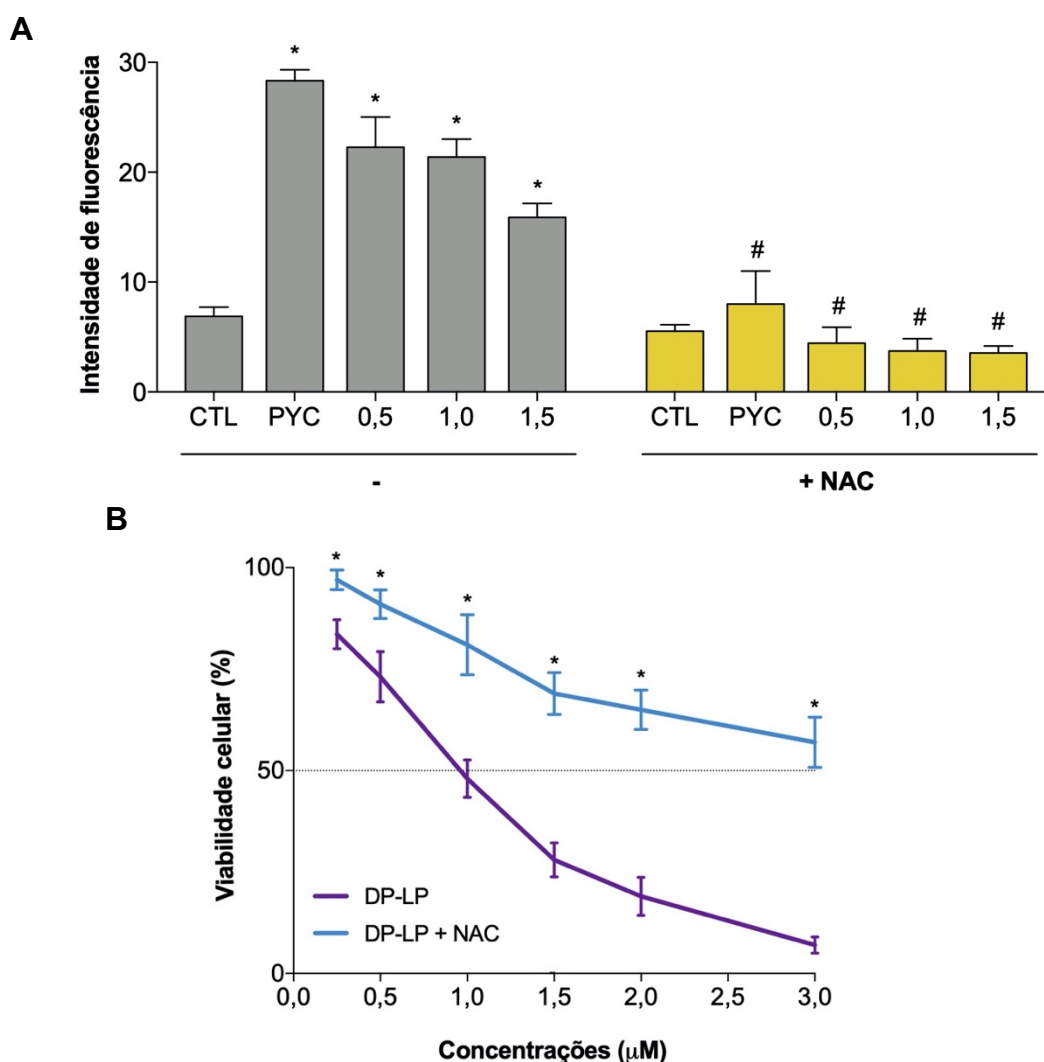


Figura 25. (A) Níveis de ERO após 24 horas de tratamento com complexo DP-LP nas concentrações de 0,5, 1 e 2 μ M na ausência (-) ou na presença (+) do antioxidante NAC (5 mM). (B) Viabilidade celular de células DU-145 avaliadas pelo ensaio de Alamar blue após 24 horas de incubação com diferentes concentrações (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 μ M) do complexo DP-LP na ausência (-) ou na presença (+) do antioxidante NAC (5 mM). O controle negativo (CTL) recebeu o veículo dos complexos (DMSO 0,1% (v/v)). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 200 μ M) e piocianina (PYC, 250 μ M) foram utilizados como controles positivos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata ou quadruplicata. # ou * $p < 0,05$ estatisticamente diferente do respectivo grupo na ausência de NAC, por ANOVA, *one-way* e pós-teste de Dunnet.

O NAC é um agente antioxidante, precursor da glutatona (GSH), reconhecido como inibidor específico da produção de ERO intracelular. De acordo com nossos resultados, enquanto que na concentração de 1,0 μ M o complexo DP-LP reduz em 48% a viabilidade das células DU-145, quando associado ao NAC (5 mM) observou-se

81% viabilidade de celular. Nossos resultados indicaram que o NAC reduziu em 80,2% os níveis intracelulares de ERO induzidos por 1,0 μ M do complexo DP-LP e preveniu a queda de até 52,6% da viabilidade celular após o cotratamento com 3 μ M do complexo.

Poucos estudos avaliaram o efeito do NAC na proteção contra os efeitos antiproliferativos mediados por ERO, induzidos por complexos metálicos. Entretanto, Wang et al. (2014) demonstraram que os danos no DNA de células HepG2 causados pela cisplatina foram atenuados com a adição do NAC. Além disso, os autores observaram um aumento na concentração de GSH intracelular, sugerindo que o NAC pode bloquear a oxidação do peptídeo causada pela cisplatina. Igualmente, Oliveira et al. (2019) observaram que o pré-tratamento com NAC reduziu a apoptose em células de leucemia HL-60, induzida por um complexo de platina com o ligante piplartina, um alcalóide pró-oxidante (BEZERRA et al., 2013). No geral, o NAC preveniu a diminuição da viabilidade celular das células DU-145 tratadas com o complexo DP-LP na maioria das concentrações analisadas, indicando que um possível modo de ação pelo qual o complexo induza a morte celular seja pelo aumento do estresse oxidativo intracelular.

De fato, o acúmulo de ERO no meio intracelular tem efeito direto na proliferação celular e na cascata de sinalização da apoptose. Esses achados podem ser justificados em parte pelos resultados obtidos nos ensaios de ciclo celular, em que o tratamento resultou em um aumento significativo do número de células na fase G2/M. O excesso de espécies reativas intracelulares pode causar danos ao DNA impedindo que as células afetadas prossigam com a divisão celular (ZHENG et al., 2018). Um dos mecanismos estabelecidos é o de que a indução de ERO pode desencadear a ativação da proteína quinase CHK1, cuja função central é a indução da parada do ciclo celular e da apoptose em resposta ao dano ao DNA celular (MACIP et al., 2006; ZHANG; HUNTER, 2014). CHK1 se liga e fosforila a proteína CDC25 (do inglês, *cell division cycle 25*), desencadeando sua degradação via ubiquitinação e degradação

proteossômica (BO et al., 2014; SCHULER et al., 2017). A inibição da atividade fosfatase da CDC25 leva ao aumento da fosforilação de tirosina quinase que inibe os complexos CDK-ciclina e bloqueia a progressão do ciclo celular. A CD25C apresenta atividade fosfatase específica para o complexo CDK1-ciclina B1, o qual contribui para a entrada na mitose. Portanto, o aumento das ERO diminui a níveis de CDC25C o que colabora para a parada do ciclo em G2/M (XIAO et al., 2005). Além disso, estudos apontam que o acúmulo de ERO inibe as proteínas Aurora-quinases, responsáveis pela conclusão da mitose após o reparo de eventuais danos no *checkpoint* G2/M (WANG et al., 2017).

Em resposta ao dano no DNA, proteínas quinases (ATM e ATR) são recrutadas, levando a interrupção do ciclo para correção do dano, prevenindo assim a transmissão dos erros às células em formação. Entretanto, se o dano não puder ser reparado, o destino celular pode ser morte ou parada permanente do crescimento (senescência) (SUROVA; ZHIVOTOVSKY, 2013). Quando células com danos irreparáveis são forçadas a entrar em mitose, elas sofrem parada permanente do crescimento ou morte celular por meio do chamado mecanismo de catástrofe mitótico. Tal mecanismo é impulsionado por uma cascata de sinalização complexa e ainda pouco compreendida, que precede a apoptose, necrose ou senescência (MC GEE, 2015; NAVARRO-SERER et al., 2019). De tal modo, a catástrofe mitótica atua em células que carregam danos como um mecanismo oncosupressivo para evitar a instabilidade genômica (VITALE et al., 2011). Em seu trabalho, Koceva-Chyła et al. (2016) descrevem complexos de rutênio como possíveis desencadeadores da catástrofe mitótica por induzirem células de câncer de mama à apoptose, à necrose e à autofagia. Os autores correlacionam alguns efeitos fenotípicos característicos da apoptose, como agregados de cromatina hipercondensados com a catástrofe mitótica à montante.

Em vista disso, pode-se propor que o complexo DP-LP induza a parada do ciclo na fase G2/M e, conseqüentemente, encaminhe as células para a apoptose pela geração de espécies reativas intracelulares. As ERO são reconhecidas por desencadearem o dano ao DNA, sendo esta uma ferramenta explorada como estratégia terapêutica. Quimioterápicos como doxorrubicina e cisplatina aumentam os níveis de ERO, o que contribui para sua genotoxicidade e, por conseqüente, indução da morte celular (CONKLIN, 2004; MARULLO et al., 2013). Assim como esses medicamentos, complexos de rutênio têm sido descritos como agentes indutores de danos ao DNA com seletiva atividade anticâncer em células de carcinoma de cólon (SILVA et al., 2019); próstata e mama (DE SOUSA et al., 2020) e em modelos *in vivo* de câncer de cólon (BALIZA et al., 2019). Baseados nisso, avaliamos se o complexo DP-LP é capaz de interagir com o DNA e causar danos, levando à instabilidade genômica.

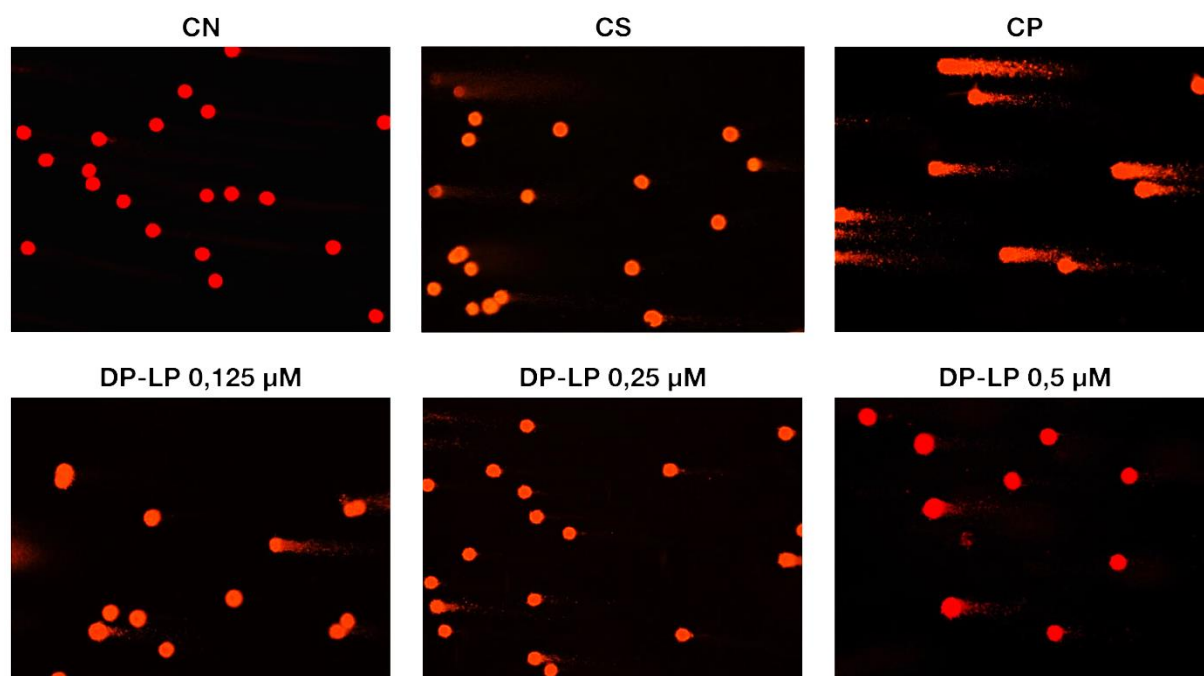
4.3 Avaliação da instabilidade genômica e interação com o DNA

As espécies reativas de oxigênio geradas pelo metabolismo ou induzidas por agentes oxidantes podem causar a instabilidade genômica. Esse efeito é constituído por vários eventos que levam à quebra de fita do DNA, à oxidação das bases e pentoses, às alterações na expressão gênica e na sequência do DNA, sendo responsável pelo surgimento de mutações no genoma de uma célula (CADET; WAGNER, 2013; KUMARI et al., 2018). Logo, agentes que possuam a capacidade de induzir alterações no material genético podem ser explorados como agentes anticâncer, pois a indução da instabilidade genômica é um efeito desejável contra células que possuem mecanismos de reparo alterados e acúmulo de outras mutações, tais como as células tumorais (ROWE et al., 2008). Além disso, a instabilidade

genômica, que pode ser desencadeada por danos ao DNA, promove o aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas, contribuindo para a indução da morte celular por apoptose (PETROS et al., 2004).

Desse modo, a detecção da genotoxicidade, que consiste na capacidade de um agente induzir danos no material genético, é uma ferramenta bastante explorada para a identificação de compostos que interfiram na proliferação celular e induzam a morte celular programada (KUMARI et al., 2018). Um ensaio amplamente utilizado para a detecção de danos ao DNA é o ensaio do cometa. Esse ensaio baseia-se na avaliação da migração do DNA em um gel de agarose e permite a detecção de quebras de fita simples e de fita dupla do DNA, passíveis de reparo. Por meio da análise dos dados obtidos nesse ensaio, que estão detalhados na Figura 26, foi possível constatar que o complexo DP-LP causou danos ao DNA das células DU-145 apenas após 24 horas de tratamento.

A



B

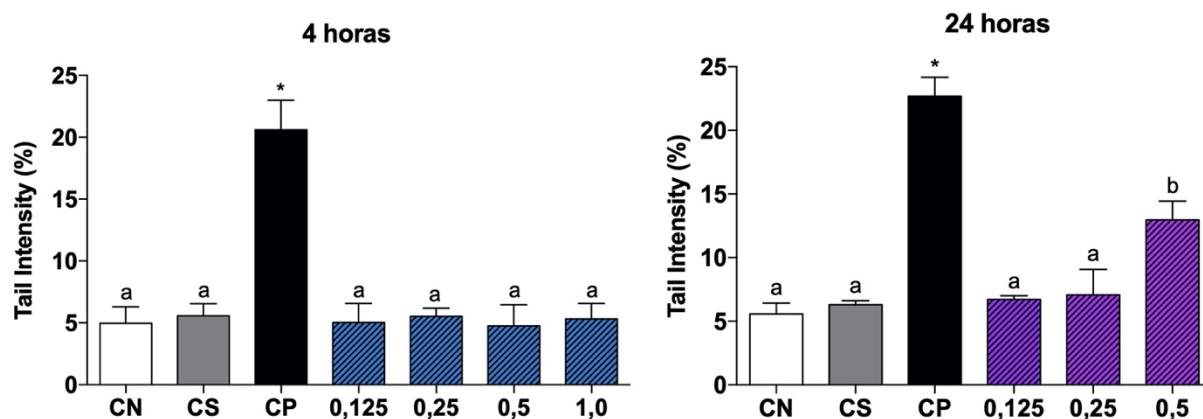


Figura 26. (A) Imagens representativas dos tratamentos de 24 horas durante a análise do ensaio do cometa das células DU-145. Aumento de 200x. (B) *Tail Intensity* (% de DNA na cauda) dos 300 nucleoides avaliados da linhagem tumoral DU-145, após o tratamento com o complexo DP-LP. O controle negativo (CN) recebeu apenas meio de cultura, o controle solvente recebeu o veículo dos complexos (DMSO 0,1% (v/v)) e o controle positivo (CP) foi tratado com metilmetanosulfonato (MMS, 150 μM). Os dados estão expressos pela média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, *one-way*, Tukey, $p < 0.05$). * Diferente do controle negativo (Teste *t* de Student, $p < 0.05$). Fonte: Rone A. De Grandis, 2018.

Em um primeiro momento, foram realizados quatro tratamentos com as concentrações de 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 μM do complexo DP-LP. No entanto, as células tratadas por 24 horas apresentaram viabilidade inferior a 70% na concentração de 1,0 μM, não sendo, portanto, utilizadas no ensaio do cometa. A análise de algumas lâminas desse tratamento permitiu identificar a formação de "células fantasmas (*ghost cells*)" ou "células com núcleos não-detectáveis (*non-detectable cell nuclei – NDCN*)" (Figura 27). A exclusão dessas células na análise dos dados é recomendada para evitar o "falso positivo", uma vez que esse padrão de imagem é indicativo de células mortas. O teste *t* de *student* mostrou diferença estatisticamente significativa entre o controle negativo (CN) e o controle positivo (CP) em ambas as linhagens. Além disso, a concentração de 0,5 μM foi capaz de aumentar estatisticamente ($p < 0.05$; Tukey) os índices de danos no DNA avaliados pela porcentagem de DNA na cauda do cometa (*tail intensity*) indicando, portanto, atividade genotóxica do complexo DP-LP na linhagem DU-145.

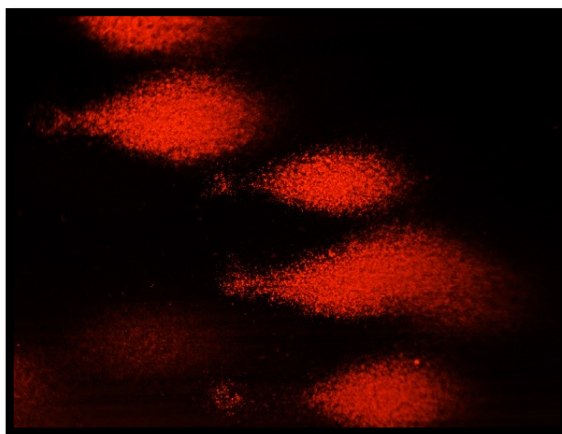


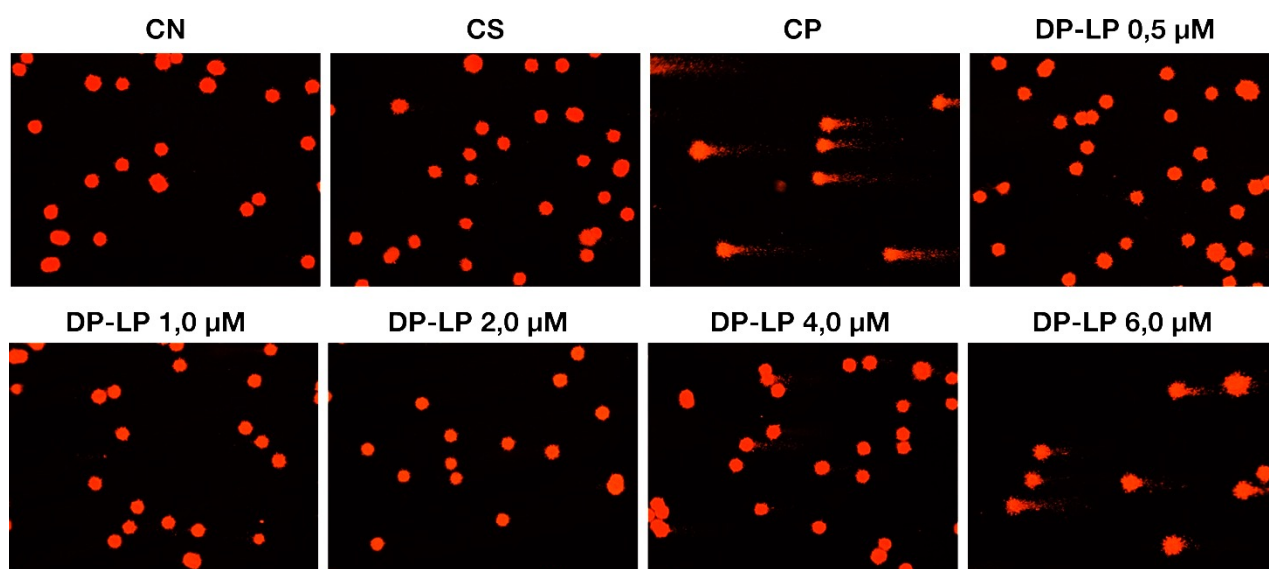
Figura 27. Imagem representativa do tratamento com 1,0 μM do complexo por 24 horas em células DU-145 do ensaio do cometa. Aumento de 200x. Fonte: Rone A. De Grandis, 2018.

O dano ao DNA é considerado uma marca registrada da apoptose (ELMORE, 2007). Desse modo, é possível inferir que a indução de apoptose causada pelo complexo DP-LP, verificada em outros experimentos, pode estar relacionada à fragmentação do DNA, evidenciada pelo ensaio do cometa.

De fato, vários trabalhos têm apresentado complexos de rutênio(II) com potencial para causar danos ao DNA, sendo essa atividade atribuída à natureza química de seus ligantes (CHEN et al., 2017; LI et al., 2014; SRISHAILAM et al., 2014). O metal rutênio, por sua vez, apresenta baixa toxicidade e não há indícios na literatura de que possua atividade genotóxica (ALLARDYCE; DYSON, 2001). Além disso, MELLO-ANDRADE et al. (2018) demonstraram que complexos de Ru(II) contendo ligantes fosfina (dppb) e bipyridina (bipy), muito semelhantes aos aqui estudados, não possuem atividade genotóxica ou mutagênica em modelos *in vivo*.

É bem descrito que as naftoquinonas podem induzir alterações no DNA por interação direta com o ácido nucleico ou mesmo por inibição de enzimas reguladoras que desempenham papel essencial na sua manutenção, as topoisomerases (PINHO et al., 2012). Essas ações são importantes para as atividades mutagênicas e genotóxicas das naftoquinonas. Além disso, o caráter pró-oxidante das quinonas naturais permite a

indução de dano oxidativo direto no DNA (HUSSAIN; GREEN, 2017). Ademais, tem sido relatado que o excesso de espécies reativas intracelulares pode atacar o DNA, resultando em danos e na ativação de várias proteínas sensoras de dano, como a ATM, proteínas histonas e a p53, que também podem desencadear o processo apoptótico (LEE et al., 2012). De fato, vários fármacos citotóxicos derivados de quinonas (p.e. daunomicina, doxorubicina, mitomicina c e mitoxantrona) foram aprovados pelo FDA para uso clínico (AVENDAÑO; MENÉNDEZ, 2008). No entanto, a janela terapêutica desses fármacos é estreita, visto que eles interferem na proliferação celular de modo geral. Assim, tecidos como o trato gastrointestinal e a medula óssea que estão em constante divisão celular, também tornam-se suscetíveis aos efeitos desses agentes (GOLAN, 2016). Esses problemas decorrentes da quimioterapia anticâncer têm estimulado a busca por fármacos mais seletivos (BRANDÃO et al., 2018). Nesse sentido, buscou-se avaliar também a atividade genotóxica do complexo DP-LP em linhagem não-tumoral. Na Figura 28 é possível observar que os tratamentos, nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 μM não influenciaram na porcentagem de danos ao DNA das células PNT-2, em relação controle negativo. Apenas a máxima concentração avaliada, de 6,0 μM do complexo DP-LP, foi capaz de induzir danos ao DNA, assim como o controle positivo.

A

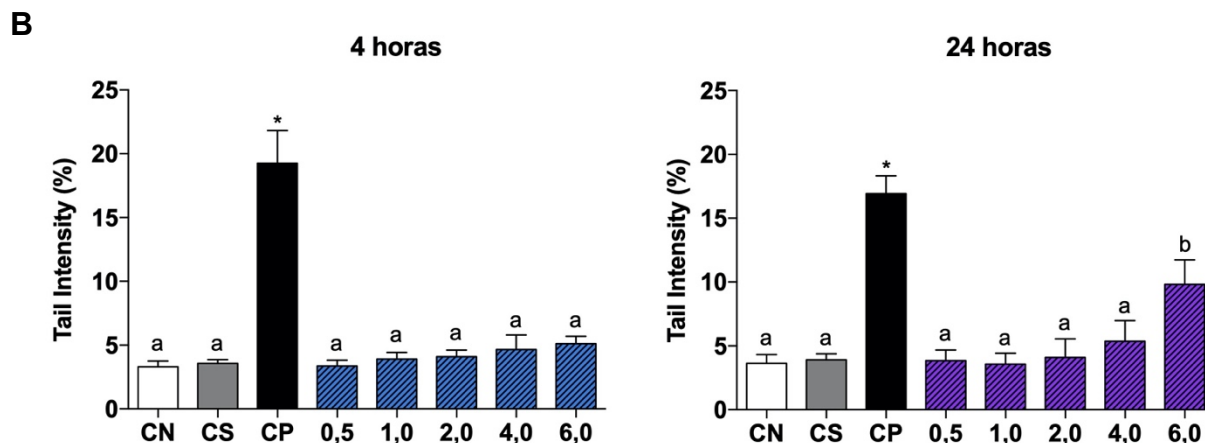


Figura 28. (A) Imagens representativas dos tratamentos de 24 horas durante a análise do ensaio do cometa das células PNT-2. Aumento de 200x. **(B) Tail Intensity** (% de DNA na cauda) dos 300 nucleoides avaliados da linhagem não-tumoral PNT-2, após o tratamento com o complexo DP-LP. O controle negativo (CN) recebeu apenas meio de cultura, o controle solvente recebeu o veículo dos complexos (DMSO 0,1% (v/v)) e o controle positivo (CP) foi tratado com metilmetanosulfonato (MMS, 150 μ M). Os dados estão expressos pela média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, one-way, Tukey, $p < 0.05$). * Diferente do controle negativo (Teste t de Student, $p < 0.05$). Fonte: Rone A. De Grandis, 2018.

Esse resultado indica que o complexo estudado possui seletividade para a linhagem de câncer de próstata pois, na concentração de 0,5 μ M, foram detectados danos ao DNA das células DU-145 (Fig. 26), enquanto que para a linhagem não-tumoral PNT-2, apenas a concentração de 6,0 μ M foi capaz de induzir danos. Ou seja, é necessária uma concentração 12 vezes maior do complexo para causar danos ao DNA das células não-tumorais. Naturalmente, células tumorais são mais susceptíveis em acumular danos ao DNA em relação a células saudáveis. Isso pode estar relacionado com a capacidade de reparo que normalmente está prejudicada em células cancerosas (TORGOVNICK; SCHUMACHER, 2015). Como já mencionado, um efeito seletivo também foi observado na citotoxicidade deste complexo para a linhagem DU-145, reforçando a evidência de que os danos excessivos ao DNA celular podem induzir à apoptose.

Entretanto, se o dano é menos severo, as células podem corrigi-lo por diversos sistemas moleculares de reparo do DNA. No entanto, quando as células não estão com

seus sistemas de reparo proficientes, os danos podem ser fixados no genoma por meio de mutações. Essas, por sua vez, quando acumuladas podem desencadear o processo de carcinogênese (LAWLEY, 1989). Contudo, com a progressão tumoral, a célula cancerosa adquire novamente a capacidade de reparar os danos no genoma, pois, do contrário, se tornariam excessivos levando a célula à morte programada.

Portanto, os mecanismos de reparo do DNA possuem um papel duplo no câncer. Nos estágios mais avançados, eles atuam para manter a estabilidade de um cariótipo aberrante; logo, são ativados para evitar a catástrofe mitótica (ASHKENAZI et al., 2008; JIANG et al., 2017). O papel duplo dos mecanismos de reparo no câncer oferece oportunidades para a terapia anticâncer. Uma vez que o acúmulo excessivo de dano genético leva a célula à morte, uma forma seletiva de combate ao câncer é na indução de danos ao DNA de células tumorais que possuem ineficiência nos processos de reparo, enquanto as células não-tumorais – cujos mecanismos de reparo estão intactos – podem corrigi-los e, assim, permanecerem viáveis (HOE et al., 2014).

Terapias alvo contra o câncer baseiam-se na capacidade de fármacos genotóxicos serem administrados em pacientes que apresentam células tumorais com deficiência em seus sistemas de reparo. Estudos mostraram que os adutos no DNA ocasionados pela terapia com cisplatina são removidos pelo sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês *nucleotide excision repair*), do qual faz parte o complexo ERCC1-ERCC4. Assim, os pacientes com carcinoma pulmonar que possuem mutações no gene *ERCC1* responderam à cisplatina, pois as células do tumor foram incapazes de corrigir o dano. Já as células saudáveis que expressam o gene *ERCC1* puderam reparar os danos causados pela cisplatina, diminuindo os efeitos adversos da terapia (ARORA et al., 2010; MCNEIL; MELTON, 2012).

Nesse sentido, procurou-se avaliar por meio do teste do micronúcleo se o complexo DP-LP é capaz de induzir mutações cromossômicas nas células de próstata

DU-145 e PNT-2. Nesse ensaio foram consideradas as concentrações que induziram danos ao DNA detectados pelo ensaio do cometa. Segundo Fenech (2000) para a análise de micronúcleos, as culturas devem apresentar um percentual de células binucleadas acima de 35%. Nesse estudo, em todos os tratamentos e controles, o percentual de células binucleadas foi superior a 60%, portanto, todos os tratamentos puderam ser analisados. Como pode ser observado na Tabela 4 o complexo DP-LP, nas concentrações de 0,5 e 1,0 μM , aumentou a frequência de micronúcleos (MNi) encontrados na linhagem celular DU-145.

Os resultados obtidos para a linhagem DU-145, demonstraram um aumento significativo da frequência de MNi no controle positivo ($p < 0,05$) em comparação com o controle negativo, validando o teste. Além disso, o complexo DP-LP apresentou efeito mutagênico nas concentrações de 0,5 e 1,0 μM . Com relação ao parâmetro CBPI, referente à proliferação celular, nenhuma alteração significativa foi observada nos grupos tratados ($p > 0,05$). Ao passo que o ensaio do cometa detecta lesões primárias no DNA, ainda passíveis de serem reparadas, o teste do micronúcleo identifica alterações estruturais como quebra ou perda de cromossomos.

Tabela 4. Frequência de micronúcleos (MNi) e índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese (CBPI) em cultura de células DU-145 após 24 horas de tratamento com o complexo DP-LP.

Tratamentos	Média de 2000 células binucleadas	
	MNi	CBPI
Controle negativo	13,0 ± 1,5	1,61 ± 0,04
Controle solvente	11,3 ± 2,3	1,72 ± 0,10
Controle positivo	41,7 ± 8,0*	1,60 ± 0,05
DP-LP		
0,25 µM	10,3 ± 3,7	1,73 ± 0,07
0,5 µM	22,7 ± 3,1*	1,64 ± 0,04
1 µM	29,0 ± 5,0*	1,61 ± 0,08

Os valores apresentados são a média ± DP do número de micronúcleos (MNi) e índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese (CBPI) em células DU-145. O controle negativo recebeu apenas meio de cultura, o controle solvente recebeu o veículo dos complexos (DMSO 0,1% (v/v)) e o controle positivo foi tratado com mitomicina c (100 ng/mL).

* $p < 0,05$ estatisticamente diferente do controle negativo por ANOVA, *one-way* e pós-teste de Dunnet.

O complexo DP-LP foi capaz de induzir danos ao DNA das células DU-145 na concentração de 0,5 µM que foram, possivelmente, fixados por meio de mutações cromossômicas evidenciadas pelo aumento de micronúcleos nas concentrações de 0,5 e 1,0 µM (Figura 29). Esses resultados permitem inferir que as lesões geradas não foram reparadas e, portanto, perpetuadas em mutações que comprometeram a viabilidade celular.

