

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

TESE DE DOUTORADO

**POTENCIAL CITOTÓXICO DE NOVOS COMPLEXOS DE
RUTÊNIO CONTENDO PIPLARTINA COMO LIGANTE**

CINARA OLIVEIRA D´SOUSA COSTA

SALVADOR- BA

2017

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**POTENCIAL CITOTÓXICO DE NOVOS COMPLEXOS DE
RUTÊNIO CONTENDO PIPLARTINA COMO LIGANTE**

CINARA OLIVEIRA D´SOUSA COSTA

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra
Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Rodrigo
Magalhães Moreira

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia
em Saúde e Medicina Investigativa,
para a obtenção do grau de Doutor.

SALVADOR-BA

2017

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C837c Costa, Cinara Oliveira D'Sousa
Potencial citotóxico de novos complexos de rutênio contendo piplartina como
ligante / Cinara Oliveira D'Sousa Costa. - 2017.
123 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra, Laboratório de Engenharia
Tecidual e Imunofarmacologia.

Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2017.

1. Produtos Naturais. 2. Quimioterápicos. 3. Rutênio. 4. Piplartina I. Título.

CDU 615.28:616-006

" POTENCIAL CITOTÓXICO DE NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO PIPLARTINA
COMO LIGANTE."

CINARA OLIVEIRA D'SOUSA COSTA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Marcos André Vannier dos Santos
Pesquisador Titular
FIOCRUZ



Dra. Flávia Oliveira de Lima
Professora adjunta
UEFS



Dr. Eudes da Silva Velozo
Coordenador
PPGFAR/UFBA

**Dedico este trabalho a meus pais e meu filho,
que são os verdadeiros incentivos para eu nunca
desistir.**

AGRADECIMENTOS

A Deus que todos os dias da minha vida me fortaleceu para seguir enfrente.

Ao meu orientador, professor Daniel Bezerra, por seu apoio, sua dedicação, competência e especial atenção nas revisões e sugestões, fatores fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao meu co-orientador, professor Diogo Magalhães, pelo seu apoio e amizade.

A professora Milena Botelho que me recebeu no LETI e acreditou no meu potencial.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido durante todo o meu aprendizado.

Aos meus colegas do grupo de câncer, um obrigado especial, por me receber, me ensinar e me apoiar com amor e carinho sempre.

Aos meus colegas do LETI pela calorosa recepção e companheirismo que tiveram.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

Aos funcionários do centro que estavam disponíveis para me auxiliar e servir nos experimentos, todas as vezes que se fez necessário.

A biblioteca do centro e os seus funcionários pelo auxílio e atenção .

Aos meus colegas de turma que me confiaram a sua representação no colegiado.

A minha eterna mestre Professora Luzimar Gonzaga Fernandez e ao meu grande amigo Paulo Roberto Ribeiro de Jesus.

Aos familiares e amigos que sempre me incentivaram e apoiaram nos momentos mais difíceis com palavras carinhosas.

“Tentar e falhar é, pelo menos, aprender. Não chegar a tentar é sofrer a inestimável perda do que poderia ter sido”

Richard Bach

COSTA, Cinara Oliveira D'Sousa. Potencial citotóxico de novos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante. f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A quimioterapia ainda é uma importante forma de tratamento de diversos tipos de cânceres; entretanto, as células cancerosas podem adquirir resistência aos agentes quimioterápicos, que por sua vez, também induzem efeitos colaterais graves. Com o intuito de novos tratamentos, se busca nas plantas com fins medicinais novos fármacos. Uma dessas moléculas que vem sendo bastante estudada é a piplartina, também conhecida como piperlongumina. Adicionalmente, com o objetivo de potencializar os efeitos citotóxicos em células tumorais, tem sido realizado a síntese de complexos metálicos, tais como rutênio, com diferentes bioligantes. **OBJETIVO:** Assim, no presente trabalho propomos a síntese e o estudo da atividade citotóxica de novos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Os complexos de rutênios $[Ru(dppb)(bipy(piplartina))_2(PF_6)]$ e $[Ru(dppf)(bipy(piplartina))_2(PF_6)]$ foram sintetizados e testado contra diferentes tipos de células tumorais (K562, HL-60, B16-F10, HepG2, SCC4, SCC9, HSC3 e HCT116) e não tumorais (MRC-5 e PBMC) através do ensaio do alamar blue após 72 h de incubação. Posteriormente, células HCT116 foram incubadas por 24 e 48 h com os complexos e o número de células viáveis foi determinado pelo ensaio de exclusão com o azul de tripam. A análise do ciclo celular, o potencial transmembrânico mitocondrial, marcação para anexina V/iodeto de propídeo e a quantificação de espécies reativas de oxigênio foram determinadas por citometria de fluxo. O efeito sobre a expressão gênica foi determinado por PCRarray. **RESULTADOS:** Ambos os complexos sintetizados apresentaram potencial citotóxico superior a piplartina. Na análise por exclusão com o azul de tripam, ambos os compostos reduziram o número de células viáveis, sem aumentar o número de células não viáveis. Um aumento da fragmentação do DNA internucleosomal sem afetar a permeabilidade da membrana citoplasmática, redução do potencial transmembrânico mitocondrial e um aumento da externalização de fosfatidilserina foram observados, sugerindo indução de morte celular apoptótica. Um aumento expressivo das espécies reativas de oxigênio também foi observado. O nível de expressão de mRNA de vários genes, incluindo proliferação celular, ciclo celular, apoptose e estresse oxidativo também foram alterados após o tratamento. **CONCLUSÃO:** Os resultados demonstram que apesar dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante serem mais potente do que a piplartina, o mecanismo de ação parece ser semelhante. Os resultados obtidos contribuem para melhor compreensão dos efeitos desses compostos como moléculas úteis para o tratamento do câncer.

Palavras – Chaves: Piplartina, Piperlongumina, Produtos Naturais, Quimioterápicos Naturais.

COSTA, Cinara Oliveira D'Sousa. Cytotoxic potential of new ruthenium complexes containing piplartine as long. f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Chemotherapy is still an important form of treatment for several types of cancers. However, cancer cells may acquire resistance to chemotherapeutic agents, which in turn, may also induce serious side effects. In the search for new treatments, one searches in medicinal plants for new active molecules. One of these molecules that has been well studied is piplartine, also known as piperlongumine. Additionally, in order to increase the cytotoxic effects in tumor cells, metal complexes of piplartina, such as with ruthenium and different bioligands has been performed. **OBJECTIVE:** Thus, in the present work we propose the synthesis and the study of the cytotoxic activity of new ruthenium complexes containing piplartine as ligand. **MATERIAL AND METHODS:** The complexes $[\text{Ru}(\text{dppb})(\text{bipy}(\text{piplartine}))_2(\text{PF}_6)]$ and $[\text{Ru}(\text{dppf})(\text{bipy}(\text{piplartine}))_2(\text{PF}_6)]$ were synthesized and tested against different tumor cell types (K562, 60, B16-F10, HepG2, SCC4, SCC9, HSC3 and HCT116) and non-tumor cells (MRC-5 and PBMC) by the alamar blue assay after 72 h of incubation. HCT116 cells were incubated for 24 and 48 h with the complexes and the number of viable cells was determined by tripan blue exclusion assay. Cell cycle analysis, mitochondrial transmembrane potential, labeling for annexin V/propidium iodide and quantification of reactive oxygen species were determined by flow cytometry. The effect on gene expression was determined by PCR array. **RESULT:** Both complexes synthesized had a cytotoxic potential higher than piplartine. In the tripan blue exclusion analysis, both complexes reduced the number of viable cells without increasing the number of non-viable cells. An increase in internucleosomal DNA fragmentation without affecting the permeability of the cytoplasmic membrane, reduction of the mitochondrial transmembrane potential and an increase in the phosphatidylserine externalization were observed, suggesting the induction of apoptotic cell death. An expressive increase of reactive oxygen species was also observed. The level of mRNA expression of various genes, including cell proliferation, cell cycle, apoptosis and oxidative stress were also altered after the treatment. **CONCLUSIONS:** The results show that the novel ruthenium complexes containing piplartine as a ligand are more potent than piplartine, and the mechanism of action appear to be similar to piplartine. The results obtained contribute to a better understanding of the effects of these compounds as molecules useful for the treatment of cancer.

Key word: Piplartine, Piperlongumine, Natural Products, Natural Chemotherapy.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	Do Inglês <i>American Type Culture Collection</i>
CDIP	Do Inglês <i>Cell Death Involved P53-target</i>
ConA	Concanavalina A
CPR1	Complexo Pliplartina Rutênio 1
CPR2	Complexo Piplartina Rutênio 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMF	Dimetilformamida
DOX	Doxorrubicina
EGF	Do Inglês <i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	Do Inglês <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERO	Especies reativas de oxigênio
EUA	Estado Unidos da América
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
OXA	Oxaliplatina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDGF	Do Inglês <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PBMC	Do Inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
RPMI	Do Inglês <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TCGA	Do Inglês <i>The Cancer Genome Atlas</i>
VEGF	Do Inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	Do Inglês <i>Vascular Endothelial Growth Fator Receptor</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenvolvimento tumoral.....	21
Figura 2	Dados estatísticos e tipos de câncer em ambos os sexos.....	23
Figura 3	Estrutura química da piplartina {5,6-dihidro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenil]-2(1H)piridinona}.....	30
Figura 4	Estruturas químicas da cisplatina, carboplatina e oxaliplatina.....	33
Figura 5	Rota para a síntese de complexos [Ru(piplartina)(dppf)(bipy)](PF ₆) ₂ e [Ru(piplartina)(dppb)(bipy)](PF ₆) ₂	25
Figura 6	Os voltamogramas de pulso diferencial dos complexos (solução de diclorometano, eletrodos de trabalho e auxiliares foram Pt estacionários, e o eletrodo de referência foi Ag/AgCl, 0,4 M Bu ₄ NClO ₄).....	46
Figura 7	Representação de isômeros com o giro do ligante da piplartina.	47
Figura 8	³¹ P { ¹ H} espectros de RMN do CPR2 (d ₆ -acetona), onde (A) mostram os dupletos do fósforo de difosfina e (B) mostram o sinal de multipletos de PF ₆	48
Figura 9	¹³ C RMN e espectro de ¹ H RMN dos complexos exibindo a duplicação de sinal, indicativo de isômeros (d ₆ -acetona).....	49
Figura 10	Espectro de ressonância magnética nuclear de fósforo (³¹ P{ ¹ H}) do composto CPR2 em acetona deuterada ((CD ₃) ₂ CO).....	50
Figura 11	Espectro de RMN ¹ H obtido para o CPR1 em acetona deuterada.....	51
Figura 12	Espectro de RMN ¹³ C{ ¹ H} obtido para o CPR1 em acetona deuterada.....	51
Figura 13	Espectro de COSY- ¹ H do CPR1.....	52
Figura 14	(A) ³¹ P { ¹ H} espectros de RMN do complexo [RuCl ₂ (dppb)(bipy)] após a adição de AgPF ₆ , na mistura acetona/água (1:9). (B) ³¹ P { ¹ H} espectros de RMN (0 - 24 h) do CPR2 na mistura acetona/água (1:9). A seta vermelha mostra o consumo do CPR2 e a seta amarela mostra o produto	

	resultante.....	53
Figura 15	Efeito dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante sobre a viabilidade de células HCT116 determinado pelo ensaio de exclusão de azul de tripam após 24 (A) e 48 (B) h de tratamento.....	60
Figura 16	<i>Dot plots</i> representativos das características de dispersão da luz em células HCT116 tratadas com os complexos de rutênio contendo piplartina como ligante determinado por citometria de fluxo usando o FSC (<i>forward scatter</i> – desvio de luz para frente) e SSC (<i>side scatter</i> – desvio de luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente.....	61
Figura 17	Histogramas representativos da análise do conteúdo de DNA de células HCT116 após o tratamento com os complexos de rutênio contendo piplartina como ligante determinado por citometria de fluxo.....	63
Figura 18	<i>Dots plots</i> representativos do efeito dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante sobre a externalização de fosfatidilserina em células HCT116 determinando por citometria de fluxo usando anexina V-FITC/IP.....	65
Figura 19	Efeito dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante sobre a externalização de fosfatidilserina em células HCT116 após 24 (A) e 48 (B) h de incubação determinando por citometria de fluxo usando anexina V-FITC/IP.....	66
Figura 20	Efeito dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante sobre o potencial transmembrânico de células HCT116 determinado por citometria de fluxo usando rodamina 123.....	68
Figura 21	Efeito dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células HCT116 após 1 (A) e 3 (B) h determinado por citometria de fluxo.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados de análise elementar e condutância molar.....	53
Tabela 2	Atribuições das frequências vibracionais (/cm) da piplartina e seus complexos de rutênio (II).....	55
Tabela 3	A atividade citotóxica dos novos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante.....	57
Tabela 4	Índice de seletividade de complexos de rutênio contendo piplartina.....	58
Tabela 5	Efeito dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante sobre o conteúdo de DNA de células HCT116.....	64
Tabela 6	Efeito dos complexos de rutênio contendo a piplartina como ligante sobre a expressão gênica de células HCT116.....	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	BIOLOGIA DO CÂNCER	21
2.2	TRATAMENTO DO CÂNCER	27
2.3	PIPLARTINA	29
2.4	COMPLEXOS METÁLICOS	32
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	OBTENÇÃO DOS NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO PIPLARTINA COMO LIGANTE	36
4.2	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA	39
4.3	SOLUBILIZAÇÃO E DILUIÇÃO DOS COMPOSTOS	40
4.4	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	40
4.5	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	41
4.6	ANÁLISE DO CONTEÚDO DE DNA	41
4.7	AVALIAÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA	42
4.8	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO MITOCONDRIAL	42
4.9	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO INTRACELULAR	43
4.10	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	43

4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5	RESULTADOS	45
5.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS	45
5.2	DETERMINAÇÕES <i>IN VITRO</i> DO PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS <i>VERSUS</i> CÉLULAS NÃO TUMORAIS	59
5.3	AVALIAÇÕES DO PADRÃO DE MORTE CELULAR/MECANISMO DE AÇÃO	56
5.3.1	Avaliação da viabilidade celular – exclusão por azul de tripam	59
5.3.2	Análise morfológica	59
5.3.3	Análise do conteúdo de DNA	62
5.3.4	Avaliação da externalização de fosfatidilserina	62
5.3.5	Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria	67
5.3.6	Ensaio de quantificação de espécies reativas de oxigênio	67
5.3.7	Avaliação da expressão gênica	70
6	DISCUSSÃO	72
7	CONCLUSÃO	78
8	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE	86
	ANEXO	90

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o câncer compõe um grupo de várias doenças apresentando em comum o crescimento desordenado de células que invadem agressivamente tecidos e órgãos, formando tumores malignos que se espalham para outras regiões do corpo, na maioria das vezes, causadas por uma desregulação de múltiplas vias de sinalização celular. O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo e a cada ano 8,2 milhões de pessoas morrem devido à doença. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano 2030 estima-se que surjam 27 milhões de casos incidentes de câncer, levando 17 milhões de pessoas ao óbito. Atualmente, mais de 32 milhões de pessoas vivem com a doença em todo o mundo, mas o número de novos casos continuará aumentando apesar do enorme investimento no combate à doença, sendo o maior efeito desse aumento em países de baixa e média renda (OMS, 2016).

Décadas de pesquisa sobre a biologia do câncer têm revelado *insights* sobre os mecanismos que impulsionam a doença, trazendo uma melhor compreensão sobre a genética, epigenética e outras alterações moleculares que podem promover o desenvolvimento e o seu crescimento. Os tumores têm a capacidade de desenvolver os seus próprios suprimentos de sangue, manipular o sistema imunológico e recrutar células normais para ajudá-los a crescer (GALLUZI et al., 2015). Com isso, novos tratamentos estão sendo desenvolvidos, que visam atuar em proteínas, que estão subjacentes ao crescimento e desenvolvimento do tumor (ABID et al., 2016; CHAMMAS, 2013). A Rede de Pesquisa do Genoma do Câncer (TCGA) recentemente identificou semelhanças genômicas entre o endométrio e outros tipos de câncer, incluindo câncer de mama, ovário e colorretal. Portanto, os tratamentos que visam alterações moleculares específicas podem funcionar não apenas contra o câncer para o qual foram desenvolvidos, mas também contra tumores de outros sítios que levam as mesmas alterações (KIMURA e BAÍA, 2002).