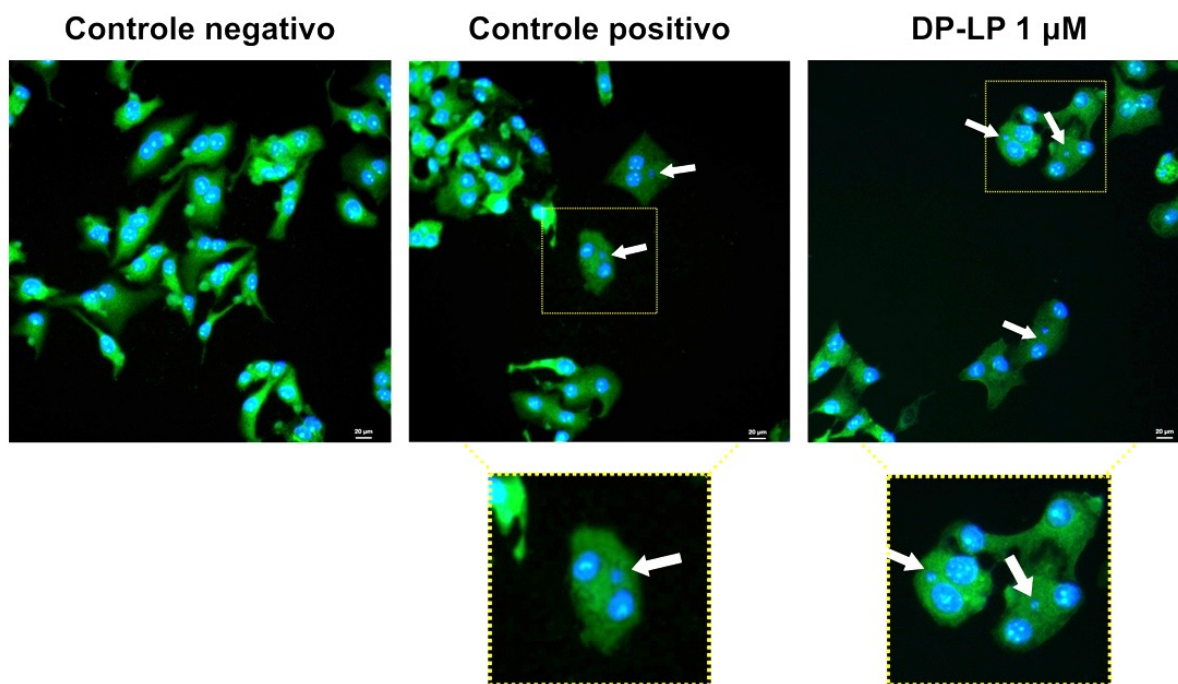


Figura 29. Imagens representativas de células DU-145 marcadas com Hoechst 33342 (núcleo) e FITC (citoplasma). As setas nas figuras indicam a presença de micronúcleos em células binucleadas. As imagens correspondem a uma das triplicatas capturadas no aparelho INCell Analyzer 2000 com magnitude de 200x. Os controles experimentais foram constituídos por meio de cultura (controle negativo) e mitomicina c (100 ng/mL) (controle positivo). Fonte: Rone A. De Grandis, 2018.

A progressão das células epiteliais da próstata de um estado normal, em que a proliferação e apoptose estão equilibradas, para um estado maligno envolve a combinação de eventos resultando na ativação de oncogenes, além da perda de função de genes supressores tumorais (LIMA et al., 2018). Os genes supressores de tumor *TP53* e *PTEN* são importante para a carcinogênese prostática e estão naturalmente pouco expressos em células de câncer de próstata (MIMEAULT; BATRA, 2005). Vaz et al. (2010) demonstraram que o oncogene *c-MYC* é altamente expresso em linhagens celulares de próstata DU-145, PC-3, LNCaP, PNT-2 e PNT-1A. Já os genes supressores de tumor *RB1* e *TP53*, que se mostraram abundantemente expresso nas linhagens não-neoplásicas de próstata (PNT-1A e PNT-2), possuem um alelo mutado na linhagem DU-145. A proteína P53 tem sido extensivamente estudada pela sua capacidade de prevenir a proliferação de células com o genoma danificado,

sendo considerada "a guardiã do genoma" (LANE, 1992; TOUFEKTCHAN; TOLEDO, 2018). Logo, em células com o gene *TP53* funcional, o sistema de reparo de DNA tende a ser eficiente. De fato, os resultados encontrados para a linhagem não-tumoral, evidenciados na Tabela 5, corroboram com essas afirmações, pois não foi observado qualquer aumento na frequência de micronúcleos nas células PNT-2. Nas células PNT-2, a concentração de 6,0 μM induziu danos ao DNA (Fig. 28). Todavia, nenhuma das concentrações avaliadas no teste do micronúcleo foi capaz de induzir efeito mutagênico.

Resultados positivos para a genotoxicidade e negativos para a mutagenicidade permitem deduzir que os danos foram reparados antes de serem fixados no genoma. A linhagem PNT-2 é proficiente para o gene *TP53* e isso pode explicar a ausência de efeito mutagênico nessa linhagem. O *European Center for Validation of Alternative Methods* (ECVAM) sugere para os ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade *in vitro* que as linhagens celulares sejam proficientes no sistema de reparo de DNA (KIRKLAND et al., 2016). Como demonstrado na Tabela 5, 8,0 μM de DP-LP é capaz de diminuir a proliferação celular pelo bloqueio da citocinese. Ou seja, nessa concentração o complexo causa atrasos no ciclo celular das células PNT-2.

Tabela 5. Frequência de micronúcleos (MNI) e índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese (CBPI) em cultura de células PNT-2 após 24 horas de tratamento com o complexo DP-LP.

Tratamentos	Média de 2000 células binucleadas	
	MNI	CBPI
Controle negativo	8,5 ± 0,5	1,80 ± 0,12
Controle solvente	7,0 ± 0,0	1,81 ± 0,06
Controle positivo	19,3 ± 0,9*	1,75 ± 0,15
DP-LP		
4 µM	8,2 ± 1,3	1,84 ± 0,11
6 µM	6,7 ± 0,8	1,80 ± 0,07
8 µM	5,5 ± 0,4	1,51 ± 0,09*

Os valores apresentados são a média ± DP do número de micronúcleos (MNI) e índice de proliferação pelo bloqueio da citocinese (CBPI) em células PNT-2. O controle negativo recebeu apenas meio de cultura, o controle solvente recebeu o veículo dos complexos (DMSO 0,1% (v/v)) e o controle positivo foi tratado com mitomicina c (100 ng/mL). * $p < 0,05$ estatisticamente diferente do controle negativo por ANOVA, *one-way* e pós-teste de Dunnet.

Em resposta a dano irreversível ao DNA, a proteína P53 que atua como fator de transcrição, aumenta a expressão de Bax (proteína pró-apoptótica) que forma poros na mitocôndria e promove a liberação de citocromo c, desencadeando o processo apoptótico (KRUISWIJK et al., 2015). Nossos resultados sugerem que o complexo DP-LP induz à apoptose independentemente de P53, o que é uma propriedade importante quando se visa um tratamento de amplo espectro. Alguns estudos mostraram que a ativação da proteína ERK, após o dano ao DNA, pode induzir a apoptose por uma via independente de P53 (SINGH et al., 2007; TANG et al., 2002), e isso se mostra bastante conveniente uma vez que cerca de metade dos tumores humanos possuem mutações em *TP53* (HOE et al., 2014). A capacidade de se induzir apoptose sem o envolvimento de P53 pode ser útil na terapia uma vez que vários tumores adquirem

resistência a agentes citotóxicos devido a mutações que acometem o gene que codifica essa proteína.

Vários estudos de mecanismo de ação de complexos metálicos com potencial anticâncer envolvem o conhecimento de sua interação com a biomolécula de DNA, sendo ela considerada um dos principais alvos dessa terapia. A cisplatina, por exemplo, após ser biotransformada, interage avidamente pelo DNA por meio da formação de ligações covalentes nos resíduos de guanina (KELLAND, 2007). Essa alteração estrutural impede a proliferação celular pelos danos causados ao DNA durante sua replicação (BASU; KRISHNAMURTHY, 2010). Neste trabalho foram utilizadas as técnicas de dicroísmo circular, eletroforese em gel e deslocamento competitivo de Hoechst, para avaliar a interação dos complexos contendo lapachol com o DNA. As análises de interação dos complexos que contém o ligante lausona estão descritas na publicação de DE Grandis et al. (2019). Inicialmente, a interação dos complexos com o CT-DNA foi investigada por dicroísmo circular. O dicroísmo circular (CD) é uma técnica muito sensível e útil para monitorar alterações na estrutura secundária do DNA, por meio de duas bandas na região do UV, uma banda positiva, em 275 nm, devido ao empilhamento de bases, e uma banda negativa em 245 nm, devido a helipticidade do DNA (giro para a direita) (DASH et al., 2014). Assim, alterações no espectro de CD do DNA, na presença de outras moléculas, podem ser atribuídas às alterações em sua estrutura. Deste modo, o CT-DNA foi incubado com os complexos em diferentes proporções molares (0,1-0,4), as bandas foram analisadas, e os efeitos são mostrados na Figura 30A-D.

As intensidades das bandas negativas e positivas do CT-DNA não mostraram mudança significativa na intensidade com a adição dos complexos de rutênio. Analisando-se os espectros da Figura 30 nota-se um pequeno aumento na elipticidade

das bandas em 275 e 245 nm para o complexo BB-LP e BP-LP, já nos complexos DB-LP e DP-LP foi observado uma pequena alteração na banda em 245 nm.

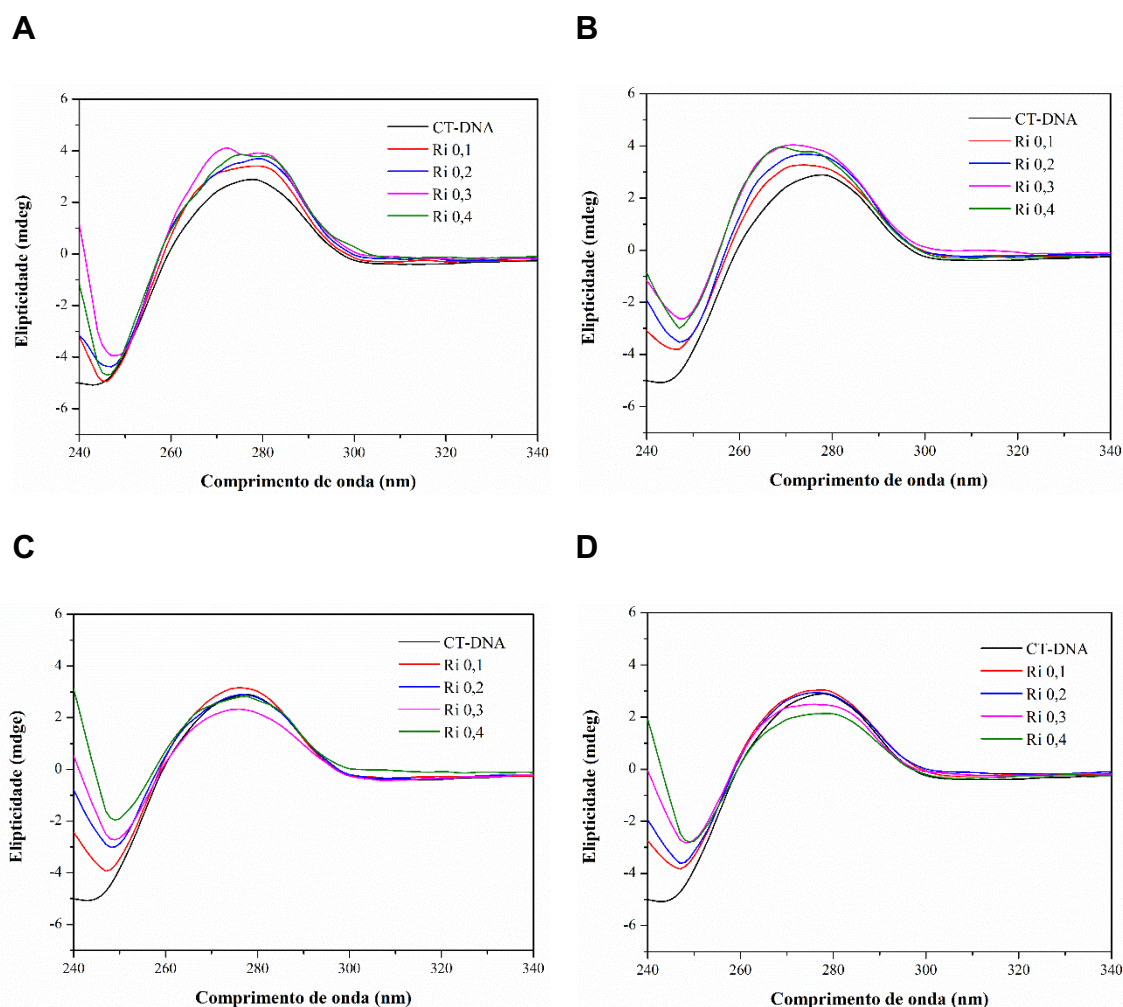


Figura 30. Espectros de emissão de fluorescência dos complexos BB-LP (A), BP-LP (B), DB-LP (C) e DP-LP (D), na presença de quantidades crescentes de CT-DNA. Espectros de CD do CT-DNA (50 μ M) na ausência e presença dos complexos em diferentes proporções molares ($R_i = [\text{complexo}] / [\text{DNA}]$), após 18 horas de incubação a 37 ° C.

No caso de interações por intercalação ou pelos sulcos do CT-DNA, têm-se mudanças nas intensidades das duas bandas do DNA, em função da estabilização da forma B (KRISHNAMOORTHY et al., 2012). Contudo, as alterações observadas nos espectros do DNA após incubação com os complexos não podem afirmar que esteja ocorrendo interações por intercalação ou pelos sulcos do DNA. A eletroforese em gel de agarose foi outra técnica utilizada para avaliar a interação dos complexos com o DNA,

na qual a mobilidade eletroforética do DNA depende do seu tamanho e da sua forma. Nessa técnica foi empregado o DNA plasmidial pBR322, que possui formas superenoveladas (SC), circulares abertas (OC) e lineares (L), sendo que cada uma dessas formas possui mobilidade diferente no gel de agarose. A interação dos complexos com o pBR322 pode causar a relaxamento da forma SC, e alterar a mobilidade eletroforética, já que as formas relaxadas (OC e L) migram mais lentamente (FRIK et al., 2014). Na Figura 31A encontra-se o gel de eletroforese do pBR322 na presença dos complexos BB-LP e BP-LP, em diferentes relações molares. Na linha do DNA é possível observar a presença das três bandas do DNA plasmidial pBR322, sendo a forma SC majoritária. Além disso, verifica-se que a porcentagem de DMSO usada não afeta o experimento. Nas linhas correspondentes as relações molares (R_i) 0,5 e 1,0 do complexo BP-LP, observa-se a influência do complexo na estrutura do DNA, com a diminuição da intensidade das bandas OC, L e SC de forma dependente da concentração.

Na Figura 31B é observado alteração na mobilidade da banda SC de pBR322, na R_i 1,0 do complexo DP-LP, mostrando um arraste na banda SC, indicando a clivagem do DNA. Para os complexos BB-LP e DB-LP não foi observado alterações nas bandas do pBR322. Comparando-se as estruturas dos complexos BB-LP e BP-LP, nota-se diferença apenas no ligante diimínico, no caso do BP-LP tem-se a 1,10-fenantrolina (phen), que possui uma maior extensão planar que o ligante 2,2-bipiridina (bipy) presente no BB-LP, o que poderia estar contribuindo para uma interação mais efetiva entre o complexo BP-LP e o DNA pelos sulcos ou por intercalação

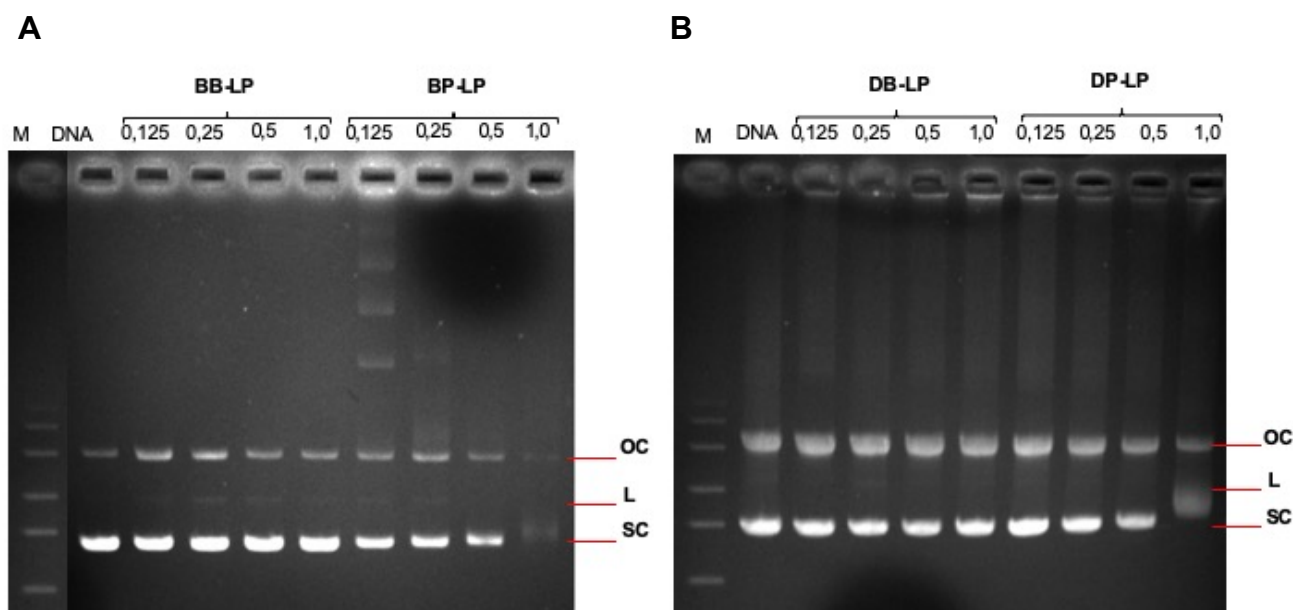


Figura 31. Mobilidade por eletroforese de DNA do plasmídeo pBR322 com quantidades crescentes de complexos BB-LP e BP-LP (A), e os complexos DB-LP e DP-LP (B), após 18 horas de incubação a 37 ° C. M = marcador de peso molecular; DNA = pBR322 (40 μ M) contendo 10% de DMSO; Relação molar complexo/DNA: 0,125; 0,25; 0,5; 1,0.

. O mesmo comportamento é observado para o complexo DP-LP, que possui um ligante phen em sua estrutura. Diante do que foi obtido nos ensaios de dicroísmo circular e eletroforese, os tipos de interações possíveis entre os complexos estudados e o DNA são: eletrostática, interações pelos sulcos ou intercalação.

Para investigar a possibilidade de interação dos complexos com o sulco menor do DNA, o ensaio de competição usando o Hoechst (HO), foi realizado. O HO é um corante fluorescente que interage com o DNA pelo sulco menor, quando sozinho em solução produz uma fraca fluorescência. No entanto, na presença de DNA, a intensidade de fluorescência do Hoechst 33258 é aumentada substancialmente. Qualquer molécula que se ligue ao DNA via mesmo modo que a HO, irá substituí-lo do sulco menor do DNA e resultar na supressão da intensidade de fluorescência do sistema HO/DNA.

A Figura 32A-D mostra alterações nos espectros de fluorescência do sistema Hoechst/CT-DNA após a adição dos complexos de rutênio. Observa-se uma diminuição

substancial na intensidade de fluorescência com o aumento da concentração dos complexos (0-125 μM), indicando que os complexos estão interagindo com o DNA pelos sulcos menores, com a substituição do HO. Em relação aos resultados obtidos CD e mobilidade eletroforética, é razoável considerar que existe uma interação fraca via sulco entre os complexos e o DNA.

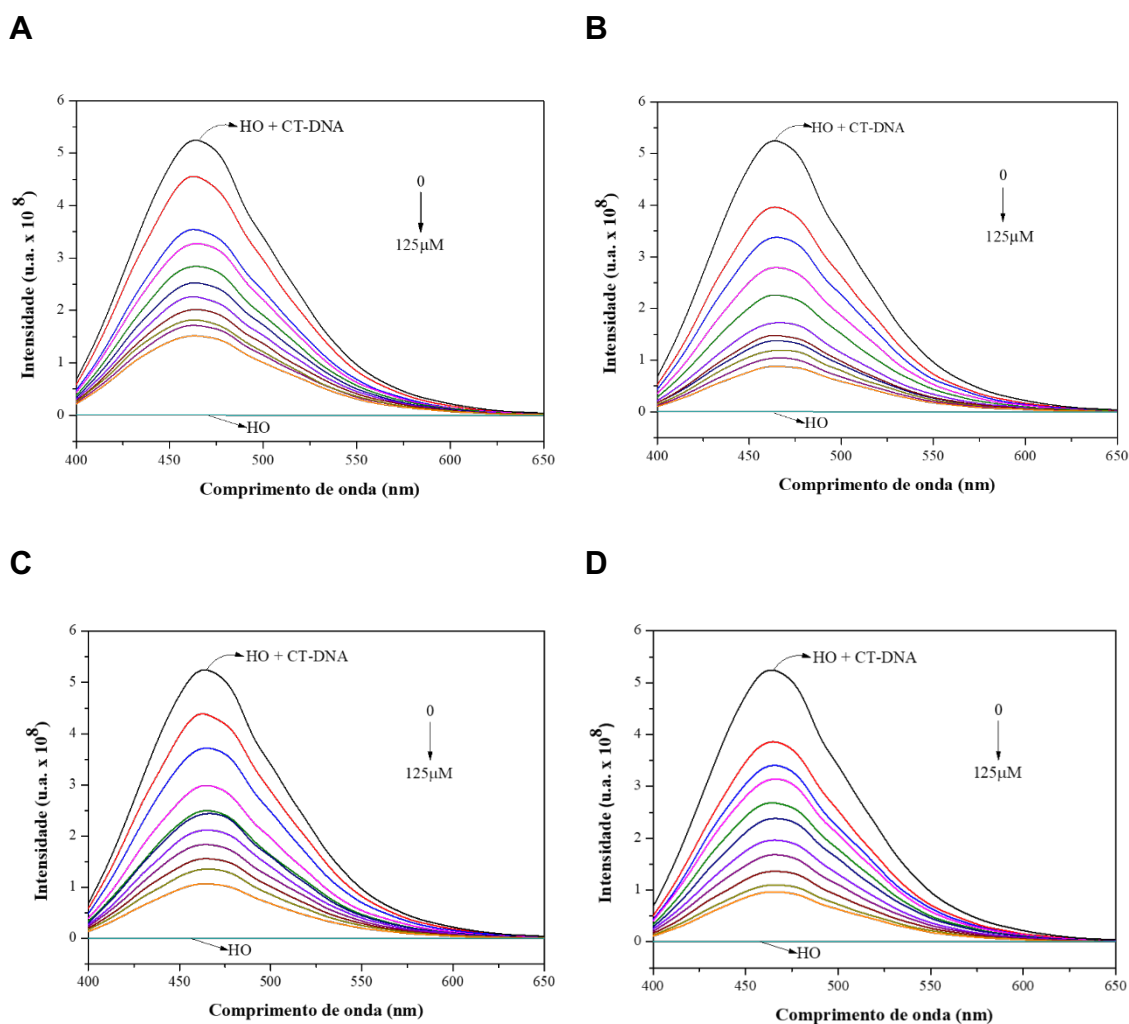


Figura 32. Espectros de emissão do Hoechst (2,7 μM), CT-DNA (125 μM), contendo diferentes relações molares [complexo]/[CT-DNA]. (A) BB-LP, (B) BP-LP, (C) DB-LP e (D) DP-LP, a 37 $^{\circ}\text{C}$ com $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$.

4.4 Análise da expressão transcricional e traducional de genes envolvidos com a atividade antiproliferativa

O mecanismo molecular subjacente ao efeito citotóxico do complexo DP-LP foi avaliado em nível da expressão de mRNA de genes alvos para terapias anticâncer. Esse complexo foi selecionado para essa análise pois apresentou resultados promissores, como descrito em relatórios anteriores. Entretanto, antes da realização dos procedimentos de RT qPCR a pureza e integridade do RNA extraído foi analisada a fim de se garantir a devida fidedignidade nos dados gerados pelos ensaios de expressão gênica.

Os resultados da quantificação do RNA total extraído das células DU-145 tratadas com o complexo DP-LP e do controle mostraram bom rendimento para a realização dos ensaios de RT2 Profile™ PCR Array, e todos os grupos apresentaram razões A260/A280 e A260/A230 próximas a 2,0, indicando a pureza das amostras após a extração de RNA (Tabela 6).

Tabela 6. Quantidade de RNA total dos grupos controle, dos grupos de células tratadas com o complexo DP-LP e razões A260/A280 e A260/A230.

Amostra	Qtde RNA (ng/ μ L)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
Controle (DMSO 0,1% (v/v))			
1	477,0	2,01	2,13
2	571,2	1,92	2,07
3	524,0	2,09	1,99
Tratamento (DP-LP 1,0 μM)			
1	553,1	2,10	1,99
2	542,4	2,07	1,97
3	591,0	2,00	2,10

Qtde RNA: quantidade de RNA (ng/ μ L). A₂₆₀/A₂₈₀: razão A₂₆₀/A₂₈₀, que mostra possíveis contaminações por DNA e proteína. A₂₆₀/A₂₃₀: razão A₂₆₀/A₂₃₀, que mostra possíveis contaminações por sais e compostos orgânicos, como a guanidina e fenol. Valores referentes a grupo.

A integridade das amostras de RNA foi analisada com o equipamento BioAnalyzer Agilent 2100. O princípio do BioAnalyzer é o mesmo de uma eletroforese em gel de agarose, mas a corrida é feita em um capilar contendo um polímero onde um

eletroferograma é gerado, e analisado automaticamente pelo aparelho que detecta qualquer traço de degradação. O resultado é exibido na forma de um gráfico, por meio do qual é possível calcular a razão 28S/18S com maior precisão a partir de seus respectivos picos, gerando dessa forma o que se denomina RIN (*RNA Integrity Number*). A integridade do RNA extraído das células tratadas e do controle apresentaram RIN superior a 9,1 e seus géis e gráficos de RIN podem ser observados na Figura 33.

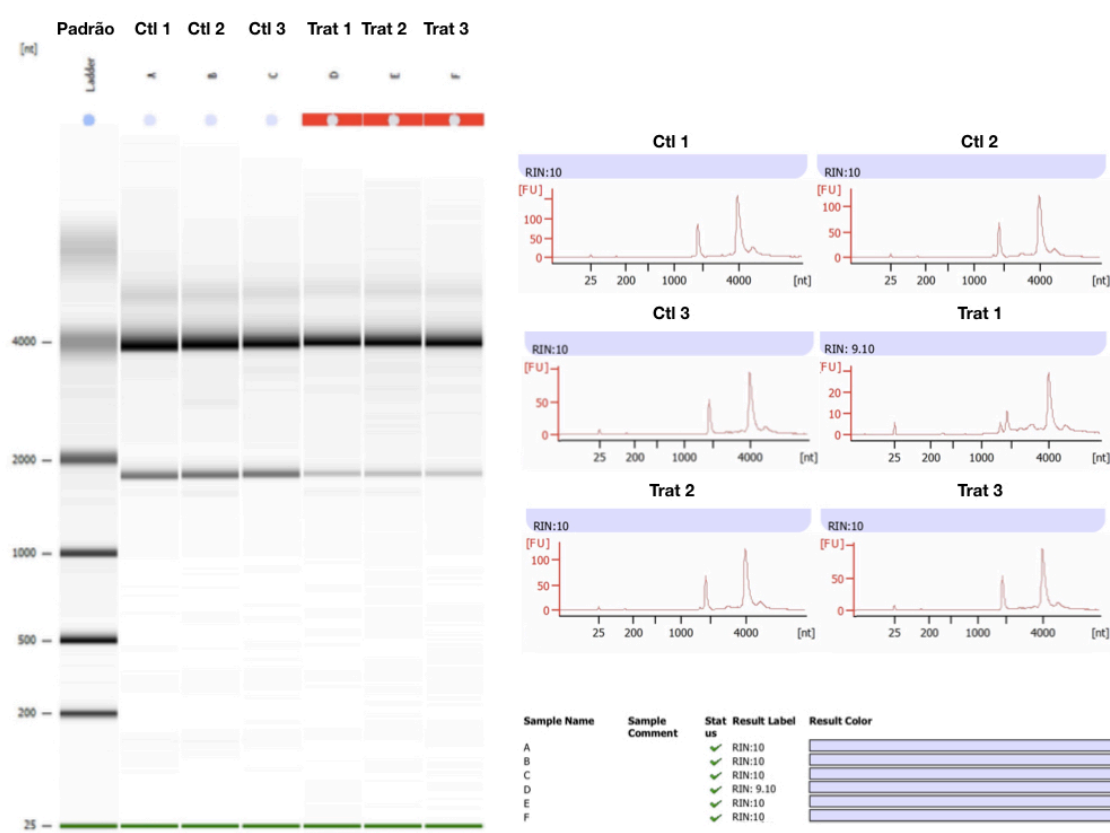


Figura 33. Gel de eletroforese capilar e número de integridade de RNA (RIN) do RNA total extraído das células DU-145. Grupo controle (Ctl1, Ctl2 e Ctl3) e tratamentos com o complexo DP-LP 1,0 µM (Trat1, Trat2 e Trat3). Fonte: Rone A. De Grandis, 2019.

Os valores de RIN estão numa escala de 1 a 10, sendo que, quanto maior é esse valor, melhor a qualidade e/ou integridade do RNA. De modo geral, para experimentos de RT qPCR, considera-se um RNA de boa qualidade quando o valor de RIN está acima de 7,5 (NITSCHKE, 2002). As amostras de RNA com alto grau pureza e

integridade foram posteriormente convertidas em cDNA para então serem submetidas as reações de PCR quantitativa em tempo real (RT pPCR) em placas de 96 poços contendo os iniciadores dos genes estudados. As reações de RT2 Profiler™ PCR Array obtiveram eficiências de amplificação dentro do limite recomendado, e os resultados da expressão relativa dos genes estão representados pelo número de vezes que aumentaram ou diminuíram a expressão quando comparados às células do grupo controle (DMSO 0,1% (v/v)). Foram considerados somente os genes que apresentaram alterações na expressão com nível de significância $p < 0,05$.

No presente estudo, foi avaliada a expressão de 84 genes pertencentes a diversas vias relacionadas com a carcinogênese (como apoptose, ciclo celular, reparo de DNA, epigenética, fatores de crescimento e outras vias de sinalização), com a proposta de identificar os efeitos antitumorais do complexo DP-LP sobre as células de carcinoma de próstata DU-145. Entre os 84 genes avaliados, 32 (38%) apresentaram alterações na expressão quando comparados ao controle ($p < 0,05$). Desses, 28 (87,5%) apresentaram a expressão diminuída e 4 (12,5%) apresentaram a expressão aumentada (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito do complexo de rutênio DP-LP sobre a expressão gênica de células DU-145.

Genes	Descrição do Gene	Regulação da expressão^a	Valor de <i>p</i>
Apoptose			
<i>BCL2</i>	<i>BCL2</i> apoptosis regulator	-4.14	0,0053
<i>BIRC5</i>	baculoviral IAP repeat containing 5	-6,36	0,0031
Fatores de crescimento e receptores			
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor	-4,11	0,0008
<i>ERBB2</i>	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2	-2.42	0,0001
<i>IGF1R</i>	Insulin-like growth factor 1 receptor	-2,70	0,0012
<i>PDGFRB</i>	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	-2,02	0,0025
Metabolismo de fármacos			
<i>GSTP1</i>	glutathione S-transferase PI 1	-2,87	0,0005
<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	+2,13	0,0006
Receptor de tirosina quinase			
<i>AKT1</i>	<i>AKT</i> serine/threonine kinase 1	- 2,59	0,0008
<i>AKT2</i>	<i>AKT</i> serine/threonine kinase 2	-2,64	0,0026
Proteínas quinase			
<i>AURKA</i>	aurora kinase A	- 5.29	0,0003
<i>AURKB</i>	aurora kinase B	- 11.07	0,0005
<i>AURKC</i>	aurora kinase C	- 2,98	0,0027
Ciclo celular			
<i>CDC25A</i>	cell division cycle 25A	-2.63	0,0042
<i>CDK1</i>	cyclin dependent kinase 1	-4.51	0,0029
<i>CDK2</i>	cyclin dependent kinase 2	-2.73	0,0034
<i>CDK4</i>	cyclin dependent kinase 4	-4,60	0,0018

CDK5	cyclin dependent kinase 5	-3,21	0,0003
CDK7	cyclin dependent kinase 7	+1,69	0,0017
MDM2	<i>MDM2</i> proto-oncogene	+1,58	0,0027
MDM4	<i>MDM2</i> proto-oncogene	+2,78	0,0067
PI-3 quinases e fosfatases			
MTOR	mechanistic target of rapamycin kinase	-3,81	0,0016
PIK3CA	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase	-2,72	0,0032
Proteínas <i>heat shock</i>			
HSP90AA	Heat shock protein 90 kDa alpha	-1,62	0,0008
HSP90B1	Heat shock protein 90 kDa beta	-1,69	0,0011
Histona deacetilases			
HDAC2	histone deacetylase 2	-1,78	0,0053
HDAC11	histone deacetylase 11	-1,70	0,0002
HDAC8	histone deacetylase 8	-1,84	0,0002
Poli (ADP-ribose) polimerases			
PARP1	poly(ADP-ribose) polymerase 1	-2,73	0,0004
PARP2	poly(ADP-ribose) polymerase 2	-2,97	0,0087
DNA topoisomerases			
TOP2A	DNA topoisomerase II alpha	- 2,10	0,0006
TOP2B	DNA topoisomerase II beta	- 2,81	0,0002

^aOs valores representam a média referente ao número de vezes que o gene foi alterado em relação ao grupo controle, em triplicata. Teste *t* de Student ($p < 0,05$) associado à alteração na expressão relativa maior ou menor do que 1,5 em relação ao grupo controle. Como controles endógenos, foram utilizados os genes *GAPDH* e *RPLP0*, considerando-se que a variação dos valores de Ct desses genes, entre os dois grupos avaliados (controle e tratamento) não foi crítica.

A indução da apoptose em células tumorais é uma estratégia bastante explorada na terapêutica. Os resultados de PCR Array demonstraram que o tratamento com o complexo DP-LP pôde induzir a apoptose em células DU-145 pela regulação negativa de *BCL2* e *BIRC5*. O proto-oncogene *BCL2* mostrou-se 4,14 vezes menos expresso

nas células tratadas. As proteínas da família BCL-2 suprimem a apoptose pela ligação com as proteínas BAX e BAK que são capazes de formar poros na mitocôndria e promover a liberação de citocromo c, desencadeando o processo apoptótico (KRUISWIJK et al., 2015). Lima et al. (2014) demonstraram que complexos de rutênio contendo ligantes fosfínicos diminuem consideravelmente a expressão do gene *BCL2* em células de sarcoma-180. Esse efeito provocou a perda do potencial de membrana mitocondrial e ativação de caspases, induzindo a apoptose, evidenciada por um aumento do número de células marcadas com Anexina V.

O tratamento com o complexo DP-LP também diminuiu a expressão do gene *BIRC5*, o qual foi 6,36 vezes menos expresso em relação ao controle. Esse gene codifica a proteína survivina, uma proteína antiapoptótica que bloqueia a morte celular dependente de caspases, estimula a angiogênese e a proliferação tumoral (GRONER; WEISS, 2014). A survivina se tornou um atrativo alvo de fármacos para o tratamento do câncer e diversos estudos têm explorado a diminuição da sua expressão em cânceres, pois sua inibição favorece a morte celular por apoptose. Estudos mostram que o bloqueio da transcrição do gene *BIRC5* em células de próstata PC-3 implantadas em animais resultou na inibição do crescimento do tumor (NAKAHARA et al., 2017). A inibição desse gene também está relacionada com o melhor efeito clínico do doxacetel em melanoma e da reversão da resistência à cisplatina em câncer de cabeça e pescoço (KUMAR et al., 2012; SATOH et al., 2009; YAMANAKA et al., 2011). Hurtado et al. (2018) mostraram que complexos de cobre(II) suprimiram a expressão de mRNA do gene *BIRC5*, bem como da proteína survivina em células de câncer de pâncreas. Esse efeito foi acompanhado de um aumento no número de células apoptóticas, parada do ciclo celular em G2/M e diminuição do crescimento de xenoinxertos tumorais em camundongos.

Além do estímulo androgênico, a proliferação de células da próstata é regulada

por vários fatores de crescimento que se ligam a receptores específicos de membrana, ativando vias promotoras de crescimento celular. Os resultados de PCR Array mostraram que o complexo DP-LP foi capaz de suprimir em 4,11 vezes a expressão do gene *EGFR* nas células DU-145. O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) apresenta relevante papel na tumorigênese prostática (KHARMATE et al., 2016). Ele encontra-se frequentemente superexpresso e tem sido associado a formas agressivas de câncer de próstata (SHAH; GHOSH; ELDER, 2008). Portanto, fármacos com a capacidade de modular essas vias são de grande interesse nos tratamentos de câncer de próstata hormônio-refratários (XU; WEIHUA, 2011).

A desregulação do ciclo celular é uma marca registrada do câncer que resulta na proliferação celular descontrolada (HANAHA; WEINBERG, 2011). As quinases dependentes de ciclina (CDKs), uma família de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, são frequentemente superexpressas ou mutadas em células cancerosas (BIZARI; SILVA; TAJARA, 2006). Assim CDKs são importantes alvos de fármacos que busquem promover a parada do ciclo celular (VIJAYARAGHAVAN et al., 2018). Os resultados de PCR Array mostraram que o complexo DP-LP promoveu a desregulação de vários genes que codificam CDKs, em especial *CDK4*.

A quinase CDK4, quando ativada pela ciclina D, forma o complexo ciclina-CDK responsável pela transição de células da fase G1 para a fase S (G1-CDK). Esse complexo promove a fosforilação da proteína RB1 durante a fase G1 e a liberação da família dos fatores de transcrição E2F que, por sua vez, levam à indução dos genes que codificam as proteínas ciclina E (G1/S-CDK) e ciclina A (S-CDK) necessárias para a transição do ciclo e duplicação do DNA (BAKER; REDDY, 2012). Agentes que regulem seletivamente a atividade do gene *CDK4* têm sido descritos na literatura pela sua capacidade de inibir a proliferação celular com efeitos tóxicos toleráveis (SHEPPARD; MCARTHUR, 2013). Essa atividade é maior em tipos de câncer que

possuem alterações genômicas que aumentam a atividade de CDK4/6, como no câncer de próstata (SCHETTINI et al., 2018). Portanto, os efeitos demonstrados pelo complexo DP-LP nas células DU-145 são relevantes pois agentes que controlam a atividade do gene *CDK4* podem contribuir no controle da proliferação celular seletiva, permitindo combinações com inibidores de outras vias de sinalização a fim de combater o desenvolvimento tumoral sem causar efeitos sistêmicos exacerbados.

Os resultados de PCR Array, também mostraram uma diminuição considerável na expressão de *AURKA* e *AURKB* que são genes que codificam as proteínas Aurora-quinases (AURORA-A e -B), as quais atuam em diversas fases do ciclo celular, como alinhamento dos cromossomos, formação do fuso mitótico e citocinese (GURDEN et al., 2018; TORCHIA et al., 2013). Diferentes trabalhos mostraram a expressão alterada de membros desta família em vários tipos de tumores e a inibição da atividade destas proteínas tem sido considerada uma potencial abordagem para o tratamento do câncer (TANG et al., 2002). AURORA-A e AURORA-B apresentam-se normalmente superexpressas em cânceres de próstata primários e tais padrões de expressão se correlacionam com tumorigenicidade, estadiamento clínico, status de margem cirúrgica e invasão tumoral (LEE et al., 2016). O tratamento com o complexo DP-LP diminuiu em 5,29 vezes a expressão do gene *AURKA*. Alguns estudos demonstram que a superexpressão de AURORA-A aumenta a motilidade celular, promovendo metástase (WANG et al., 2010)

Além disso, o complexo DP-LP reduziu significativamente a expressão do gene *AURKB* em células DU-145 (-11,07 vezes). Esse resultado pode indicar que o complexo inibe etapas da mitose, resultando no seu efeito antiproliferativo demonstrado pela inibição da clonogenicidade das células DU-145. A proteína quinase AURORA-B participa do CPC (do inglês, *chromosome passenger complex*), um complexo necessário para a ligação dos microtúbulos ao cinetocoro dos cromossomos, de forma

a garantir a fusão adequada para a divisão celular. Além disso, AURORA-B está envolvida na inibição da expressão de P21 por meio da supressão da atividade de P53, resultando na ativação aberrante de G1/S-CDK e S-CDK, o que leva à progressão do ciclo e proliferação celular desenfreada (TANG et al., 2017). Estudos mostram que o nocaute de *AURKB* mediado por RNA de interferência (RNAi) inibe substancialmente a proliferação de células tumorais de próstata PC-3, induzindo a morte celular por apoptose *in vitro*. Além disso, esse procedimento resultou na inibição do crescimento do tumor de próstata em camundongos, sendo que 40% dos animais nocauteados tornaram-se livres da doença (ADDEPALLI et al., 2009).

De fato, outros trabalhos mostraram que a inibição da AURORA-B tem efeito antiproliferativo e pode causar a regressão do câncer de próstata em modelos *in vitro* e *in vivo* (CHIEFFI et al., 2006; PAN et al., 2017; ZEKRIA et al., 2017).

Para inibir a atividade quinase de AURORA-B, moléculas capazes de ocupar o sítio de ligação catalítica foram identificadas, porém devido à alta homologia da subunidade catalítica das Aurora quinases, a maioria dos inibidores desenvolvidos até o momento não tem seletividade e inibem os outros representantes dessa família de proteínas (CHIEFFI, 2018). Nesse contexto, estudos pré-clínicos de fármacos que modulam especificamente a expressão do gene *AURKB*, associados ou não à quimioterapia convencional, têm demonstrando efeito aditivo ou mesmo sinérgico, abrindo novos caminhos para a terapia anticâncer (CHIEFFI, 2018; FANG et al., 2018). Assim, pode se propor que o complexo DP-LP representa um candidato promissor para estudos que busquem controlar a atividade do gene *AURKB* uma vez que o tratamento promoveu uma considerável diminuição da expressão desse gene em células DU-145.

Além dos grupos de genes alvos para terapias anticâncer discutidos acima, genes relacionados com a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR mostraram-se menos expressos em células DU-145 tratadas com o complexo DP-LP. Essa via, quando

superativada, desempenha um papel crítico na carcinogênese, promovendo importantes atividades celulares tais como proliferação, sobrevivência celular e angiogênese (PÓPULO et al., 2012). A via modulada por mTOR está normalmente superativada em cânceres de próstata e por isso, mostra-se como um interessante alvo para terapias dirigidas (LISS et al., 2018).

Em conjunto, os resultados de expressão gênica mostraram que o complexo DP-LP pode regular vários genes relacionados com vias de proliferação em células de carcinoma de próstata DU-145. Entre os genes que tiveram a expressão diminuída destacam-se *AURKA*, *AURKB*, *BIRC5*, *BCL2*, *CDK4*, *CDK1*, *CDK5* e *MTOR*. A regulação negativa desses genes reforça que o mecanismo de ação desse complexo envolva parada do ciclo celular em G2/M e indução da morte celular por apoptose. Portanto, foram também realizados ensaios para detecção de proteínas relacionadas com o ciclo celular e com a iniciação da resposta apoptótica.

Sabe-se que a apoptose é induzida principalmente pela ativação de receptores de morte (via extrínseca) e/ou pelo colapso do potencial de membrana mitocondrial (via intrínseca), levando à ativação de caspases. Caspases são uma importante classe de cisteína proteases que desempenham um papel importante no desencadeamento da apoptose pela clivagem e consequente ativação de diversos substratos celulares (RIEDL; SHI, 2004). Essas proteínas são expressas na sua forma inativa (pró-caspases) e são ativadas depois de serem clivadas no segmento N-terminal após sinais de morte celular (ELMORE, 2007).

A fim de esclarecer o mecanismo pelo qual o complexo DP-LP induz a morte celular apoptótica, a ativação da caspases-3 efetora e das caspases iniciadoras, caspase-8 (relacionada à via do receptor da morte) e caspase-9 (relacionada à via mitocondrial) foi avaliada pela técnica de *western blot*. Os resultados, representados nas Figuras 34 e 35, mostram que o tratamento com o complexo DP-LP aumentou de

forma significativa a expressão da caspase-3 e -9 quando comparado com as células não tratadas. Por outro lado, o complexo não exerceu quase nenhuma influência sobre a expressão da caspase-8 clivada. Os resultados ainda revelaram um aumento notável na atividade da caspase-9 de maneira dependente da concentração a partir de 1,0 μ M de DP-LP, o que indica que a via de sinalização apoptótica mitocondrial está envolvida na citotoxicidade induzida pelo complexo DP-LP. Essa proteína é uma caspase iniciadora chave na via intrínseca da apoptose.

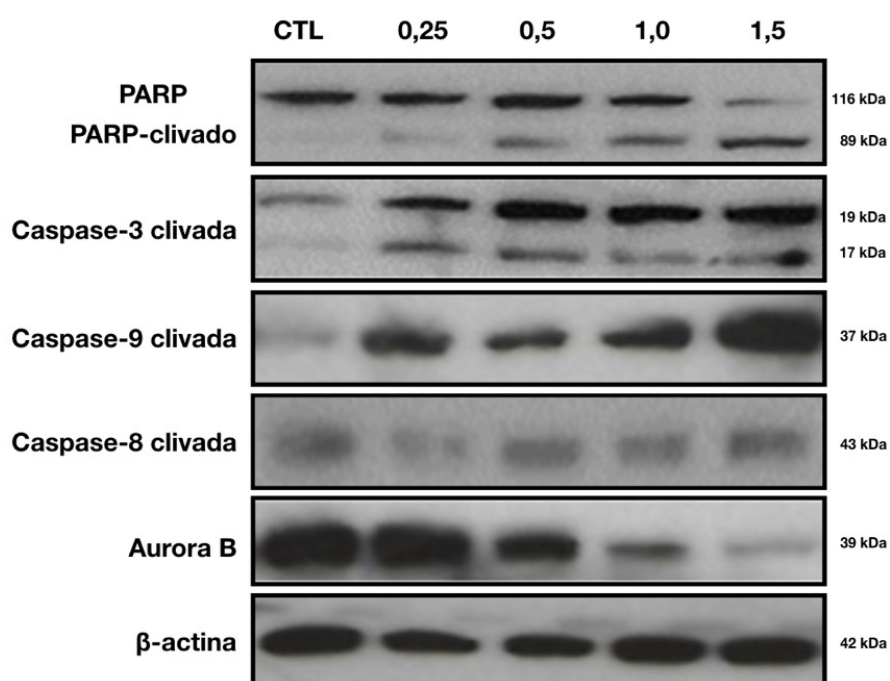


Figura 34. Expressão das proteínas PARP, PARP-clivada, caspase-3 clivada, caspase-9 clivada, caspase-8 clivada, AURORA-B e do controle endógeno β-actina em células DU-145 analisada por western blot. As células foram tratadas por 24 horas com o complexo DP-LP nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 M. O controle negativo (CTL) recebeu o veículo dos complexos (DMSO 0,1% (v/v)). Fonte: Rone A. De Grandis, 2019.

Estímulos apoptóticos, como danos ao DNA, podem provocar a perda da atividade anti-apoptótica controlada pela família BCL-2. Na ausência de tal supressão, poros são formados na membrana mitocondrial interna o que resulta na perda do potencial transmembrana e consequente liberação de proteínas pró-apoptótica, tal como o citocromo c. No citoplasma, o citocromo c liga-se a APAF-1 (do inglês, *Apoptotic protease activating factor 1*), bem como à pró-caspase-9, formando o

“apoptossoma”. Assim, a caspase-9 ativa a caspase-3 a qual inicia a clivagem de substratos específicos resultando na ativação proteases que conduzem à condensação da cromatina e à fragmentação do DNA (ELMORE, 2007).

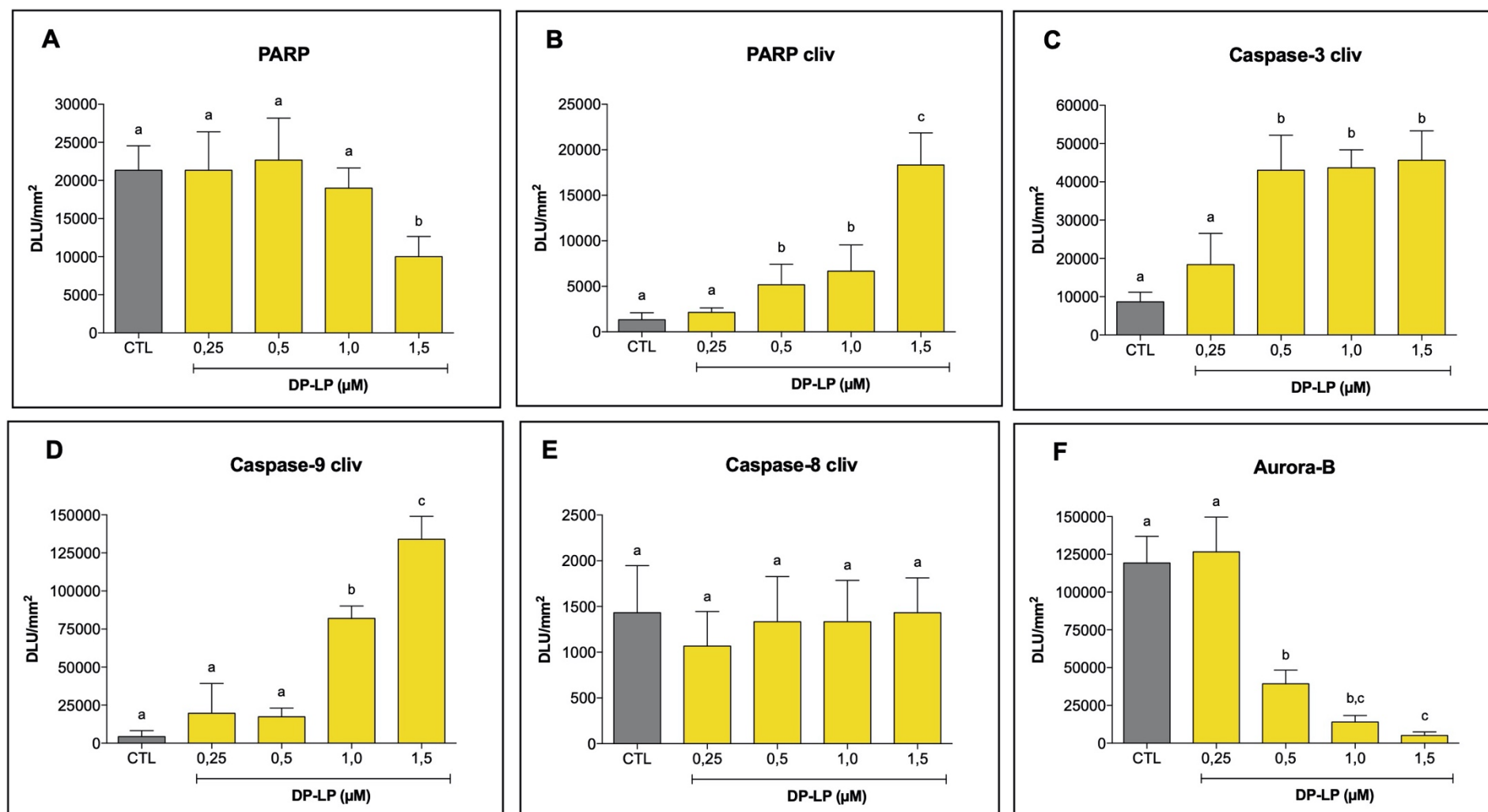


Figura 35. Valores obtidos na análise pelo programa Scion Image, referentes às médias dos valores de expressão proteica e seu desvio padrão. As proteínas foram extraídas a partir de células DU-145 tratadas com DMSO 0,1% (v/v) (CTL) e com diferentes concentrações do complexo DP-LP por 24 horas. Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, *one-way*, Tukey, $p < 0.05$). A) PARP; B) PARP-clivado; C) Caspase-3 clivada; D) Caspase-9 clivada; E) Caspase-8 clivada e F) AURORA-B.

Os resultados encontrados neste estudo sugerem que o complexo DP-LP aumenta a produção de espécies reativas intracelulares capazes de causar danos ao DNA das células DU-145. Esse efeito pode ser o responsável pela perturbação do potencial de membrana mitocondrial e subsequente expressão de caspases-3/-9 ativadas, identificadas pela técnica de *western blot*.

De acordo com outros estudos, complexos de rutênio são possíveis perturbadores do potencial de membrana mitocondrial por induzirem a geração espécies reativas intracelulares, além de conduzirem à apoptose pela ativação de caspases (LI et al., 2019; WAN et al., 2017). O desencadeamento do estresse oxidativo por complexos fosfínicos de rutênio(II) foi responsável pela perda do potencial transmembrana mitocondrial, bem como pela quebra de fita dupla de DNA, que induziram células leucêmicas à apoptose pela via JNK/p38 (BOMFIM et al., 2019). A geração de ERO também foi relacionada com a ativação de caspases-3/-7, BAX e BAD em células HepG2 após o tratamento com concentrações citotóxicas de complexos de rutênio(II) (ZENG et al., 2016).

Para confirmar nossos achados, a análise de *western blot* também foi utilizada para determinar a presença da proteína nuclear PARP (Poli (ADP-ribose) polimerase), um biomarcador de células em apoptose mediada por caspases (CHAITANYA; ALEXANDER; BABU, 2010). Como mostrado na Figura 35B, o tratamento ocasionou efetivamente a clivagem de PARP de modo dependente da concentração, o que é considerada uma marca registrada da apoptose (KAUFMANN et al., 1993). Assim, a clivagem proteolítica de PARP propiciada pela ativação da caspase-9, um iniciador à montante da caspase-3, confirma que o complexo DP-LP induz morte celular por apoptose em células DU-145.

A ativação de PARP desencadeia sinais de reparação do DNA (HERCEG; WANG, 2001). No entanto, quando observam-se os resultados do ensaio do cometa, constata-se que os danos causados pelo tratamento não foram reparados, uma vez que o complexo DP-LP induziu a fragmentação do DNA após 24 horas de tratamento com 0,5 μ M do complexo. Tal efeito corrobora com os resultados da análise do ciclo celular, em que comprova-se parada na fase G2/M, o que impede que as células finalizem a divisão celular. De fato, a literatura apresenta diversos complexos de rutênio com diferentes ligantes com demonstrada capacidade de ligação ao DNA, levando à inibição da síntese de sua síntese e à indução de apoptose por meio da via mitocondrial (ČANOVIĆ et al., 2017; DE CARVALHO et al., 2018; HAN et al., 2015; LAI et al., 2016; MILUTINOVIĆ et al., 2017).

Em relação à proteína AURORA-B, esta foi significativamente menos expressa após o tratamento com o complexo DP-LP (Fig. 35F), o que confirma os ensaios de expressão gênica, em que identificou-se uma redução significativa da expressão de seu gene, o *AURKB*. Como já discutido, a proteína AURORA-B associa-se aos cromossomos durante a prófase, onde desempenha um papel catalítico crucial no CPC de modo que garante a segregação correta dos cromossomos durante a mitose (CARMENA et al., 2012).

Nossos resultados mostraram que o tratamento com o complexo DP-LP induziu um acúmulo de células na fase G2/M e apoptose, o que é consistente com a inibição da atividade de AURORA-B. Uma possível explicação para esse efeito é a potencial genotóxico demonstrado por esse complexo em células DU-145. Estudos propõem que a expressão e atividade de AURORA-B é inibida por proteínas dos sistemas de reparo de DNA (WILLEMS et al., 2018; YANG et al., 2011; ZEKRI et al., 2016). O reparo de danos ao DNA é iniciado por proteínas sensoriais que se acumulam nos locais dos

danos. Esse acúmulo de proteínas ativa uma cascata de fosforilação que modifica a cromatina e permite o acesso de fatores de reparo de DNA. Entre esses, destaca-se o papel da via de reparo por união de extremidade não-homóloga ou NHEJ (do inglês, *Non-homologous end joining*), o principal mecanismo no reparo de quebras de fita dupla do DNA (DERIANO; ROTH, 2013). Estudos destacam que o heterodímero Ku70 é um componente central do NHEJ, pois ele promove a ancoragem do complexo de reparo sobre o dano. Em resposta ao dano, Ku70 é fosforilado na serina 1555 (Ku70 S155D). Logo, foi identificado que Ku70 S155D interage com AURORA-B, inibindo sua atividade quinase, impondo a parada do ciclo celular e proporcionando tempo para concluir o reparo do DNA (FELL et al., 2016). Também é descrita a atividade inibitória de PARP-1 sobre a atividade da AURORA-B a fim de se bloquear a mitose, possibilitando o reparo do dano (MONACO et al., 2005; SLADE, 2019).

Tomadas em conjunto, as evidências acima sugerem que o complexo DP-LP promove parada do ciclo celular em células DU-145 na fase G2/M pela inibição da expressão de AURORA-B. O mecanismo central para esse feito é a capacidade desse complexo aumentar a geração de espécies reativas intracelular. Tal efeito pode ser o responsável pelo sua capacidade de causar danos ao DNA e desencadear a apoptose por meio da via intrínseca.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste projeto de pesquisa, nas condições empregadas neste estudo, podemos concluir que os complexos de fórmula geral $[\text{Ru}(\text{L})(\text{dppm})(\text{N-N})]\text{PF}_6$ apresentaram satisfatória atividade antiproliferativa e citotóxica em diversas células tumorais, com destaque para células derivadas de câncer de próstata. Acreditamos que a atividade citotóxica encontrada para essa série de complexos seja devida a presença do ligante difenilfosfinometano (dppm) que melhorou não apenas a lipofilicidade dos complexos, como também sua atividade citotóxica. Além disso, os ensaios de sobrevivência clonogênica mostraram que a substituição do ligante bipyridina pela fenantrolina aumentou a atividade dos compostos, o que levou à perda da clonogenicidade das células DU-145. Nossos estudos também demonstraram o complexo DP-LP é capaz de permear através de esferoides de células DU-145 cultivadas em três dimensões e desestabilizar as agregações celulares, resultando na perturbação das interações célula-matriz e, por fim, na morte celular. De fato, o complexo DP-LP desencadeia apoptose em células DU-145 acompanhado de um acúmulo de células na fase G2/M, o que é consistente com a inibição da atividade da proteína AURORA-B. O mecanismo central relacionado com esses efeitos é de que a presença do lapachol no complexo DP-LP promova a geração de espécies reativas intracelulares que podem causar danos ao DNA. A fragmentação do DNA, evidenciada pelo ensaio do cometa pode ativar sistemas de reparos de DNA que mantêm as células no *checkpoint* G2/M devido a diminuição da expressão do gene *AURKB*. Além disso, os danos ao DNA configuram o estímulo que desencadeia a ativação de caspases que conduz as células DU-145 à apoptose. Em suma, os resultados encontrados neste estudo contribuem para a seleção e elucidação das propriedades antiproliferativas e citotóxicas de novos compostos, demonstrando que a coordenação do lapachol em

complexos fosfínicos de rutênio(II) possibilita a formação de complexos com potencial de impacto na área de saúde tendo como alvo o tratamento do câncer.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAN, A.; BARAN, Y. K. AND Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 2016, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016.
- ADDEPALLI, M. K. et al. RNAi-mediated knockdown of AURKB and EGFR shows enhanced therapeutic efficacy in prostate tumor regression. **Gene Therapy**, v. 17, n. 3, p. 352–359, 2009.
- ALBANI, B. A. et al. 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**, v. 136, n. 49, p. 17055–17101, 2014.
- ALDOSSARY, S. A. Review on pharmacology of cisplatin: Clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 12, n. 1, p. 7–15, 2019.
- ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in medicine: Current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Review**, v. 45, n. 2, p. 62–69, 2001.
- ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Metal-based drugs that break the rules. **Dalton Trans.**, v. 45, n. 8, p. 3201–3209, 2016.
- ALMEIDA, E. R. DE. Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and Beta-Lapachone. **The Open Natural Products Journal**, v. 2, n. 1, p. 42–47, 20 abr. 2009.
- AMABLE, L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. **Pharmacological research**, v. 106, p. 27–36, abr. 2016.
- AMERICAN CANCER SOCIETY, A. **Chemotherapy Drugs: How They Work?**. Disponível em: < <https://www.cancer.org/treatment> >. Acesso e 23 de dez de 2019.
- ANTONARAKIS, E. S.; EMADI, A. Ruthenium-based chemotherapeutics: Are they ready for prime time? **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 66, p. 1–9, 2010.
- ANTONI, D. et al. Three-dimensional cell culture: a breakthrough *in vivo*. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 3, p. 5517–27, 11 mar. 2015.
- ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 0102-695X, p. 57–59, 2002.

ARORA, S. et al. Downregulation of XPF–ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. **DNA Repair**, v. 9, n. 7, p. 745–753, 1 jul. 2010.

ASHKENAZI, R.; GENTRY, S. N.; JACKSON, T. L. Pathways to Tumorigenesis—Modeling Mutation Acquisition in Stem Cells and Their Progeny. **Neoplasia**, v. 10, n. 11, p. 1170-IN6, nov. 2008.

ASLANTÜRK, Ö. S. *In Vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. **Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World**, p. 1–18, 2018.

AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. **Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs**. 2nd edition. Elsevier Science, 2008.

AVORN, J. The \$2.6 Billion Pill — Methodologic and Policy Considerations. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 20, p. 1877–1879, 14 maio 2015.

BADONI SEMWAL, R. et al. *Lawsonia inermis* L. (henna): Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological aspects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 80–103, ago. 2014.

BAKA, E.; COMER, J. E. A.; TAKÁCS-NOVÁK, K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 2, p. 335–341, 2008.

BAKER, S. J.; REDDY, E. P. CDK4: A key player in the cell cycle, development, and cancer. **Genes and Cancer**, 2012.

BAL-PRICE, A.; COECKE, S. Guidance on Good Cell Culture Practice (GCCP). In: **Cell Culture Techniques**. v. 56, p. 1–25, 2011.

BALIZA, I. R. S. et al. Ruthenium Complexes With Piplartine Cause Apoptosis Through MAPK Signaling by a p53-Dependent Pathway in Human Colon Carcinoma Cells and Inhibit Tumor Development in a Xenograft Model. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. July, p. 1–11, 2019.

BARBOSA, I. R. et al. Cancer mortality in Brazil: Temporal Trends and Predictions for the Year 2030. **Medicine**, v. 94, n. 16, p. e746, abr. 2015.

BASU, A.; KRISHNAMURTHY, S. Cellular responses to cisplatin-induced DNA damage. **Journal of Nucleic Acids**, v. 20, n. 10, p. 1–16, 2010.

BERGAMO, A. et al. Preclinical combination therapy of the investigational drug NAMI-A with doxorubicin for mammary cancer. **Investigational New Drugs**, v. 33, n. 1, p. 53–63, 2015.

BEZERRA, D. P. et al. Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 453–463, fev. 2013.

BIZARI, L.; SILVA, A. E.; TAJARA, E. H. Gene amplification in carcinogenesis. **Genetics and Molecular Biology**, 2006.

BLACKADAR, C. B. Historical review of the causes of cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 1, p. 54–86, 2016.

BLOCK, J. et al. Early clinical studies with lapachol (NSC-11905). **Cancer chemotherapy reports. Part 2**, v. 4, n. 4, p. 27, 1974.

BO, S. et al. Chk1, but not Chk2, is responsible for G2/M phase arrest induced by diallyl disulfide in human gastric cancer BGC823 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 61–70, 2014.

BOMFIM, L. M. et al. Ruthenium(II) complexes with 6-methyl-2-thiouracil selectively reduce cell proliferation, cause DNA double-strand break and trigger caspase-mediated apoptosis through JNK/p38 pathways in human acute promyelocytic leukemia cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2019.

BRABEC, V.; KASPARKOVA, J. Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agents. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 376, p. 75–94, 2018.

BRANDÃO, G. C. et al. Antimalarial naphthoquinones. Synthesis via click chemistry, in vitro activity, docking to PfDHODH and SAR of lapachol-based compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 191–205, 2018.

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

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622,

2009.

CADET, J.; WAGNER, J. R. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 2, p. a012559–a012559, 1 fev. 2013.

ČANOVIĆ, P. et al. Impact of aromaticity on anticancer activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes: synthesis, structure, DNA/protein binding, lipophilicity and anticancer activity. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 1007–1028, 2017.

CARMENA, M. et al. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 12, p. 789–803, 23 dez. 2012.

CASTRO, F. A. V et al. Cytotoxicity mechanism of two naphthoquinones (menadione and plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, 2008.

CHAITANYA, G. V.; ALEXANDER, J. S.; BABU, P. P. PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. **Cell Communication and Signaling**, v. 8, n. 1, p. 31, 2010.

CHEN, J. et al. Synthesis, characterization, cellular uptake and apoptosis-inducing properties of two highly cytotoxic cyclometalated ruthenium(II) β -carboline complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 140, p. 104–117, nov. 2017.

CHIEFFI, P. et al. Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation. **Prostate**, v. 66, n. 3, p. 326–333, 2006.

CHIEFFI, P. Aurora B: A new promising therapeutic target in cancer. **Intractable and Rare Diseases Research**, v. 7, n. 2, p. 141–144, 2018.

COELHO-CERQUEIRA, E. et al. Beyond Topoisomerase Inhibition: Antitumor 1,4-Naphthoquinones as Potential Inhibitors of Human Monoamine Oxidase. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 83, n. 4, p. 401–410, 2014.