Atualmente dispomos de vários tratamentos na clínica para prolongar a sobrevida do paciente, que pode ser através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea, ou ainda, de uma combinação

de mais de uma modalidade. A quimioterapia ainda é a estratégia de primeira linha para o tratamento de diversos tipos de cânceres, entretanto, as células cancerosas frequentemente adquirem resistência aos agentes quimioterápicos, que por sua vez, também induzem efeitos colaterais graves. Mais recentemente, surgiram alguns agentes quimioterápicos de uso oral com boa aceitação pelos pacientes e oncologistas, devido a praticidade da administração, bons resultados e os custos bem mais baixos (CRAGG e PEZZUTO, 2016). Existe a perspectiva de um futuro mais promissor para o tratamento do câncer com a medicina personalizada. Desta maneira, novos fármacos antineoplásicos com baixa probabilidade de induzir resistência e causar poucos efeitos colaterais são desafios atuais e constantes na pesquisa (CALABRESI e CHABNER, 2001).

As plantas com fins medicinais, são estudadas frequentemente para a busca de novos fármacos, com o intuito de encontrar tratamento, cura e até a prevenção na formação de tumores (revisado por COSTA-LOTUFO et al., 2010). Desde a década de 1990, a OMS divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JUNIOR et al., 2005). E ao longo do tempo foram registrados variados procedimentos clínicos utilizando as plantas medicinais entre outros recursos naturais como fontes primárias de agentes antineoplásicos (CRAGG e PEZZUTO, 2016). Uma dessas moléculas derivada de produtos naturais que vem sendo bastante estudada é a piplartina, também conhecida como piperlongumina, a qual é encontrada em diversas espécies do gênero *Piper* (Piperaceae) (AODAH et al., 2016). A piplartina apresentou efeitos citotóxicos e antitumorais em diversos modelos experimentais. Com o objetivo de potencializar os efeitos citotóxicos em células tumorais, tem sido utilizada a associação com metais de transição, incluindo complexos de platina, tal como cisplatina e oxaliplatina; entretanto, os seus efeitos colaterais relacionados a nefrotoxicidade e neurotoxicidade são elevados. Por outro lado, os complexos de coordenação utilizando o rutênio são agentes anticancerígenos potentes e seletivos, sendo atualmente considerados mais ativos e seletivos que os de platina (ABID et al., 2016). Conseqüentemente, várias moléculas orgânicas estão sendo usadas como

ligantes para formar complexos com rutênio visando a melhoria de sua atividade citotóxica. Todavia, esta abordagem ainda não foi utilizada com a piplartina. Portanto, propomos a síntese e o estudo da atividade citotóxica de novos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOLOGIA DO CÂNCER

A presença de células em crescimento contínuo, com propriedades de invasão e destruição do tecido adjacente, bem como o crescimento em outros sítios diferentes do tumor primário (metástase), faz parte das propriedades que são ocasionadas por um acúmulo de mutações nos oncogenes, nos genes supressores tumorais e nos genes reparadores de DNA, o qual caracterizam um tumor maligno (câncer) (figura 1). Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa de células que se multiplicam vagorosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (revisado por COSTA-LOTUFO et al., 2010). Sabe-se que vários fatores são responsáveis pelo aumento desenfreado da doença mundialmente, nas quais, estão associadas principalmente ao envelhecimento (DIAS et al., 2015).

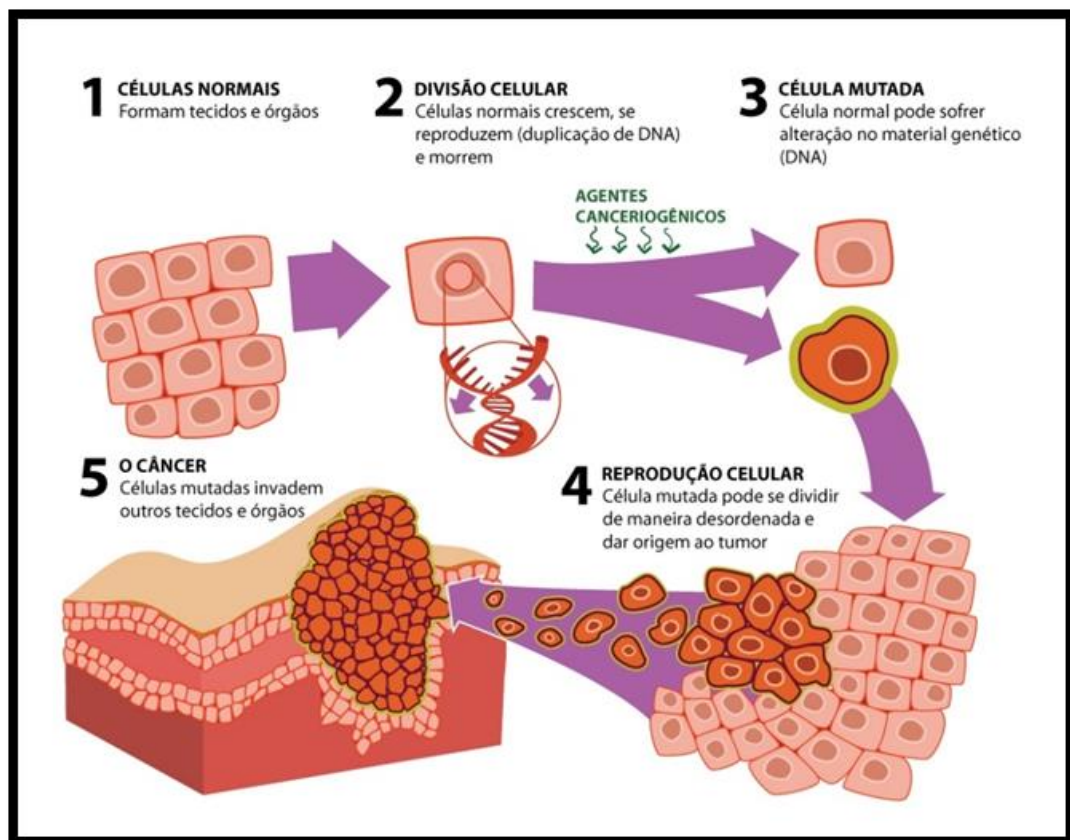


Figura 1. Desenvolvimento tumoral. Fonte: OMS, 2016.

Embora o câncer afete pacientes individuais e suas famílias de diferentes maneiras, o estudo de seu impacto em grandes populações pode fornecer informações importantes que influenciam práticas políticas e programas que afetem diretamente a saúde de milhões de pessoas a cada ano (OMS, 2016). Pesquisas vem sendo desenvolvidas, nos quais, alguns padrões comportamentais possam influenciar o risco de câncer ou sua recorrência (como o uso do tabaco, dieta e práticas de triagem), identificando como os fatores genéticos herdados e as exposições ocupacionais, ambientais, médicas, entre outras uma forma de risco para o desenvolvimento e o aumento da doença (revisado por COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Estudos mostram que mulheres que praticam pelo menos quatro horas de atividade física semanal durante os anos de vida reprodutiva têm risco 60% menor de desenvolver câncer de mama. Nas que já atingiram a menopausa, a prática de exercício físico também está associada a menor incidência, por causar diminuição dos níveis de estrógeno e da massa gordurosa (DA SILVA, 2017). Por razões pouco conhecidas, obesidade e vida sedentária aumentam também a incidência de outros tipos de câncer. Quando combinados, os dois fatores são responsáveis por: 20% dos casos de câncer de mama; 50% dos carcinomas de endométrio (camada mucosa que reveste a parte interna do útero); 25% dos tumores malignos do cólon (intestino grosso); 37% dos casos de adenocarcinoma de esôfago, um tipo de câncer cuja incidência tem aumentado exponencialmente nos últimos anos (INCA, 2016).

O envelhecimento é um outro fator fundamental para o desenvolvimento do câncer, essa incidência aumenta com a idade, provavelmente devido a uma acumulação de riscos para tipos específicos, combinada com a tendência que os mecanismos de reparação celular sejam menos eficazes à medida que a pessoa envelhece (OMS, 2016). Representando 8,8 milhões de mortes em 2015, o câncer pode atingir ambos os sexos. Alguns tipos são mais comuns de morte, como: pulmão (1,69 milhões de óbitos); fígado (788 000 óbitos); colorretal (774 000 de óbitos); estômago (754 000 de óbitos) e mama (571 000 de óbitos), sendo o de pele que mais acomete ambos os sexos, seguido por mama em mulheres e de próstata em homens, conforme podemos observar na figura 2 (INCA, 2016).

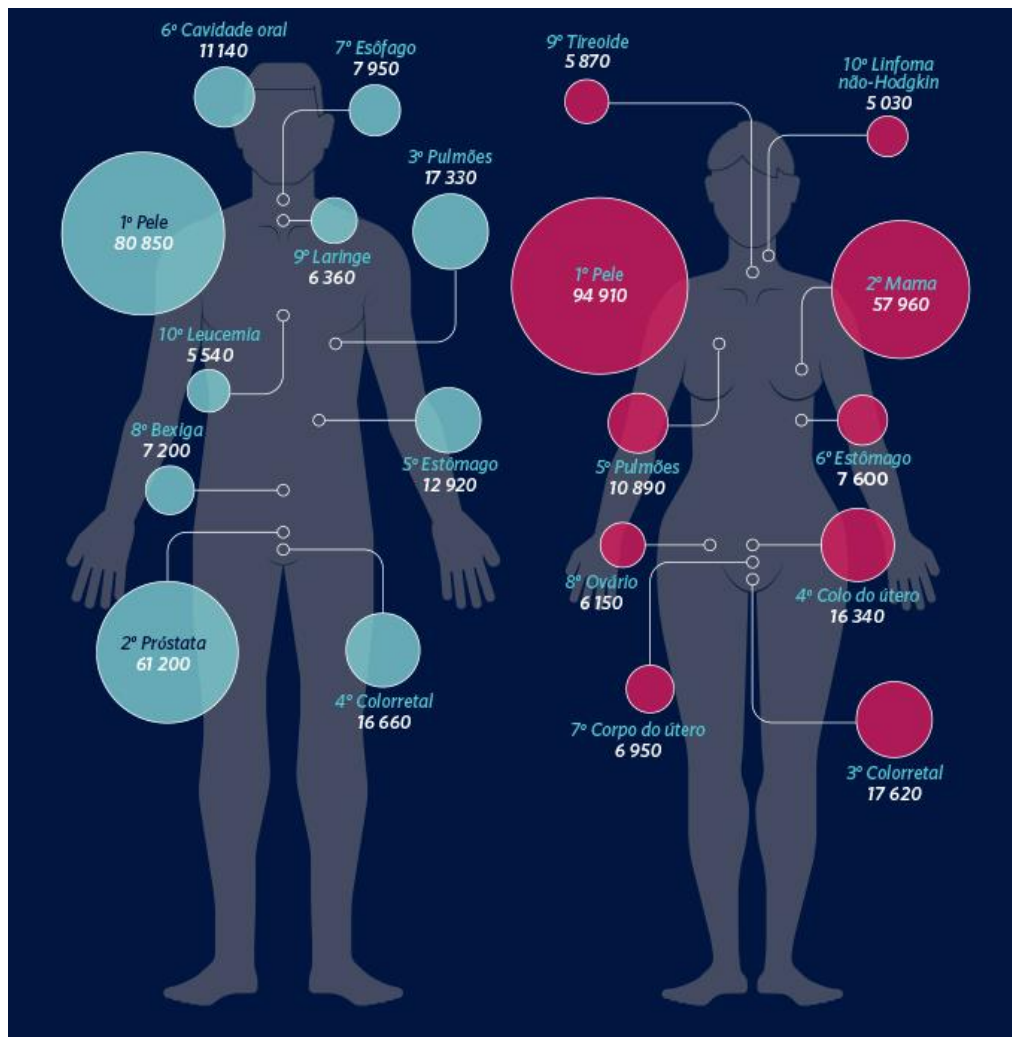


Figura 2. Dados estatísticos e tipos de câncer em ambos os sexos.
Fonte: (INCA,2016)

A mortalidade pode ser reduzida se os casos forem detectados e tratados precocemente, sendo mais provável de responder a um tratamento eficaz e resultando em uma maior probabilidade de sobrevivência e melhorias significativas ao paciente.

As células tumorais exibem uma morfologia padrão, tais como núcleos aberrantes, cromatina abundante e mitose atípica (CAMMAROTA e LAUKKANEN, 2016). Alterações do genoma ocasionadas por estímulos de infecções de patógenos específicos ou condições inflamatórias persistentes, ressaltam a importância da estabilidade dos genes como chave para o desenvolvimento dos tumores. Além das alterações estruturais algumas alterações são dependentes do controle de transcrição de genes que promovem alterações epigenética, proliferação, imortalização, resistência à morte celular, insensibilidade a fatores de

inibição, invasão, metástase e angiogênese no contexto de origem genômica (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Os genes reparadores de danos do DNA estão constantemente refazendo as moléculas que sofrem mutação e o mau funcionamento dos mecanismos de regulação do ciclo celular permitindo a passagem das células que sofreram mutações pelo ciclo e acumulando mutações que contribuem para o surgimento das características do tumor maligno. As aquisições dessas propriedades biológicas resultam na interação entre a célula e agentes carcinogênicos (tais como, vírus, radiação, agentes químicos, etc), ou podem ser herdadas em células germinativas, especialmente nos genes supressores de tumor (revisado por COSTA-LOTUFO et al., 2010; HANAHAN e WEINBERG, 2011; CHAMMAS, 2013; DIAS et al., 2015).

Mutações em um gene altera todo o metabolismo celular, sendo suficiente para o desenvolvimento do câncer. Os oncogenes são genes dominantes, e as alterações genéticas que levam à ativação desses genes, incluem mutações pontuais, translocações, ampliações de genes (CROCE, 2008) e modificações epigenética. Estas mutações levam os oncogenes a expressar em excesso sua proteína estimuladora de genes relacionada com o crescimento celular. A relação existente entre oncogenes e vírus foi levantada em 1909, quando Peyton Rous descobriu que um vírus (conhecido como Rous sarcoma vírus) causava sarcoma em aves. Este vírus usava um único gene, o oncogene v-src, que uma vez ativado, transformava o crescimento normal das células em crescimento carcinogênico. Os produtos de oncogenes podem ser classificados em fatores de crescimento (PDGF, EGF, VEGF), receptores do fator de crescimento (EGFR e grupos VEGF-R), transdutores de sinal (Ras, Abl, Raf), reguladores de apoptose (Bclx e Bcl2), remodeladores de cromatina (ALL) e fatores de transcrição (Fos, Jun) (RIVOIRE et al., 2001; CROCE, 2008; DIAS et al., 2015). De um modo geral, os oncogenes promovem a proliferação celular desordenada enquanto os genes supressores mantêm essa proliferação sob controle, restringindo o crescimento celular (revisado por COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Estudos realizados recentemente demonstraram que a fosfatase dual-MAP quinase desempenha um papel fundamental na regulação e na sinalização oncogênica através das vias Ras/ERK e DUSP. As MKPS podem atuar como supressor tumoral ou como reguladores pró-oncogênicos de Ras e na sinalização

ERK, e isto, podem depender dos limiares diferentes e específicos de tecido da atividade de ERK que são permissivas para promover a proliferação celular. Por outro lado, pode causar bloqueio no ciclo celular, senescência ou morte celular. No entanto, talvez os dados mais convincentes, implicando DUSP/MKP-3 como uma fosfatase pró-oncogênica, veio de um estudo recente da transformação de células pré-B em leucemia aguda linfoblástica (RELÓGIO et al., 2014; DIAS et al., 2015).