CONKLIN, K. A. Chemotherapy-associated oxidative stress: Impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integrative Cancer Therapies**, v. 3, n. 4, p. 294–300, 2004.

COOPER, G. The Development and Causes of Cancer. **The Cell: A Molecular Approach**. 2nd edition. Sunderland (MA): Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.

The Development and Causes of Cancer. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>>.

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

CORTES, J. et al. Eribulin monotherapy versus treatment of physician's choice in patients with metastatic breast cancer (EMBRACE): A phase 3 open-label randomised study. **The Lancet**, v. 377, n. 9769, p. 914–923, 2011.

COSTA, E. V. S. et al. Antileishmanial Activity of *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose (Bignoniaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–6, 2017.

CUMMINGS, B. S.; WILLS, L. P.; SCHNELLMANN, R. G. Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. **Curr Protoc Pharmacol**, v. 1, n. Lemasters 1999, p. 1–30, 2004.

CUNHA, B. N. et al. Hydrolysis reaction promotes changes in coordination mode of Ru(II)/acylthiourea organometallic complexes with cytotoxicity against human lung tumor cell lines. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 186, n. March, p. 147–156, 2018.

D'SOUSA, C. O. et al. Novel piplartine-containing ruthenium complexes: synthesis, cell growth inhibition, apoptosis induction and ROS production on HCT116 cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 61, p. 104367–104392, 2017.

DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364–378, 2014.

DASH, S. P. et al. Syntheses and structural investigation of some alkali metal ion-mediated LVVO2- (L2- = tridentate ONO ligands) species: DNA binding, photo-induced DNA cleavage and cytotoxic activities. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 26, p. 10139–10156, 2014.

DE CAMARGO, M. S. et al. Inhibition of human DNA topoisomerase IB by nonmutagenic ruthenium(II)-based compounds with antitumoral activity. **Metallomics**, v. 8, n. 2, p. 179–192, 2016.

DE CARVALHO, N. C. et al. A novel ruthenium complex with xanthoxylin induces S-phase arrest and causes ERK1/2-mediated apoptosis in HepG2 cells through a p53-

independent pathway article. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 2, 2018.

DE GRANDIS, R. A. et al. Human topoisomerase inhibition and DNA/BSA binding of Ru(II)–SCAR complexes as potential anticancer candidates for oral application. **BioMetals**, v. 30, n. 3, p. 321–334, 16 jun. 2017.

DE GRANDIS, R. A. et al. Novel lawsone-containing ruthenium(II) complexes: Synthesis, characterization and anticancer activity on 2D and 3D spheroid models of prostate cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 85, n. January, p. 455–468, 2019.

DE SOUSA, I. H. et al. Ruthenium (II) complexes with N, O-chelating proline and threonine ligands cause selective cytotoxicity by the induction of genomic instability, cell cycle arrest and apoptosis in breast and prostate tumor cells. **Toxicology in Vitro**, v. 62, n. July 2019, p. 104679, 2020.

DENG, Z. et al. Ruthenium complexes with phenylterpyridine derivatives target cell membrane and trigger death receptors-mediated apoptosis in cancer cells. **Biomaterials**, v. 129, p. 111–126, 2017.

DERIANO, L.; ROTH, D. B. Modernizing the Nonhomologous End-Joining Repertoire: Alternative and Classical NHEJ Share the Stage. **Annual Review of Genetics**, v. 47, n. 1, p. 433–455, 2013.

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G. Economics of New Oncology Drug Development. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 2, p. 209–216, 10 jan. 2007.

DUVAL, K. et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 266–277, jul. 2017.

EDMONDSON, R. et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and drug development technologies**, v. 12, n. 4, p. 207–18, 2014.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 25 jun. 2007.

EPIFANO, F. et al. Lapachol and its congeners as anticancer agents: A review. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 37–49, 2014.

ESPINOSA, E. et al. Classification of anticancer drugs - A new system based on therapeutic targets. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, n. 6, p. 515–523, 2003.

FAGUET, G. B. A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current

knowledge database. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 9, p. 2022–2036, 2015.

FANG, H. et al. RecQL4-Aurora B kinase axis is essential for cellular proliferation , cell cycle progression , and mitotic integrity. **Oncogenesis**, p. 0–11, 2018.

FANG, Y.; EGMEN, R. M. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. **SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D**, v. 22, n. 5, p. 456–472, 18 jun. 2017.

FELL, V. L. et al. Ku70 Serine 155 mediates Aurora B inhibition and activation of the DNA damage response. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–17, 2016.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 81–95, 2000.

FORBES, S. A. et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D805–D811, 28 jan. 2015.

FRANKEN, N. A P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

FRIEDRICH, J. et al. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nat. Protocols**, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009.

FRIK, M. et al. Luminescent iminophosphorane gold, palladium and platinum complexes as potential anticancer agents. **Inorganic Chemistry Frontiers**, v. 1, n. 3, p. 231–241, 2014.

GALLUZZI, L. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 8, p. 1093–1107, 2009.

GIANCOTTI, F. G. Deregulation of cell signaling in cancer. **FEBS Letters**, v. 588, n. 16, p. 2558–2570, 19 ago. 2014.

GOLAN, D. E. **Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy**. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2016.

GÓMEZ CASTELLANOS, J. R.; PRIETO, J. M.; HEINRICH, M. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) - A global ethnopharmacological commodity? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 1–13, jan. 2009.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. DA. Morte Celular por Apoptose (Apoptosis: Programmed Cell Death). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

GRONER, B.; WEISS, A. Targeting Survivin in cancer: Novel drug development approaches. **BioDrugs**, v. 28, n. 1, p. 27-39, 2014.

GUIDELINE FOR TESTING OS CHEMICALS, O. *In vitro* mammalian cell micronucleus test. No. 487. **OECD Guidelines**, n. September, p. 1–26, 2014.

GURDEN, M. D. et al. Aurora B prevents premature removal of spindle assembly checkpoint proteins from the kinetochore: A key role for Aurora B in mitosis. **Oncotarget**, v. 9, n. 28, p. 19525–19542, 2018.

HALASI, M. et al. ROS inhibitor *N* -acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors. **Biochemical Journal**, v. 454, n. 2, p. 201–208, 2013.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HE, X.; JIN, L.; TAN, L. 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**, v. 135C, p. 101–109, 2014.

HERCEG, Z.; WANG, Z. Q. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 477, n. 1–2, p. 97–110, 2001.

HOE, K. H.; VERMA, C. S.; LANE, D. P. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 3, p. 217–236, 1 mar. 2014.

HURTADO, M. et al. Novel survivin inhibitor for suppressing pancreatic cancer cells growth via downregulating Sp1 and Sp3 transcription factors. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 1894–1907, 2018.

HUSSAIN, H. et al. Lapachol: an overview. **Arkivoc**, v. 2007, n. ii, p. 145–171, 2007.

HUSSAIN, H.; GREEN, I. R. Lapachol and lapachone analogs: a journey of two decades of patent research (1997-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 10, p. 1111–1121, 3 out. 2017.

IARC, I. A. FOR R. ON C. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. **WHO - World Health Organization**, n. September, p. 13–15, 2018.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Incidência de Câncer no Brasil (Estimativa 2018)**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/>>. Acesso em 19 de dez de 2019.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **ESTIMATIVA 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br>>. Acesso em 11 de jul de 2017.

JEMAL, A. et al. Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 8, p. 1893–1907, 2010.

JIANG, B. et al. IDH1 Mutation Promotes Tumorigenesis by Inhibiting JNK Activation and Apoptosis Induced by Serum Starvation. **Cell Reports**, v. 19, n. 2, p. 389–400, abr. 2017.

KAUFMANN, S. H. et al. Specific Proteolytic Cleavage of Poly(ADP-ribose) Polymerase: An Early Marker of Chemotherapy-induced Apoptosis. **Cancer Research**, v. 53, n. 17, p. 3976–3985, 1993.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 7, p. 573–584, 2007.

KHARMATE, G. et al. Epidermal growth factor receptor in prostate cancer derived exosomes. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–14, 2016.

KIRKLAND, D. et al. Updated recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 795, p. 7–30, 2016.

KOCEVA-CHYŁA, A. et al. Insights into the in vitro Anticancer Effects of Diruthenium-1. **ChemMedChem**, v. 2, p. 2171–2187, 2016.

KOPPENOL, W. H.; BOUNDS, P. L.; DANG, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 5, p. 325–337, 2011.

KOSIHA, A. et al. Metal complexes of naphthoquinone based ligand: synthesis, characterization, protein binding, DNA binding/cleavage and cytotoxicity studies. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 1102, n. 12, p. 1–12, 20 dez. 2017.

KRISHNAMOORTHY, P. et al. Copper(I) and nickel(II) complexes with 1:1 vs. 1:2 coordination of ferrocenyl hydrazone ligands: Do the geometry and composition of complexes affect DNA binding/cleavage, protein binding, antioxidant and cytotoxic activities? **Dalton Transactions**, v. 41, n. 15, p. 4423–4436, 2012.

KRUISWIJK, F.; LABUSCHAGNE, C. F.; VOUSDEN, K. H. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 7, p. 393–405, 2015.

KUBANIK, M. et al. Towards targeting anticancer drugs: ruthenium(ii)-arene complexes with biologically active naphthoquinone-derived ligand systems. **Dalton transactions**, v. 45, n. 33, p. 13091–103, 2016.

KUMAR, B. et al. YM155 Reverses Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer by Decreasing Cytoplasmic Survivin Levels. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 9, p. 1988–1998, 2012.

KUMARI, S. et al. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. **Biomarker Insights**, v. 13, p. 117727191875539, 6 jan. 2018.

LABARBERA, D. V; REID, B. G.; YOO, B. H. The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 9, p. 819–830, 2012.

LACERDA, M. A. Chemotherapy and Anaesthesia. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 51, n. 3, p. 250–270, 2001.

LAI, S. H. et al. Protein binding and anticancer activity studies of ruthenium(II) polypyridyl complexes toward BEL-7402 cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 39–48, 2016.

LAMHAMED-CHERRADI, S. E. et al. 3D tissue-engineered model of Ewing's sarcoma. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 79, p. 155–171, 2014.

LANE, D. P. p53 - Guardian of the Genome. **Nature**, v. 358, n. 2, p. 15–16, 1992.

LANGHANS, S. A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2018.

LAWLEY, P. D. Mutagens as carcinogens: development of current concepts. **Mutation research**, v. 213, n. 1, p. 3–25, 1989.

LEE, E. C. Y. et al. Targeting aurora kinases for the treatment of prostate cancer. **Cancer Research**, v. 66, n. 10, p. 4996–5002, 2006.

LEE, R. et al. The Differential Distribution of RAPTA-T in Non-Invasive and Invasive Breast Cancer Cells Correlates with Its Anti-Invasive and Anti-Metastatic Effects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1869, 2017.

LEE, S. W. et al. SUMOylation of hnRNP-K is required for p53-mediated cell-cycle arrest in response to DNA damage. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 23, p. 4441–4452, 2012.

LEGESSE-MILLER, A. et al. Quiescent fibroblasts are protected from proteasome inhibition-mediated toxicity. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 18, p. 3566–3581, 2012.

LEIJEN, S. et al. 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**, v. 33, n. 1, p. 201–214, 2015.

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

LI, Y. et al. Polypyridyl Ruthenium(II) complex-induced mitochondrial membrane potential dissipation activates DNA damage-mediated apoptosis to inhibit liver cancer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 164, p. 282–291, 2019.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 211–218, 2016.

LIMA, A. P. et al. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium(II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

LIMA, A. R. et al. Discrimination between the human prostate normal and cancer cell

exometabolome by GC-MS. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5539, 2018.

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

LIRA, A. A. M. et al. Development of Lapachol Topical Formulation: Anti-inflammatory Study of a Selected Formulation. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 163–168, 25 mar. 2008.

LISS, M. A. et al. mTOR inhibitors for treatment of low-risk prostate cancer. **Medical Hypotheses**, v. 117, n. 1, p. 63–68, 2018.

LÓPEZ-LÓPEZ, L. I. et al. Naphthoquinones: Biological properties and synthesis of lawsone and derivatives - A structured review. **Vitae**, v. 21, n. 3, p. 248–258, 2014.

LOZANO-PÉREZ, A. A. et al. Antitumor properties of platinum(IV) prodrug-loaded silk fibroin nanoparticles. **Dalton transactions**, v. 44, n. 30, p. 13513–21, 2015.

LUCKERT, C. et al. Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells. **Archives of toxicology**, v. 91, n. 1, p. 393–406, 2016.

LUNDQVIST, E. Å.; FUJIWARA, K.; SEOUD, M. Principles of chemotherapy. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 131, n. 12, p. S146–S149, 2015.

LUO, G. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 3-substituted 4-anilino-coumarin derivatives as antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 4, p. 867–874, fev. 2017.

MACIP, S. et al. Oxidative stress induces a prolonged but reversible arrest in p53-null cancer cells, involving a Chk1-dependent G2 checkpoint. **Oncogene**, v. 25, n. 45, p. 6037–6047, 2006.

MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, n. 2, p. 201–218, 1961.

MÁRQUEZ-JURADO, S. et al. Mitochondrial levels determine variability in cell death by modulating apoptotic gene expression. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

MARULLO, R. et al. Cisplatin induces a mitochondrial-ros response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–15, 2013.

MARX, K. A. et al. Data Mining the NCI Cancer Cell Line Compound GI50 Values: Identifying Quinone Subtypes Effective Against Melanoma and Leukemia Cell Classes. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, n. 5, p. 1652–1667, 2003.

MC GEE, M. M. Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

MCNEIL, E. M.; MELTON, D. W. DNA repair endonuclease ERCC1-XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 20, p. 9990–10004, 2012.

MEDEIROS, C. S. et al. Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 4, p. 345–349, abr. 2010.

MEHTA, G. et al. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 2, p. 192–204, dez. 2012.

MELLO-ANDRADE, F. et al. Antitumor effectiveness and mechanism of action of Ru(II)/amino acid/diphosphine complexes in the peritoneal carcinomatosis progression. **Tumor Biology**, v. 39, n. 10, p. 1–18, 2017.

MELLO-ANDRADE, F. et al. Acute toxic effects of ruthenium (II)/amino acid/diphosphine complexes on Swiss mice and zebrafish embryos. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, n. August, p. 1082–1092, nov. 2018.

MENYHÁRT, O. et al. Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1866, n. 2, p. 300–319, 2016.

MILUTINOVIĆ, M. M. et al. New 4'-(4-chlorophenyl)-2,2':6',2"-terpyridine ruthenium(II) complexes: Synthesis, characterization, interaction with DNA/BSA and cytotoxicity studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 169, p. 1–12, 2017.

MIMEAULT, M.; BATRA, S. K. Recent advances on multiple tumorigenic cascades involved in prostatic cancer progression and targeting therapies. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 1, p. 1–22, 2005.

MONACO, L. et al. Inhibition of Aurora-B kinase activity by poly(ADP-ribosyl)ation in

response to DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 40, p. 14244–14248, 2005.

MOTSWAINYANA, W. M.; AJIBADE, P. A. Anticancer Activities of Mononuclear Ruthenium(II) Coordination Complexes. **Advances in Chemistry**, v. 2015, p. 1–21, 2015.

MUHAMMAD, N.; GUO, Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, p. 144–153, 2014.

NAKAHARA, T. et al. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. **Cancer Research**, v. 67, n. 17, p. 8014–8021, 2017.

NAVARRO-SERER, B. et al. Aurora A inhibition limits centrosome clustering and promotes mitotic catastrophe in cells with supernumerary centrosomes. **Oncotarget**, v. 10, n. 17, p. 1649–1659, 2019.

NCI, National Cancer Institute. **What Is Cancer? A Collection of Related Diseases**. Disponível em: < <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em 27 de set de 2018

NITA, M.; GRZYBOWSKI, A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–23, 2016.

NITSCHKE, R. Cell fluorescence assays on the Agilent 2100 bioanalyzer – general use. **Agilent Technologies**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2002.

OCANA, A. et al. Preclinical development of molecular-targeted agents for cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 8, n. 4, p. 200–209, 2011.

OLIVEIRA, K. M. et al. Ruthenium (II)/ triphenylphosphine complexes : An effective way to improve the cytotoxicity of lapachol. **Polyhedron**, v. 130, p. 108–114, 2017a.

OLIVEIRA, K. M. et al. Selective Ru (II)/ lawsone complexes inhibiting tumor cell growth by apoptosis. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 176, n. August, p. 66–76, 2017b.

OLIVEIRA, L. et al. Antileishmanial Activity of 2-Methoxy-4H-spiro-[naphthalene-1,2'-oxiran]-4-one (Epoxymethoxy-lawsone): A Promising New Drug Candidate for Leishmaniasis Treatment. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 864, 2018.

OLIVEIRA, M. DE S. et al. A novel platinum complex containing a piplartine derivative exhibits enhanced cytotoxicity, causes oxidative stress and triggers apoptotic cell death by ERK/p38 pathway in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Redox Biology**, v. 20, n. 6, p. 182–194, 2019.

ORAMAS-ROYO, S. et al. Synthesis and cytotoxic activity of metallic complexes of lawsone. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 9, p. 2471–2477, 2013.

OTT, I.; GUST, R. Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. **Archiv der Pharmazie**, v. 340, n. 3, p. 117–126, 2007.

OUN, R.; MOUSSA, Y. E.; WHEATE, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 19, p. 6645–6653, 2018.

OURIQUE, F. et al. DNA damage and inhibition of akt pathway in MCF-7 cells and ehrlich tumor in mice treated with 1,4-naphthoquinones in combination with ascorbate. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, Article ID 495305, 2015.

PAGE, B.; PAGE, M.; NOEL, C. A New Fluorometric Assay for Cytotoxicity Measurements in vitro. **International Journal of Oncology**, v. 3, n. 3, p. 473–476, 1993.

PAN, H. W. et al. Targeted TPX2 increases chromosome missegregation and suppresses tumor cell growth in human prostate cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 10, p. 3531–3543, 2017.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1644, n. 2–3, p. 83–94, mar. 2004.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PINHO, B. R. et al. Naphthoquinones' biological activities and toxicological effects. **Bioactive Compounds: Types, Biological Activities and Health Effects**, n. March, p. 181–218, 2012.

PIRES, W. C. et al. Ru(II)/diphenylphosphine/pyridine-6-thiolate complexes induce S-180 cell apoptosis through intrinsic mitochondrial pathway involving inhibition of Bcl-2 and p53/Bax activation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 438, n. 1–2, p. 199–217, 2018.

PÓPULO, H.; LOPES, J. M.; SOARES, P. The mTOR signalling pathway in human cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 2, p. 1886–1918, 2012.

PRADHAN, R. et al. From Body Art to Anticancer Activities: Perspectives on Medicinal Properties of Henna. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 14, p. 1777–1798, 2012.

PRESA, A. et al. Photoswitching the Cytotoxic Properties of Platinum(II) Compounds. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 15, p. 4561–4565, 2015.

RADEMAKER-LAKHAI, J. M. et al. A phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 11, p. 3717–3727, 2004.

RAJA, W.; AGRAWAL, R. C.; OVAIS, M. Chemopreventive action of *Lawsonia inermis* leaf extract on DMBA-induced skin papilloma and B16F10 melanoma tumour. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 1243–1249, 2009.

RAJENDRAN, M. Quinones as photosensitizer for photodynamic therapy: ROS generation, mechanism and detection methods. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 13, p. 175–187, 2015.

RAMADEVI, P. et al. 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**”, v. 305, p. 1–10, 2015.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 11, p. 897–907, 2004.

ROWE, L. A.; DEGTYAREVA, N.; DOETSCH, P. W. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 8, p. 1167–1177, out. 2008.

SANT, S.; JOHNSTON, P. A. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 23, p. 27–36, mar. 2017.

SARWAR, T. et al. Multi-spectroscopic and molecular modelling studies on the interaction of esculetin with calf thymus DNA. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 2, p. 522–531, 2015.

SATOH, T. et al. Phase I study of YM155, a novel survivin suppressant, in patients with advanced solid tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 11, p. 3872–3880, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil. **Sistema de Informação Ambulatorial do SUS - ONCOLOGIA**. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/manual>>. Acesso em 21 de dez de 2019

SAVA, G. et al. Metal complexes of ruthenium: antineoplastic properties and perspectives. **Anticancer Drugs**, v. 1, n. 2, p. 99–108, 1990.

SAVA, G.; BERGAMO, A. Ruthenium-based compounds and tumour growth control (review). **International Journal of Oncology**, v. 17, n. 2, p. 353–365, 2000.

SCHETTINI, F. et al. CDK 4/6 Inhibitors as Single Agent in Advanced Solid Tumors. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. 12, p. 1–12, 2018.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 9, p. 308–313, 2004.

SCHULER, F. et al. Checkpoint kinase 1 is essential for normal B cell development and lymphomagenesis. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2017.

SEGURA, D. F. et al. Synthesis and biological evaluation of ternary silver compounds bearing N,N-chelating ligands and thiourea: X-ray structure of $[Ag(bpy)(\mu-tu)]_2(NO_3)_2$ (bpy = 2,2'-bipyridine; Tu = thiourea). **Polyhedron**, v. 79, p. 197–206, 2014.

SHAH, R. B.; GHOSH, D.; ELDER, J. T. Epidermal Growth Factor Receptor (ErbB1) Expression in Prostate Cancer Progression: Correlation With Androgen Independence. **The Prostate**, v. 66, n. 4, p. 129–138, 2008.

SHEPPARD, K. E.; MCARTHUR, G. A. The cell-cycle regulator CDK4: An emerging therapeutic target in melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 19, p. 5320–5328, 2013.

SHIBAI-OGATA, A. et al. Evaluation of high-throughput screening for *in vitro* micronucleus test using fluorescence-based cell imaging. **Mutagenesis**, v. 26, n. 6, p. 709–719, 1 nov. 2011.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature reviews of Cancer**, v. 6, n. 10, p. 813–23, 2006.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2016. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.

SIKOV, W. M. Assessing the Role of Platinum Agents in Aggressive Breast Cancers. **Current Oncology Reports**, v. 17, n. 2, Article number: 3, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25665554>>. Acesso em: 11 de mai de 2018.

SILVA, S. L. R. et al. Ru(II)-thymine complex causes DNA damage and apoptotic cell death in human colon carcinoma HCT116 cells mediated by JNK/p38/ERK1/2 via a p53-independent signaling. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

SIMPSON, P. V. et al. Defining the Anti-Cancer Activity of Tricarbonyl Rhenium Complexes: Induction of G2/M Cell Cycle Arrest and Blockade of Aurora-A Kinase Phosphorylation. **Chemistry - A European Journal**, v. 23, n. 27, p. 6518–6521, 2017.

SINGH, D. K.; LUQMAN, S. *Lawsonia inermis* (L.): A perspective on anticancer potential of Mehndi/Henna. **Biomedical Research and Therapy**, v. 1, n. 4, p. 112–120, 2014.

SINGH, S. et al. p53 regulates ERK activation in carboplatin induced apoptosis in cervical carcinoma: A novel target of p53 in apoptosis. **FEBS Letters**, v. 581, n. 2, p. 289–295, 23 jan. 2007.

SLADE, D. Mitotic functions of poly(ADP-ribose) polymerases. **Biochemical Pharmacology**, v. 167, n. March, p. 33–43, 2019.

SOUZA, M. A. et al. The antimicrobial activity of lapachol and its thiosemicarbazone and semicarbazone derivatives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 342–351, maio 2013.

SPOERLEIN-GUETTLER, C. et al. Ferrocene and (arene)ruthenium(II) complexes of the natural anticancer naphthoquinone plumbagin with enhanced efficacy against resistant cancer cells and a genuine mode of action. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 138, p. 64–72, 2014.

SRISHAILAM, A. et al. Synthesis, characterization; DNA binding and antitumor activity of ruthenium(II) polypyridyl complexes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 141, p. 47–58, dez. 2014.

SU, Z. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 48, 2015.

SUROVA, O.; ZHIVOTOVSKY, B. Various modes of cell death induced by DNA

damage. **Oncogene**, v. 32, n. 33, p. 3789–3797, 2013.

TABRIZI, L.; CHINIFOROSHAN, H. Ruthenium(II) p-cymene complexes of naphthoquinone derivatives as antitumor agents: A structure–activity relationship study. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 822, p. 211–220, nov. 2016.

TABRIZI, L.; TALAIE, F.; CHINIFOROSHAN, H. Copper(II), cobalt(II) and nickel(II) complexes of lapachol: synthesis, DNA interaction, and cytotoxicity. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 35, n. 15, p. 3330–3341, 18 nov. 2017.

TANG, A. et al. Aurora kinases: novel therapy targets in cancers. **Oncotarget**, v. 8, n. 14, p. 23937–23954, 2017.

TANG, D. et al. ERK Activation Mediates Cell Cycle Arrest and Apoptosis after DNA Damage Independently of p53. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 15, p. 12710–12717, 12 abr. 2002.

THEODORAKI, M. A. et al. Spontaneously-forming spheroids as an *in vitro* cancer cell model for anticancer drug screening. **Oncotarget**, v. 6, n. 25, 2015.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–221, 6 jun. 2000.

TORCHIA, E. C. et al. Aurora Kinase-A Deficiency during Skin Development Impairs Cell Division and Stratification. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 1, p. 78–86, 2013.

TORGOVNICK, A.; SCHUMACHER, B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. 4, p. 1–15, 2015.

TOUFEKTCHAN, E.; TOLEDO, F. The Guardian of the Genome Revisited: p53 Downregulates Genes Required for Telomere Maintenance, DNA Repair, and Centromere Structure. **Cancers**, v. 10, n. 5, p. 135, 2018.

TUNG, Y.-C. et al. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. **The Analyst**, v. 136, n. 3, p. 473–478, 2011.

VAN RIJT, S. H.; SADLER, P. J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug Discovery Today**, 2009.

VANTANGOLI, M. M. et al. Morphologic Effects of Estrogen Stimulation on 3D MCF-7 Microtissues. **Toxicology Letters**, v. 248, p. 1–8, 2016.

VAZ, C. A. V. **Effect of Regucalcin on the expression of oncogenes and tumor suppressor genes in prostate cell lines**. Thesis. Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2010.

VERJANS, E.-T. et al. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort? **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 4, p. 2993–3003, abr. 2018.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labelled expression on Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 95, p. 39–51, 1995.

VIJAYAN, P. et al. 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**, v. 768, p. 163–177, 2014.

VIJAYARAGHAVAN, S. et al. Inhibiting CDK in Cancer Therapy: Current Evidence and Future Directions Targeted Oncology. **Targeted Oncology**, v. 13, n. 1, p. 21–38, 2018.

VINCI, M. et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. **BMC Biology**, v. 10, n. 1, p. 29, 2012.

VITALE, I. et al. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 6, p. 385–392, 2011.

WAN, D. et al. Synthesis and anticancer properties of ruthenium (II) complexes as potent apoptosis inducers through mitochondrial disruption. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 139, p. 180–190, 2017.

WANG, F. et al. Protective effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced oxidative stress and DNA damage in HepG2 cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 8, n. 6, p. 1939–1945, dez. 2014.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 5–6, p. 612–616, 1999.

WANG XIANG, J., YAN, M., ZHANG, Y., ZHAO, Y., YUE, C., XU, J., ZHENG, F., CHEN, J., KANG, Z., CHEN, T., XING, D., LIU, Q., L. et al. The Mitotic Kinase Aurora-A Induces Mammary Cell Migration and Breast Cancer Metastasis by Activating the

Cofilin-F-actin Pathway. **Cancer Research**, v. 70, n. 22, p. 9118–9128, 2010.

WANG, Y.; ZHU, W. G.; ZHAO, Y. Autophagy substrate SQSTM1/p62 regulates chromatin ubiquitination during the DNA damage response. **Autophagy**, v. 13, n. 1, p. 212–213, 2017.

WEISS, A. et al. 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.**, v. 5, n. 12, p. 4742–4748, 2014.

WELLINGTON, K. W. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review. **RSC Adv.**, v. 5, n. 26, p. 20309–20338, 2015.

WILLEMS, E. et al. The functional diversity of Aurora kinases: A comprehensive review. **Cell Division**, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2018.

XIAO, D. et al. Diallyl trisulfide-induced G2-M phase cell cycle arrest in human prostate cancer cells is caused by reactive oxygen species-dependent destruction and hyperphosphorylation of Cdc25C. **Oncogene**, v. 24, n. 41, p. 6256–6268, 2005.

XU, S.; WEIHUA, Z. Loss of EGFR induced autophagy sensitizes hormone refractory prostate cancer cells to adriamycin. **Prostate**, v. 71, n. 11, p. 1216–1224, 2011.

YAMANAKA, K. et al. Antitumor activity of YM155, a selective small-molecule survivin suppressant, alone and in combination with docetaxel in human malignant melanoma models. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 16, p. 5423–5431, 2011.

YANG, C. et al. Aurora-B Mediated ATM Serine 1403 Phosphorylation Is Required for Mitotic ATM Activation and the Spindle Checkpoint. **Molecular Cell**, v. 44, n. 4, p. 597–608, 2011.

YOKOTA, J. Tumor progression and metastasis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 497–503, 2000.

ZEKRI, A. et al. Inhibitor of Aurora Kinase B Induces Differentially Cell Death and Polyploidy via DNA Damage Response Pathways in Neurological Malignancy: Shedding New Light on the Challenge of Resistance to AZD1152-HQPA. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 3, p. 1808–1823, 2016.

ZEKRIA, A. et al. Reactive oxygen species generation and increase in mitochondrial copy number: New insight into the potential mechanism of cytotoxicity induced by aurora kinase inhibitor, AZD1152-HQPA. **Anti-Cancer Drugs**, v. 28, n. 8, p. 841–851, 2017.

ZENG, C. C. et al. The induction of apoptosis in HepG-2 cells by ruthenium(II) complexes through an intrinsic ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 122, p. 118–126, 2016.

ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New metal complexes as potential therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 4, p. 481-489, 2003.

ZHANG, Y.; HUNTER, T. Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. **International Journal of Cancer**, v. 134, n. 5, p. 1013–1023, 2014.

ZHAO, J. et al. Ruthenium arene complex induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of P53-mediated signaling pathways. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 898, p. 120-139, 2019.

ZHENG, W. L. et al. ROS-mediated cell cycle arrest and apoptosis induced by zearalenone in mouse sertoli cells via ER stress and the ATP/AMPK pathway. **Toxins**, v. 10, n. 1, 2018.

ZORZET, S. et al. Lack of In vitro cytotoxicity, associated to increased G(2)-M cell fraction and inhibition of matrigel invasion, may predict In vivo-selective antimetastasis activity of ruthenium complexes. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 295, n. 3, p. 927–933, 2000.

ZUMRUTDAL, E.; OZASLAN, M. A miracle plant for the herbal pharmacy; Henna (*Lawsonia inermis*). **International Journal of Pharmacology**, v. 8, n. 6, p. 483–489, 2012.

Capítulo 2



Novel lawsone-containing ruthenium(II) complexes: Synthesis, characterization and anticancer activity on 2D and 3D spheroid models of prostate cancer cells

Rone Aparecido De Grandis^{a,*}, Patrick Wellington da Silva dos Santos^b, Katia Mara de Oliveira^c, Ana Rita Tomazela Machado^b, Alexandre Ferro Aissa^b, Alzir Azevedo Batista^c, Lusânia Maria Greggi Antunes^b, Fernando Rogério Pavan^{a,*}

^a School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Araraquara, São Paulo 14800-903, Brazil

^b School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14040-903, Brazil

^c Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo 13561-901, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cancer
1,4-naphthoquinone
3D-cell culture
ROS
Apoptosis
BAX/BCL-2

ABSTRACT

This study describes a series of newly synthesized phosphine/diimine ruthenium complexes containing the lawsone as bioligand with enhanced cytotoxicity against different cancer cells, and apoptosis induction in prostatic cancer cells DU-145. The complexes [Ru(law)(N-N)₂](PF₆) where N-N is 2,2'-bipyridine (1) or 1,10-phenanthroline (2) and [Ru(law)(dppm)(N-N)]PF₆, where dppm means *bis*(diphenylphosphino)methane, N-N is 2,2'-bipyridine (3) or 1,10-phenanthroline (4), and law is lawsone, were synthesized and fully characterized by elemental analysis, molar conductivity, NMR, UV-vis, IR spectroscopies and cyclic voltammetry. The interaction of the complexes (1–4) with DNA was evaluated by circular dichroism, gel electrophoresis, and fluorescence, and the complexes presented interactions by the minor grooves DNA. The phosphinic series of complexes exhibited a remarkably broad spectrum of anticancer activity with approximately 34-fold higher than cisplatin and 5-fold higher than doxorubicin, inhibiting the growth of 3D tumor spheroids and the ability to retain the colony survival of DU-145 cells. Also, the complex (4) inhibits DU-145 cell adhesion and migration potential indicating antimetastatic properties. The mechanism of its anticancer activity was found to be related to increased reactive oxygen species (ROS) generation, increased the BAX/BCL-2 ratio and subsequent apoptosis induction. Overall, these findings suggested that the complex (4) could be a promising candidate for further evaluation as a chemotherapeutic agent in the prostate cancer treatment.

1. Introduction

The research based on transition metals was strongly encouraged thanks to the quest for novel anticancer therapies [1]. So far, cisplatin is probably still the most essential chemotherapeutic based on metals complexes. However, platinum complexes have caused several side effects and cross drug resistance which limited their applications [2]. Therefore, the development of novel metallodrugs agents remains a significant challenge.

In this important field, ruthenium-based complexes are highlighted due to its unique properties as chemical stability, a variety of oxidation states, structural diversity, low toxicity and ability to mimic iron binding in the biological system [3–6]. Moreover, several ruthenium (Ru) complexes have been foreground reported due to its antimetastatic

activities, low toxicity to non-cancer cells and high selectivity for tumor cells [7,8]. For instance, some Ru complexes as NAMI-A (*trans*-[RuCl₄(1H-imidazole)(DMSO-S)]), NKP-1339 (sodium [*trans*-RuCl₄(1H-imidazole)₂]) and KP1019 (*trans*-[RuCl₄(1H-imidazole)₂]) have been evaluated in preclinical and phase I or II clinical trials, representing a novel class of less toxic antineoplastic chemotherapy [9,10]. Accumulative evidences suggest that Ru-based compounds could act as potential anticancer agents through molecular mechanisms providing an increase of reactive oxygen species (ROS) [11], DNA intercalation [12], DNA damage [13], induction of cell apoptosis and metastasis inhibition [14,15].

One rational approach to improve the efficacy of metal complexes consists of incorporating different chelating ligands with complementary biological activity to enhance the physiological targets of

* Corresponding authors.

E-mail addresses: degrandis.rone@fcf.usp.br (R.A. De Grandis), fernando.pavan@unesp.br (F.R. Pavan).

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.010>

Received 11 September 2018; Received in revised form 29 January 2019; Accepted 3 February 2019

Available online 08 February 2019

0045-2068/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

the metallodrug. In this context, active ligands with quinone moiety represent an unquestioned tool in bioinorganic medicinal chemistry for improving the anticancer activity of metal complexes. Undoubtedly, some quinone based drugs such as doxorubicin, mitomycin C, and mitoxantrone are recognized as FDA-approved compounds with excellent anticancer properties [16,17]. A representative class of quinone compounds, known as naphthoquinones, widely distributed in nature, have been recognized to own an extensive range of biological activities such as antimicrobial [18], antiparasitic [19], antiviral [20] and anticancer activity [21].

Mainly, 1,4-naphthoquinone, or lawsone, is an example of a natural compound that contains two ketone groups as suitable chromophore responsible for its biological activity due to their ability to accept electrons [22,23]. Recently, lawsone compounds have shown promising pharmacological effects presenting antiproliferative activity in a large number of cancer cell lines and inhibition of tumor burden *in vivo* [24,25].

Furthermore, findings indicated that anticancer activity also might be related to the inhibition of the enzyme DNA-topoisomerase II [26]. Lawsone can bind potentially to metal ions in different oxidations states coordinating metals in a bidentate way which allows them to play an essential role in biological systems [27]. Indeed, some metal complexes containing lawsone ligands have been exhibited higher biological activity than free lawsone [28]. Therefore, as part of our ongoing effort to design multi-target bioactive metallodrug candidates, in the last years our research group has synthesized several Ru-complexes containing phosphine and diimines ligands with promising pharmacological activities for anticancer proposes [29–35]. In light of these considerations and of some previous results, herein we have investigated the anticancer properties of the newly synthesized phosphine/diimine Ru-complexes containing lawsone as bioligand. The corresponding complexes 1–4 (showed in Fig. 1) were synthesized and characterized, and their potential as anticancer agents was investigated for the first time

towards a comprehensive panel of human cancer cell lines cultured in conventional and 3D models. Besides, we analyzed the antimetastatic effects on human prostate carcinoma DU-145 cells and their ability to interact with CT-DNA. Finally, for elucidating the anti-cancer functions and molecular mechanisms, reactive oxygen species (ROS) production and apoptosis-inducing ability were also investigated.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis of novel lawsone-containing ruthenium complexes

The complexes (1–4) containing lawsone (law), phosphines and diimines as ligands were obtained according to the procedure illustrated in Fig. 1.

The synthetic route obtained pure complexes with high-yield according to spectroscopic data, as well as elemental analyses, molar conductivity and $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, ^1H and ^{13}C NMR spectrum. All complexes are dark purple air-stable solids, soluble in dichloromethane, acetone, methanol, dimethyl sulfoxide and water insoluble.

In the IR spectra of the free law is observed the intense band of the stretching modes of the phenolic $\nu(\text{O}-\text{H})$ around 3200 cm^{-1} , this band disappear from the spectra of all complexes, indicating the ligand deprotonation and the coordination by oxygen. The band relative to the carbonyl group ($\text{C}_1=\text{O}$) at 1640 cm^{-1} in the free law were shifted to lower frequencies, around 1603 cm^{-1} in the complexes, denoting the bidentate coordination. Also, the band at 1679 cm^{-1} of the group ($\text{C}_4=\text{O}$) also presented a small displacement to lower frequencies, 1614 cm^{-1} . The band C_2-O presented displacement from 982 cm^{-1} to 1098 cm^{-1} , approximately, in the complexes, which are in concordance with the coordination by the oxygen. The same behavior was observed for others ruthenium complexes containing the lawsone as ligand [28].

The complexes (1–4) were characterized by $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. In the $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ of complexes (3) and (4) was

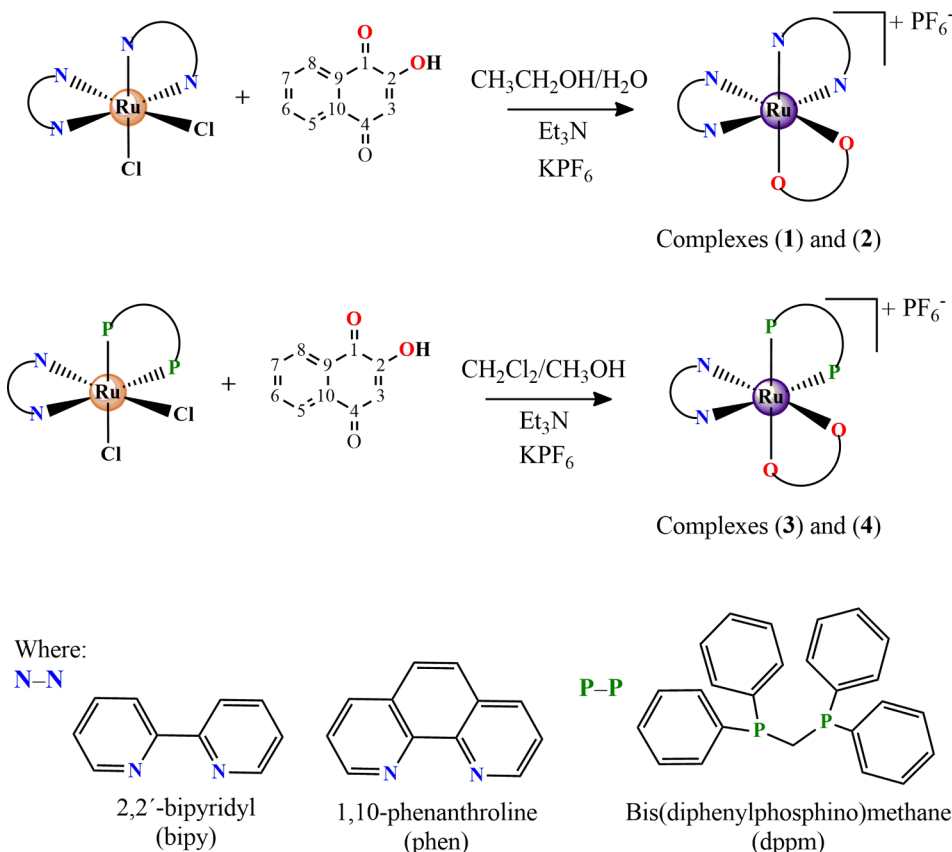


Fig. 1. Synthetic route to the preparation of the new ruthenium complexes containing the naphthoquinone lawsone.

observed four pairs of signals (17.9/6.7 ppm and 15.2/5.9 ppm for complex (3) and 18.2/6.6 ppm and 15.4/6.2 ppm for complex (4)) for the two phosphorus atoms of diphosphine dpmm, indicating the non-equivalence of phosphorus. The duplication of the signals is due to the formation of isomers, where there is an isomer with the phosphorus atom of dpmm trans to the oxygen of the carbonyl of lawsone, and in the other, the oxygen atom of the carbonyl is trans to the nitrogen of bipy or phen (see [Supplementary Information, Figs. S2–S3](#)). In the ^1H spectra of all complexes were observed the presence of the singlet at ca. 5.8 ppm belonging to the hydrogen of bonded to carbon 3 of lawsone. In the case of complex (4) was observed in the region of 9.2–6.3 multiplets referring to 32 hydrogen atoms from the dpmm, phen and law, and in 5.5 ppm was observed the multiplet attributed to the CH_2 of aliphatic chain of dpmm. All complexes presented the same behavior.

Characteristic NMR ^{13}C signals belonging to the carbon of carbonyl groups of lawsone were observed for complex (4) at 200.3 ppm ($\text{C}_1=\text{O}$), 182.5 ppm ($\text{C}_4=\text{O}$) and 172.6 ppm ($\text{C}_2=\text{O}$). These signals are observed in 184.5 ppm ($\text{C}_1=\text{O}$), 181.2 ppm ($\text{C}_4=\text{O}$) and 159.5 ppm ($\text{C}_2=\text{O}$) in free lawsone. The most significant displacements are found for the carbons atoms of the groups $\text{C}_1=\text{O}$ and $\text{C}_2=\text{O}$, indicating the coordination of these oxygen atoms. More recently, our research group developed *trans*- $[\text{Ru}(\text{law})(\text{PPh}_3)_2(\text{N}-\text{N})]\text{PF}_6$ complexes and were observed the same behavior in NMR experiments [31].

The electrochemical behavior of the complexes was evaluated by cyclic voltammetry and the redox process $\text{Ru(II)}/\text{Ru(III)}$ for all complexes were observed in the region of 1–1.1 V. The values are higher than those for complexes precursors, which occur around 0.1–0.6 V. This difference can be explained by the higher stability of the complexes after coordination of lawsone, due the replacement of two chlorides σ and π donor by a negative monocharged chelating lawsone.

2.2. Partition coefficient ($\log P$) study

Determining the lipophilicity is an important physicochemical property that figures out the possible pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of new drugs candidates in the discovery development phase [36]. The well-known shake-flask has been widely recommended as a reference method to determine a partition coefficient experimentally [37]. The $\log P(\text{o/w})$ values, calculated by the shake-flask method, were positive and ranged from 0.228 ± 0.012 to complex (1), 0.573 ± 0.023 to complex (2), 0.437 ± 0.025 to complex (3) and 0.793 ± 0.031 to complex (4). As demonstrates, the higher lipophilicity of complexes (2) and (4) can be attributed to the presence of phen ligand. Other studies established that the presence of 1,10-Phenanthroline acts improving the lipophilicity of silver complexes when compared to bipyridine analogs [38]. Our finding also suggests that the use of diphosphines as ligands can adjust the lipophilic/hydrophilic balance in metal complexes, where in general, its biological activity is found to increase thanks to an increase in the lipophilicity [39]. Thus, the $\log P$ indicates that the coordination of phen and dpmm chelating ligands in one single molecular structure improve the lipophilicity and, as a consequence, may contribute to enhance the cell membrane permeability and its biological activity.

2.3. The complexes display enhanced cytotoxicity against a panel of cancer cell lines

The cytotoxicity of the ruthenium complexes was evaluated in a panel of different histological types of cancer cell lines (A549, Caco-2, DU-145, HepG2, PC-3 and MDA-MB-231) and against two non-cancer cells (FGH and HUVEC) in two-dimensional (2D) culture by Alamar Blue assay 24 h after incubation, as shown in [Table 1](#). All of the complexes presented enhanced cytotoxicity to different cancer cells and more potent activity than metal-free lawsone. The synthesized Ru(II) phosphine complexes investigated exhibited remarkable cytotoxic properties displaying better anticancer activity than cisplatin

(Fauldcispla[®]) and doxorubicin (Fauldoxo[®]). As expected, the phosphine-coordinating ligand improved not only the lipophilicity of ruthenium compounds but also their biological activity. Metal complexes with different phosphine ligands had antitumor profiles characterized by high cytotoxic potency and selectivity between different cancer cells [40,41]. Compared to the other complexes and metal-free lawsone, the phosphine complexes (3) and (4) had low IC_{50} values, where complex (3) presented IC_{50} values ranging from 1.9 to 4.8 μM for cancer cell lines DU-145 and A549, respectively and (4) presented IC_{50} values ranging from 1.3 to 3.0 μM for cancer cell lines DU-145 and MDA-MB-231, respectively.

In addition, complex (3) was more potent than cisplatin in A549 (3-fold), Caco-2 (7-fold), DU-145 (12-fold), HepG2 (6-fold), PC-3 (6-fold) and MDA-MB-231 (10-fold). Complex (4) was more potent than doxorubicin on DU-145 (4-fold), HepG2 (2-fold), PC-3 (2-fold) and cisplatin on A549 (4-fold), Caco-2 (8-fold), DU-145 (18-fold), HepG2 (6-fold), PC-3 (9-fold) and MDA-MB-231 (12-fold). The precursors of types $[\text{RuCl}_2(\text{N}-\text{N})_2]\text{PF}_6$ and $[\text{RuCl}_2(\text{dpmm})(\text{N}-\text{N})]\text{PF}_6$ ($\text{N}-\text{N} = 2,2'$ -bipyridine or 1,10-phenanthroline) exhibited weak cytotoxicity ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). The IC_{50} value for non-cancer cells was 4.3 and 8.1 μM for the complex (3), 3.2 and 6.9 μM for the complex (4) and 1.9 and 4.6 μM for doxorubicin on FGH and HUVEC cells, respectively.

[Table 2](#) shows the calculated selectivity index (SI) of each compound. The SI was calculated using the following formula: $\text{SI} = \text{IC}_{50} [\text{non-cancer cells}] / \text{IC}_{50} [\text{cancer cells}]$. The SI is a clear manner to estimate the therapeutic range of a drug and to identify drug candidates for further studies [11]. Complexes (3) and (4) were more cytotoxic and selective to prostate cancer cells DU-145. Furthermore, both complexes exhibit selectivity index greater than displayed by the drug controls cisplatin and doxorubicin, which are clinically useful drugs in the treatment of cancer. Probably, the presence of the dpmm ligand in the complexes (3) and (4) may contribute to increasing cytotoxic activity, as previously observed for other ruthenium complexes, where the increase of phosphine ligands is directly related to the increase of biological activity [30,42].

The promising cytotoxic activity of the complexes (3) and (4) towards prostate cancer cells encouraged us to study their effects at the cellular level. In a new set of experiment, DU-145 cell line was used as a cellular model, since it was among the most sensitive cell line to the complexes tested. Therefore, the cytotoxicity of phosphine complexes was confirmed by clonogenic survival assay that is extremely sensitive to determine the effects on cell proliferation after treatments. Clonogenic assays represent the gold-standard method to study the cytotoxic and constitute a traditional technique of choice to determine the long-term effect of proliferating cells [43]. The results revealed that both complexes inhibited cell colony formation of DU-145 cells in a dose-dependent manner as shown in [Fig. 2A](#). The plating efficiency of untreated DU-145 cells was higher than 70% for all replicates. Moreover, following seven days of culture, the inhibitory effect of the complex (4) was greater than that of the complex (3) at the same concentration. At concentrations of 0.125, 0.25, 0.5 and 1 μM , the complex (3) reduced the colony-forming presenting survival fractions (SF) of 79.1, 68.2, 31.1 and 13.4%, respectively. Complex (4), at same concentrations, presented SF of 68.1, 39.5, 22.4 and 5.1%, respectively. No significant ($p > 0.05$) decrease in the number of colonies was observed in control (DMSO 0.1% v/v). Few colonies of DU-145 cells were visible after incubation with 1 μM of (4) which indicates that the substitution of diimine ligand increases the activity of the compound ([Fig. 2B](#)).

The higher cytotoxicity, exhibited by complexes (3) and (4), indicated that the coordination of phosphine and lawsone chelating ligands in one single molecule made it possible to create a compound with increased antitumor activity. Furthermore, these findings predicted the loss of clonogenicity of DU-145 cells after the exposure with (3) and (4) which is an effective parameter to distinguish the cytostatic of the cytotoxic effects of drug treatments [44]. Cisplatin did not

Table 1

Cytotoxic activity of Ru complexes in human cell lines.

	IC ₅₀ in μ M							
	FGH	HUVEC	A549	Caco-2	DU-145	HepG2	PC-3	MDA-MB-231
BB	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
BP	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
DB	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
DP	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
LAW	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
(1)	74.3 $\pm$ 1.4	93.1 $\pm$ 7.4	99.1 $\pm$ 0.2	60.3 $\pm$ 5.3	41.4 $\pm$ 4.5	53.9 $\pm$ 3.8	61.9 $\pm$ 2.3	63.1 $\pm$ 5.7
(2)	80.7 $\pm$ 6.6	78.7 $\pm$ 2.2	69.1 $\pm$ 5.2	58.1 $\pm$ 2.9	37.2 $\pm$ 2.1	49.0 $\pm$ 3.6	52.1 $\pm$ 1.0	69.4 $\pm$ 4.5
(3)	4.3 $\pm$ 0.6	8.1 $\pm$ 1.6	4.8 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.9	3.6 $\pm$ 0.5
(4)	3.2 $\pm$ 0.4	6.9 $\pm$ 0.8	4.2 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 1.8	3.0 $\pm$ 0.3
CIS	11.2 $\pm$ 0.5	11.0 $\pm$ 0.5	16.5 $\pm$ 1.0	19.9 $\pm$ 0.9	24.5 $\pm$ 2.8	11.4 $\pm$ 1.6	21.3 $\pm$ 0.1	37.4 $\pm$ 6.2
DXR	1.9 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 1.8	1.8 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 1.3	3.8 $\pm$ 1.6	4.5 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.3

Data are presented as the means $\pm$ S.E.M. of IC₅₀ values in μ M obtained by nonlinear regression from at the least three independent experiments performed in triplicate, measured by Alamar blue assay after 24 h incubation. Cancer cells: A549 (human lung carcinoma); Caco-2 (human colorectal adenocarcinoma); DU-145 (human prostate carcinoma); HepG2 (human hepatocellular carcinoma); PC-3 (human prostate adenocarcinoma) and MDA-MB-231 (human breast adenocarcinoma). Non-cancer cells: FGH (human mouth fibroblast) and HUVEC (human umbilical vein endothelial cells). The precursor complexes *bis*-bipyridine (BB), *bis*-phenanthroline (BP), *bis*-diphenylphosphinomethane:bipyridine (DB), diphenylphosphinomethane:phenanthroline (DP) and the ligand lawsone (LAW) were used as controls. Cisplatin (CIS, Fauldcispla[®]) and doxorubicin (DXR, Fauldoxo[®]) were used as positive controls.

Table 2

Selectivity index of the Ru complexes.

		Cancer cells					
		A549	Caco-2	DU-145	HepG2	PC-3	MDA-MB-231
Non-cancer cells	FGH	(1) 0.7	1.2	1.8	1.4	1.2	1.2
		(2) 1.1	1.4	2.2	1.6	1.5	1.2
		(3) 0.9	1.6	2.3	2.4	1.3	0.8
		(4) 0.8	1.3	2.5	1.8	1.4	1.0
	CIS	0.7	0.6	0.4	1.0	0.5	0.3
	DXR	0.8	1.0	0.7	0.5	0.4	0.7
HUVEC		(1) 0.9	1.5	2.2	1.7	1.5	1.4
		(2) 1.1	1.3	2.1	1.6	1.5	1.1
		(3) 1.6	3.1	4.2	4.5	2.4	2.2
		(4) 1.6	2.8	5.3	3.8	3.1	2.3
	CIS	0.6	0.5	0.4	0.9	0.5	0.2
	DXR	2.0	2.5	1.8	1.2	1.0	1.8

Data are presented with the selectivity index (SI) calculated using the following formula: SI = IC₅₀[non-cancer cells]/IC₅₀[cancer cells]. Cancer cells: A549 (human lung carcinoma); Caco-2 (human colorectal adenocarcinoma); DU-145 (human prostate carcinoma); HepG2 (human hepatocellular carcinoma); PC-3 (human prostate adenocarcinoma) and MDA-MB-231 (human breast adenocarcinoma). Non-cancer cells: FGH (human mouth fibroblast) and HUVEC (human umbilical vein endothelial cells). Cisplatin (CIS – Fauldcispla[®]) and doxorubicin (DXR – Fauldoxo[®]) were used as positive controls.

significantly reduce the colony-forming at the same concentrations analyzed ($p > 0.05$).

In complementary to conventional cell monolayer cytotoxic assays performed, we also established 3D multicellular tumor spheroids (MCTS) based on DU-145 cells and used this model for investigating the activity of the ruthenium phosphine complexes toward prostate carcinoma spheroids. The MCTS is a well-established 3D *in vitro* model system that closely reflects the *in vivo* tumor environment concerning nutrient and oxygen gradients, hypoxic/necrotic regions, cell-cell matrix interactions, and gene expression profiles [45]. Therefore, the MCTS was introduced to mimic solid tumors *in vitro* and to study the viability of DU-145 cancer cells treated with the Ru(II) complexes once this model represents a great tool for drug discovery [46,47]. Spheroids grown in ultra-low attachment 96-well plates for 5 days were treated with complexes (3) and (4) for a period of 24 h to determinate the MCTS viability and were examined for morphological changes until 12 days. The Alamar Blue assay showed that complexes (3) and (4) reduced the viability of DU-145 MCTS after treatment (Fig. 3A). In

general, DU-145 MCTS showed more considerable resistance to both complexes compared to the 2D-cultured cells. Indeed, the MCTS are typically more resistant to antiproliferative compounds because of the differences in the drugs penetration and varying microenvironments (such as pH, hypoxia, extracellular matrix) within spheroids [48]. Similar to *in vivo* tumors, the hypoxic regions inside the spheroids reduces the rate of cell division impairs the effects of anti-proliferative drugs such as cisplatin [49].

Interestingly, the cells in the spheroids showed morphological changes, indicating an effective permeability into spheroid and, therefore, cytotoxicity. The treatment with complex (4) disrupted the cell aggregations, resulting in the presence of cell debris after 9 days, suggesting disturbance in cell-matrix interactions (Fig. 3B). The IC₅₀ of the complexes (3) and (4) was 4.1 and 3.4 μ M, respectively, while cisplatin presented IC₅₀ of 62.6 μ M. The complex (4) was more potent than cisplatin at the least 18-fold, demonstrating that its cytotoxic activity is effective in the tumor microenvironment, independent of hypoxia. Therefore, (4) was selected for detailed studies of the mechanism of cell death.

2.4. The complexes reduce DU-145 cell adhesive and migratory potential

Afterward, cell adhesion and migration assays were performed to evaluate the antimetastatic capability of the complex (4). Cancer metastasis mainly occurs due to the migration and adhesion of neoplastic cells from a primary tumor to distant sites following angiogenesis and tumor growth [50]. Therefore, in this research, the anti-migratory and anti-adhesive effects of the complex (4) were investigated by wound healing and extracellular matrix adhesion assay on DU-145 cells. For this assays, the cells were treated with concentrations below the IC₅₀ values of (4) (1.3 $\pm$ 0.2 μ M, in 24 h). As seen in Fig. 4, untreated DU-145 monolayers were wounded at 0 h and images were registered at different time points after the treatment. The wound space was reduced severely in size in the absence of compounds because of cell proliferation and migration. Complex (4) inhibits the cell migration of DU-145 cells, exhibiting deeply reduced wound healing patterns after 48 h were the cells exposed to 0.5 μ M presents inhibition of 80% of wound closure, compared to control at the same time. Indeed, the complex (4) as expectedly showed an antimetastatic feature, in accordance with the previously reported studies of anti-migratory and anti-angiogenic effects of others ruthenium complexes containing phosphines and diimines as ligands [28,51]. These data demonstrate that low concentrations of (4) impaired the androgen-metastatic prostate cancer DU-145 cells migratory potential.

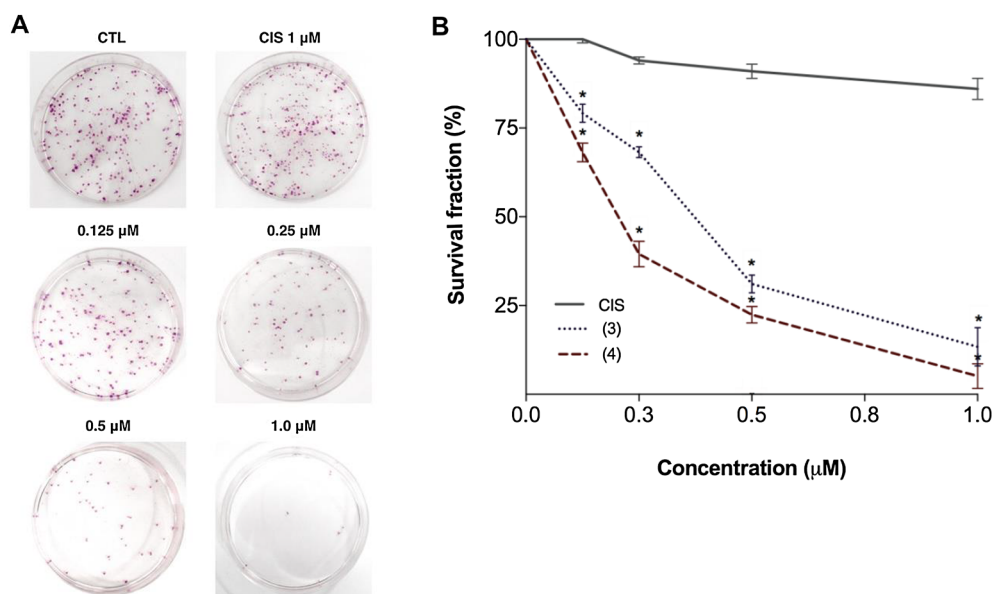
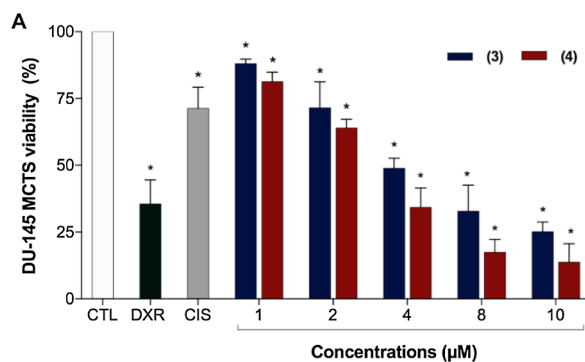


Fig. 2. Assessment of colony survival by clonogenic assay. (A) Representative colony formation images of DU-145 cells after treatment with complex (4). (B) The survival fractions after 24 h treatment with 0.125; 0.25; 0.5 and 1 μM of (3), (4) and cisplatin against DU-145 cells. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% DMSO) used for diluting the tested compound. Data are presented as the means $\pm$ S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ compared with the control by ANOVA followed by Dunnet's test.

Next, we assessed the cell adhesion inhibition of complex (4) using mimic extracellular matrix (ECM) adhesion assay. The *in vivo* binding of cells to the extracellular matrix (ECM) is fundamental for cell survival and cell-to-cell communication but is also essential for the metastatic potential of cancer cells [52]. DU-145 cells were incubated to adhere to either collagen or Matrigel[®] in the presence of different concentrations

of the complex (4) and assessing the relative numbers of attached cells. As measured by colorimetric assay, untreated and vehicle-treated (CTL) cells exhibited similar adhesion to collagen (Fig. 5A) or Matrigel[®] (Fig. 5B). The treatments of DU-145 cells with different concentrations of the complex (4) significantly inhibited the cell adhesion in a concentration-dependent manner. At 0.5 μM the maximum inhibition of



Spheroids	IC ₅₀ in μM		
	(3)	(4)	CIS
DU-145	4.1 $\pm$ 0.1	3.4 $\pm$ 0.5	62.6 $\pm$ 3.2

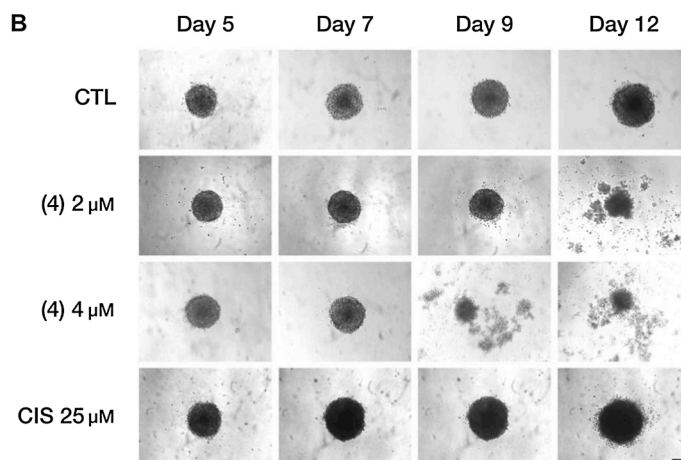


Fig. 3. Effects of the complex (3) and (4) in 3D *in vitro* model of multicellular tumor spheroids of DU-145 cells. (A) The MCTS viability determined by Alamar Blue assay after 24 h treatment and IC₅₀ values in μM obtained by nonlinear regression from at the least three independent experiments performed in triplicate. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% DMSO) used for diluting the compounds tested. Doxorubicin (DOX, Fauldoso[®] 5 μM), Cisplatin (CIS, Fauldcispla[®] 25 μM) were used as the positive controls. (B) DU-145 MCTS were examined using inverted microscope (amplification 200 $\times$), scale bar = 100 μm. Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ compared with the control by ANOVA followed by Dunnet's test.

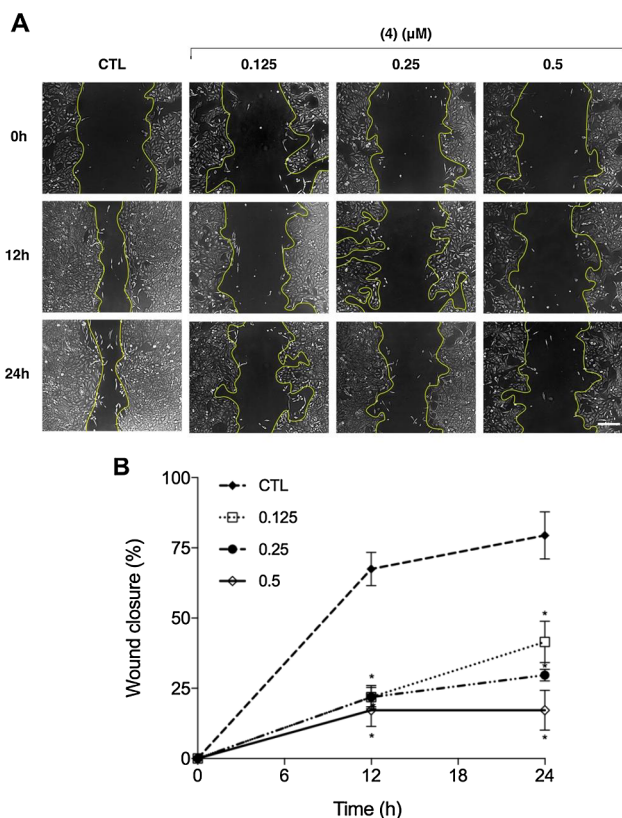


Fig. 4. Inhibitory effects of the complex (4) on DU-145 cells migration *in vitro*. (A) Representative photographs taken at 0, 24 and 48 h post-wound using inverted microscope (amplification 100 $\times$), scale bar = 200 μ m. The cell monolayer was wounded by a 100 μ L pipette tip followed by treatment with different concentrations (0.125, 0.25, and 0.5 μ M) of (4) for 24 h. The distance of the wound edge was measured before and after the treatments. (B) Quantification of the relative migration by wound closure. Wound closure (%) were identified from measurements of the migration distance of DU-145 cells from the control group and with complex (4) treatment. Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate. * p < 0.05 compared with the control by ANOVA followed by Dunnet's test.