Genes supressores de tumor representam o lado oposto da célula no controle do crescimento, e normalmente atua para inibir a proliferação celular e o desenvolvimento do tumor. Em muitos tumores, estes genes são perdidos ou inativados, removendo-se assim os reguladores da proliferação celular. A ativação dos oncogenes celulares e a inativação de genes supressores de tumores representam alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento do tumor e como consequência dessas alterações os oncogenes conduzem uma proliferação celular, um aumento de expressão dos genes ou uma atividade descontrolada das proteínas codificadas (DAYAL, 2017). O primeiro gene supressor de tumor foi identificado através de estudos de retinoblastoma (tumor ocular). Estudos demonstraram que, aproximadamente, 50% das crianças apresentavam retinoblastoma quando herdados de um progenitor afetado, que confere susceptibilidade ao desenvolvimento do tumor (COOPER, 2000; DIAS et al., 2015). Estudos *in vivo* em camundongos geneticamente modificados permitiram a identificação de genes supressores de tumor com base nos sintomas clínicos e na caracterização dos mecanismos carcinogênicos. Inativação dos genes supressores de tumor podem envolver diferentes modulações, além de mutação, eliminação e perda de heterozigotos, como, por exemplo, o promotor de silenciamento por metilação do DNA. Uma das estratégias terapêuticas dos genes supressores de tumor ou suas proteínas é de se comportar como um alvo molecular capaz de suprimir a formação de tumores, por exemplo o gene TP53 (TENG et al., 2016).

A metástase é a disseminação do câncer para outros órgãos, nas quais, as células tumorais desprendem do tumor primário e entram na corrente sanguínea ou no sistema linfático com distinta localização (SPANNO et al., 2012). Os tumores metastáticos eram considerados como a fase final da progressão do tumor, mas, atualmente sabe-se que a cascata metastática pode ocorrer no início. Nos tumores tradicionais, o modelo de evolução clonal tem como característica principal, serem

homogêneos e capazes de repovoar e regenerar os tumores por si próprios. Qualquer heterogeneidade é conseguida por um subconjunto de células que adquirem mutações adicionais após intrínseca (por exemplo, genética e epigenética) ou extrínseca (por exemplo, microambiente) através de estímulos que promovam a sua agressividade e potencial metastático (MOLTZAHN e THALMANN, 2013).

Nos últimos anos, a cascata metastática continua sendo um grande desafio na pesquisa do câncer, envolvendo uma complexa sequência de passos-locais de invasão, extravasamento, micro metástases e colonização, permitindo que as células tumorais primárias invadam tecidos adjacentes e se adaptem no microambiente do nicho metastático (SPANO et al., 2012). As células cancerígenas adquirem um fenótipo invasivo num processo denominado de transição epitélio-mesênquima em referência a passos morfogenéticos que ocorrem durante a embriogênese. As capacidades metastáticas de células cancerosas não dependem apenas das alterações genéticas celular-autônoma e epigenéticas, mas também em mudanças e adaptação do microambiente tumoral (KIN et al., 2017)

Um tumor é composto de uma grande variedade de outros tipos celulares, incluindo fibroblastos, células epiteliais, pericitos, miofibroblastos, células vascular e endotelial (linfo vascular) e células do sistema imune. No entanto, durante o início da tumorigênese, as primeiras células que são recrutadas por uma neoplasia são os fibroblastos que representam o principal constituinte do tecido estromal e associados ao câncer, na qual têm um papel fundamental na secreção de fatores que atuam sobre as células tumorais em ambas as formas, parácrinas e autócrinas (SPANO et al., 2012). As células do estroma, especialmente macrófagos, também são importantes na metástase, segregando TNF- α e EGF, o que contribui para transição epitélio-mesênquima e motilidade celular, respectivamente. Em geral, a colonização metastática é biologicamente ineficiente e o estroma precisa ser ativado previamente no nicho metastático. A ativação do estroma pode ser induzida por células tumorais próprias através da secreção de CCL9 e CSF-1, o qual estimula a diferenciação de macrófagos e de células progenitoras mielóides, respectivamente. Os macrófagos tumorais, por sua vez, são resistentes à hipóxia e baixa tensão de oxigênio que induz a secreção de grandes quantidades de IL-8 e

VEGFA e do aumento da atividade antigênica que é fundamental para o sucesso da colonização metastática (KONG, 2008; LI et al., 2015).

2.2 TRATAMENTO DO CÂNCER

Estudos demonstram que 1/3 dos casos de câncer são evitáveis ou podem ser curados com tratamentos de alta complexidade. Cerca de 80% dos tratamentos atuais incluem a ressecção cirúrgica dos tumores associados à quimioterapia e/ou radioterapia. A eficácia de cada terapia envolve uma combinação de diferentes modalidades terapêuticas que variam de acordo com cada tipo de câncer (revisado por COSTA-LOTUFO et al., 2010; GALI-MUHTASIB, et al., 2015).

Atualmente os estudos destinados às novas terapias anticancerígenas estão voltados a interromper os produtos ou vias de sinalização, induzir a morte e impedir a progressão das alterações celulares. Apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico contra o câncer, vários tipos de tumores ainda não dispõem de tratamento adequado (revisado por COSTA-LOTUFO et al., 2010). Desta maneira, os problemas de resistência aos fármacos e os efeitos colaterais causados por essas terapias vem sendo os maiores problemas enfrentados na prática clínica oncológica (NOOR et al, 2012).

O primeiro quimioterápico antineoplásico foi desenvolvido a partir de táticas químicas em guerra com gás de mostarda. Após exposição ao agente, soldados desenvolveram hipoplasia medular e linfóide, despertando o interesse do seu uso na clínica como tratamento em linfomas malignos. A partir de 1946, estudos clínicos e observações foram realizadas em crianças com leucemias, levando a um avanço crescente com o tratamento. Cinquenta anos depois, mais de sessenta fármacos foram registrados nos EUA para o tratamento do câncer em várias classes diferentes da doença, entretanto, diversas pesquisas, ainda são dedicadas a testar compostos com várias combinações diferentes (CONNORS, 1996; BARRETO et al., 2014).

A quimioterapia é um dos procedimentos mais utilizados no tratamento do câncer e tem como principal objetivo a destruição das células tumorais (KAPUVÁRI et al., 2015). Diversas pesquisas realizadas atualmente estão empenhadas em diminuir os efeitos colaterais dos tratamentos, tal como náuseas, alopecia e um

aumento da susceptibilidade a infecções. A presença das altas taxas de toxicidade representa um risco iminente na interrupção do tratamento, aumentando a probabilidade da sua ineficácia (DIAS et al., 2015).

A maioria dos quimioterápicos antineoplásicos atuam sobre as células que estão nas fases do ciclo celular. Há agentes que atuam dependentemente do ciclo celular, necessitando da proliferação celular para exercer seus efeitos citotóxicos. Alguns têm ação preferencial em uma fase específica do ciclo, enquanto outros são citotóxicos em qualquer ponto do ciclo celular. As associações medicamentosas com agentes que atuam em diferentes fases parecem ter ação sinérgica no combate ao crescimento e desenvolvimento do tumor (LEE et al., 2001).

Os quimioterápicos antineoplásicos são classificados conforme a estrutura e função em nível celular, os quais podem incluir: agentes alquilantes (mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucil, etilenamina e alquil sifonatos); nitrosouréias (carmustina, lomustina e estreptomizicina); triazenos (dacarbazina e temozolomida); agentes antimetabólicos (metotrexato e 5-fluorouracil); produtos naturais (alcaloides da vinca, placlitaxel, teniposídeo e etoposídeo); complexos metálicos (complexos de platina, incluindo cisplatina, carboplatina e oxaliplatina); uréia substituída (hidroxiureia); derivado de metilidrazina (procarbazina); supressor adrenocortical (mitotano e aminoglutetimida); e inibidores da tirosina quinase (rituximab, imatinib e trastuzumabe) (CALABRESI et al., 2001).

Alguns desses agentes antineoplásicos citados são bastante empregados no tratamento do câncer, sozinhos ou associados. Por exemplo, os alquilantes são agentes capazes de se ligar ao DNA de modo a impedir o fenômeno das hélices de espiralar, fato indispensável a replicação, afetando as células em todas as fases do ciclo celular; os antimetabólitos, agentes que afetam as células inibindo a biossíntese do DNA e RNA, com isso, impedindo a multiplicação e função normal das células, alterando a fase de síntese do ciclo celular (fase S); os antibióticos interagem com o DNA inibindo a sua síntese, sem atuar em uma fase específica do ciclo celular; os inibidores sintéticos podem paralisar a mitose na metáfase, devido a sua ação sobre a tubulina, ocorrendo a interrupção da divisão celular e alguns agentes não podem ser agrupadas em uma determinada classe de ação farmacológica, entre eles a dacarbazina, indicada no tratamento do melanoma avançado e sarcomas de partes moles e linfomas, cujo o mecanismo de ação não

foi ainda completamente descrito. Entretanto, todos os agentes atuam em células normais e tumorais acarretando em uma série de efeitos colaterais nos pacientes (ALMEIDA et al., 2005; KOBYLINSKA et al., 2017).

A resistência aos agentes utilizados como quimioterápicos ocorrem porque as células são capazes de ativar vias metabólicas alternativas, através da síntese de novas enzimas ou desenvolvimento de uma nova codificação genética (mutação). É possível reverter o mecanismo de resistência a partir de compostos que inativem essas proteínas, principalmente, quando a população tumoral é pequena. Existem dois problemas fundamentais no desenvolvimento de fármacos: a falta de exames laboratoriais adequados e a dificuldade de realização de ensaios clínicos iniciais. Em primeiro lugar, nenhum método de laboratório existente pode prever com precisão qual produto químico será eficaz contra uma determinada classe de câncer humano. Na melhor das hipóteses, os testes podem demonstrar uma propriedade geral antitumoral, por exemplo a descoberta da cisplatina. (CONNORS, 1996; AYYAGARI et al., 2017).

Descobertas de novos fármacos e o desenvolvimento de novas classes de quimioterápicos com baixa toxicidade e resistência são os desafios de grande relevância para as indústrias farmacêuticas, com a finalidade de promover aos pacientes maior sobrevida e melhor qualidade de vida.

2.3 PIPLARTINA

A piplartina (figura 3), também conhecida como piperlongumina, é um alcalóide/amida encontrado em plantas do gênero *Piper*, a qual apresenta diversas atividades farmacológicas. Entre as atividades da piplartina, podemos citar suas propriedades citotóxica, antitumoral, antiangiogênica, antimetastática, antinociceptiva, ansiolítica, antidepressiva, anti-aterosclerótica, antidiabética, antibacteriana, antifúngica, leishmanicida, tripanocida e esquistossomicida (revisado por BEZERRA et al., 2013). Dentre essas, o seu potencial anticancerígeno é amplamente estudado.

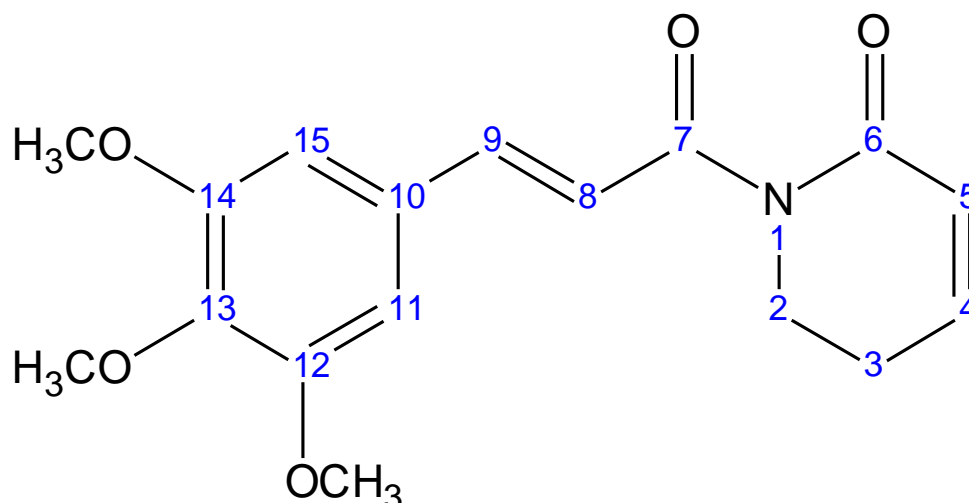


Figura 3. Estrutura química da piplartina {5,6-dihidro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenil]-2(1H)piridinona}.

Com relação ao seu mecanismo de ação citotóxico, estudos realizados utilizando linhagem celular de leucemia humana, demonstraram que a piplartina causa diminuição do crescimento levando a morte celular tanto por apoptose quanto necrose e em células normais polimorfonucleares de sangue periférico humano, foi observada baixa citotoxicidade, mostrando seletividade desta amida entre a célula tumoral e normal (BEZERRA et al., 2007; FOFARIA et al., 2016). A piplartina induziu parada do ciclo celular na fase G₂/M seguido de morte celular por apoptose dependente de mitocôndria (BEZERRA et al., 2008; WANG et al., 2014) quando testado em linhagem celular V79, linhagem celular derivado de fibroblastos de *hamster* chinês. A piplartina inibiu, preferencialmente, a proliferação das células andrógeno-independente do que as células andrógeno-dependentes. Também foi relatada parada do ciclo celular na fase G₂/M e diminuição concentração-dependente da expressão de cdc-2 após o tratamento da piplartina na linhagem PC-3. Não foi observado alteração quando avaliada a expressão da ciclina B1, molécula importante para a transição da fase G₂/M. Mudança no nível de bax não foi detectada; entretanto, bcl-2, um inibidor da via intrínseca da apoptose, diminuiu significativamente, sugerindo que a piplartina induz morte celular por apoptose através de *down-regulation* de bcl-2. Foi também encontrado ativação de caspase 3 e poli (ADPribose) polimerase, proteínas efetoras no processo de apoptose (BEZERRA et al., 2008; ROH et al., 2014).

Segundo estudos realizados por Raj e colaboradores (2011) a piplartina induziu morte celular em células cancerosas, mas não em células normais. A morte celular pela piplartina foi associada com a indução da expressão de p53, possuindo tanto efeito em linhagens tumorais selvagens quanto com mutações para expressão do p53. Em adição, o tratamento com a piplartina reduz a expressão de diversas proteínas de sobrevivência celular como Bcl2, survivina e XIAP. O tratamento com a piplartina também promove o aumento da expressão de genes pró-apoptóticos como Bim, PUMA e Noxa. Em células tratadas com piplartina, também foi observado ativação do gene CDIP (*cell death involved p53-target*). Utilizando técnicas de proteômica foi identificado 12 alvos potenciais para o efeito citotóxico da piplartina, entre eles sete vias estão envolvidas na resposta celular ao estresse oxidativo. Além disso, verificou-se que a piplartina é capaz de interagir diretamente com GSTP1, inibir a atividade de glutathione S-transferase, diminuir os níveis de glutathione reduzida e aumentar os níveis de glutathione oxidada nas células tumorais. Também foi observado que a piplartina induz a liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células tumorais; entretanto, a piplartina não foi capaz de aumentar os níveis de ERO em células normais (RAJ et al., 2011; ALPAY et al., 2016).

Quando testadas em modelo pré-clínico *in vivo*, a piplartina reduz o crescimento de tumores da linhagem Sarcoma 180, o que a confere um promissor potencial antitumoral (BEZERRA et al., 2006). Utilizando modelos xenográficos, foi observada atividade antitumoral da piplartina contra EJ (carcinoma de bexiga humano), MDA-MB-436 (melanoma humano) e A549 (carcinoma de pulmão humano). Também foi observada inibição de tumor de camundongos inoculados com melanoma murino B16-F10 em camundongos C57BL/6, após o tratamento com a piplartina. O tratamento com a piplartina aumenta a expressão de CDKN1A, PUMA e caspase-3 em células tumorais EJ, o qual pode estar relacionado com o efeito antitumoral da piplartina sobre os animais transplantados. Além desses dados, a piplartina foi capaz de inibir a formação de vasos sanguíneos em modelo de tumor xenográfico e a expressão de VEGF, o qual implica atividade antiangiogênica. Também foi observado efeito antitumoral da piplartina em modelo de câncer de mama em animais transgênicos MMTV-PyVT, modelo de câncer de mama espontâneo. Neste modelo, também foi observado à diminuição da formação

de vasos sanguíneos após o tratamento com a piplartina e diminuição da expressão de CD31. Neste modelo, também é possível observar a formação de metástase, o qual foi inibido após o tratamento com piplartina (RAJ et al., 2011).