DU-145 adhesion was calculated by more than 70% on Matrigel[®] matrix. The anti-metastatic activity of ruthenium compounds is well-recognized by NAMI-A studies [53]. Furthermore, current studies suggest Ru-based complexes inhibits the formation of tube-like structures, an essential step in angiogenesis and metastasis [54]. Our findings indicate that complex (4) reduce the ability of DU-145 cells to adhere to ECMs which may impact on their metastatic capacity.

2.5. DNA interactions

The DNA is the most studied targets when it comes to the development of compounds with antitumor properties. It occurs because the interaction between DNA and compounds can cause irreversible damage and prevent cell replication, leading to cell death [55]. In this context, we investigated the ability of the ruthenium complexes to interact with DNA by Circular Dichroism (CD), fluorescence and gel electrophoresis.

The CD technique can be used to analyze the conformation changes in the secondary structure of the calf-thymus DNA (CT-DNA) by monitoring the two bands in the UV region, a positive band at 275 nm and a negative band at 245 nm, due to base stacking and right-handed helicity, respectively. Thus, the CT-DNA was incubated with ruthenium complexes in different molar ratios (0.1–0.4), and the bands were analyzed, and the effects are shown in Fig. 6 for complex (4). The intensities of negative and positive bands of the CT-DNA did not show any significant change in intensity upon addition of the ruthenium complex, and the same behavior was observed for all complexes (1–4).

The ability of the complexes to change the tertiary structure of DNA was investigated by electrophoresis in agarose gel employing the pBR322 plasmid DNA, upon incubation with ruthenium complexes in different molar ratios. Alterations in the electrophoretic mobility of plasmid DNA on agarose gel is commonly considered as evidence for direct DNA–metal interactions. Modification of the DNA structure causes hindrance in the migration of supercoiled DNA and a slight improvement in the mobility of open circular DNA to a feature where both forms comigrate. The pBR322 presents three forms, OC (open circular), L (linear) and CC (supercoiled), which show different electrophoretic mobility. Fig. 7 shows the effect of ruthenium complexes on the mobility of pBR322 after incubation at 37 $^{\circ}$ C for 18 h. The control in lane 2 refers only to pBR322, and the lanes 3–11 correspond to the pBR322 in the presence of complexes (3) and (4). The complexes were capable of affecting the mobility of the bands of pBR322, mainly to OC

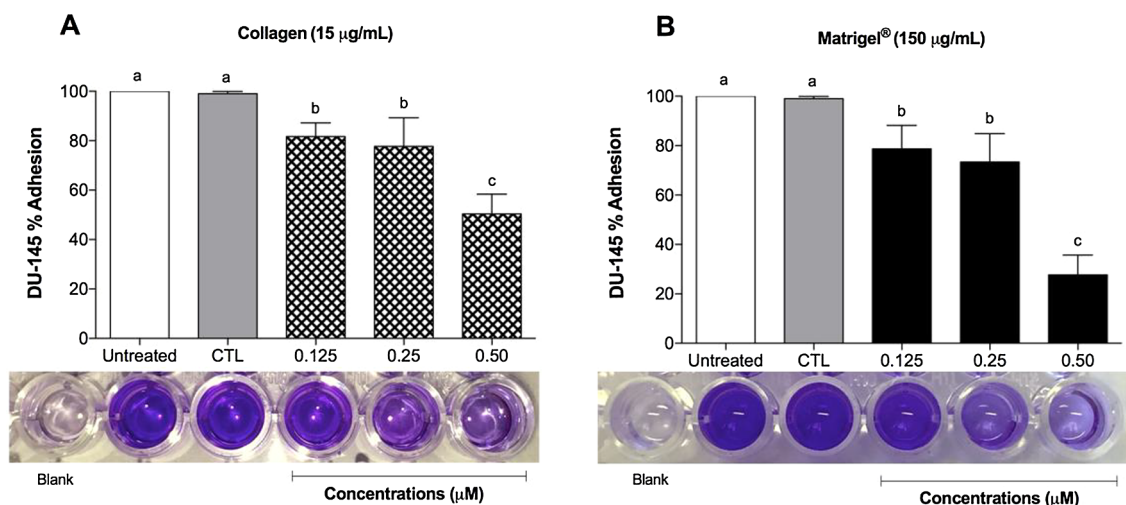


Fig. 5. Complex (4) significantly decreased DU-145 cells adhesive rate on collagen and Matrigel[®] matrixes. DU-145 cells in the presence of 0.125, 0.25 and 0.5 μ M were seeded into 96 well plates coated with collagen (A) and Matrigel[®] (B) and allowed adhere for 24 h after which supernatants were removed and adhered cells washed and stained with crystal violet. Plates were assayed on a plate reader at 590 nm. Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate. Values not sharing the same letter are significantly different from each other (p < 0.05; ANOVA followed by the Tukey's test).

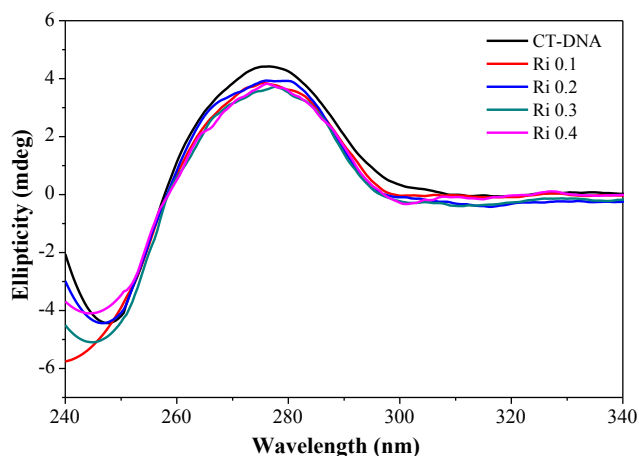


Fig. 6. Fluorescence emission spectra of complex (4) in the presence of increasing amounts of CT-DNA. CD spectra of CT-DNA (50 μ M) in the absence and presence of complex (1) in different molar ratio ($R_i = [\text{complex (4)}]/[\text{DNA}]$), after 18 h of incubation at 37 $^{\circ}$ C.

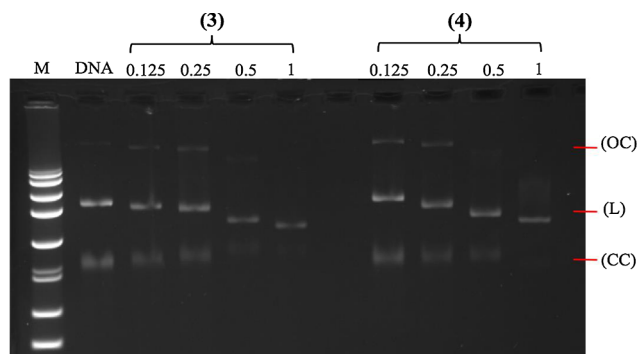


Fig. 7. Electrophoresis mobility of pBR322 plasmid DNA with increasing amounts of complexes (3) and (4) after 18 h of incubation at 37 $^{\circ}$ C.

and CC bands at R_i 0.5 and 1. The complex (4) was found to exhibit nuclease activity followed by conversion of CC into L, proposing single strand DNA cleavage and the amount of nicked DNA increased at 1 μ M showing complete disappearance of CC.

To gain more information about the interaction of complexes with DNA the competition assay using the Hoechst 33258, the fluorescent dye that interacts with DNA through the minor groove, was performed. DNA binding dyes are extensively used to study the mode of drug-DNA interaction. Hoechst 33258 produce a weak fluorescence, but when it binds to DNA a significant increase in fluorescence at 455 nm is observed when excited at 343 nm, thus, it is used as a probe to monitor compounds that interact with DNA [56–58]. Fig. 8 shows the fluorescence spectra of the Hoechst-CT-DNA upon successive addition of complex (4). The complex (4) was able to decrease the fluorescence of the Hoechst-CT-DNA system with increasing of the concentration, indicating that the complex (4) interact with DNA by the minor groove and compete with Hoechst, removing it from DNA structure and consequently, decrease the fluorescence of the system. The same behavior was observed to all ruthenium complexes (Figs. S3–S6 of Supplementary Information). Taken together all the assays employed to investigate the interaction with DNA, we can conclude that ruthenium complexes interact with DNA via the minor groove.

2.6. The complexes induce apoptosis via the BAX/BCL-2 pathway in DU-145 cells

Apoptosis is acknowledged as an essential physiological process in tissue homeostasis. Nevertheless, some cancer cells may adapt to high

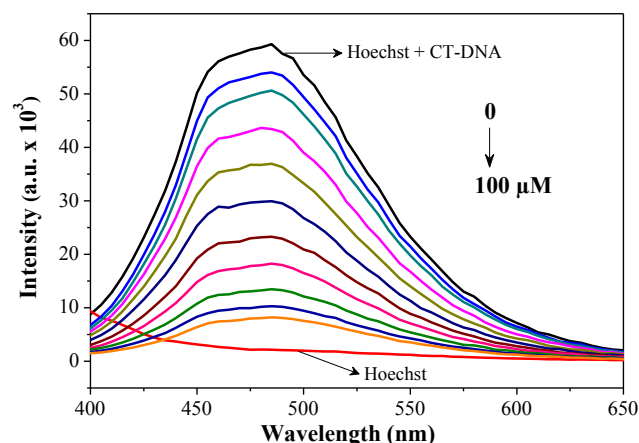


Fig. 8. Emission spectra of Hoechst (2.7 μ M, $\lambda_{\text{ex}} = 343$ nm), CT-DNA (125 μ M) in presence of the complex (4) in different concentrations (0–100 μ M), at 37 $^{\circ}$ C.

levels of oncogenic signaling by disabling their senescence- or apoptosis-inducing circuitry. This acquired resistance is appreciated as a hallmark of almost all types of cancer [58,59]. To evaluate whether the complex (4) presents the ability to induce apoptosis or necrosis, we selected its concentrations that have shown cytotoxic activity. Therefore, nuclear morphology was assessed by Hoechst 33342/propidium iodide (PI) staining technique for fluorescence microscopy. The results clearly showed that complex (4) might induce apoptosis of DU-145 cells based on its staining and morphological characterization after treatments (Fig. 9A).

To determine the percentage of apoptosis and necrosis, the DU-145 cells were treated with 0.25–2.0 μ M of the complex (4) for 24 h followed by annexin V-FITC/PI staining, and the results were analyzed by using flow cytometry. In live cells, phosphatidylserine (Ptd-L-Ser) is located on the cytoplasmic surface of the cell membrane. The exposure of Ptd-L-Ser on the outer leaflet of the plasma membrane is the final event of apoptosis and can be detected by the binding of fluorescently labeled annexin V [60]. Therefore, annexin V-FITC/PI dual staining can be used to quantify the different cell phenotypes that occur during apoptosis. The percentages of early apoptotic, late apoptotic, necrotic and living cells of DU-145 are shown in Fig. 9B. The incubation of DU-145 cells with increasing concentrations of the complex (4) produced a considerable increase in the percentage of apoptotic cells (Q2 and Q4 quadrants) (Fig. 9C). The population of apoptotic cells treated with complex (4) had increased remarkably with dose-dependent relation (6.30% for control group, 19.1% for 0.25 μ M, 30.9% for 0.50 μ M, 45.1% for 1.0 μ M and 66.8% for 2.0 μ M). Cisplatin treatment at the fixed concentration of 25 μ M (IC_{50}) showed 19.5% of apoptotic cells. Therefore, a 100-fold lower concentration of (4) was required for the same effect of cisplatin on DU-145 cells. None of the concentrations induced a significant increase in necrotic cells. Indeed, ruthenium complexes with different ligands have been lead to the apoptosis through the mitochondria, death receptor and oxidative stress pathways [34,61,62]. The molecular mechanism underlying the apoptotic effect of the complex (4) was assessed at the level of mRNA expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic genes. The 24 h treatment with complex (4) at 1.5 μ M (IC_{50}) upregulated BAX expression by 2.73-fold and downregulated the expression of the gene BCL-2 by 2.40-fold (Fig. 9D). BAX and BCL-2 are two members of a gene family involved in the regulation of cellular apoptosis. Gene expression analysis revealed that complex (4) induced an increase of the expression of the pro-apoptotic BAX gene and a decrease of the expression of the anti-apoptotic BCL-2. Cells with a high BAX/BCL-2 ratio will be more sensitive to given apoptotic stimuli when compared to a similar cell type with a comparatively low BAX/BCL-2 ratio [63]. Therefore, the altered ratio might be an essential key question to understand the sensitizing effect

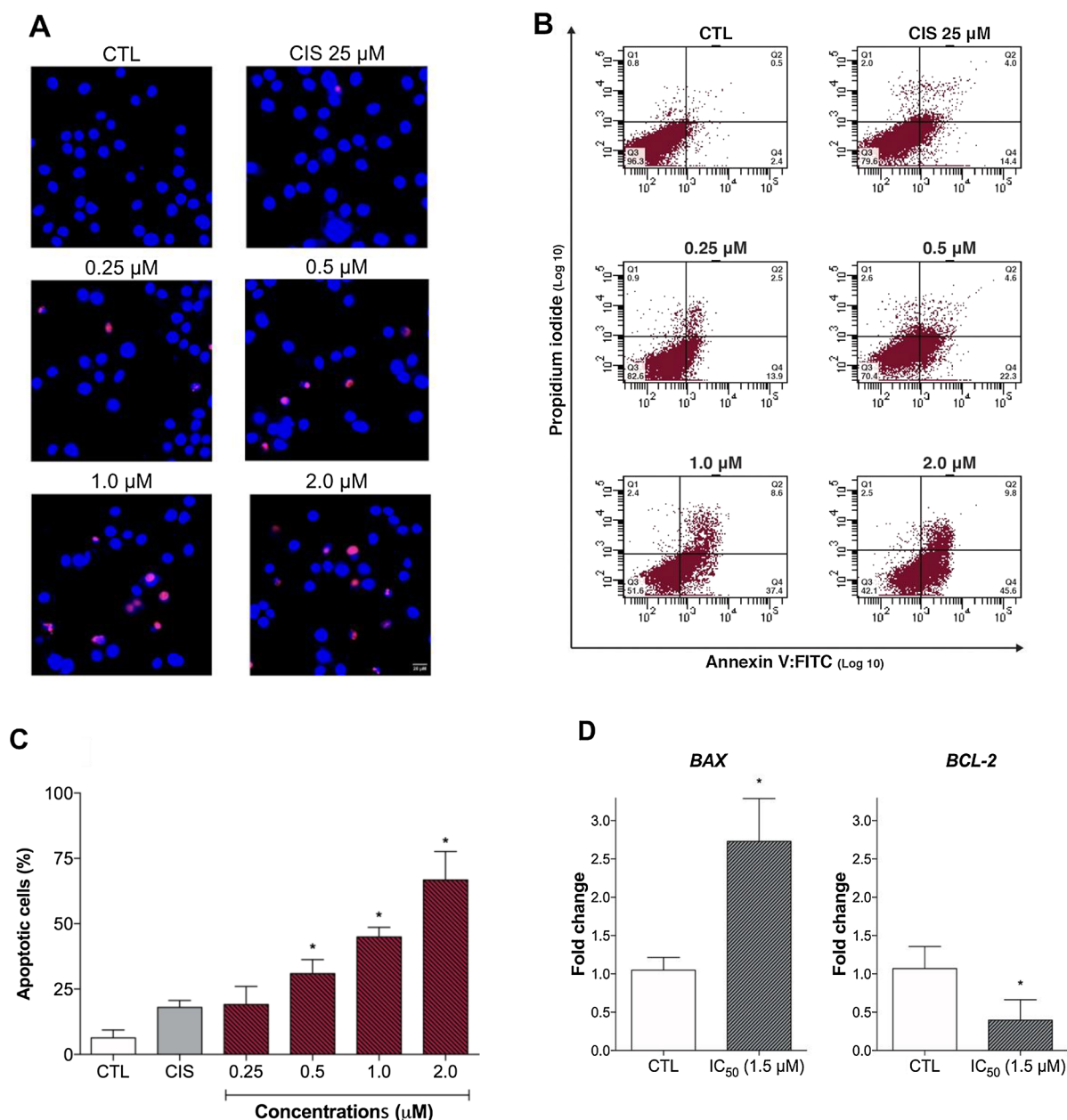


Fig. 9. Effect of the ruthenium complex (4) on the induction of apoptosis in DU-145 cells. (A) Representative images of DU-145 cells double-stained with Hoechst 33342 and PI captured with ImageXpress micro, scale bar = 20 μm . (B) Representative flow cytometry dot plots show the percent cells in the viable (Q3), early apoptotic (Q4), late apoptotic (Q2) and necrotic (Q1) stages as determined by flow cytometry using annexin V-FITC/PI staining. (C) Quantification of apoptotic DU-145 cells. (D) Relative expression of the genes *BAX* and *BCL-2* in DU-145 cells treated with complex (4) for 24 h. *ACTB* was used as reference gene for normalization. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% DMSO) used for diluting the tested compound and cisplatin (CIS, 25 μM) was used as drug control. Data are presented as the means $\pm$ S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate. Ten thousand events were evaluated per experiment, and cellular debris was omitted from the analysis. * $p < 0.05$ compared with the control by ANOVA followed by Dunnett's test.

of the complex (4) in DU-145 cells. Thus, our results demonstrated that complex (4) induced cell death by up-regulation of *BAX* and down-regulation of *BCL-2* in DU-145 cancer cells.

2.7. Scavenging intracellular ROS abolishes the cytotoxic effects of the complex (4)

It has been reported that ROS play an important role in cancer cell death and apoptosis. This activity is widely induced by several chemotherapeutic drugs to kill the cancer cells [64]. To investigate whether ROS production is underlying the cytotoxic activities of the

complex (4), we used the Cellular ROS/Superoxide Detection Assay (ab139476) to detect the production of reactive species of oxygen and nitrogen (ROS/RNS) in DU-145 cells. Previously, the total ROS levels were assessed after a 1, 6, 12 and 24 h of incubation with the complex (4) using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) as a fluorescent dye to determine which time would be more appropriate for a ROS/Superoxide analysis.

As shown in Fig. 10A, upon treatment of DU-145 cells for different times with a single dose of the complex (4) (IC_{50}), a higher increase of ROS generation was observed at 24 h of exposure. Due to this result, the ROS/Superoxide production was assessed after 24 h of treatment with

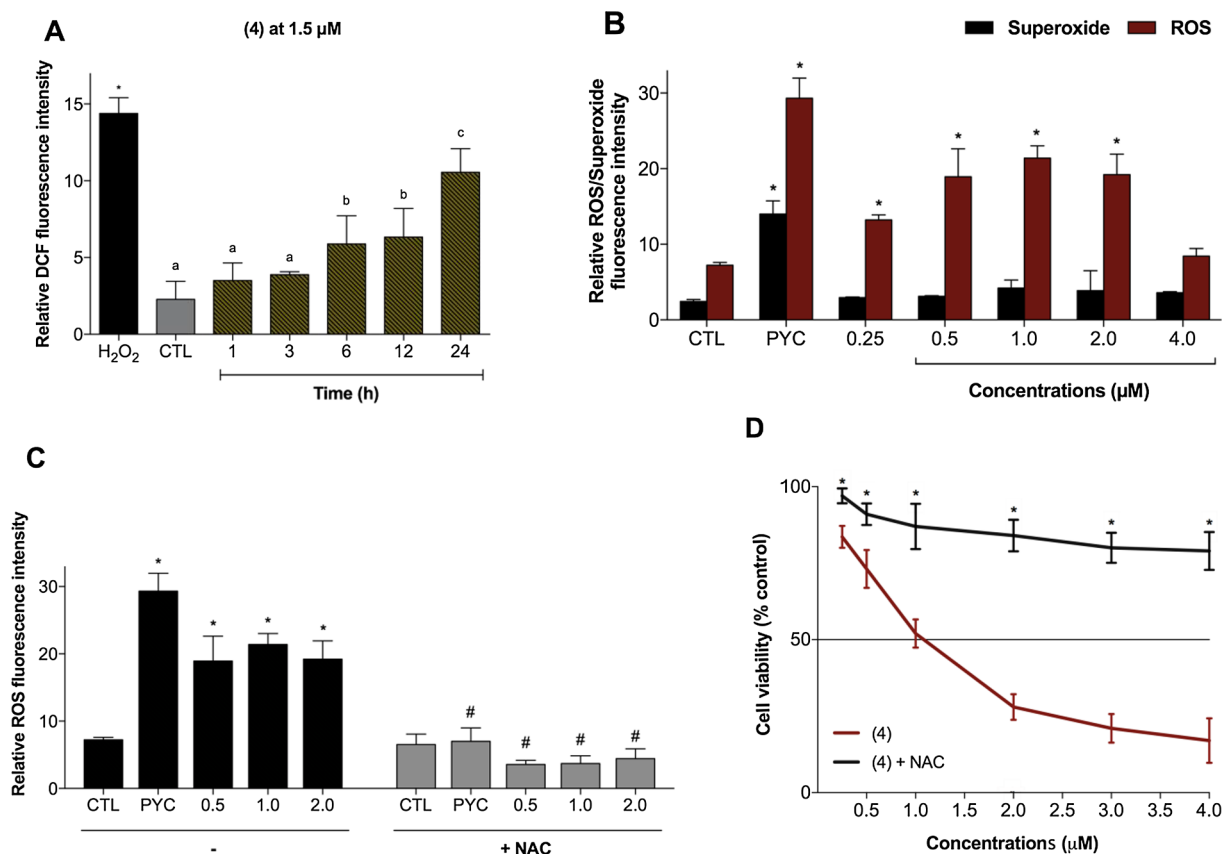


Fig. 10. Effect of the ruthenium complex (4) in the levels of reactive oxygen species (ROS) of DU-145 cells and protection by NAC. (A) ROS levels of DU-145 cells after 1, 3, 6, 12 and 24 h of incubation with complex (4) at IC₅₀ (1.5 μM). (B) Assessment of total intracellular ROS/Superoxide levels 24 h after incubation with different concentrations of (4). (C) ROS levels of DU-145 cells after 24 h treatment with complex (4) at 0.5, 1 and 2 μM with or without the antioxidant NAC (5 mM). (D) Cell viability of DU-145 cells assessed by Alamar Blue assay after 24 h incubation with different concentrations of (4) with or without the antioxidant NAC (5 mM). The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% DMSO) used for diluting the tested compounds. Hydrogen peroxide (H₂O₂, 200 μM) and pyocyanin (PYC, 250 μM) were used as the positive controls. Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate or quadruplicate. * $p < 0.05$ compared with the control by ANOVA followed Dunnet's test. # $p < 0.05$ compared with the respective treatment without NAC by ANOVA followed Dunnet's test. Values not sharing the same letter are significantly different from each other ($p < 0.05$; ANOVA followed by the Tukey's test).

different concentrations of the complex (4). After the complex (4) treatment, DU-145 cells exhibited an increase of reactive species, yielding a fluorescent product indicative of cellular production of different ROS/RNS types (Fig. 10B). Moreover, at 4 μM was observed a decrease of ROS/RNS levels, probably because increasing concentrations promotes cell death. These results indicate that complex (4) can enhance intracellular oxidative stress suggesting that apoptosis may be the principal mechanism of cell death triggered by ROS. This effect can be guaranteed by the use of lawsone that has a mechanism of action closely related with their electron accepting capability producing semiquinone radicals that can induce ROS production in the intracellular environment [65]. On the other hand, the production of superoxide did not appear in any treatment of the complex (4), except in inducer control (pyocyanin).

Besides, to verify whether or not ROS/RNS generation increase is related to the complex (4)-induced cytotoxicity, the cells were treated with the ROS-scavenger *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), an antioxidant that has been demonstrated to present cytoprotective effects against ROS-induced cell death [66]. The results displayed that co-treatment with NAC suppressed the generation of intracellular ROS induced by complex (4) (Fig. 10C) and prevented the reduction of cell viability, as assessed by Alamar Blue assay (Fig. 10D). These findings suggest that the complex (4) played an essential role in inducing apoptosis, just as other naphthoquinones derivatives compounds do [67], by induced increasing oxidative stress, which was prevented by co-treatment with NAC.

3. Conclusions

In this paper, novel lawsone-containing ruthenium(II) complexes were synthesized and assessed for its cellular response in human prostate carcinoma DU-145 cells in 2D and 3D culture systems for the first time. As discussed, other studies have shown that ruthenium complexes have been extensively reported as anticancer candidates *in vitro* and *in vivo* [6,68,69]. Herein we proposed lawsone as a bioactive natural compound that forms ruthenium complexes with potent cytotoxic activity in cancer cells. Overall, the phosphine complexes studied in this work showed promising values of IC₅₀ against DU-145 prostate cancer cells. Complexes (3) and (4) displayed more potent cytotoxicity than metal-free lawsone against different cancer cell lines and can decrease the survival of DU-145 cells at lower concentrations better than cisplatin. Several studies shown the addition of phosphine ligand increase the lipophilicity of the complex, which in turn enhances the cytotoxic effect against several cancer cell lines [70–73]. This effect is related with the enhanced lipophilicity which considerably affecting the uptake by tumor cells and proteins binding [41,74]. Our ruthenium complexes, especially the complex (4), exhibited considerable cytotoxic effects against 3D multicellular DU-145 spheroids that simulate the prostate tumor microenvironment. The compound also exhibited cytotoxic potency over 18-fold orders of magnitude higher than cisplatin in monolayers of DU-145 cancer cells and for 3D multicellular DU-145 tumor spheroids. Even under a low non-cytotoxic concentration of 0.125–0.5 μM , (4) was able to effectively inhibit the cell adhesion and

migration of DU-145 cells indicating antimetastatic potential *in vitro*. Taken together, all the complexes (1–4) showed an effective DNA interactive abilities via DNA minor groove intercalation, which can be considered very valuable taking into account the importance of the history and development of DNA intercalators as anticancer agents. Additionally, complex (4) induced DU-145 cell apoptosis through elevated intracellular ROS levels. Moreover, we also showed that ROS scavenger NAC reduced cytotoxicity induced by ROS production caused by the complex (4). In summary, this study describes a series of newly synthesized phosphine/diimine ruthenium complexes containing the 1,4-naphthoquinone that have been identified as a potent antiproliferative and antimetastatic agents towards DU-145 cells. By our data, we suggest the coordination with naphthoquinone bioligand enhance ROS-induced apoptotic cell death via upregulation of *BAX/BCL-2* ratio. Therefore, the 1,4-naphthoquinone-containing ruthenium complexes showed a promising anticancer activity better than cisplatin toward prostate cancer cells, target the intracellular oxidative stress.

4. Experimental

4.1. Materials

4.1.1. Chemical and equipments

All chemicals used to prepare the ruthenium complexes were of analytical grade or chemically pure grade. The synthesis of the complexes were carried under argon atmosphere. The $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (CAS 13815-94-6), KPF_6 (CAS 17084-13-8), triphenylphosphine (PPh_3 , CAS 603-35-0), *bis*(diphenylphosphino)methane (dppm , CAS 2071-20-7), *N,N* = 2,2'-bipyridine (*bipy*, CAS 366-18-7), 1,10-phenanthroline (*phen*, CAS 66-71-7), resazurin sodium salt (CAS 62758-13-8), calf-thymus DNA (CT-DNA, CAS 73049-39-5), dimethylsulfoxide (DMSO, CAS 67-68-5), dimethylformamide (DMF, CAS 68-12-2), methanol (CAS 67-56-1), acetic acid (CAS 64-19-7), Triton[™] X-100 (CAS 9002-93-1), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA ; CAS 4091-99-0), hydrogen peroxide solution 30% (w/w) (H_2O_2 ; CAS 7722-84-1) agarose (CAS 9012-36-6), collagen (CAS 9007-34-5), trypan blue (CAS 72-57-1), crystal violet (CAS 548-62-9), *N*-acetyl-L-cysteine (NAC, CAS 616-91-1) and pBR322 plasmid DNA from *E. coli* (CAS 93384-17-9) were obtained from Sigma-Aldrich[®] MERCK (St. Louis, MO, USA). Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640), trypsin-EDTA 5X, accutase, L-glutamine, antibiotic-antimycotic mix 100X, Hoechst 33342 (CAS 23491-52-3) and propidium iodide (PI; CAS 25535-16-4) were acquired from Gibco-Invitrogen[®] Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Matrigel[®] matrix was obtained from Corning (New York, NY, USA). Fauldcispla[®] (cisplatin) and Fauldoxo[®] (doxorubicin hydrochloride) were purchased from Libbs Pharmaceutical Ltda. (São Paulo, SP, Brazil). All the other chemicals were of analytical grade.

Elemental analyses (C, H, and N) were performed using a FISIONS CHNS, model EA 1108 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) equipment. The IR spectra were recorded on an FT-IR Bomem-Michelson 102 spectrometer in the 4000–250 cm^{-1} region using KBr pellets. Conductivity measures were obtained in a Meter Lab CDM2300 using 10^{-3} M solutions of the complexes in CH_2Cl_2 , at room temperature. All the NMR experiments were recorded on a Bruker DRX 400 MHz using tetramethylsilane as reference and DMSO- d_6 to solubilize the complexes. UV-visible (UV-vis) was recorded on a Hewlett Packard diode array – 8452A spectrophotometer. Fluorescence spectra were performed using a Synergy H1 Fluorescence Spectrophotometer (BioTek[®]). The electrochemical experiments were carried using a BAS, model 100B at room temperature in CH_2Cl_2 containing 0.10 M tetrabutylammonium perchlorate (TBAP) (Fluka Purum[®]) as a supporting electrolyte. The working and auxiliary electrodes were stationary Pt foils, and the reference electrode was Ag/AgCl, 0.10 M TBAP in CH_2Cl_2 , in a Luggin capillary probe.

4.1.2. Cell lines and culture conditions

Human lung carcinoma (A549, ATCC[®] CCL-185[™]), human prostate carcinoma (DU-145, ATCC[®] HTB-81[™]), human hepatocellular carcinoma (HepG2, ATCC[®] HB-8065[™]), human prostate adenocarcinoma (PC-3, ATCC[®] CRL-1435[™]), human breast adenocarcinoma (MDA-MB-231, ATCC[®] HTB-26[™]) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, ATCC[®] CRL-1730[™]) were obtained from American Type Cell Collection (ATCC). Human colorectal adenocarcinoma (Caco-2, BCRJ 0059) and human gingival normal fibroblasts (FGH BCRJ 0089) were obtained from Rio de Janeiro Cells Bank (BCRJ). The cells A549, Caco-2, DU-145, HepG2, MDA-MB-231, and FGH, were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), PC-3 and HUVEC cells were grown in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640). Both mediums were supplemented according to the needs of each lineage, as recommended by its cell banks with 2 mM L-glutamine, 10% or 20% FBS, 1% antibiotic-antimycotic solution (5 mg/mL penicillin, 5 mg/mL streptomycin, and 10 mg/mL neomycin), 4.5 g/L of glucose and 3.7 g/L of NaHCO_3 . All cell lines were cultured in flasks at 37 °C in 5% CO_2 and 96% of relative humidity according to the procedures proposed by [75]. The experiments were conducted between the third and the eight-cell passage with sub-cultures every 3–4 days to maintain exponential growth. The cell viability was examined using the trypan blue exclusion assay for all experiments where over 90% of the cells were viable at the beginning of the culture.

4.2. Methods

4.2.1. Synthesis and characterization of the ruthenium complexes

4.2.1.1. $[\text{Ru}(\text{law})(\text{N-N})_2]\text{PF}_6$. The complexes $[\text{Ru}(\text{law})(\text{N-N})_2]\text{PF}_6$ where N-N = *bipy* or *phen* were obtained from the reaction between the complex precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{N-N})_2]$ prepared how described by [76] and the ligand lawsone (*law*). The ligand *law* (0.054 g; 0.31 mmol) was added to the solution of ethanol and water (2:1 v/v) (30 mL) with the complex precursor (0.21 mmol), 80 μL of triethylamine and KPF_6 (0.076 g; 0.41 mmol). The mixture was maintained in argon atmosphere and reflux for 12 h. The dark solution was concentrated to ca. 5 mL and the solid formed was filtered, washed with distilled water and ethyl ether and dried under vacuum.

$[\text{Ru}(\text{law})(\text{bipy})_2]\text{PF}_6$ (1): Yield: 0.113 g (75%). Anal. Calc. For $\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{F}_6\text{N}_4\text{O}_3\text{Pru}$ exp. (calc.) C, 49.03 (49.25); H, 3.29 (2.89); N, 7.73 (7.66) %. $\Lambda_M = 49.81 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$, in 1.0 mM CH_2Cl_2 solution. IR (Selected bands, cm^{-1}): $\nu(\text{C}_1=\text{O})$ 1590, $\nu(\text{C}_4=\text{O})$ 1609, $\nu(\text{C}_2-\text{O})$ 1027; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C): $\delta(\text{ppm})$: 10.3–7.3 (m, 20H, an overlap of aromatic protons of *bipy* (16H) and *Law* (4H), 5.7 (s, 1H, *Law*); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C): $\delta(\text{ppm})$ 196.9 ($\text{C}_1=\text{O}$), 182.7 ($\text{C}_4=\text{O}$) and 172.7 (C_2-O).