Em outros estudos recentes a piplartina induziu a morte celular apoptótica e suprimiram a atividade de ligação ao DNA do NF- κ B em células de carcinoma de pulmão e, em modelo xenográfico, suprimiu o seu crescimento tumoral (ZHENG et al., 2016 a). A piplartina também reduziu a viabilidade celular e a sinalização JNK foi ativada durante o tratamento nas células HCT116 (WEN et al., 2015).

2.4 COMPLEXOS METÁLICOS

Os complexos metálicos são utilizados em diagnósticos e como fármacos no tratamento de várias doenças. Os conhecimentos do mecanismo da ação farmacológica destes compostos são de suma importância no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e seguros ao paciente (WEIDMANN et al., 2014). Atualmente, o ouro, complexos de prata e os complexos de platina são bem utilizados em diferentes tratamentos, e novos complexos metálicos de paládio e rutênio tem sido pesquisado e descrito com resultados promissores, principalmente no tratamento do câncer (SUN et al., 2015). A cisplatina foi o primeiro complexo metálico comercializado como agente antitumoral eficaz sendo largamente utilizado na clínica no tratamento de diferentes tipos de câncer (incluindo ovário, testículos, bexiga, pulmão e cabeça e pescoço). Alguns estudos têm observado o acúmulo mitocondrial de cisplatina em células cisplatina-resistente. Entretanto, diversos efeitos colaterais são apresentados (nefrotoxicidade, neurotoxicidade, toxicidade gastrointestinais e mielossupressão) (CHEN, 2009). Em tentativas de reduzir os efeitos colaterais, foram sintetizados milhares de análogos, contudo, destes, apenas carboplatina e oxaliplatina (Figura 4) foram aprovadas para utilização em todo o mundo. Estes complexos exibem efeitos colaterais diferentes e superam alguma resistência à cisplatina, respectivamente, embora de outro modo não demonstram melhorias significativas na eficácia global.

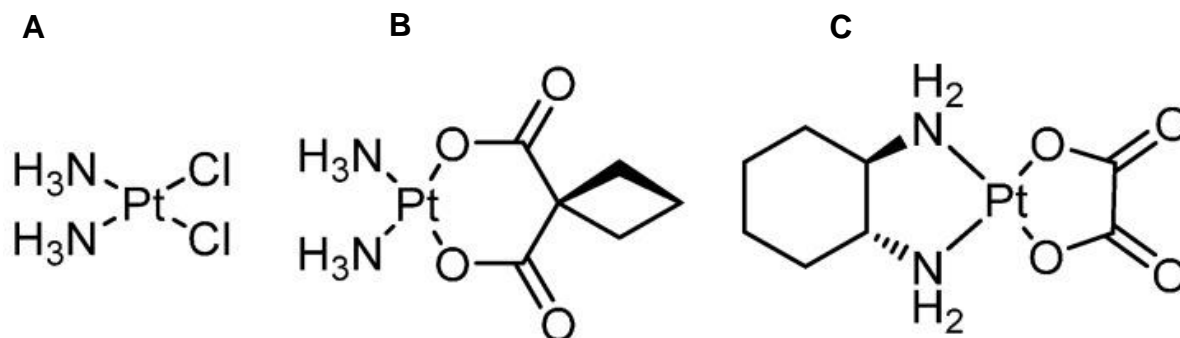


Figura 4. Estruturas químicas da **A** cisplatina, **B** carboplatina e **C** oxaliplatina.

Outro metal bastante utilizado na medicina desde os tempos antigos é o ouro apresentando um potencial antiproliferativo e propriedades citotóxicas através das vias pró-apoptóticas (MARKOWSKA et al., 2015). Por exemplo, os complexos de ouro têm sido relativamente bem-sucedidos em química medicinal, embora a maioria dos complexos anticancerígenos ativos não visam o DNA. Os complexos de ouro macrocíclico (III) recentemente relatados que incorporaram uma porção quinoxalina para promover a intercalação do DNA demonstraram atividade citotóxica e um efeito inibidor da topoisomerase I (DEO et al., 2016). Um estudo em camundongos transgênicos com leucemia linfocítica crônica foi realizado, no qual observou-se uma redução no tamanho do tumor, estendendo a sobrevivência global (MARKOWSKA et al., 2015)

Devido à sua geometria octaédrica, o que facilita a formação de complexos com moléculas orgânicas, complexos de rutênio são amplamente estudados como agentes antitumorais, os quais têm apresentado seletividade e menos efeitos colaterais em comparação aos fármacos a base de platina. Os complexos de rutênio têm demonstrado efeito inibitório sobre a enzima topoisomerase e indução de espécies reativas de oxigênio (MARKOWSKA et al., 2015; ZENG et al., 2016). Os seus análogos KP1019 e NKP-1339 foram testados apresentando atividade citotóxica *in vitro* em carcinoma do cólon e *in vivo* em diferentes tipos de tumores (SPRECKELMEYER et al., 2014). Em outros estudos, complexos de rutênio produziram citotoxicidade em células de carcinoma gástrico humano através da indução de apoptose e autofagia através da via Akt/mTOR. Ambos os compostos apresentam notável atividade antitumoral em carcinomas colorretais (BLAZEVIC et al., 2017). Além disso, alguns complexos de rutênio estão em testes clínicos de fase I ou II com resultados promissores (LENTZ, et al., 2009; LEIJEN, et al., 2015).

Uma variedade de complexos baseados em metais de transição são potentemente citotóxicos e demonstraram intercalação de DNA. Os complexos de cobre, níquel e zinco podem intercalar e clivar o DNA, e em estudos recentes apresentaram compostos potentes. O aparecimento de ligantes com outros metais, como ouro e ferro, produziram mais complexos citotóxicos com mecanismos distintamente diferentes para “matar” células cancerosas. A grande variedade de propriedades de metais de transição e combinações de ligantes produziu um espectro extremamente amplo de complexos anticancerígenos intercalares, cada um com um mecanismo de ação exclusivo. A expansão contínua destes complexos tem sido um grande potencial para fornecer uma quimioterapia mais efetiva (DEO et al., 2016; NAIR et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o potencial citotóxico de novos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o potencial citotóxico dos novos complexos de rutênio em diferentes células tumorais e não tumorais;
- ✓ Avaliar o efeito sobre o ciclo celular dos novos complexos de rutênio em células HCT116;
- ✓ Avaliar o padrão de morte celular induzido pelos novos complexos de rutênio em células HCT116;
- ✓ Avaliar a capacidade de indução de espécies reativas de oxigênio pelos novos complexos de rutênio em células HCT116;
- ✓ Avaliar o efeito dos novos complexos de rutênio sobre a expressão gênica de células HCT116.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS NOVOS COMPLEXOS DE RUTÊNIO CONTENDO PIPLARTINA COMO LIGANTE

Todos os procedimentos envolvendo as soluções dos complexos foram realizados sob atmosfera inerte (argônio). Os solventes utilizados nas manipulações foram purificados por métodos padrão. O $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb), 1,1-bis(difenilfosfina)ferroceno (dppf), 2,2'-bipiridina (bipy) foram adquiridos a Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) e a piplartina foi adquirida da Cayman Chemical Company (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) (QUEIROZ et al., 1998; GALLATTI et al., 2007). Os compostos com fórmula geral $[\text{Ru}(\text{P-P})(\text{N-N})(\text{piplartina})]^+$, onde P-P = bis(difenilfosfina)metano (dpmm); 1,2-bis(difenilfosfina)etano (dppe); 1,3-bis(difenilfosfina)propano (dppp); 1,4-bis(difenilfosfina)butano (dppb); 1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno (dppf), N-N = 2,2'-bipiridina (bipy) e derivados, foram obtidos a partir da reação de substituição dos cloretos, coordenados precursores do tipo $[\text{RuCl}_2(\text{P-P})(\text{N-N})]$, pela piplartina. A adição de um sal de prata (AgClO_4 ou AgPF_6) foi necessária para a retirada destes cloretos.

A espectroscopia vibracional na região infravermelha foi registrada em um espectrômetro FT-IR Bomem Michelson 102 na região $4000 - 350 \text{ cm}^{-1}$ usando pastilhas KBr. Os dados de conduta foram realizados em acetona seca, usando um modelo Micronal B-330 conectado a um eletrodo de platina, com célula constante de 0,089 cm, usando soluções de 1mM dos complexos, à temperatura ambiente. As análises elementares foram realizadas com o microanalisador EA 1108 CHNS (Fisons Instruments), no Laboratório de Microanálise do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Experimentos eletroquímicos (voltametria cíclica e de pulso) foram realizados a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em CH_2Cl_2 contendo BuTNCIO_4 0,10 M (perclorato de tetrabutilamônio, TBAP), registrado com um analisador eletroquímico Bioanalytical Systems Inc, modelo BAS-100B/W. Os eletrodos de trabalho e auxiliares eram platina estacionária; um sistema Ag/AgCl na sonda capilar Luggin foi usado como eletrodo de referência. Nestas condições, o casal de

ferroceno (Fc+/Fc) foi oxidado a 0,43 V. Os experimentos de RMN (^1H , ^{13}C { ^1H , ^{31}P { ^1H }, ^1H - ^1H gCOSY, ^1H - ^{13}C { ^1H } gHSQC e DEPT-135) foram realizados em Bruker DRX 400 Ultrashield™ (400,132 MHz para a frequência de hidrogênio, 100,623 MHz para a frequência de carbono e 161,976 MHz para a frequência de fósforo), referenciado com TMS (tetrametilsilano). Nos experimentos com ^1H , ^{13}C { ^1H }, ^1H - ^1H gCOSY, ^1H - ^{13}C { ^1H } gHSQC e DEPT-135, foram dissolvidos 25 mg de complexos metálicos finais em acetona deuterada (DMSO- d_6 , Cambridge Isotope Laboratories, Inc., EUA). Os experimentos de estabilidade ^{31}P { ^1H } foram relatados em relação ao H_3PO_4 (85% v/v), usando um capilar contendo D_2O .

Para o complexo $[\text{Ru}(\text{piplartina})(\text{dppf})(\text{bipy})](\text{PF}_6)_2$ (CPR1) foi utilizado um balão de Schlenk contendo 10 mL de diclorometano e 10 mL de acetona, adicionaram-se *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppf})(\text{bipy})]$ (0,066 mmol) e piplartina (0,099 mmol). Após a solubilização completa dos sólidos, adicionou-se 0,165 mmol de AgPF_6 , formando imediatamente um precipitado branco. A solução foi mantida à temperatura ambiente e à escuridão, sob uma atmosfera inerte e sob agitação durante 1 h. Em seguida, evaporou-se a solução até 2 mL e adicionou-se 10 mL de CH_2Cl_2 para formar um pó branco (AgCl) que foi removido por filtração. A solução filtrada foi concentrada até 3 mL e adicionou-se hexano (10 mL) para precipitar um pó de laranja, que foi removido por filtração, lavado com hexano, éter dietílico e seco sob vácuo. Rendimento: 70 mg (87%). Anal. Calc. Para $[\text{C}_{61}\text{H}_{55}\text{FeN}_3\text{O}_5\text{P}_2\text{Ru}](\text{PF}_6)_2$: exp. (Calc) C, 51,76 (51,64); H, 3,75 (3,91); N, 2,65 (2,96)%. Condutância molar ($\text{S}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$, acetona) 193,9. IR (cm^{-1}): (nCH) 3093, (nCH₂) 2942, (nCH) 2845; (NC = O) 1650; (NC = N) 1598; (NCC = C e vCC = N) 1544, 1502, 1434, 1421, 1332, 1305; (NC-O) 1122; (NP-C) 1093; (Nring) 1000; (NP-F) 844; (NC-H-cp) 750; (NP-CH) 636; (ΔP -F) 557; (NRu-P) 520 e 495; (NRu-O + nFe-cp) 474; (NRu-N) 428. ^{31}P { ^1H } RMN (162 MHz, d_6 -acetona, 298 K): δ (ppm) (d, 39,1; 39,3/43,1; 45,9, 2J = 29,6/30,3 Hz); RMN de ^1H (400 MHz, d_6 -acetona, 298 K): δ (ppm): 9,00, 8,93 (1H, d, bipy); 8,56, 8,50 (2H, s largo, bipy); 8,30 (0,5H, s bipy) 8,14 (2H, m, bipy); 7,76-6,87 (28H, m, Ho, Hm e Hp de dppf, 2,5H bipy, 2H, H aromático da piplartina, 3H H duplo da piplartina); 6,74, 6,11 (1H, d, H duplo da piplartina); 5,20 - 4,42 (8H, m, cp de ferroceno); 4,03 - 3,77 (11H, m, CH₃ e CH₂ da piplartina) e 2,55-2,44 (2H, m,

CH₂-piplartina). ¹³C {¹H} RMN (125,74 MHz, d₆-acetona, 298 K): δ (ppm) 174,22, 172,29, 171,92, 170,38 (C = O); 163,50-150,64 (C-Bipy, C-piplartina); 143,53 - 108,16 (C-dppb, C-Bipy, C-piplartina); 81,30 – 73,29 (C-cp ferroceno), 60,93 – 56,83 (CH₃ de piplartina) e 48,70 – 48,40, 25,15 – 24,95 (CH₂ de piplartina).

Para a síntese do complexo ([Ru(piplartina)(dppb)(bipy)](PF₆)₂) (CPR2), utilizou-se o mesmo procedimento do complexo anterior. Rendimento: 75 mg (88%). Anal. Calc. Para [C₅₅H₅₅N₃O₅P₂Ru](PF₆)₂: exp. (Calc) C, 50,85 (51,17); H, 4,45 (4,29); N, 2,94 (3,25)%. Condutância molar (S.cm².mol⁻¹, acetona) 193,9. IR (cm⁻¹): (νCH) 3061, (νCH₂) 2936, (νCH) 2862; (νC = O) 1651; (νC = N) 1600; (νC = C e νCC = N) 1579, 1501, 1463, 1435, 1421, 1328, 1304; (νC-O) 1122; (νP-C) 1096; (νringing) 1002; (νP-F) 842; (νC-H-cp) 743; (νP-CH₂) 698; (ΔP-F) 557; (νRu-P) 520 e 489; (νRu-O) 491; (νRu-N) 447. ³¹P {¹H} RMN (162 MHz, d₆-acetona, 298 K): δ (ppm) (d, 39,4; 42,3/41,0; 41,7, 2J = 32,6/34,9 Hz); RMN de ¹H (400 MHz, d₆-acetona, 298 K): δ (ppm): 8,79, 8,69 (1H, d, bipy); 8,71, 8,60 (1H, s largo, bipy); 8,38 - 8,33 (1H, d. Bipy); 8,25 (1H, d bipy); 7,06 (1H, s, H aromático da piplartina); 6,93 (1H, s, H aromático da piplartina); 8,22 – 6,18 (29H, m, Ho, Hm e Hp de dppf, bipy, H duplo da piplartina); 3,94 - 3,79 (9H, s, CH₃ da piplartina); 4,12 – 4,01, 3,59 – 3,45, 3,18 – 2,98, 2,75 - 2,14 e 1,58 (12H, m, CH₂ de dppb e CH₂ da piplartina). ¹³C {¹H} RMN (125,74 MHz, d₆-acetona, 298 K): δ (ppm) 173,76, 172,05, 171,69, 170,68 (C = O); 162,35-150,09 (C-Bipy, C-piplartina); 143,51 - 108,11, (C-dppb, C-Bipy, C-piplartina); 60,80 - 56,77 (CH₃ da piplartina) e 48,52 - 48,14 (CH₂ da piplartina) e 28,90 - 23,31 (CH₂ da piplartina e CH₂ do dppb).

A obtenção de caracterização dos complexos de rutênio contendo piplartina foram realizadas pelos professores Dr. Alzir Azevedo Batista e João Honorato de Araújo Neto no Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

4.2 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA

Foram utilizadas as linhagens celulares K562 (leucemia eritrócítica crônica humana), HL-60 (leucemia promielocítica aguda humana), B16-F10 (melanoma murino), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), SCC4 (carcinoma escamocelular oral humano), SCC9 (carcinoma escamocelular oral humano), HSC3 (carcinoma escamocelular oral humano), HCT116 (carcinoma de cólon humano) e MRC5 (células fibroblásticas humana) obtidas da ATCC. Todas as linhagens celulares foram testadas, mensalmente, para micoplasma utilizando o kit *Mycoplasma Stain* (Sigma-Aldrich), as quais estavam isentas de contaminação. As células foram cultivadas em garrafas de cultura e mantidas com RPMI 1640, suplementados com 10% de soro bovino fetal e gentamicina a 10µg/mL, acondicionadas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37°C. Para a manutenção das células aderidas, utilizou-se tripsina (0,25%) com a finalidade de retirar as células que permaneceram presas na superfície das garrafas.

PBMC (*peripheral blood mononuclear cells* – linfócitos e monócitos) foram obtidas de cultura primária coletados de voluntários saudáveis entre 20-45 anos de idade, não fumantes, que não tinham tomado quaisquer drogas durante pelo menos 15 dias anteriores à amostragem. O comitê de ética em pesquisa do Instituto Gonçalo Moniz (IGM-FIOCRUZ/BA, Salvador, Bahia, Brasil) aprovou o protocolo experimental (nº 031019/2013). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participação do estudo. A coleta do sangue foi realizada em frascos heparinizados por profissionais capacitados no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (IGM, Fiocruz, Bahia), utilizando seringas esterilizadas e descartáveis com volume de 10 mL. As PBMC foram isoladas por protocolo padrão, utilizando o gradiente com Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia). O precipitado de PBMC foram lavados duas vezes com solução salina e ressuspendido na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL em meio RPMI 1640 com 20% de soro bovino e 10 µg/mL de gentamicina. Foi utilizado no início da cultura 10 µg/mL de concanavalina A (ConA- Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) para desencadear a divisão celular em linfócitos T. A viabilidade celular foi examinada utilizando ensaio de

exclusão de azul de tripam, na qual mais de 90% das células estavam viáveis no início da cultura.

4.3 SOLUBILIZAÇÃO E DILUIÇÃO DOS COMPOSTOS

Inicialmente a estabilidade dos novos complexos (CPR1 e CPR2) foram testadas em diferentes solventes. Para isso, os complexos foram solubilizados em DMSO (dimetilsulfóxido), DMF (dimetilformamida), tween 80 e uma mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água e sua estabilidade foi determinada por técnicas de RMN. Foi observada a decomposição dos complexos quando solubilizados em DMSO e DMF, mas não com tween 80 ou com a mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água. Nos testes iniciais de citotoxicidade, o tween 80 apresentou toxicidade celular, o que inviabilizou sua utilização como veículo para solubilizar e diluir os complexos estudados. Diante disso, a mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água foi utilizada como solvente para solubilizar e dissolver os complexos.

4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A viabilidade celular foi quantificada utilizando o ensaio do alamar blue, um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox, de acordo com Ahmed et al. (1994). Para todos os experimentos, as células foram inseridas em placas de 96 poços ($0,7 \times 10^5$ células/mL para células aderidas e $0,3 \times 10^6$ células/mL para células em suspensão em $100 \mu\text{L}$ de meio). Após 24 h, os compostos testes nas concentrações de 0,19 a $25 \mu\text{g/mL}$ foram adicionados em cada poço em duplicatas e incubados por 72 h. A doxorrubicina (pureza $\geq 95,0\%$, cloridrato de doxorrubicina, Laboratório IMA SAIC), oxaliplatina (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) e a piplartina (pureza $> 98\%$, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) foram usadas como controles positivo. O controle negativo recebeu o veículo que foi utilizado para diluir os compostos (0,5 % da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água). Quatro (para células tumorais) ou 24 horas (para PBMC)

antes do término do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado em cada poço. Após o período de incubação, as placas foram mensuradas nas absorvâncias de 570 nm e 600 nm utilizando o leitor SpectraMax 190.

Para os ensaios de estudos do padrão de morte celular/mecanismo de ação, células HCT116 na densidade de $0,7 \times 10^5$ células/mL foram adicionadas a placas de 24 poços por um período inicial de 24 h para aderirem. Após este período, as células foram tratadas por 24 e/ou 48 h com os complexos em duas concentrações diferentes (as concentrações foram estabelecidas previamente com base no valor de CI_{50}). As células foram mantidas em estufa a 37° C e a 5% de CO₂. Doxorrubicina (1 µM), oxaliplatina (3 µM) e a piplartina (10 µM) foram utilizadas como controles positivos e o controle negativo recebeu apenas o veículo (0,1% da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) usado para solubilizar e diluir as substâncias testadas.

4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a viabilidade celular, a cada término do período de tratamento as células foram tripsinizadas e uma alíquota de 90 µL foi acrescida a 10 µL do corante azul de tripam. A contagem foi realizada levando em consideração a exclusão do corante por células viáveis, em câmara de Neubauer, por meio de microscópio óptico (Olympus CX41).

4.6 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE DNA

A determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o IP (iodeto de propídio) como agente fluorógeno. Decorridos os períodos de tratamento com os compostos, o sobrenadante foi coletado, as células foram tripsinizadas e centrifugadas (295 xG/ 5 minutos) juntamente com o sobrenadante. As células foram diluídas com a solução de permeabilização (200 µL) contendo 0,1 % de triton X-100 (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), 0,1% de citrato de sódio,

2 µg/mL iodeto de propídio (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) e 100 µg/mL RNase (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) em água destilada, na ausência de luz e a 37°C. Após 30 minutos, as células foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do *software* BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). As proporções de DNA fragmentado e as fases do ciclo celular foram obtidas utilizando o *software* Flowjo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os *debris* celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.7 AVALIAÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA

Após o tratamento com os complexos, as células foram marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídio (IP) para determinar a viabilidade celular (viável, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose), de acordo com o protocolo do fabricante (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA). As células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes com solução salina e em seguida, ressuspensas numa solução de 100 µL do tampão de ligação, 5 µL de iodeto de propídio e 5 µL de anexina V-FITC. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, na ausência de luminosidade, 400 µL de tampão de ligação foram adicionados a cada amostra. As células foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo, conforme descrito acima.

4.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO MITOCONDRIAL

As células foram plaqueadas na densidade de $0,7 \times 10^5$ células/mL com diferentes concentrações dos compostos testes. Uma alíquota de 50 µL foi recolhida após a incubação com as substâncias. As células foram diluídas com a solução de rodamina 123 (1 µg/mL, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) na ausência de luz e a 37 °C, e, após 15 minutos. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspensado em salina e reincubado por 30 minutos e, então, analisadas por citometria de fluxo, conforme descrito acima.

4.9 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO INTRACELULAR

As células foram tratadas por 1 h e 3 h com os complexos. Após esse período, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em 1 mL de meio fresco e 2 µL de diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCF-DA), que é convertido num produto fluorescente na presença de espécies reativas de oxigênio intracelular. Após 30 minutos de incubação a 37° C, na ausência de luminosidade, as células foram centrifugadas (295 xG/ 5 minutos), ressuspensas em salina e adquiridas imediatamente em citômetro de fluxo, conforme descrito acima.

4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

As células foram tratadas por 12 h com os complexos. Para o procedimento de extração de RNA, foram utilizadas microcolunas de sílica-Rneasy Plus Mini Kit (QIAGEN). As amostras foram lisadas com o tampão RLT, homogeneizadas com auxílio do vórtex e através da passagem do lisado por agulha de 0.9mm, acoplada a uma seringa, durante 10 vezes consecutivas. O lisado foi transferido para a microcoluna contendo DNase, a fim de eliminar o DNA genômico. Em seguida, foi adicionado 350 µL de etanol 70% e o mesmo misturado gentilmente a amostra, com auxílio de pipeta. Após a passagem por nova microcoluna de sílica, lavagens com tampões do kit (RW1 e RPE), o RNA foi eluído com 50 µL de água livre de Rnase/Dnase, pH 7.4 e armazenado em temperatura de -80°C. A quantidade e pureza do RNA extraído de cada amostra foi analisada em aparelho de fluorimetria (QuBit™, Life Technologies, USA). A transcrição reversa foi realizada com a enzima transcriptase Superscript VILO™ (Invitrogen Corporation, USA) e as amostras de cDNA armazenadas em temperatura de -20°C. Para as reações de PCR quantitativo foram utilizados TaqMan Gene Expression Assays™ (Life Technologies) inventoriados para TaqMan Array Human Molecular Mechanisms of Cancer 96 plate, Fast (ID 4418806, Applied Biosystems™). As reações foram conduzidas

no aparelho ABI ViiA7 (Applied Biosystems™), utilizando placa Fast de 96 poços e com um volume total de 20 µL. O programa de amplificação consistiu de um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Todos os experimentos foram realizados em condições livres de DNase/RNase. As quantidades relativas (QR) da expressão de mRNA foram calculadas pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando o Software Gene Expression Suite™ (Applied Biosystems™) e as células tratadas com o controle negativo (0,1% de uma mistura contendo 70% Sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) como calibrador. Os genes GAPDH, 18S e HPRT1 foram utilizados para a normalização da expressão gênica. Considerou-se que os genes estavam com a expressão gênica aumentada se $QR \geq 2$, o que significa que a expressão do gene em células tratadas com o composto era pelo menos duas vezes maior que nas células tratadas com controle negativo. De forma semelhante, considerou-se que os genes estavam com a expressão gênica reduzida se $QR \leq 0,5$, o que significa que a expressão gênica em células tratadas com o composto era metade ou menos da metade do que em células tratadas com o controle negativo.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. ou valores de CI_{50} e respectivos intervalos de confiança de 95%, obtidos através de regressão não linear, a partir de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. A diferença entre os grupos experimentais foi avaliada pelo teste ANOVA (análise de variância) seguida do teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$). O programa GRAPHPAD PRISM (Intuitive Software for Science) foi utilizado para a realização de todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS

Os novos complexos de rutênio contendo piplartina foram obtidos usando dois precursores diferentes do tipo $[\text{RuCl}_2(\text{NN})(\text{PP})]$ ($\text{NN} = 2,2'$ -bipiridina (bipy); $\text{PP} = 1,1'$ -bis (difenilfosfino) ferroceno (dppf) para CPR1 (heterometálico) e $1,4$ -bis (difenilfosfino) butano (dppb) para CPR2 (monometálico) como indicado na figura 5. O hexafluorofosfato de prata foi empregado para sequestrar o clorido do precursor, permitindo a coordenação do ligante de piplartina ao centro de metal e formação do sal AgCl insolúvel, que foi facilmente removido por filtração. O emprego de solvente seco não coordenado (acetona ou diclorometano), durante as sínteses dos complexos é necessário para evitar a formação de subprodutos da reação. Ambos os complexos foram preparados com bons rendimentos, superiores a 85%, como sólidos de laranja, estáveis sob a luz e o ar.

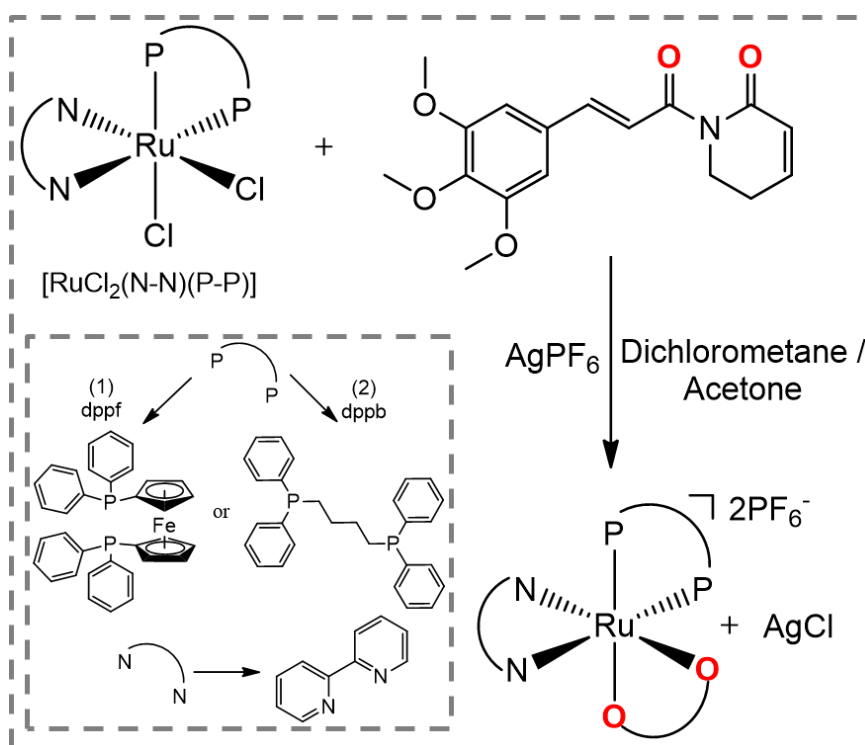


Figure 5. Rota para a síntese de complexos $[\text{Ru}(\text{piplartina})(\text{dppf})(\text{bipy})](\text{PF}_6)_2$ (**1**) e $[\text{Ru}(\text{piplartina})(\text{dppb})(\text{bipy})](\text{PF}_6)_2$ (**2**).

A oxidação DPV dos complexos e da piplartina livre estão representados na Figura 6. CPR1, que é um composto bimetálico, exibe três processos de oxidação: o primeiro, que é quase reversível ($i_{pa}/i_{pc} = 1,2$, $E_{pa} = 0,88$ V) pertence à oxidação de Fe (II)/Fe (III), enquanto a segunda, irreversível, com $E_{pa} = 1,37$ V, pertence ao processo de oxidação da piplartina. Este processo também é observado para o ligante livre (figura 6). CPR2 exibe dois processos, o primeiro, irreversível A 1,48 V (E_{pa}), pertence à oxidação do ligando de piplartina e o segundo, quase reversível, a 1,62 V (E_{pa}), pertence ao Ru (II)/Ru (III). O valor de E_{pa} de Ru (II)/Ru (III) processos de oxidação para o precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] é observado em cerca de 0,65 V, indicando claramente que a substituição dos dois cloridos por um ch não carregado ligante de elato (piplartina), estabilizando o centro de Ru (II) em aproximadamente 1,0 V. Esta estabilização é plausível, por isso, a substituição de dois ligantes de clorido doador σ e π por uma piplartina de quelação não carregada, o que aumenta o potencial de oxidação do centro de metal.

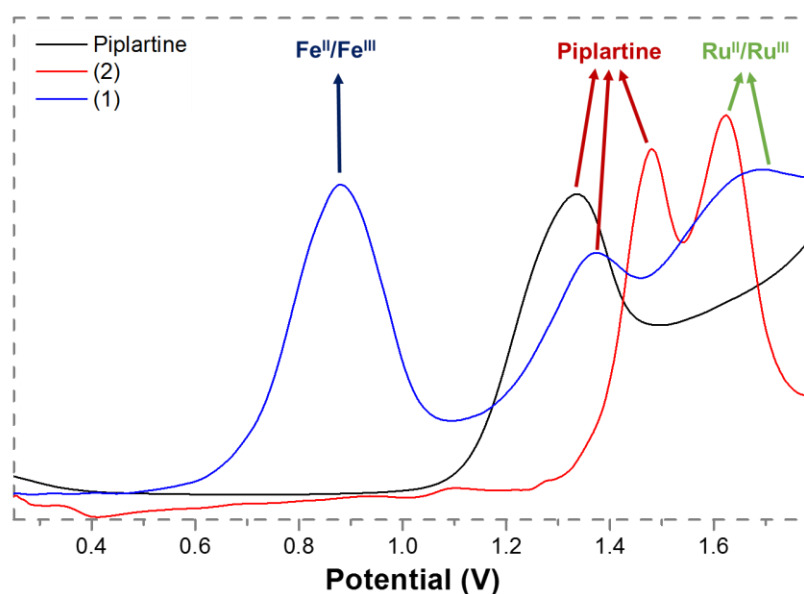


Figure 6. Os voltamogramas de pulso diferencial dos complexos (solução de diclorometano, eletrodos de trabalho e auxiliares foram Pt estacionários, e o eletrodo de referência foi Ag/AgCl, 0,4 M Bu₄NClO₄).