$[\text{Ru}(\text{law})(\text{phen})_2]\text{PF}_6$ (2): Yield: 0.102 g (70%). Anal. Calc. For $\text{C}_{34}\text{H}_{21}\text{F}_6\text{N}_4\text{O}_3\text{Pru}$ exp. (calc.) C, 52.09 (52.38); H, 2.81 (2.72); N, 6.93 (7.19) %. $\Lambda_M = 44.74 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$, in 1.0 mM CH_2Cl_2 solution. IR (Selected bands, cm^{-1}): $\nu(\text{C}_1=\text{O})$ 1593, $\nu(\text{C}_4=\text{O})$ 1612, $\nu(\text{C}_2-\text{O})$ 1098; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C): $\delta(\text{ppm})$: 10.8–7.4 (m, 20H, an overlap of aromatic protons of *phen* (16H) and *Law* (4H), 5.6 (s, 1H, *Law*); ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C): $\delta(\text{ppm})$ 197.3 ($\text{C}_1=\text{O}$), 182.5 ($\text{C}_4=\text{O}$) and 172.9 (C_2-O).

4.2.1.2. $[\text{Ru}(\text{law})(\text{dppm})(\text{N-N})]\text{PF}_6$. Firstly, the precursor complexes *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})(\text{bipy})]$ and *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})(\text{phen})]$ were obtained from the reaction of the *cis,trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{N-N})]$, where N-N = *bipy* or *phen* [77] (0.12 mmol) with the *dppm* (0.14 mmol) in 50 mL of toluene. The reaction was kept in reflux under argon atmosphere for 48 h. The red solid formed was filtered, washed with ethyl ether and dried under vacuum.

The complexes $[\text{Ru}(\text{law})(\text{dppm})(\text{N-N})]\text{PF}_6$, where N-N = *bipy* or *phen* were obtained from the precursor *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})(\text{N-N})]$. For this, the ligand *law* (0.04 g; 0.22 mol) was added to the solution of *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppm})(\text{N-N})]$ (0.14 mmol) in 30 mL of $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1, v/v

v). 80 μL of triethylamine and KPF_6 (0.28 mmol) were added and the reaction kept in reflux under argon atmosphere for 12 h. The volume was reduced to ca. 5 mL and water was added to precipitate a dark solid.

[Ru(law)(dppm)(bipy)] PF_6 (**3**): Yield: 0.129 g (82%). Anal. Calc. for $\text{C}_{45}\text{H}_{35}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_3\text{P}_3\text{Ru}$ exp. (calc.) C, 56.26 (56.31); H 3.85 (3.68); N 2.65 (2.92) %. $\Lambda_{\text{M}} = 48.0 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$, in 1.0 mM CH_2Cl_2 solution. IR (Selected bands, cm^{-1}): $\nu(\text{C}_1=\text{O})$ 1603, $\nu(\text{C}_4=\text{O})$ 1614, $\nu(\text{C}_2-\text{O})$ 1097. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CH_2Cl_2 , 25 $^\circ\text{C}$) $\delta(\text{ppm})$: (d, 17.9; 6.7/15.2; 5.75/ $^2J = 73/68$ Hz); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 25 $^\circ\text{C}$): $\delta(\text{ppm})$: 8.8–6.7 (m, 32H, an overlap of aromatic protons of phenyl groups of dppm (20H), bipy (8H) and Law (4H), 5.8 (s, 1H, Law), 5.4 (m, 2H, chain aliphatic of dppm); ^{13}C NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 25 $^\circ\text{C}$): $\delta(\text{ppm})$ 200.2/196.8 ($\text{C}_1=\text{O}$), 182.4/181.9 ($\text{C}_4=\text{O}$) and 172.4/171.2 (C_2-O).

[Ru(law)(dppm)(phen)] PF_6 (**4**): Yield: 0.104 g (78%). Anal. Calc. for $\text{C}_{47}\text{H}_{35}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_3\text{P}_3\text{Ru}$ exp. (calc.) C, 57.67 (57.38); H, 3.71 (3.59); N, 2.48 (2.85) %. $\Lambda_{\text{M}} = 50.3 \Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$, in 1.0 mM CH_2Cl_2 solution. IR (Selected bands, cm^{-1}): $\nu(\text{C}_1=\text{O})$ 1599, $\nu(\text{C}_4=\text{O})$ 1614, $\nu(\text{C}_2-\text{O})$ 1101. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CH_2Cl_2 , 25 $^\circ\text{C}$) $\delta(\text{ppm})$: (d, 18.2; 6.6/15.4; 6.2/ $^2J = 74/68$ Hz); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 25 $^\circ\text{C}$): $\delta(\text{ppm})$: 9.2–6.3 (m, 32H, an overlap of aromatic protons of phenyl groups of dppm (20H), phen (8H) and Law (4H), 5.8 (s, 1H, Law), 5.5 (m, 2H, chain aliphatic of dppm); ^{13}C NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 25 $^\circ\text{C}$): $\delta(\text{ppm})$ 200.3/196.8 ($\text{C}_1=\text{O}$), 182.5/181.9 ($\text{C}_4=\text{O}$) and 172.6/171.4 (C_2-O).

4.2.2. Partition coefficient (*n*-octanol/water) determination

The octanol-water partition coefficient ($\log P$) were determined using the shake-flask method [78]. Each complex was tested in a mixture of equal volumes of water and *n*-octanol with continuous shaking for 24 h at 112g and 37 $^\circ\text{C}$. Then the samples were centrifuged for 5 min at 10g, and the organic and aqueous phases were separated. The concentration of drug in each phase was measured spectrophotometrically to determine values of $\log P = [\text{compound}] \text{ (in } n\text{-octanol)} / [\text{compound}] \text{ (in water)}$. The experiments were carried out in triplicate.

4.2.3. Cytotoxicity activity assay

The *in vitro* antiproliferative activity was quantified using the Alamar Blue assay, according to the method reported by [79]. Cells were inserted in 96-well plates for all experiments (1.5×10^4 cells/well). After 24 h, the complexes were dissolved in DMSO and added to each well and incubated for 24 h. Dilutions of the complexes were prepared to obtain concentrations ranging from 0.3 to 100 μM . Cisplatin (Fauldcispla $^\circ$) and doxorubicin hydrochloride (Fauldoxo $^\circ$) were used as the reference cytotoxic drugs. DMSO (0.1% (v/v)) was used as the vehicle control. Following 24 h of incubation, 50 μL of Alamar Blue (resazurin at 0.01% w/v) was added to each well, and the plates were incubated for 2 h, at 37 $^\circ\text{C}$, in the dark. The fluorescence reading was performed in a CaryEclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) reader using excitation and emission filters at wavelengths of 560 and 590 nm, respectively. The potency of cell growth inhibition for each complex was expressed as half-maximal (50%) inhibitory concentration (IC_{50}).

4.2.4. Clonogenic assay

The clonogenic assay was performed in accordance by the guidelines of [43]. The DU-145 cells (1×10^6 cells/well) were inserted in 6-well plate and treated with different concentrations varying of 0.125 to 1 μM of the complexes and cisplatin for 24 h. Negative control received the vehicle (DMSO 0.1% (v/v)) that was used for diluting the compounds tested. At the end of the treatments, the cells were washed with PBS and harvested by trypsinization. The cells were counted using a Neubauer chamber and re-plated then on Nunclon $^\circ$ cell culture dishes of 21.5 cm^2 in a density of two hundred cells per culture dish for each treatment in triplicate. After 7 days cells were washed with PBS and fixed in ice-cold methanol: acetic acid: distilled water (1:1:8) for

20 min, air-dried and stained with crystal violet (0.5% (w/v)) in PBS for 20 min. Colonies with at least 50 cells were counted. The plating efficiency (PE) of DU-145 cells was calculated by the ratio of the number of colonies observed after 7 days of incubation to the number of cells seeded (two hundred). The average of colonies in control was regarded as 100% and the number of colonies that arise after treatment of cells, expressed regarding PE, is called the surviving fraction (SF), obtained by:

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

4.2.5. 3D multicellular tumor spheroids culture

The multicellular tumor spheroids (MCTS) were obtained according to the method reported by [80]. Briefly, 200 μL of a solution of DU-145 cells (2.0×10^3 cells/well) were inserted in agarose-coated 96-well plates (1.5% (w/v)) and cultured in complete medium plus 3% Matrigel $^\circ$. DU-145-MCTS with stable structures had formed after five days. Then, the spheroids were exposed to the complexes in a range of five different concentrations varying from 1 to 10 μM and incubated for 24 h. Cisplatin (Fauldcispla $^\circ$) at 25 μM was used as the reference cytotoxic drug. Negative control received the vehicle (DMSO 0.1% (v/v)) that was used for diluting the compounds tested. At the end of the experiment, the cell viability was determined by Alamar Blue assay as described above. To investigate the morphological changes after treatment, other MCTSs were examined for 12 days by light microscopy (Inverted Trinocular Microscope Opton TNB-O5T-PL) using AxioVision LE software (Carl Zeiss, Jena, Germany).

4.2.6. Wound healing migration assay

DU-145 cells were seeded at a density of 1×10^5 cells per well in 12-well plates and grown for 48 h in 5% CO_2 in a humidified atmosphere at 37 $^\circ\text{C}$ in serum-free media. Once confluent, a “wound” was created across the cell monolayer using a sterile pipette. The culture medium containing cells in suspension was removed and replaced with new media containing different concentrations of the complex (**4**). Negative control received the vehicle (DMSO 0.1% (v/v)) that was used for diluting the compounds tested. Images of each wound were recorded using an inverted trinocular microscope (Opton TNB-O5T-PL) coupled to a camera (AxioVision) with amplification of $10\times$, at different times (0–24 h). The wound closure was analyzed by the recorded images using Image J software.

4.2.7. Cell adhesion

DU-145 cells were seeded at a density of 1.5×10^4 cells per well in the presence or absence of different concentrations of the complex (**4**) in pre-coated 96-well plates with either 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ collagen or Matrigel $^\circ$ 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and left for 24 h at 5% CO_2 in a humidified atmosphere to adhere. Negative control received the vehicle (DMSO 0.1% (v/v)) that was used for diluting the compounds tested and, cell-free coated wells acted as blank controls. Following adhesion, cells were washed 3x with PBS and fixed with 100 μL methanol at -20°C for 5 min. Once removed, cells were stained for 15 min with crystal violet (0.1% (w/v)) after which they were rinsed with tap water. Following 10 min air-drying, 50 μL of 0.5% Triton $^\circ$ X-100 was added to wells and left 2 h at room temperature with gentle agitation. Finally, the absorbance was measured in a spectrophotometer (Biotek Elx800–Winooski, VT, USA) set at 590 nm.

4.2.8. DNA interactions assays

The CT-DNA solution was prepared by dilution of 2 mg of the CT-DNA in 1 mL of Tris-HCl buffer (4.5 mM Tris-HCl, 0.5 mM Tris-base, 50 mM NaCl, pH 7.4), and the concentration was determined by absorption spectrophotometric using the molar absorption coefficient $6600 \text{ mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$ at 260 nm [81].

4.2.8.1. Interaction with CT-DNA (Calf Thymus) by circular dichroism (CD). The interaction of the ruthenium complexes (1–4) with CT-DNA by CD was investigated using a spectropolarimeter JASCO J720 from 240 to 350 nm at 298 K, in a continuous scanning mode (200 nm min^{-1}), under constant nitrogen flush. The complexes were incubated with CT-DNA ($50 \mu\text{M}$) at 37°C for 18 h in Tris-HCl buffer containing 10% of DMSO for solubilization of the complexes, in molar ratios ($[\text{complex}]/[\text{DNA}]$) ranging from 0.1 to 0.5.

4.2.8.2. pBR322 plasmid. Plasmid pBR322 ($38 \mu\text{M}$) was mixed with different concentrations ($4.84\text{--}38 \mu\text{M}$) of ruthenium complexes and incubated at 37°C for 18 h. Then the loading buffer was added and the samples and analyzed by agarose gel electrophoresis for 90 min in 1% agarose gel using a Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (0.45 M Tris-HCl, 0.45 M acetic acid, 10 mM EDTA, pH 7.4) and employing ethidium bromide for staining. The bands were visualized with a ChemiDoc MP imager (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

4.2.8.3. Competitive displacement with Hoechst 33258 by fluorescence. The competitive displacement assay was carried out using as probe the Hoechst 33258 by the fluorescence quenching experiment [57]. Thus, the CT-DNA ($125 \mu\text{M}$) was incubated with Hoechst ($2.7 \mu\text{M}$), and the extinction of the fluorescence intensity was monitored by the addition of different concentrations of ruthenium complexes in Tris-HCl containing 10% of DMSO. The fluorescence emission spectra were recorded from 300 to 500 nm after excitation wavelength of 343 nm, using an opaque 96-well plate, in a Synergy/H1-Biotek fluorimeter, at 37°C .

4.2.9. Apoptosis analyses

The measurement of cell death was performed by the guidelines of [82]. Previously, the nuclear morphology of DU-145 cells was assessed by Hoechst-propidium iodide (PI) dual-staining assay. Briefly, the cells were seeded (5×10^3 cells/well) into black 96-well plates and maintained to attach at 37°C in 5% CO_2 . After 24 h, the cells were treated with complex (4) (0.25, 0.50, 1.0 and $2.0 \mu\text{M}$) for 24 h. Negative control received the vehicle (DMSO 0.1% (v/v)) and, positive controls received cisplatin ($25 \mu\text{M}$) and doxorubicin ($5 \mu\text{M}$). The cells were incubated with Hoechst 33342 ($10 \mu\text{M}$) and PI ($10 \mu\text{M}$) diluted in PBS for 10 min at room temperature. The cells were then observed by ImageXpress Micro XLS system (Molecular Devices, CA, USA). The detection of apoptotic/necrotic cells was determined by flow cytometry using the Alexa Fluor® 488 Annexin V/PI (Molecular Probes™) and the analysis were performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, DU-145 cells were seeded (5.5×10^4 cells/well) in 12-well plates and maintained to attach at 37°C in 5% CO_2 . After 24 h, the cells were treated as described above. Then, the cells were collected with accutase, washed with PBS and resuspended in $200 \mu\text{L}$ of cold annexin-binding buffer. Next, it was added $10 \mu\text{L}$ of Alexa Fluor® 488 Annexin V ($50 \mu\text{L}/\text{mL}$) staining buffer, and the mixture was incubated in the dark at 4°C for 15 min. Previously the analyses, $100 \mu\text{L}$ of PI ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$) was added, and then, the fluorescence was measured by flow cytometry in a FACSCanto flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) using the Diva software. Ten thousand events were evaluated per experiment, and cellular debris was omitted from the analysis.

4.2.10. Gene expression analysis by qPCR array

DU-145 cells were plated in bottles tissue culture (1×10^5 cells/mL). After 24 h of incubation with complex (4) at IC_{50} , total RNA was isolated from the cells using the RNeasy Plus mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified using a spectrophotometer at an absorbance of 260 nm in NanoDrop ND-2000 (Thermo-Fisher Scientific, USA) and the quality of each RNA sample was verified by gel electrophoresis in a Bioanalyzer (Agilent Inc). RNA purity was calculated from the ratio of absorbance A_{260}/A_{280} and the integrity by RIN (RNA Integrity Number).

Complementary DNA (cDNA) strands were synthesized using the RT² First Strand kit (Qiagen, Germany), following the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was carried out with the Power SYBR® Green Master Mix in a Step One Plus system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), using KiCqStart® SYBR® Green Primers pre-designed for gene expression for mRNA analysis (Sigma-Aldrich), as follows: H_ACTB_1 (NM_0011101), H_BAX_1 (NM_004324) and H_BCL2_1 (NM_000633). Quantification of relative fold change of each gene was calculated by $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [83] using the reference gene ACTB (actin beta) for normalization. All experiments were performed in triplicate in DNase/RNase free conditions.

4.2.11. Detection of intracellular ROS and RNS

The total intracellular ROS generation was measured using H2DCFDA, as reported by [84]. Briefly, DU-145 cells were seeded (1.5×10^4 cells/well) into black 96-well plates and maintained to attach at 37°C in 5% CO_2 . After 24 h, the cells were treated with $1.5 \mu\text{M}$ (IC_{50}) of the complex (4) for 1, 6, 12 and 24 h. After that, the cells were labeled with H2DCFDA solution at $5 \mu\text{M}$ in DMF. After that, the fluorescence intensity was measured in a Synergy H1 Fluorescence Spectrophotometer (BioTek®), at the excitation and emission wavelengths of 495 and 527 nm, respectively. After that, the ROS/RNS levels were measured using Cellular ROS/Superoxide Detection Assay Kit (Abcam). The cells were seeded (1.5×10^4 cells/well) into black 96-well plates and maintained to attach at 37°C in 5% CO_2 . After 24 h, the cells were treated with complex (4) (0.25, 0.50, 1.0 and $2.0 \mu\text{M}$) for 24 h. Negative control received the vehicle (DMSO 0.1% v/v), and positive control received pyocyanin ($250 \mu\text{M}$) as ROS inducer. Following this, the cells were labeled with Oxidative Stress Detection Reagent (Green) for ROS detection and Superoxide Detection Reagent (Orange) according to the manufacturer's instruction. Fluorescence was then measured in quadruplicates using a fluorescent microplate reader Synergy H1 (BioTek®) with standard fluorescein ($\text{Ex} = 488 \text{ nm}$, $\text{Em} = 520 \text{ nm}$) and rhodamine ($\text{Ex} = 550 \text{ nm}$, $\text{Em} = 610 \text{ nm}$) filter sets for ROS and superoxide determination, respectively.

The protection assays using the antioxidant NAC were also performed. In brief, the cells were treated with 5 mM NAC in association with complex (4) (0.25, 0.50, 1.0 and $2.0 \mu\text{M}$) for 24 h. The cells were then labeled with H2DCFDA solution, and the ROS levels were measured as described above. In a new set of experiments, the cells were treated with 5 mM NAC in association with cytotoxic concentrations of (4). After 24 h of treatment, the cell viability was determined by Alamar Blue assay as described above.

4.3. Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. or as IC_{50} values with 95% confidence intervals (CI 95%) obtained by nonlinear regression. Differences between experimental groups were compared using analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett's or Tukey's test ($p < 0.05$). All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 for Mac OS X (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, USA).

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support from the São Paulo Research Foundation (FAPESP, Grants 2016/22429-7, 2016/16312-0 and 2018/00163-0), Coordinating Committee for Advancement of Higher Education Staff in Brazil (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). The authors also thank Mrs. Joana D'Arc Castania Darin from the Department of Clinical Analysis, Toxicology and Food Sciences at FCFRP-USP for her technical assistance.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.010>.

References

- [1] M. Frezza, S. Hindo, D. Chen, A. Davenport, S. Schmitt, D. Tomco, et al., Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy, *Curr. Pharm. Des.* 16 (2010) 1813–1825, <https://doi.org/10.2174/138161210791209009>.
- [2] A.M. Florea, D. Büsselfberg, Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects, *Cancers (Basel)* 3 (2011) 1351–1371, <https://doi.org/10.3390/cancers3011351>.
- [3] G. Sava, S. Pacor, G. Mestroni, E. Alessio, Na[trans-RuCl₄(DMSO)]m, a metal complex of ruthenium with antimetastatic properties, *Clin. Exp. Metastasis* 10 (1992) 273–280, <https://doi.org/10.1007/BF00133563>.
- [4] C.S. Allardyce, P.J. Dyson, Metal-based drugs that break the rules, *Dalt. Trans.* 45 (2016) 3201–3209, <https://doi.org/10.1039/C5DT03919C>.
- [5] J.K. Barton, E.D. Olmon, P.A. Sontz, Metal complexes for DNA-mediated charge transport, *Coord. Chem. Rev.* 255 (2011) 619–634.
- [6] M. Pal, U. Nandi, D. Mukherjee, Detailed account on activation mechanisms of ruthenium coordination complexes and their role as antineoplastic agents, *Eur. J. Med. Chem.* 150 (2018) 419–445, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.015>.
- [7] S. Zorzet, A. Bergamo, M. Cocchiato, A. Sorc, B. Gava, E. Alessio, et al., Lack of *In vitro* cytotoxicity, associated to increased G(2)-M cell fraction and inhibition of matrix invasion, may predict *In vivo*-selective antimetastasis activity of ruthenium complexes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295 (2000) 927–933.
- [8] C.S. Allardyce, P.J. Dyson, Ruthenium in medicine: Current clinical uses and future prospects, *Platin. Met. Rev.* 45 (2001) 62–69.
- [9] F. Lentz, A. Drescher, A. Lindauer, M. Henke, R.A. Hilger, C.G. Hartinger, et al., Pharmacokinetics of a novel anticancer ruthenium complex (KP1019, FFC14A) in a phase I dose-escalation study, *Anticancer. Drugs* 20 (2009) 97–103, <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e3283222fbc5>.
- [10] S. Leijen, S.A. Burgers, P. Baas, D. Pluim, M. Tibben, E. Van Werkhoven, et al., Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy, *Invest. New Drugs* 33 (2015) 201–214, <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0179-1>.
- [11] C.O. D'Sousa, J.H. Araujo, I.R.S. Baliza, R.B. Dias, F. Valverde, M.T.A. Vidal, et al., Novel piplartine-containing ruthenium complexes: synthesis, cell growth inhibition, apoptosis induction and ROS production on HCT116 cells, *Oncotarget* 8 (2017) 104367–104392, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22248>.
- [12] H. Chen, J.A. Parkinson, S. Parsons, R.A. Coxall, R.O. Gould, P.J. Sadler, Organometallic ruthenium(II) diamine anticancer complexes: Arene-nucleobase stacking and stereospecific hydrogen-bonding in guanine adducts, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 3064–3082, <https://doi.org/10.1021/ja017482e>.
- [13] R.A. De Grandis, F.A. Resende, M.M. Da Silva, F.R. Pavan, A.A. Batista, E.A. Varanda, *In vitro* evaluation of cyto-genotoxic potential of ruthenium(II) SCAR complexes: a promising class of antituberculosis agents, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 798 (2016) 11–18, <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2015.02.029>.
- [14] C. Tan, S. Hu, J. Liu, L. Ji, Synthesis, characterization, antiproliferative and anti-metastatic properties of two ruthenium-DMSO complexes containing 2,2'-biimidazole, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 1555–1563, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.01.074>.
- [15] V.R. Silva, R.S. Corrêa, L.D.S. Santos, M.B.P. Soares, A.A. Batista, D.P. Bezerra, A ruthenium-based 5-fluorouracil complex with enhanced cytotoxicity and apoptosis induction action in HCT116 cells, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–13, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18639-6>.
- [16] C. Avendaño, J.C. Menéndez, Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs, Elsevier Science, 2008, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52824-7.00001-9>.
- [17] A.K. McClendon, N. Osheroff, DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer, *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 623 (2007) 83–97, <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.06.009>.
- [18] J.S. Novais, C.S. Moreira, A.C.J.A. Silva, R.S. Loureiro, A.M. Sá Figueiredo, V.F. Ferreira, et al., Antibacterial naphthoquinone derivatives targeting resistant strain Gram-negative bacteria in biofilms, *Microb. Pathog.* 118 (2018) 105–114, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.024>.
- [19] G.C. Brandão, F.C. Rocha Missias, L.M. Arantes, L.F. Soares, K.K. Roy, R.J. Doerken, et al., Antimalarial naphthoquinones. Synthesis via click chemistry, *in vitro* activity, docking to PDHODH and SAR of lapachol-based compounds, *Eur. J. Med. Chem.* 145 (2018) 191–205, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.051>.
- [20] E.C.B. Da Costa, R. Amorim, F.C. Da Silva, D.R. Rocha, M.P. Papa, L.B. De Arruda, et al., Synthetic 1,4-pyran naphthoquinones are potent inhibitors of dengue virus replication, *PLoS One* 8 (2013) 1–11, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082504>.
- [21] V. Prachayasittikul, R. Pingaew, A. Worachartcheewan, C. Nantasenamat, S. Prachayasittikul, S. Ruchirawat, et al., Synthesis, anticancer activity and QSAR study of 1,4-naphthoquinone derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 84 (2014) 247–263, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.024>.
- [22] R. Verma, Anti-cancer activities of 1,4-naphthoquinones: a QSAR Study, *Anticancer. Agents Med. Chem.* 6 (2006) 489–499, <https://doi.org/10.2174/187152006778226512>.
- [23] J. Benites, J.A. Valderrama, K. Bettega, R.C. Pedrosa, P.B. Calderon, J. Verrax, Biological evaluation of donor-acceptor aminonaphthoquinones as antitumor agents, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 6052–6057, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.10.006>.
- [24] L.I. López-López, D.S. Nery-Flores, Y.S. Silva-Belmares, A. Sáenz-Galindo, Naphthoquinones: Biological properties and synthesis of lawsone and derivatives - a structured review, *Vitae* 21 (2014) 248–258.
- [25] D.K. Singh, S. Luqman, *Lawsonia inermis* (L.): a perspective on anticancer potential of Mehndi/Henna, *Biomed. Res. Ther.* 1 (2014) 112–120, <https://doi.org/10.7603/s40730-014-0018-1>.
- [26] E. Coelho-Cerqueira, P.A. Netz, V.P. Do Canto, A.C. Pinto, C. Follmer, Beyond topoisomerase inhibition: antitumor 1,4-naphthoquinones as potential inhibitors of human monoamine oxidase, *Chem. Biol. Drug Des.* 83 (2014) 401–410, <https://doi.org/10.1111/cbdd.12255>.
- [27] S. Oramas-Rayo, C. Torrejón, I. Cuadrado, R. Hernández-Molina, S. Hortelano, A. Estévez-Braun, et al., Synthesis and cytotoxic activity of metallic complexes of lawsone, *Bioorganic Med. Chem.* 21 (2013) 2471–2477, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.03.002>.
- [28] K.M. Oliveira, L. Liany, R.S. Corrêa, V.M. De, M.R. Cominetti, A.A. Batista, Selective Ru(II)/lawsone complexes inhibiting tumor cell growth by apoptosis, *J. Inorg. Biochem.* 176 (2017) 66–76, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.019>.
- [29] T.A. Heinrich, G. Von Poelhsitz, R.I. Reis, E.E. Castellano, A. Neves, M. Lanznaster, et al., A new nitrosyl ruthenium complex: synthesis, chemical characterization, *in vitro* and *in vivo* antitumor activities and probable mechanism of action, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 3616–3622, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.04.064>.
- [30] R.A. De Grandis, M.S. de Camargo, M.M. da Silva, E.O. Lopes, E.C. Padilha, F.A. Resende, et al., Human topoisomerase inhibition and DNA/BSA binding of Ru(II)-SCAR complexes as potential anticancer candidates for oral application, *BioMetals* 30 (2017) 321–334, <https://doi.org/10.1007/s10534-017-0008-z>.
- [31] K.M. Oliveira, R.S. Corrêa, M.I.F. Barbosa, J. Ellena, M.R. Cominetti, A.A. Batista, Ruthenium(II)/triphenylphosphine complexes: an effective way to improve the cytotoxicity of lapachol, *Polyhedron* 130 (2017) 108–114, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.04.005>.
- [32] L. Colina-Vegas, J.L. Dutra, W. Villarreal, J.H. João, M.R. Cominetti, F. Pavan, et al., Ru(II)/clotrimazole/diphenylphosphine/bipyridine complexes: Interaction with DNA, BSA and biological potential against tumor cell lines and *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Inorg. Biochem.* 162 (2016) 135–145, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.06.023>.
- [33] M.S. de Camargo, M.M. da Silva, R.S. Correa, S.D. Vieira, S. Castelli, I. D'Anessa, et al., Inhibition of human DNA topoisomerase IB by nonmutagenic ruthenium(II)-based compounds with antitumoral activity, *Metallomics* 8 (2016) 179–192, <https://doi.org/10.1039/C5MT00227C>.
- [34] N.C. De Carvalho, S.P. Neves, R.B. Dias, L.D.F. Valverde, C.B.S. Sales, C.A.G. Rocha, et al., A novel ruthenium complex with xanthoxylin induces S-phase arrest and causes ERK1/2-mediated apoptosis in HepG2 cells through a p53-independent pathway article, *Cell Death Dis.* 9 (2018), <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0104-6>.
- [35] W.C. Pires, B.A.V. Lima, F. de Castro Pereira, A.P. Lima, F. Mello-Andrade, H.D. Silva, et al., Ru(II)/diphenylphosphine/pyridine-6-thiolate complexes induce S-180 cell apoptosis through intrinsic mitochondrial pathway involving inhibition of Bcl-2 and p53/Bax activation, *Mol. Cell. Biochem.* 438 (2018) 199–217, <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3129-3>.
- [36] E. Rutkowska, K. Pająk, K. Józwiak, Lipophilicity - Methods of determination and its role in medicinal chemistry, *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* 70 (2013) 3–18.
- [37] O. Guideline, for testing os chemicals, Partition coefficient (n-octanol/water): shake flask method, OECD Guidel. 107 (1995) 1–4, <https://doi.org/10.1787/9789264069626-en>.
- [38] D.F. Segura, A.V.G. Netto, R.C.G. Frem, A.E. Mauro, P.B. Da Silva, J.A. Fernandes, et al., Synthesis and biological evaluation of ternary silver compounds bearing N, N-chelating ligands and thiourea: X-ray structure of [Ag(bpy)(u-tu)]₂(NO₃)₂(bpy = 2,2'-bipyridine; Tu = thiourea), *Polyhedron* 79 (2014) 197–206, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2014.05.004>.
- [39] C.J. Lima, L. Rodríguez, Phosphine-gold (I) compounds as anticancer agents: general description and mechanisms of action, *Anticancer. Agents Med. Chem.* 11 (2011) 921–928.
- [40] W. Villarreal, L. Colina-Vegas, G. Visbal, O. Corona, R.S. Corrêa, J. Ellena, et al., Copper(I)-phosphine polypyridyl complexes: synthesis, characterization, DNA/HSA binding study, and antiproliferative activity, *Inorg. Chem.* 56 (2017) 3781–3793, <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b02419>.
- [41] J.J. Liu, P. Galetti, A. Farr, L. Maharaj, H. Samarasingha, A.C. McGechan, et al., *In vitro* antitumor and hepatotoxicity profiles of Au(I) and Ag(I) didentate pyridyl phosphine complexes and relationships to cellular uptake, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 303–310, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.09.003>.
- [42] L. Biancalana, S. Zacchini, N. Ferri, M.G. Lupo, G. Pampaloni, F. Marchetti, Tuning the cytotoxicity of ruthenium(II) para-cymene complexes by mono-substitution at a triphenylphosphine/phenoxydiphenylphosphine ligand, *Dalt. Trans.* 46 (2017) 16589–16604, <https://doi.org/10.1039/C7DT03385K>.
- [43] 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, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
- [44] L. Galluzzi, S.A. Aaronson, J. Abrams, E.S. Alnemri, D.W. Andrews, E.H. Baehrecke, et al., Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes, *Cell Death Differ.* 16 (2009) 1093–1107, <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.44>.
- [45] L.C. Kimlin, G. Casagrande, V.M. Virador, *In vitro* three-dimensional (3D) models in cancer research: an update, *Mol. Carcinog.* 52 (2013) 167–182, <https://doi.org/10.1002/mc.21844>.