Um aspecto importante inerente aos novos complexos de rutênio contendo piplartina observados neste trabalho, foi a presença de isômeros

gerados a partir da posição do ligando de piplartina, como mostrado na figura 7. Para um isômero, o oxigênio coordenado - Oa é trans para o nitrogênio do ligando de biperidina, enquanto o Ob é trans para o átomo de fósforo da difosfina. O segundo isômero tem o oposto, o Oa trans para o átomo de fósforo a partir de difofa e Ob, trans para o nitrogênio da biperidina. A presença dos dois isômeros foi observada usando a técnica de RMN multiatômica, pela duplicação de sinais nos espectros. Assim, nos espectros de RMN ^{31}P { ^1H } dos complexos, foram observados dois pares de dupletos, em que cada par é consistente com um padrão AB com acoplamento J específico. Este sistema indica a presença de dois átomos de fósforo inequivalentes para cada isômero. Os sinais, na região de 39 a 45 ppm para o CPR1 e 39 a 41 ppm para o CPR2, são consistentes com uma geometria onde um dos nitrogênio da 2,2'-biperidina é trans para um átomo de fósforo de dppb/dppf, para ambos os complexos, e o segundo é trans para o oxigênio dos grupos carboxílicos, Oa ou Ob (isomers), como é mostrado na figura 7.

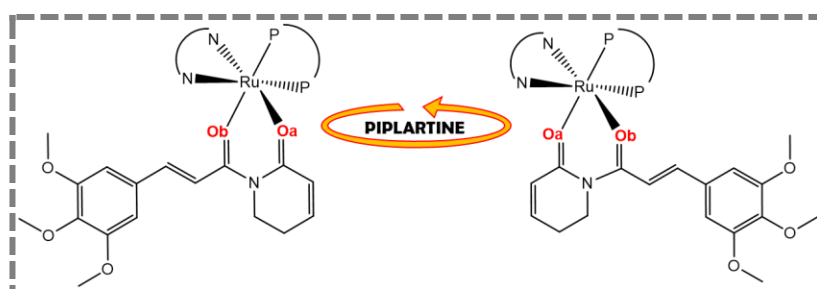


Figure 7. Representação de isômeros com o giro do ligante da piplartina.

Os espectros de ^1H RMN dos complexos, em d_6 -acetona, exibem sinais correspondentes aos átomos de hidrogênio dos ligandos difosfina, biperidina e piplartina, exibindo vários sinais duplicados, confirmando a presença dos isômeros em solução. O ligando livre, piplartina, exibe dois singletos largos, a 3,78 e 3,90 ppm, referente aos grupos metilo presentes na molécula. Para os complexos, esses sinais apresentam deslocamento químico semelhante, no entanto, ambos os sinais são duplicados, como mostrado na Figura 8. Os hidrogênios aromáticos do grupo fenilo do dppf (CPR1) e dos ligandos dppb (CPR2) estão no intervalo típico de 6,0-7,9 ppm. O CPR1 exibe os sinais

aromáticos protegidos esperados correspondentes aos hidrogênios dos anéis de ferroceno do ligando de dppf a 4,3 e 5,3 ppm. Além disso, ambos os complexos exibiram os dupletos desviados duplicados esperados correspondentes aos hidrogênios orto do ligando 2,2'-bipiridínico a 8,45 - 9,05 ppm para o CPR1 e 8,55 - 8,85 ppm para o CPR2.

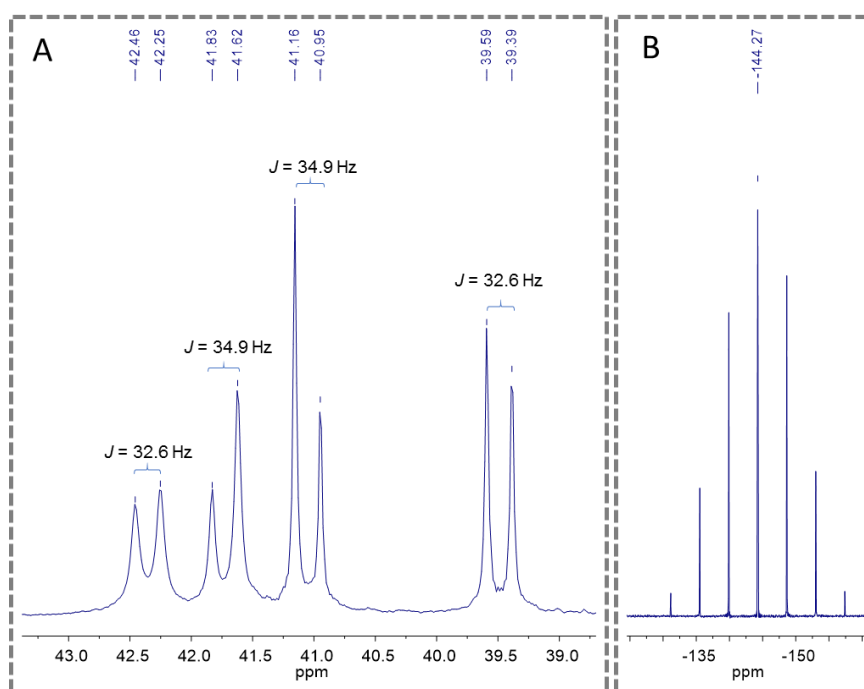


Figure 8. $^{31}\text{P} \{^1\text{H}\}$ espectros de RMN do CPR2 (d_6 -acetona), onde (A) mostram os dupletos do fósforo de difosfina e (B) mostram o sinal de multipletto de PF_6^- .

Os espectros de RMN ^{13}C dos complexos apresentam quatro sinais em torno de 170-175 ppm, típico do grupo $\text{C} = \text{O}$ coordenado. Este sinal é desmatado, em comparação com o observado para o ligando de piplartina livre, onde ocorrem a 165 e 168 ppm, indicando que o oxigênio do grupo de carboxilo é coordenado com o metal. Conforme demonstrado em outras técnicas de RMN usadas anteriormente ($^{31}\text{P} \{^1\text{H}\}$ e RMN de ^1H), todos os sinais também são duplicados, devido à presença de isômeros, como mostrado aos sinais de RMN carbonil carbonados coordenados na Figura 9.

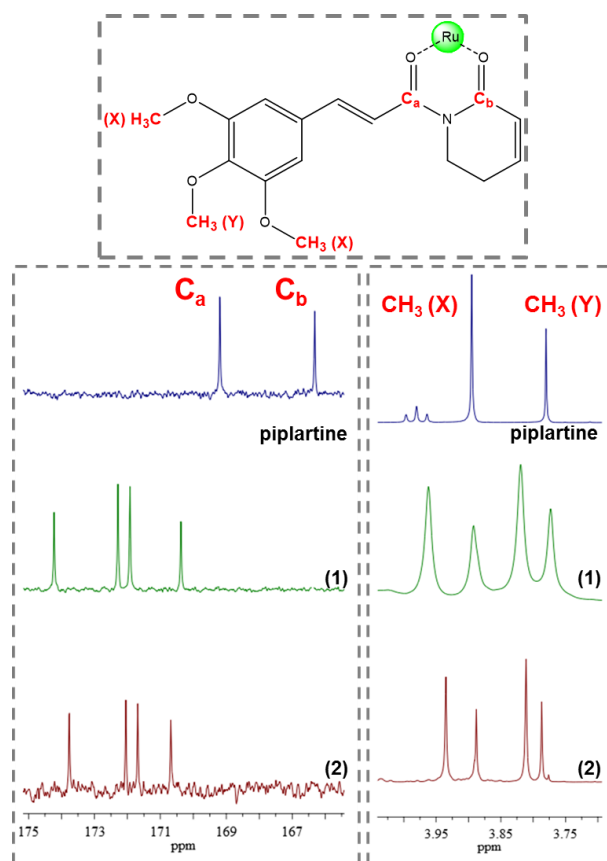


Figure 9. ^{13}C RMN e espectro de ^1H RMN dos complexos exibindo a duplicação de sinal, indicativo de isômeros (d_6 -acetona).

Nos experimentos de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dos compostos sintetizados, as amostras foram dissolvidas em acetona deuterada ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$). Nos espectros de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ obtidos, foi possível observar que todos os compostos apresentam dois conjuntos de dubletos, condizentes com um sistema AX. Os sistemas AX classicamente correspondem a um sistema de dois spins, caracterizados pela diferença da frequência ressonante dos dois sinais, que são diferentes por se tratar de dois átomos de fósforo em ambientes magnéticos diferentes, que como esperado, condizem com os complexos na forma *cis*, conforme apresentado na figura 10.

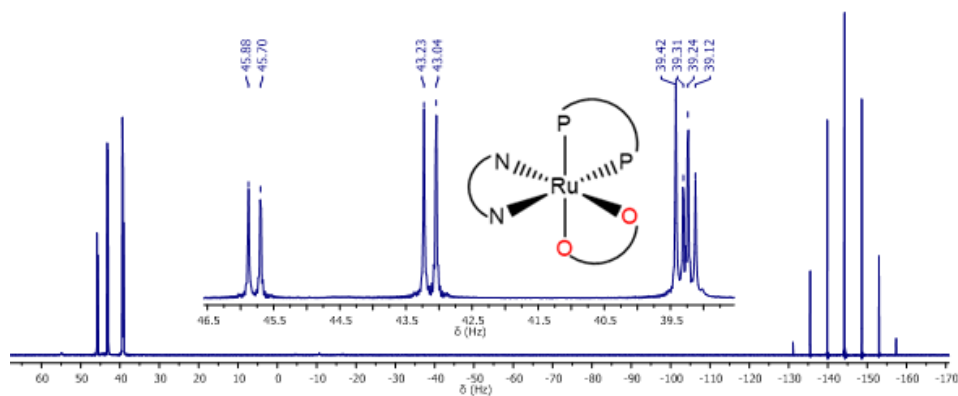


Figura 10. Espectro de ressonância magnética nuclear de fósforo ($^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$) do CPR2 em acetona deuterada ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$).

Os dados de RMN de ^1H contribuem para elucidação estrutural de cada um dos compostos, onde pode-se distinguir os hidrogênios da piplartina presentes no complexo e além disso conforme mostrado na figura 11. Em todos os espectros obtidos as integrais dos sinais são equivalentes as estruturas esperadas e devido a existência dos isômeros, todos os sinais estão duplicados.

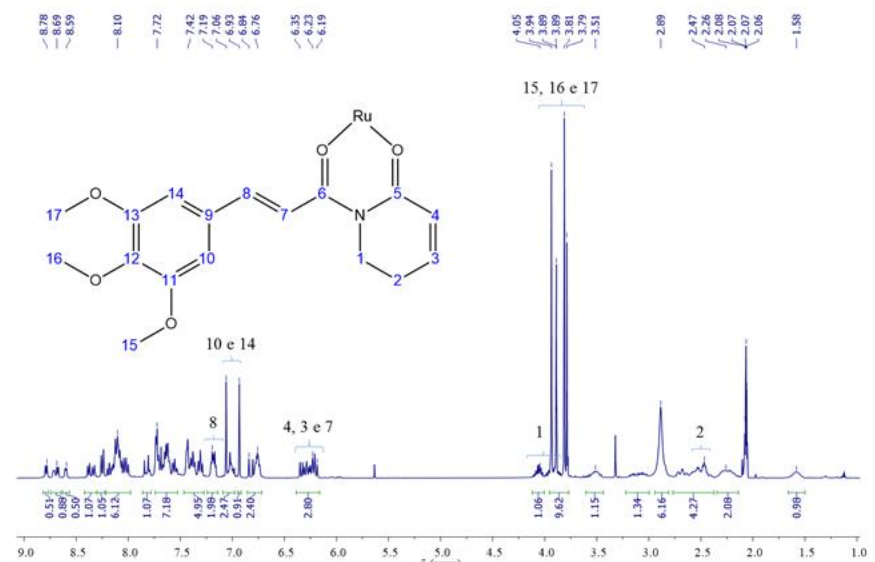


Figura 11. Espectro de RMN ^1H obtido para o CPR1 em acetona deuterada.

Nos experimentos de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, também foi possível identificar os sinais inerentes a piplartina e demais ligantes coordenados ao rutênio. Um fato

importante que confirma a coordenação pelas carbonilas é o deslocamento dos sinais referentes aos carbonos da ligação C=O (5 e 6). Na piplartina não coordenada, as carbonilas encontram-se em 165 ppm (5) e 168 ppm (6), porém após a coordenação, além da duplicação dos sinais, os mesmos deslocam para campo baixo, exibindo sinais em 170, 171, 172 e 173 ppm. Deste modo, vemos que a desblindagem observada nos carbonos das carbonilas, conforme observado na figura 12, comprovam a coordenação proposta para a piplartina.

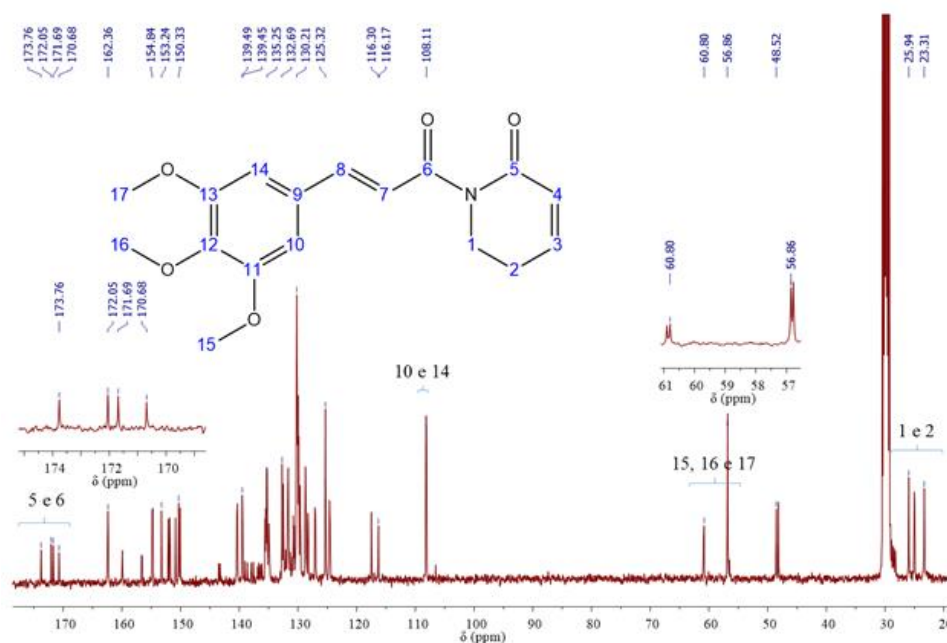


Figura 12. Espectro de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ obtido para o CPR1 em acetona deuterada.

Nos experimentos de COSY- ^1H vemos dois tipos grupos distintos de acoplamentos, onde o primeiro grupo (1) é caracterizado pelos acoplamentos dos hidrogênios das ligações duplas (H 4 e 3, H 8 e 7). O segundo grupo (2) é caracterizado pelos acoplamentos dos hidrogênios aromáticos dos anéis da fosfina, bipyridina e piplartina. Estes dois grupos estão delimitados na figura 13.