- [46] S.A. Langhans, Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 1–14, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>.
- [47] W.N. Hait, Anticancer drug development: the grand challenges, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 253–254, <https://doi.org/10.1038/nrd3144>.
- [48] E.T.9.J. Doijen, W. Luyten, B. Landuyt, L. Schoofs, Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort? *J. Cell. Physiol.* (2017) 2993–3003, <https://doi.org/10.1002/jcp.26052>.
- [49] G. Mehta, A.Y. Hsiao, M. Ingram, G.D. Luker, S. Takayama, Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy, *J. Control. Release*. 164 (2012) 192–204, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.045>.
- [50] P. Parhi, S. Suklabaidya, S.K. Sahoo, Enhanced anti-metastatic and anti-tumorigenic efficacy of Berberine loaded lipid nanoparticles *in vivo*, *Sci. Rep.* (2017) 1–13, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05296-y>.
- [51] L.F. Magalhães, F. Mello-Andrade, W.C. Pires, H.D. Silva, P.F.F. da Silva, L.M. Macedo, et al., *cis*-[RuCl(BzCN)(bipy)(dppe)]PF₆ induces anti-angiogenesis and apoptosis by a mechanism of caspase-dependent involving DNA damage, PARP activation, and Tp53 induction in Ehrlich tumor cells, *Chem. Biol. Interact.* 278 (2017) 101–113, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.09.013>.
- [52] P. Lu, V.M. Weaver, Z. Werb, The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression, *J. Cell Biol.* 196 (2012) 395–406, <https://doi.org/10.1083/jcb.201102147>.
- [53] A. Vacca, M. Bruno, A. Boccarelli, M. Coluccia, D. Ribatti, A. Bergamo, et al., Inhibition of endothelial cell functions and of angiogenesis by the metastasis inhibitor NAMI-A, *Br. J. Cancer*. 4 (2002) 993–998, <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600176>.
- [54] L. Gu, X. Li, Q. Ran, C. Kang, C. Lee, J. Shen, Antimetastatic activity of novel ruthenium (III) pyridine complexes, *Cancer Med.* 5 (2016) 2850–2860, <https://doi.org/10.1002/cam4.826>.
- [55] G. Barone, A. Terenzi, A. Lauria, A.M. Almerico, J.M. Leal, N. Busto, et al., DNA-binding of nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes: structure-affinity relationships, *Coord. Chem. Rev.* 257 (2013) 2848–2862, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.023>.
- [56] N. Narayanaswamy, M. Kumar, S. Das, R. Sharma, P.K. Samanta, S.K. Pati, et al., A thiazole coumarin (TC) turn-on fluorescence probe for AT-base pair detection and multipurpose applications in different biological systems, *Sci. Rep.* 4 (2014) 1–10, <https://doi.org/10.1038/srep06476>.
- [57] T. Sarwar, M.A. Husain, S.U. Rehman, H.M. Ishqi, M. Tabish, Multi-spectroscopic and molecular modelling studies on the interaction of esculetin with calf thymus DNA, *Mol. Biosyst.* 11 (2015) 522–531, <https://doi.org/10.1039/c4mb00636d>.
- [58] D. Hanahan, R. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell* 100 (2000) 57–70, <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>.
- [59] D. Hanahan, R. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (2011) 646–674, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [60] I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken, C. Reutelingsperger, A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labelled expression on Annexin V, *J. Immunol. Methods* 184 (1995) 39–51.
- [61] F. Mello-Andrade, W.L. da Costa, W.C. Pires, F.de.C. Pereira, C.G. Cardoso, R.de.S. Lino-Junior, et al., Antitumor effectiveness and mechanism of action of Ru (II)/amino acid/diphosphine complexes in the peritoneal carcinomatosis progression, *Tumor Biol.* 39 (2017) 1–18, <https://doi.org/10.1177/1010428317695933>.
- [62] Z. Deng, P. Gao, L. Yu, B. Ma, Y. You, L. Chan, et al., Ruthenium complexes with phenylterpyridine derivatives target cell membrane and trigger death receptors-mediated apoptosis in cancer cells, *Biomaterials* 129 (2017) 111–126, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.017>.
- [63] H. Perlman, X. Zhang, M.W. Chen, K. Walsh, R. Buttyan, An elevated BAX/BCL-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis, *Cell Death Differ.* 6 (1999) 48–54, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400453>.
- [64] R. Kasiappan, S. Safe, ROS-inducing agents for cancer chemotherapy, *React. Oxyg. Species* 1 (2016) 22–37, <https://doi.org/10.20455/ros.2016.805>.
- [65] K.W. Wellington, Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review, *RSC Adv.* 5 (2015) 20309–20338, <https://doi.org/10.1039/C4RA13547D>.
- [66] M. Halasi, M. Wang, T.S. Chavan, V. Gaponenko, N. Hay, A.L. Gartel, ROS inhibitor N -acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors, *Biochem. J.* 454 (2013) 201–208, <https://doi.org/10.1042/BJ20130282>.
- [67] L.O. Klotz, X. Hou, C. Jacob, 1,4-naphthoquinones: From oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling, *Molecules* 19 (2014) 14902–14918, <https://doi.org/10.3390/molecules190914902>.
- [68] A. Bergamo, G. Sava, Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 8818–8835, <https://doi.org/10.1039/C5CS00134J>.
- [69] J.X. Liang, H.J. Zhong, G. Yang, K. Vellaisamy, D.L. Ma, C.H. Leung, Recent development of transition metal complexes with *in vivo* antitumor activity, *J. Inorg. Biochem.* 177 (2017) 276–286, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.06.002>.
- [70] W.M. Motswainyana, P.A. Ajibade, Anticancer activities of mononuclear ruthenium (II) coordination complexes, *Adv. Chem.* 2015 (2015) 1–21, <https://doi.org/10.1155/2015/859730>.
- [71] A.M. Al-Majid, S. Yousuf, M.I. Choudhary, F. Nahra, S.P. Nolan, Gold-NHC complexes as potent bioactive compounds, *ChemistrySelect* 1 (2016) 76–80, <https://doi.org/10.1002/slct.201600009>.
- [72] M. Porchia, F. Tisato, M. Zancato, V. Gandin, C. Marzano, *In vitro* antitumor activity of water-soluble copper(I) complexes with diimine and monodentate phosphine ligands, *Arab. J. Chem.* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.09.003>.
- [73] M. Echeverri, A. Alvarez-Valdés, F. Navas, J. Perles, I. Sánchez-Pérez, A.G. Quiroga, Using phosphine ligands with a biological role to modulate reactivity in novel platinum complexes, *R. Soc. Open Sci.* 5 (2018), <https://doi.org/10.1098/rsos.171340>.
- [74] M.J. McKeage, S.J. Berners-Price, P. Galettis, R.J. Bowen, W. Brouwer, L. Ding, et al., Role of lipophilicity in determining cellular uptake and antitumor activity of gold phosphine complexes, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46 (2000) 343–350, <https://doi.org/10.1007/s002800000166>.
- [75] A. Bal-Price, S. Coecke, Guidance on good cell culture practice (GCCP), *Cell Cult. Tech.* (2011) 1–25, https://doi.org/10.1007/978-1-61779-077-5_1.
- [76] B.P. Sullivan, D.J. Salmon, T.J. Meyer, Mixed phosphine 2,2'-bipyridine complexes of ruthenium, *Inorg. Chem.* 17 (1978) 3334–3341, <https://doi.org/10.1021/ic50190a006>.
- [77] A.A. Batista, M.O. Santiago, C.L. Donnici, I.S. Moreira, P.C. Healy, S.J. Berners-Price, et al., Electrochemical and spectroscopic studies on RuCl₂(PPh₃)₂(N)₂ and RuCl₂(PPh₃)₂(N–N) complexes (N = pyridine derivatives and N–N = phenanthroline or bipyridine derivatives). X-ray structure of RuCl₂(PPh₃)₂(phen), *Polyhedron* 20 (2001) 2123–2128, [https://doi.org/10.1016/S0277-5387\(01\)00744-6](https://doi.org/10.1016/S0277-5387(01)00744-6).
- [78] E. Baka, J.E.A. Comer, K. Takács-Novák, Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 335–341, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.10.030>.
- [79] S. Page, Ruthenium compounds as anticancer agents, *Educ. Chem.* 26–29 (2012).
- [80] J. Friedrich, C. Seidel, R. Ebner, L.A. Kunz-Schughart, Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 309–324, <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226>.
- [81] J. Marmur, A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms, *J. Mol. Biol.* 3 (1961) IN1–218, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80047-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80047-8).
- [82] B.S. Cummings, L.P. Wills, R.G. Schnellmann, Measurement of cell death in mammalian cells, *Curr. Protoc. Pharmacol.* 1 (2004) 1–30, <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1208s25>.
- [83] T.D. Schmittgen, K.J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1101–1108, <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- [84] H. Wang, J.A. Joseph, Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 612–616, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00107-0).

Human topoisomerase inhibition and DNA/BSA binding of Ru(II)–SCAR complexes as potential anticancer candidates for oral application

Rone A. De Grandis  · Mariana S. de Camargo · Monize M. da Silva · Érica O. Lopes · Elias C. Padilha · Flávia A. Resende · Rosângela G. Peccinini · Fernando R. Pavan · Alessandro Desideri · Alzir A. Batista · Eliana A. Varanda

Received: 18 January 2017 / Accepted: 7 March 2017 / Published online: 16 March 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Three ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes were selected aimed at investigating anticancer activity against several cancer cell lines and the capacity of inhibiting the supercoiled DNA relaxation mediated by human topoisomerase IB (Top 1). The structure–lipophilicity relationship in membrane permeability using the Caco-2 cells have also been evaluated in this study. **SCAR 5** was found to present 45 times more cytotoxicity against breast cancer cell when compared to cisplatin. **SCAR 4** and **5** were both found to be capable of inhibiting the supercoiled DNA relaxation mediated by Top 1. Interaction studies showed that **SCAR 4** and **5** can bind to DNA through electrostatic interactions while **SCAR 6** is able to bind covalently to DNA. The

complexes **SCAR** were found to interact differently with bovine serum albumin (BSA) suggesting hydrophobic interactions with albumin. The permeability of all complexes was seen to be dependent on their lipophilicity. **SCAR 4** and **5** exhibited high membrane permeability ($P_{app} > 10 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) in the presence of BSA. The complexes may pass through Caco-2 monolayer via passive diffusion mechanism and our results suggest that lipophilicity and interaction with BSA may influence the complexes permeation. In conclusion, we demonstrated that complexes have powerful pharmacological activity, with different results for each complex depending on the combination of their ligands.

R. A. De Grandis (✉) · É. O. Lopes ·
E. C. Padilha · R. G. Peccinini · F. R. Pavan ·
E. A. Varanda
School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State
University, Araraquara 14800-903, Brazil
e-mail: degrandis.rone@usp.br

M. S. de Camargo · M. M. da Silva · A. A. Batista
Center of Exact Sciences and Technology, Federal
University of São Carlos, São Carlos 13565-905, Brazil

F. A. Resende (✉)
Department of Health and Biological Sciences, University
of Araraquara, Araraquara 14801-340, Brazil
e-mail: flaviabiomed@yahoo.com.br

A. Desideri
Department of Biology, University of Rome Tor Vergata,
Rome 173, Italy

Determination of in vitro absorption in Caco-2 monolayers of anticancer Ru(II)-based complexes acting as dual human topoisomerase and *PARP* inhibitors

Mariana S. de Camargo  · Rone A. De Grandis · Monize M. da Silva ·
Patricia B. da Silva · Mariana M. Santoni · Carlos E. Eismann ·
Amauri A. Menegário · Marcia R. Cominetti · Cleslei F. Zanelli ·
Fernando R. Pavan · Alzir A. Batista

Received: 4 September 2018 / Accepted: 28 November 2018
© Springer Nature B.V. 2018

Abstract Due to their unique and versatile biochemical properties, ruthenium-based compounds have emerged as promising anticancer agents. Previous studies showed that three ruthenium(II) compounds: [Ru(pySH)(bipy)(dppb)]PF₆ (**1**), [Ru(HSpym)(bipy)(dppb)]PF₆ (**2**) and Ru[(SpymMe₂)(bipy)(dppb)]PF₆ (**3**) presented anticancer properties higher than doxorubicin and cisplatin and acted as human topoisomerase IB (Topo I) inhibitors. Here, we focused our studies on in vitro intestinal permeability and anticancer mechanisms of these three complexes.

Caco-2 permeation studies showed that **1** did not permeate the monolayer of intestinal cells, suggesting a lack of absorption on oral administration, while **2** and **3** permeated the cells after 60 and 120 min, respectively. Complexes **2** and **3** fully inhibited Topo II relaxation activity at 125 µM. In previously studies, **3** was the most potent inhibitor of Topo I, here, we concluded that it is a dual topoisomerase inhibitor. Moreover, it presented selectivity to cancer cells when evaluated by clonogenic assay. Thus, **3** was selected to gene expression assay front MDA-MB-231 cells from triple-negative breast cancer (TNBC), which represents the highly aggressive subgroup of breast cancers with poor prognosis. The analyses revealed changes of 27 out of 84 sought target genes. *PARP1* and *PARP2* were 5.29 and 1.83 times down-regulated after treatment with **3**, respectively. *PARPs* have been attractive antitumor drug targets, considering *PARP* inhibition could suppress DNA damage repair and sensitize tumor cells to DNA damage agents. Recent advances in DNA repair studies have shown that an approach that causes cell lethality using synthetic *PARP*-inhibiting drugs has produced promising results in TNBC.

Keywords Ruthenium compounds · Triple negative breast cancer · Topoisomerase · *PARP* inhibitor

M. S. de Camargo (✉) · M. M. da Silva · A. A. Batista
Center of Exact Sciences and Technology, Federal
University of São Carlos, São Carlos, SP 13565-905,
Brazil
e-mail: marianasantoro@gmail.com

R. A. De Grandis · M. M. Santoni · C. F. Zanelli ·
F. R. Pavan
School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State
University, Araraquara, SP 14800-903, Brazil

P. B. da Silva
Department of Genetics and Morphology, University of
Brasília, Federal District, DF 70910-970, Brazil

C. E. Eismann · A. A. Menegário
Center of Environmental Studies, São Paulo State
University, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil

M. R. Cominetti
Department of Gerontology, Federal University of São
Carlos, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

PAPER

[View Article Online](#)
[View Journal](#) | [View Issue](#)Cite this: *Dalton Trans.*, 2019, **48**, 14885

Non-mutagenic Ru(II) complexes: cytotoxicity, topoisomerase IB inhibition, DNA and HSA binding†

Monize M. da Silva, ^a Mariana S. de Camargo, ^b Rodrigo S. Correa, ^c Silvia Castelli,^a Rone A. De Grandis, ^d Jessica E. Takarada, ^a Eliana A. Varanda, ^d Eduardo E. Castellano, ^e Victor M. Deflon, ^f Marcia R. Cominetti, ^g Alessandro Desideri ^a and Alzir A. Batista ^{*b}

Herein we discuss five ruthenium(II) complexes with good cytotoxicity against cancer cells. These complexes are named [Ru(tzdt)(bipy)(dppb)]PF₆ (**1**), [Ru(mmi)(bipy)(dppb)]PF₆ (**2**), [Ru(dmp)(bipy)(dppb)]PF₆ (**3**), [Ru(mpca)(bipy)(dppb)]PF₆ (**4**) and [Ru(2mq)(bipy)(dppb)]PF₆ (**5**), where tzdt = 1,3-thiazolidine-2-thione, mmi = mercapto-1-methyl-imidazole, dmp = 4,6-diamino-2-mercaptopyrimidine, mpca = 6-mercapto-pyridine-3-carboxylic acid, 2mq = 2-mercapto-4(3*H*)-quinazolinone, bipy = 2,2'-bipyridine and dppb = 1,4-bis(diphenylphosphino)butane. *In vitro* cell culture experiments revealed significant cytotoxic activity for **1–5** against MDA-MB-231, MCF-7, A549, DU-145 and HepG2 tumor cells, higher than that for the standard anticancer drug cisplatin. Compound/DNA interaction studies were carried out showing that **1–5** interact with DNA by electrostatic force of attraction or by hydrogen bonding. Moreover, the complexes interact, moderately and spontaneously, with human serum albumin (HSA) through the hydrophobic region. The five complexes are able to inhibit the DNA supercoiled relaxation mediated by human topoisomerase IB (TopoIB), and complex **1** is found to be the most efficient TopoIB inhibitor among the five compounds. The inhibitory effect and analysis of different steps of the TopoIB catalytic cycle indicate that complex **1** inhibits the cleavage reaction impeding the binding of the enzyme to DNA and has no effect on the religation step. Complexes **1**, **2** and **3** did not show mutagenic activity when they were evaluated by the cytokinesis-block micronucleus cytome assay in HepG2 cells and the Ames test in the presence and absence of mouse liver S9 metabolic activation. Therefore, it is necessary to perform further in-depth analysis of the therapeutic potential of these promising ruthenium complexes as anticancer drugs.

Received 7th May 2019,
Accepted 4th September 2019

DOI: 10.1039/c9dt01905g

rsc.li/dalton

Introduction

Cisplatin is one of the most widely used anticancer drugs. The clinical drawbacks of this metallodrug are apparent, including limited applicability, acquired resistance, and serious side effects, which have limited its application.¹ Therefore, developing new metal-based compounds cytotoxic for cancer cells, which are less toxic than cisplatin has been increasing over the last few years, and one of the most promising metals in cancer therapy is ruthenium.^{2–5} Thus, ruthenium complexes have attracted attention not only as anticancer candidates, but also as antibacterial and antifungal drug candidates.⁶ The mechanism by which metal complexes exert anticancer activity has been widely investigated and several possibilities have been suggested to underlie the anticancer activities of metal complexes, including their interaction with DNA^{7–9} and proteins^{10,11} and inhibition of topoisomerase enzyme activity,^{12,13} among others. Topoisomerases are involved in

^aDipartimento di Biologia, Università Tor Vergata di Roma, 00133 Rome, Italy.

E-mail: monizemilva@gmail.com

^bDepartamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, CEP 13565-905 São Carlos, SP, Brazil. E-mail: daab@ufscar.br; Tel: +55 16 33518285; Fax: +55 16 33518350^cDepartamento de Química, Universidade Federal de Ouro Preto, CEP 35400-000 Ouro Preto, MG, Brazil^dDepartamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, CEP 14801-902 Araraquara, SP, Brazil^eInstituto de Física, Universidade de São Paulo, CP 369, CEP 13560-970 São Carlos, SP, Brazil^fInstituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, CEP 13560-970 São Carlos, SP, Brazil^gDepartamento de Gerontologia, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, CEP 13565-905 São Carlos, SP, Brazil†Electronic supplementary information (ESI). CCDC 1483972 (**1**), 1484618 (**3**), and 1485378 (**5**). For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/C9DT01905G



Ruthenium(II)-mercapto Complexes with Anticancer Activity Interact with Topoisomerase IB

Monize M. da Silva,^{*,a} Mariana S. de Camargo,^a Silvia Castelli,^b Rone A. de Grandis,^c Eduardo E. Castellano,^d Victor M. Deflon,^e Marcia R. Cominetti,^f Alessandro Desideri^g and Alzir A. Batista^h  ^{*,a}

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de São Carlos,
CP 676, 13565-905 São Carlos-SP, Brazil

^bDipartimento di Biologia, Università Tor Vergata di Roma, 00133 Rome, Italy

^cDepartamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade Estadual Paulista (Unesp), 14801-902 Araraquara-SP, Brazil

^dInstituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo,
CP 369, 13560-970 São Carlos-SP, Brazil

^eInstituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo,
CP 780, 13560-970 São Carlos-SP, Brazil

^fDepartamento de Gerontologia, Universidade Federal de São Carlos,
CP 676, 13565-905 São Carlos-SP, Brazil

Herein we present four new ruthenium(II) complexes: [Ru(mtz)₂(dppb)] (**1**), [Ru(mmi)₂(dppb)] (**2**), [Ru(dmp)₂(dppb)] (**3**), and [Ru(mpca)₂(dppb)] (**4**), where mtz = 2-mercaptothiazoline; mmi = 2-mercapto-1-methyl-imidazole; dmp = 4,6-diamino-2-mercaptopyrimidine; mpca = 6-mercaptopyridine-3-carboxylic acid; dppb = 1,4-bis(diphenylphosphino)butane. *In vitro* cell culture experiments revealed cytotoxic activity for complexes **2**, **3** and **4** against MCF-7 (breast, non-invasive), MDA-MB-231 (breast, invasive), A549 (lung), DU-145 (prostate) and HepG2 (liver) tumor cells, in some cases lower than the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) for the reference drug (cisplatin). The deoxyribonucleic acid (DNA) interactions studied by viscosity measurements, gel electrophoresis and square-wave voltammetry indicated that the DNA binding affinity primarily occurs through non-covalent interactions. Only complex **2** was able to fully inhibit the DNA supercoiled relaxation mediated by human topoisomerase IB (Top IB). The analysis indicates that complex **2** inhibits the cleavage and the reconnection steps of the catalytic cycle, being both a poison and a catalytic inhibitor.

Keywords: ruthenium(II) complexes, mercapto ligands, cytotoxicity, topoisomerase IB

Introduction

Mercapto molecules have been used as ligands to prepare compounds with different biological activities, mainly because they already have some antitumor and antiviral activities and may have synergistic effects when coordinated to the metal.¹⁻⁴ These characteristics make the interaction of mercapto ligands with heavy metals of particular interest for the synthesis of complexes that could be potential metalodrugs.³

Metal complexes, which efficiently bind and cleave deoxyribonucleic acid (DNA) under physiological conditions stopping the reconnection of the biomolecule, can be considered as potential candidates for use as therapeutic agents against cancer, and thus should be considered as an issue deserving further scrutiny.⁵⁻⁸

Ruthenium compounds with bidentate ligands are not very toxic and some of them have shown to be quite selective for cancer cells. Thus, this class of complexes has advantages compared to platinum drugs, showing greater selectivity for cancer cells, leading to reduced side effects. These complexes have also demonstrated cytotoxic activity

*e-mail: monize_martins@yahoo.com.br; daab@ufscar.br



Acid diterpenes from *Copaiba oleoresin* (*Copaifera langsdorffii*): Chemical and plasma stability and intestinal permeability using Caco-2 cells

M. Mauro^a, R.A. De Grandis^a, M.L. Campos^b, A. Bauermeister^c, R.G. Peccinini^a, F.R. Pavan^a, N.P. Lopes^c, N.V. De Moraes^{a,*}

^a São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, SP ZIP 14801-902, Brazil

^b Federal University of Mato Grosso, Sinop, MT, Brazil

^c University of São Paulo (USP), NPPNS, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP ZIP 14040-903, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Copalic acid
Kaurenoic acid
Caco-2
Intestinal absorption
Viability

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Copaiba oleoresin has been used in folk medicine in the treatment of bronchitis, syphilis, skin diseases and ulcers due to its anti-inflammatory and antiseptic activities, but there is no information about major compounds oral absorption to support the traditional use.

Aim of study: Considering the potential of copalic (CA) and kaurenoic acid (KA) – major biological activity (in vitro) diterpenes found in the oleoresin, this study aimed to evaluate the intestinal permeability of CA and KA using Caco-2 cells model as predictive test for oral drug absorption.

Materials and methods: Chemical stability at pH 1.2 and 7.4 and plasma stability were evaluated to mimic physiological conditions of the gastrointestinal tract. The intestinal permeability of CA and KA was evaluated in Caco-2 cells in the presence and absence of the P-glycoprotein inhibitor verapamil.

Results: CA and KA were rapidly degraded at pH 1.2 (0.2 M Clark-Lubs buffer). At pH 7.4 (0.1 M phosphate buffer), CA was stable for up to 24 h and KA for up to 6 h. In human plasma, CA and KA can be considered stable for 24 h and 12 h at 37 °C, respectively. Caco-2 cells were considered viable when incubated with CA or KA in the range of 3.9–250 μM for 24 h. CA and KA exhibited moderate apparent permeability (P_{app}) of $4.67 (\pm 0.08) \times 10^{-6}$ cm/s and $4.66 (\pm 0.04) \times 10^{-6}$ cm/s, respectively. Simultaneous incubation with verapamil showed that P-glycoprotein does not play a relevant role on CA and KA oral absorption, with P_{app} of $4.48 (\pm 0.26) \times 10^{-6}$ cm/s and $5.37 (\pm 0.72) \times 10^{-6}$ cm/s observed for CA and KA, respectively.

Conclusion: The oral absorption of both CA and KA is driven by mainly passive permeability, is not limited by p-glycoprotein, but enteric-coated dosage forms should be used to avoid chemical instability in the gastric pH.

1. Introduction

Copaifera species, popularly known as "copaibeiras" or "copaiba", are of great economic and ecological interest in Amazon forest. It is estimated that Copaiba oleoresin has been used in popular medicine for more than 500 years (Pieri et al., 2009). Gaspar Barléu observed that animals rubbed themselves in the trunk of *Copaifera* to heal their wounds (Barléu, 1974). It is assumed that by observing this behaviour, natives began to use the oleoresin with the same intention of healing (Pieri et al., 2009; Veiga Junior and Pinto, 2002). Beyond the use for healing several skin wounds such as ulcers scarring and leishmania skin

lesions, copaiba oleoresin has also been used orally in folk medicine in the treatment of bronchitis and syphilis due to anti-inflammatory and antiseptic activities (Albuquerque et al., 2017; Vargas et al., 2015; Tincusi et al., 2002). Natives also apply the oleoresin as mosquito repellent, and currently investigations allowed the development patented formulations for the use based on the traditional knowledge (Pohlitz et al., 2011a, 2011b).

Copalic acid (CA) and kaurenoic acid (KA) (Fig. 1) are two major diterpenes of copaiba oleoresin (Veiga Junior et al., 2007, 2005). CA presents in vitro antibacterial activity (da Trindade et al., 2018; Souza et al., 2018), antifungal activity against dermatophytes, (Nakamura

* Correspondence to: São Paulo State University (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Rodovia Araraquara-Jaú, km 01, Araraquara, SP ZIP 14801-902, Brazil.

E-mail addresses: mariana.mauro@unesp.br (M. Mauro), r.grandis@unesp.br (R.A. De Grandis), michelcampos@ufmt.br (M.L. Campos), ane.meister@usp.br (A. Bauermeister), rosangela.peccinini@unesp.br (R.G. Peccinini), fernando.pavan@unesp.br (F.R. Pavan), npeoples@fcfrp.usp.br (N.P. Lopes), natalia.v.moraes@unesp.br (N.V. De Moraes).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.02.017>

Received 30 November 2018; Received in revised form 4 February 2019; Accepted 10 February 2019

Available online 11 February 2019

0378-8741/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



Evaluation of cytoprotective effects of compounds isolated from *Copaifera langsdorffii* Desf. against induced cytotoxicity by exposure to methylmercury and lead

Jennyfer Andrea Aldana^a, Rone Aparecido De Grandis^b, Heloiza Nicolella^d, Ana Paula Prado Guissoni^d, Iara Squarisi^d, Caroline Arruda^a, Victor Pena Ribeiro^a, Denise Crispim Tavares^d, Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos^c , Lusânia Maria Greggi Antunes^c  and Jairo Kenupp Bastos^a

^aDepartment of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; ^bDepartment of Biological Sciences, São Paulo State University, Araraquara, Brazil; ^cDepartment of Clinical Toxicological and Bromatological Analyses, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; ^dNucleus of Research in Sciences and Technology, University of Franca, Franca, Brazil

ABSTRACT

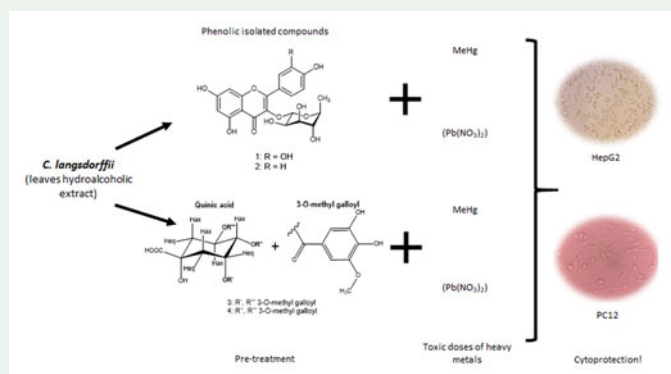
Copaifera langsdorffii L. is one of the most known medicinal species in Brazil. Its leaves are rich in phenolic compounds with potential biological activities as an antioxidant and chelating agent. This paper reports the isolation of four compounds from the hydroalcoholic extract of the leaves of *C. langsdorffii* and the investigation of their possible cytoprotective effects against heavy metal poisoning. Quercitrin (1), afzelin (2), 3,5-di-O-(3-O-methyl galloyl) quinic acid (3) and 4,5-di-O-(3-O-methyl galloyl) quinic acid (4), were associated with toxic doses of methylmercury and lead and evaluated by Alamar blue cell viability assays in HepG2 and PC12. The compounds displayed significant cytoprotective effect for the HepG2 cell line against both metals. Compounds 1–4 did not protect PC12 cells against methylmercury induced-cytotoxicity, but at lower concentrations, they protected against lead induced-cytotoxicity. The evaluated compounds showed a promising cytoprotection effect against exposure to heavy metals and should be further investigated as protective agents.

ARTICLE HISTORY

Received 12 July 2018
Accepted 29 October 2018

KEYWORDS

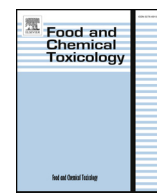
Copaifera langsdorffii;
Caesalpinaceae; cytoprotection; heavy metals; flavonoids; galloylquinic compounds



CONTACT Jairo Kenupp Bastos  jkbastos@fcrp.usp.br

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1543673>.

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



Transcriptome and DNA methylation changes modulated by sulforaphane induce cell cycle arrest, apoptosis, DNA damage, and suppression of proliferation in human liver cancer cells



Patrick Wellington da Silva dos Santos^a, Ana Rita Thomazela Machado^a,
Rone Aparecido De Grandis^b, Diego Luis Ribeiro^b, Katiuska Tuttis^b, Marco Morselli^c,
Alexandre Ferro Aissa^a, Matteo Pellegrini^c, Lusânia Maria Greggi Antunes^{a,*}

^a Department of Clinical Analysis, Toxicology and Food Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. do Café - Vila Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, 14040-903, Brazil

^b Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900 - Vila Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil

^c Department of Molecular, Cell, and Developmental Biology, University of California at Los Angeles, 610 Charles E Young Dr S, Los Angeles, CA, 90095, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Isothiocyanate
Active compound
Sequencing
Epigenetics
Chemoprevention

ABSTRACT

Abnormal epigenetic alterations are one of the keystones of cancer development. Epigenetic targeting drugs have become a promising and effective cancer therapy strategy. However, due to the high toxicity and unclear mechanisms of action of these drugs, natural compounds that cause epigenetic modulation have also been studied. Sulforaphane (SFN) is a promising bioactive compound for epigenetic targeting therapy. In this study, we investigate the effects of SFN on gene expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma cells (HepG2). Using high throughput technologies in combination with cell-based assays, we find SFN is a potent anticancer agent, as it induces DNA damage, mitotic spindle abnormalities followed by apoptosis and proliferation inhibition in HepG2 cells. Our results show the upregulation of DNA damage response and cell cycle checkpoint genes. Also, we find the downregulation of cellular pathways frequently overexpressed in human cancer. As expected, SFN exerts epigenetic modulation effects by inhibiting histone deacetylases (HDACs). SFN might affect the activity of oncogenic transcription factors through methylation of its binding sites motifs. Our findings offer insights into SFN chemopreventive molecular effects in HepG2 cells and highlight SFN as a valuable natural approach to cancer therapy for future investigation.

1. Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most aggressive and lethal malignancy of primary liver cancer (Hlady and Robertson, 2018). Unsatisfactory results with conventional treatments due to the high recurrence rate underscore the need for novel approaches to treat liver cancer (Zeidler et al., 2017). In addition to genetic mutations, epigenetic modulation is associated with the initiation and development of HCC (Ma et al., 2014). Silencing of tumor suppressors and activation of oncogenes by epigenetic mechanisms such as aberrant DNA methylation pattern and histone modifications plays an essential role in promoting cancer (Kelly and Issa, 2017). Global DNA methylation changes and abnormal expression of epigenetic regulatory genes have been

reported in HCC (Ozen et al., 2013). Deacetylation of histones via histone deacetylases (HDACs) results in transcriptional repression and heterochromatin formation (Yang and Seto, 2007). High expression of these enzymes has been reported in many types of cancer, including HCC (Li and Seto, 2016).

Research investigating novel approaches for the treatment and prevention of cancer has improved our understanding of the interactions between diet and gene regulation (Nosrati et al., 2017). Many dietary compounds have been shown to be useful in cancer prevention by modulating gene expression through multiple mechanisms (Hardy and Tollefsbol, 2011; Meeran et al., 2010). Sulforaphane (SFN), a bioactive isothiocyanate found in cruciferous vegetables, activates the nuclear factor NRF2, upregulating cytoprotective genes, including

* Corresponding author. Av. do Café, s/n, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

E-mail addresses: patrickwsantos@gmail.com (P.W.d.S. dos Santos), anaritatomachado@usp.br (A.R.T. Machado), degrandis.rone@gmail.com (R.A. De Grandis), diegoluisribeiro@usp.br (D.L. Ribeiro), kattuttis@gmail.com (K. Tuttis), mmorselli@g.ucla.edu (M. Morselli), afaissa@gmail.com (A.F. Aissa), matteop@mcdb.ucla.edu (M. Pellegrini), lusania@fcfrp.usp.br, lusania@fcfrp.usp.br (L.M.G. Antunes).

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111047>

Received 24 October 2019; Received in revised form 30 November 2019; Accepted 5 December 2019

Available online 12 December 2019

0278-6915/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.