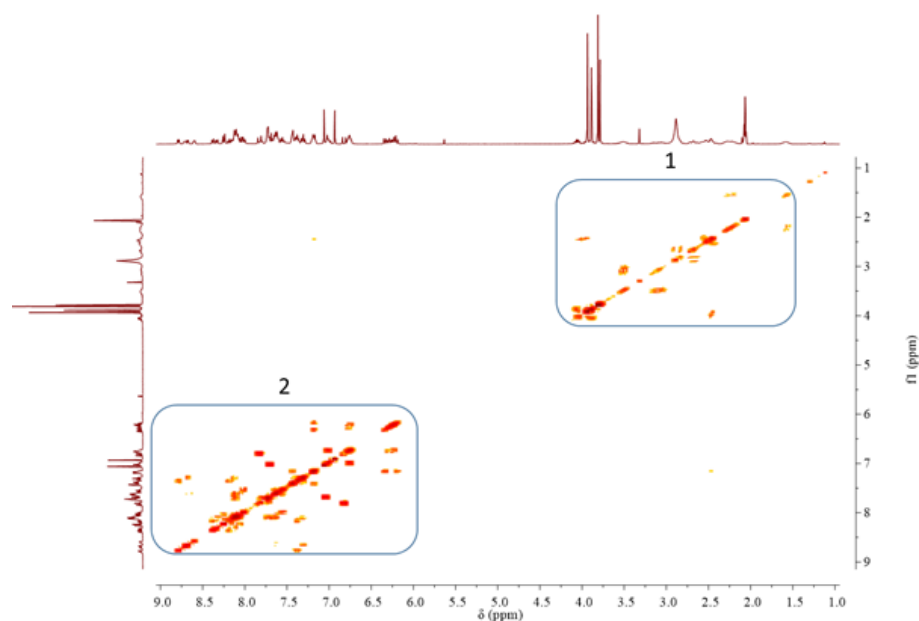


Figura 13. Espectro de COSY-¹H do CPR1.

A técnica de RMN ³¹P {¹H} também é uma ferramenta versátil para estudar a estabilidade em diferentes solventes e foi usada para estudar a instabilidade dos complexos. Os complexos apresentam instabilidade quando dissolvidos em solventes de coordenação (DMSO, metanol ou DMF). Assim, quando os complexos são dissolvidos nestes solventes, o ligando piplartina é rapidamente e completamente labilizado a partir do centro de metal. Portanto, em solventes não coordenantes (acetona, diclorometano ou clorofórmio), os complexos apresentam boa estabilidade, durante pelo menos 72 h. Na mistura acetona/água (1:9), a labilização da piplartina ocorre gradualmente (flecha vermelha) e, após 24 h, observa-se a labilização completa da piplartina, mostrando a presença de uma única espécie em solução [provavelmente o [Ru(H₂O)₂(dppb)(bipy)]²⁺ espécies (seta laranja) (figura **14**)], que exibe apenas um par de dupletos, em cerca de 37 e 48 ppm.

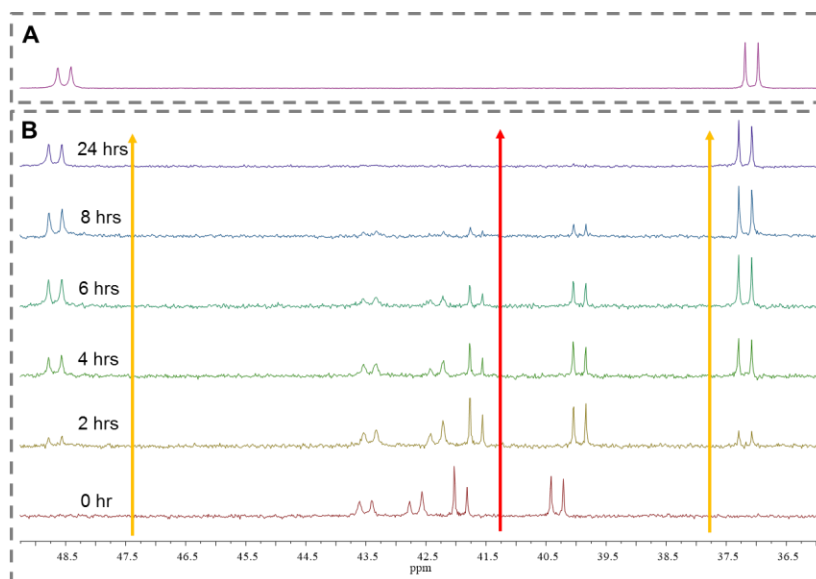


Figura 14. (A) ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ espectros de RMN do complexo $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$ após a adição de AgPF_6 , na mistura acetona/água (1:9). (B) ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ espectros de RMN (0 - 24 h) do CPR2 na mistura acetona/água (1:9). A seta vermelha mostra o consumo do CPR2 e a seta amarela mostra o produto resultante.

A composição química destes compostos foi determinada por análise elementar, que indica fórmula molecular do composto através da obtenção dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos compostos. Os resultados de análise elementar revelaram a composição química dos compostos (tabela 1), resultados estes condizentes com as composições químicas propostas e com considerável grau de pureza.

Tabela 1 – Dados de análise elementar* e condutância molar**

Composto	C (%)	H (%)	N (%)	Condutância ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
CPR1	50,85 (51,17)	4,45 (4,29)	2,94 (3,25)	158,1
CPR2	51,76 (51,64)	4,75 (4,91)	2,65 (4,96)	193,9

* Dados teóricos entre parêntese. ** Experimento realizado em acetona (25°C), faixa 1:2 = 122 – 335 $\mu\text{S}/\text{cm}$

As medidas de condutância dos compostos (tabela 2) foram realizadas em acetona e os valores encontrados para os compostos estão na faixa de eletrólito 1:1 (59 – 188 $\mu\text{S}/\text{cm}$ em acetona).

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi utilizada como uma técnica complementar na caracterização dos complexos. A comparação dos modos vibracionais observados dos ligantes, precursor e complexo final, confirmam a coordenação da piplartina ao metal.

Nos espectros de infravermelho dos complexos CPR1 e CPR2, observa-se o deslocamento de algumas das bandas presentes nos ligantes, sendo que a principal evidencia que confirma o modo de coordenação proposto (através das duas carbonilas da piplartina), é o deslocamento de estiramento da ligação C=O ($\nu\text{C}=\text{O}$), que com a coordenação passa a ter uma menor frequência, passando de 1685/cm no ligante livre para 1650/cm nos complexos. Todos os complexos apresentam duas bandas de vibração $\nu(\text{Ru}-\text{P})$, referentes as bandas de estiramento assimétrica e simétrica dos átomos de fósforos da bifosfina que se encontram em *cis* na região de 520/cm.

Também foram observadas bandas na região entre 490 – 470/cm, características das vibrações $\nu(\text{Ru}-\text{N})$ da bipyridina e $\nu(\text{Ru}-\text{O})$ da piplartina. Todos os complexos apresentam duas novas bandas bem características atribuídas $\nu\text{P}-\text{F}$ e $\delta\text{P}-\text{F}$ referente ao contra-íon PF_6^- (842 e 557/cm). A tabela 2 apresenta as bandas características dos complexos CPR1 e CPR2.

Tabela 2 - Atribuições das frequências vibracionais (/cm) da piplartina e seus complexos de rutênio

Atribuição	Piplartina	CPR1	CPR2
vOH _{agua}	3460 f	3448 m	3453 m
vCH	3070 f	3061 f	3093 f
v _{as} CH ₂	2966 m	2936 m	2942 f
v _s CH ₂	2830 m	2862 f	2450 f
vC=O	1685 F	1651 m	1650 m
vC=C	1620 F	1599 m	1598 f
	1586 m	1580 m	1475 f
vC=N	1425 m	1434 m	1434 m
δ _s C-H ₃	1387 f	1388 f	1385 f
vP-CH	-	1112 F	1122 m
vP-CH ₂	-	1095 F	1092 f
vP-F + δP-F	-	842 F	843 F
		557 m	558 m
γ anel	595 m	698 m	699 m
vP-CH	-	622 f	636 f
vRu-P	-	508 f	520 f
vRu-O	-	492 f	493 f
vRu-N	-	492 f	472 f

F = forte, m = médio e f = fraco

5.2 DETERMINAÇÕES *IN VITRO* DO PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS TUMORAIS *VERSUS* CÉLULAS NÃO TUMORAIS

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada contra oito linhagens de células tumorais e contra duas células não tumorais, após 72 h de incubação utilizando o ensaio de alamar blue. Os resultados encontram-se na tabela 3. Ambos os novos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante, apresentaram atividade citotóxica superior a piplartina. A piplartina apresentou valores de Cl_{50} variando de 6,31 a 18,63 μM para HepG2 e K562, respectivamente. O CPR1 apresentou valores de Cl_{50} variando de 0,63 a 4,43 μM para HSC3 e SCC9, respectivamente. O CPR2 apresentou valores de Cl_{50} variando de 1,34 a 6,79 μM para HSC3 e SCC9, respectivamente. O CPR1 foi aproximadamente 4, 4, 12, 5, 4, 4, 5 e 4 vezes mais potente que a piplartina para as linhagens HCT116, HepG2, HSC3, SCC4, SCC9, HL-60, K562 e B16-F10, respectivamente. Já o CPR2 foi aproximadamente 1, 3, 6, 3, 2, 3, 3 e 3 vezes mais potente que a piplartina para as mesmas linhagens, respectivamente. O valor de Cl_{50} para as células não tumorais foram de 17,34 e 34,22 μM para piplartina, 3,35 e 1,82 μM para CPR1 e 6,33 e 3,24 μM para CPR2 para as células MRC5 e PBMC, respectivamente. A tabela 4 apresenta o índice de seletividade calculado. A doxorrubicina e a oxaliplatina, usadas como controles positivos, apresentaram valores de Cl_{50} variando de 0,02 a 2,59 μM para B16-F10 e SCC9, e 0,60 a 4,08 μM para HL-60 e HCT116, respectivamente. O valor de Cl_{50} para as células não tumorais foram de 1,27 e 5,43 μM doxorrubicina e 1,25 e 9,43 μM para oxaliplatina para as células MRC5 e PBMC, respectivamente.

Tabela 3 – A atividade citotóxica dos novos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante

Células	CI ₅₀ em µM				
	CPR1	CPR2	PL	DOX	OXA
Células tumorais					
HCT116	1,73	5,49	6,43	0,18	4,08
	1,51 – 2,00	4,70 – 6,41	3,21 – 9,47	0,12 – 0,28	2,33 – 5,45
HepG2	1,73	1,90	6,31	0,20	2,18
	1,35 – 2,22	1,38 – 3,50	4,43 – 8,78	0,15 – 0,29	1,34 – 3,78
HSC-3	0,63	1,34	7,44	0,53	3,34
	0,46 – 0,86	0,77 – 2,30	3,13 – 11,32	0,47 – 0,60	1,41 – 7,83
SCC-4	3,23	5,36	15,46	2,09	2,10
	2,16 – 4,82	3,93 – 7,31	11,32 – 19,83	1,68 – 2,61	1,70 – 2,61
SCC-9	4,43	6,79	16,46	2,59	N.d.
	3,34 – 5,89	5,25 – 8,78	14,23 – 19,03	2,00 – 3,34	
HL-60	3,36	4,49	13,34	0,20	0,60
	1,80 – 6,27	2,91 – 6,95	4,14 – 18,74	0,20 – 0,30	0,10 – 0,80
K-562	3,54	5,75	18,63	1,01	0,99
	2,87 – 4,36	4,94 – 6,68	11,55 – 23,89	0,57 – 1,80	0,11 – 1,26
B16-F10	2,76	4,06	10,57	0,02	2,22
	2,02 – 3,76	3,04 – 5,41	6,90 – 16,11	0,01 – 0,07	1,18 – 4,13
Células não tumorais					
MRC-5	3,35	6,33	17,34	1,27	1,25
	2,83 – 3,96	4,34 – 9,23	11,28 – 25,53	1,03 – 1,54	0,96 – 2,22
PBMC	1,82	3,24	34,22	5,43	9,43
	1,05 – 3,16	1,77 – 5,94	28,04 – 43,88	3,13 – 9,42	6,48 – 11,37

A tabela apresenta os valores de CI₅₀ (concentração inibitória média) e o intervalo de confiança de 95% de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do alamar blue após 72 horas de exposição com as células B16-F10 (melanoma murino), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HSC3, SCC4 e SCC9 (carcinoma escamocelular oral humano), HCT116 (carcinoma de cólon humano) e MRC5 (fibroblastos de pulmão humano) e PBMC (*peripheral blood mononuclear cell* ativados com ConA – linfoblastos normais). Piplartina (PL), doxorubicina (DOX) e a oxaliplatina (OXA) foram usadas como controles positivo. N.d. Não determinado.

Tabela 4. Índice de seletividade de complexos de rutênio contendo piplartina

Células tumorais	Células não tumorais									
	MRC					PBMC				
	DOX	OXA	PL	CPR1	CPR2	DOX	OXA	PL	CPR1	CPR2
HCT116	6,5	0,3	2,7	2,0	1,1	27,0	2,3	5,3	1,1	0,6
HepG2	6,5	0,6	2,7	2,0	3,3	27,0	4,3	5,4	1,1	1,7
HSC-3	2,6	0,4	2,3	5,7	4,8	10,8	2,8	4,6	3,0	2,5
SCC-4	0,6	0,2	1,1	1,1	1,2	2,6	1,2	2,2	0,6	0,6
SCC-9	0,5	N.d	1,0	0,8	0,9	2,1	N.d	2,1	0,4	0,5
HL-60	6,5	2,2	1,3	1,0	1,4	27,0	15,7	2,6	0,5	0,7
K-562	1,3	1,3	0,9	1,0	1,1	5,4	9,4	1,8	0,5	0,6
B16-F10	65,0	0,6	1,6	1,2	1,5	270,0	4,3	3,2	0,6	0,8

Os dados representam o índice de seletividade (IS) calculado usando a seguinte fórmula: $IS = C_{50} \text{ [células não tumorais]} / C_{50} \text{ [células tumorais]}$. Células tumorais: HCT116 (carcinoma do cólon humano); HepG2 (carcinoma hepatocelular humano); HSC-3 (carcinoma escamocelular oral humano); SCC-4 (carcinoma escamocelular oral humano); SCC-9 (carcinoma escamocelular oral humano); HL-60 (leucemia promielocítica humana); K-562 (leucemia mielóide crônica humana); e B16-F10 (melanoma murino). Células não tumorais: MRC-5 (fibroblasto pulmonar humano) e PBMC (células mononucleares de sangue periférico humano). Doxorrubicina (DOX), oxaliplatina (OXA) e piplartina (PL) foram utilizados como controles positivos. N.d. Não determinado.

5.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MORTE CELULAR/MECANISMO DE AÇÃO

Para os ensaios de padrão de morte celular/mecanismo de ação, células da linhagem HCT116 foram usadas como modelo celular, uma vez que estava entre as linhagens mais sensíveis aos compostos testados. As concentrações testadas foram 1,25 e 2,5 μM para CPR1 e 2,5 e 5 μM para CPR2, definidas de acordo com os valores de CI_{50} desses compostos nessa linhagem.

5.3.1 Avaliação da viabilidade celular – exclusão por azul de tripam

A figura **15** apresenta os resultados do ensaio de viabilidade celular por exclusão com o corante azul de tripam em células da linhagem HCT116 tratadas com os complexos. Os resultados demonstraram que os tratamentos com os complexos reduziram significativamente o número de células viáveis quando comparado com o controle negativo em 24 e 48 h de incubação. Não houve aumento do número de células não viáveis. A piplartina, doxorubicina e oxaliplatina, utilizadas como controles positivo, também reduziram o número de células viáveis.

5.3.2 Análise morfológica

A figura **16** mostra as alterações morfológicas das células HCT116 tratadas com os compostos. Os complexos causaram encolhimento celular observado pelo decréscimo da dispersão luminosa para a frente (FSC) e condensação nuclear, como observado por um aumento na dispersão lateral (SSC), alterações consistentes com morte apoptótica. A piplartina, doxorubicina e oxaliplatina também apresentaram alterações condizentes com mecanismos apoptóticos de morte celular.

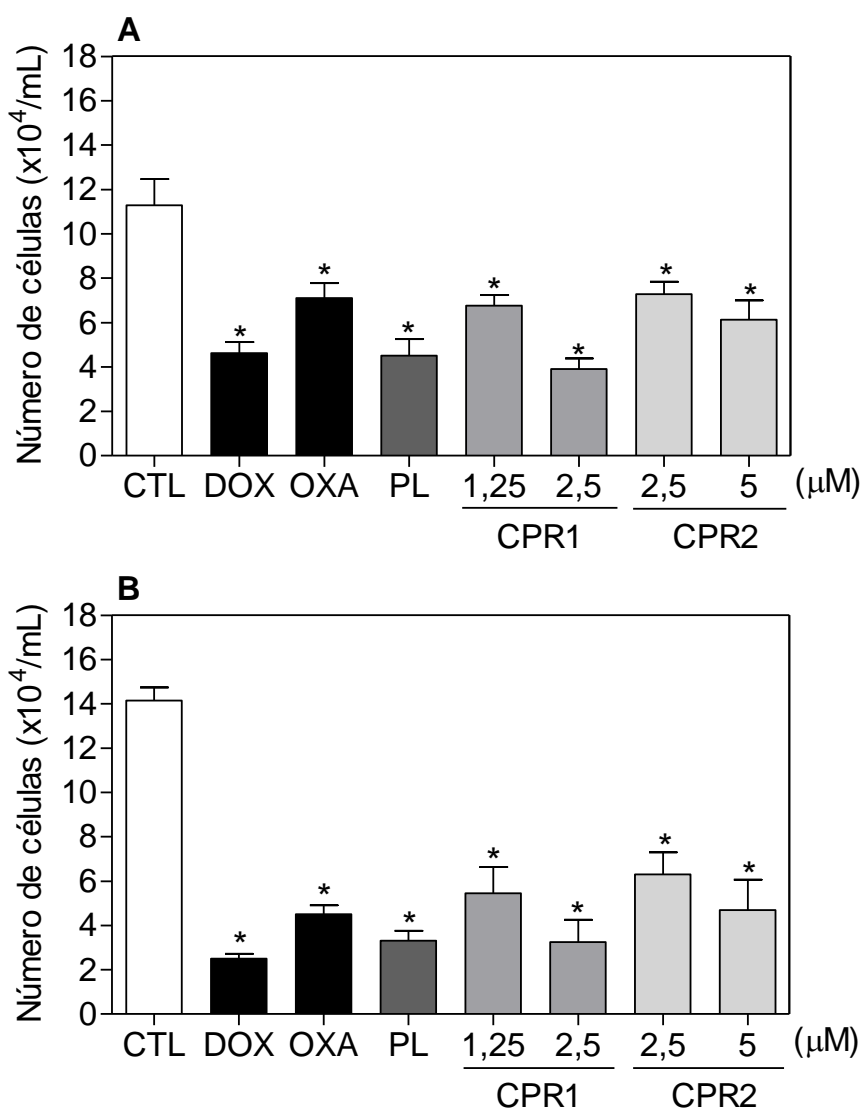


Figura 15. Efeito dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante sobre a viabilidade de células HCT116 determinado pelo ensaio de exclusão de azul de tripam após 24 (**A**) e 48 (**B**) h de tratamento. O controle negativo foi tratado o veículo (mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. A piplartina (PL, 10 μM), doxorubicina (DOX, 1 μM) e oxaliplatina (OXA, 3 μM) foram utilizadas como controles positivo. Os valores respondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

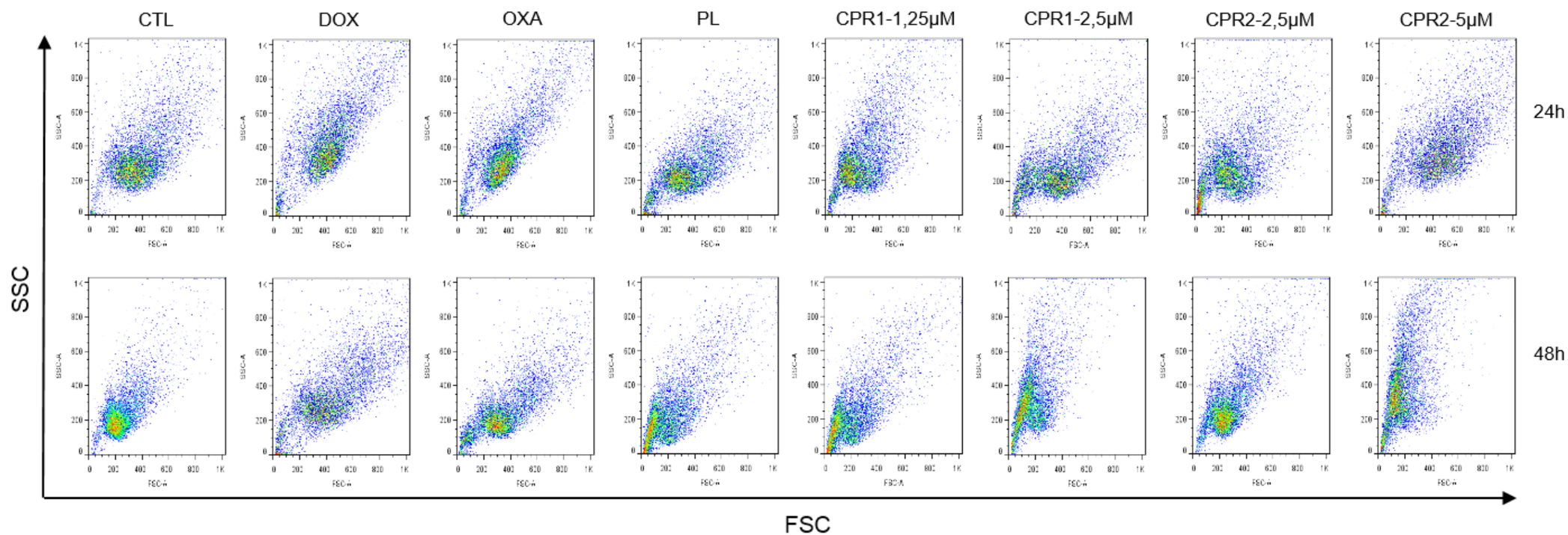


Figura 16. *Dot plots* representativos das características de dispersão da luz em células HCT116 tratadas com os complexos de rutênio contendo piplartina como ligante determinado por citometria de fluxo usando o FSC (*forward scatter* – desvio de luz para frente) e SSC (*side scatter* – desvio de luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo e granulosidade ou complexidade interna da célula, respectivamente. O controle negativo foi tratado com o veículo (mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. A piplartina (PL, 10 µM), doxorubicina (DOX, 1 µM) e oxaliplatina (OXA, 3 µM) foram utilizadas como controles positivo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os *debris* celulares foram excluídos das análises.

5.3.3 Análise do conteúdo de DNA

A distribuição do conteúdo de DNA foi analisada por citometria de fluxo com o intuito de diferenciar as fases do ciclo celular. A figura **17** e a tabela **5** mostram os resultados encontrados. Os complexos induziram fragmentação do DNA internucleosomal de modo tempo e concentração dependente, como observado pelo aumento do número de células em sub-G₀/G₁. A doxorubicina, utilizadas como controle positivo, induziu parada do ciclo celular na fase G₂/M de modo tempo dependente. A parada do ciclo celular foi seguida do aumento da fragmentação do DNA internucleosomal, como observado pelo aumento do número de células em sub-G₀/G₁. A oxaliplartina e a piplartina também induziram fragmentação do DNA internucleosomal.

5.3.4 Avaliação da externalização de fosfatidilserina

A avaliação do perfil de morte celular foi verificada a partir da externalização da fosfatidilserina (figura **18** e **19**), através da ligação de anexina V a esse fosfolípido de membrana celular. Os resultados obtidos demonstram uma exposição significativa de fosfatidilserina em células HCT116 tratadas com os complexos em ambas as concentrações e tempos testados. A piplartina, doxorubicina e oxaliplatina também apresentaram uma exposição significativa de fosfatidilserina em células HCT116.

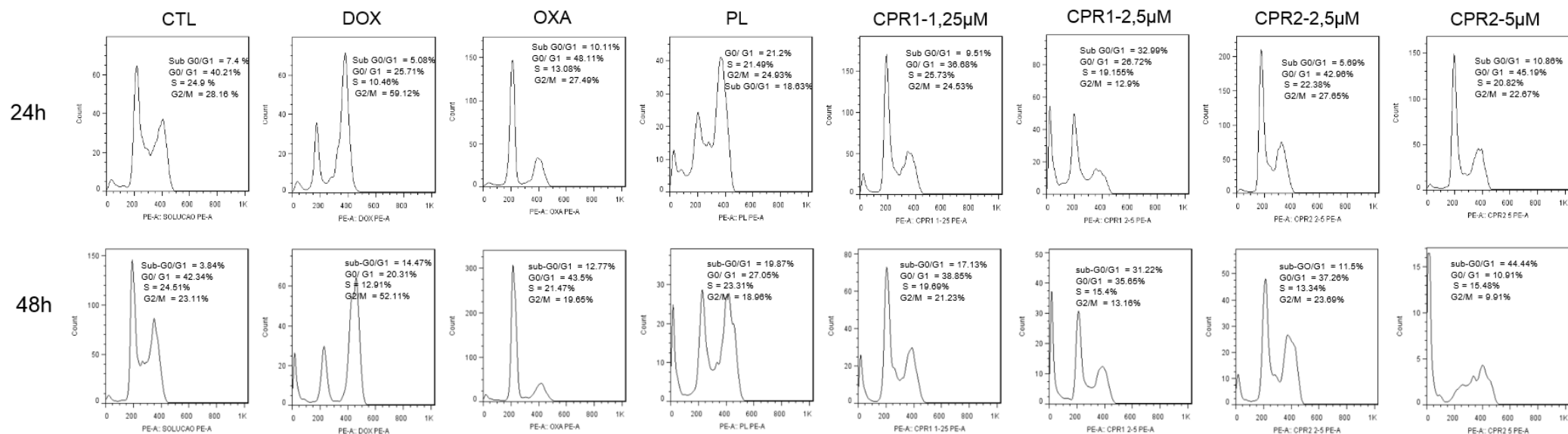


Figura 17. Histogramas representativos da análise do conteúdo de DNA de células HCT116 após o tratamento com os complexos de rutênio contendo piplartina como ligante determinado por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado o veículo (mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. A piplartina (PL, 10 µM), doxorubicina (DOX, 1 µM) e oxaliplatina (OXA, 3 µM) foram utilizadas como controles positivo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os *debris* celulares foram excluídos das análises.

Tabela 5. Efeito dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante sobre o conteúdo de DNA de células HCT116

Tratamento	Concentração (μM)	Conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G ₀ /G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
24h de tratamento					
CTL	-	5,01 \pm 0,89	46,62 \pm 1,80	18,68 \pm 1,55	27,95 \pm 1,56
DOX	1	5,22 \pm 1,44	22,14 \pm 2,35	9,79 \pm 0,84*	58,95 \pm 2,82*
OXA	3	14,31 \pm 3,56	38,39 \pm 5,39	16,93 \pm 2,02	25,37 \pm 2,14
PL	10	20,30 \pm 1,76*	22,70 \pm 0,56	21,39 \pm 2,32	21,54 \pm 2,87
CPR1	1,25	9,12 \pm 2,39	42,48 \pm 1,71	21,91 \pm 2,48	22,36 \pm 1,13
	2,5	31,83 \pm 1,40*	28,55 \pm 5,89	11,48 \pm 2,45	12,66 \pm 1,72*
CPR2	2,5	8,82 \pm 1,44	45,08 \pm 1,34	18,74 \pm 1,75	22,90 \pm 1,85
	5	23,59 \pm 7,86*	41,00 \pm 4,59	15,63 \pm 1,75	18,97 \pm 2,93
48h de tratamento					
CTL	-	3,85 \pm 0,83*	47,45 \pm 3,34	20,05 \pm 2,58	22,91 \pm 1,12
DOX	1	21,76 \pm 5,35*	15,79 \pm 1,96*	10,43 \pm 1,05*	48,99 \pm 5,88*
OXA	3	14,81 \pm 1,28*	44,19 \pm 2,19	17,39 \pm 1,93	21,22 \pm 0,98
PL	10	33,90 \pm 5,84*	27,02 \pm 2,90*	16,40 \pm 2,19	21,89 \pm 0,91
CPR1	1,25	13,47 \pm 1,00	39,42 \pm 1,80	20,12 \pm 1,42	21,51 \pm 0,76
	2,5	45,77 \pm 8,78*	30,04 \pm 5,83*	13,48 \pm 1,47	9,02 \pm 3,16*
CPR2	2,5	15,70 \pm 3,10	33,72 \pm 4,21*	21,22 \pm 2,56	20,51 \pm 2,53
	5	31,86 \pm 4,15*	17,96 \pm 2,66*	17,55 \pm 1,28	15,73 \pm 2,63

A tabela apresenta os valores correspondentes a média \pm E.P.M de três experimentos independentes realizados em duplicata. O controle negativo foi tratado com o veículo (mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. A piplartina, doxorrubicina e oxaliplatina foram usadas como controles positivo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os *debris* celulares foram excluídos das análises. * $P < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

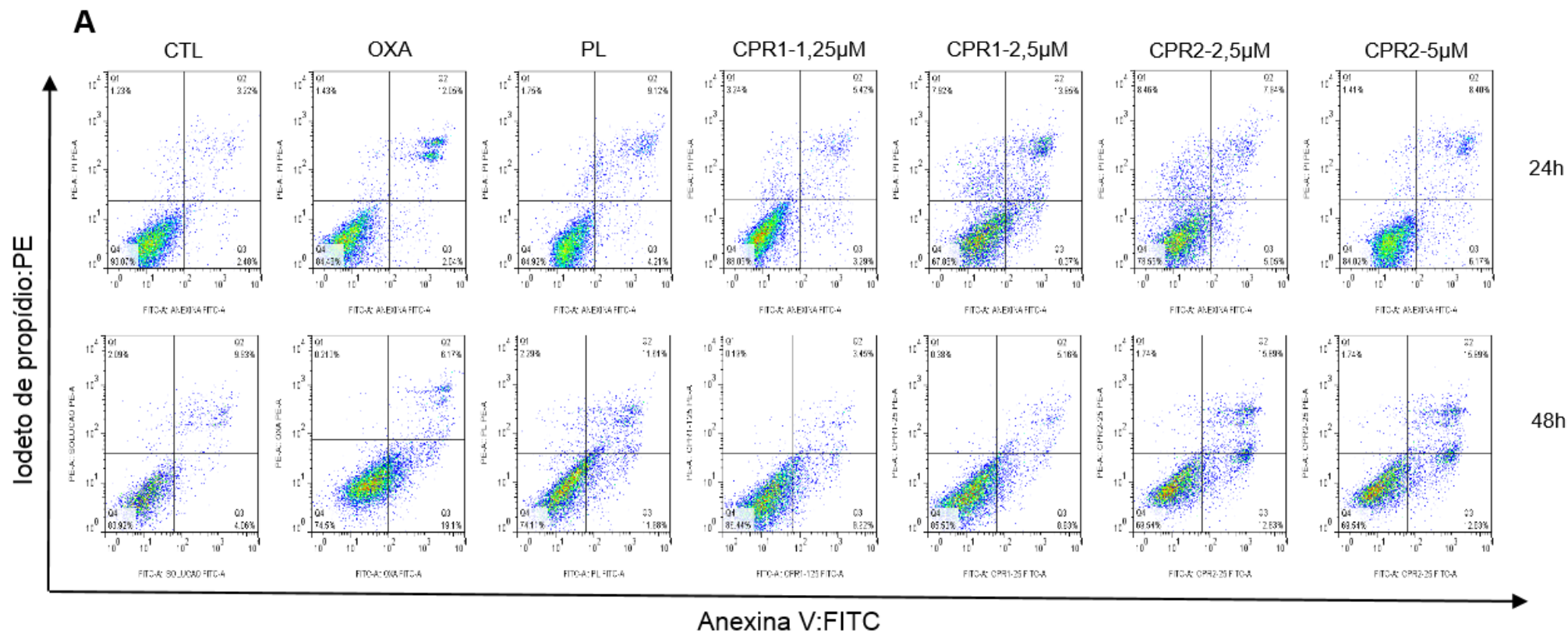


Figura 18. *Dot plots* representivos do efeito dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante sobre a externalização de fosfatidilserina em células HCT116 determinando por citometria de fluxo usando anexina V-FITC/IP. O controle negativo foi tratado com o veículo (mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. A piplartina (PL, 10 μ M), doxorrubicina (DOX, 1 μ M) e oxaliplatina (OXA, 3 μ M) foram utilizadas como controles positivo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os *debris* celulares foram excluídos das análises.

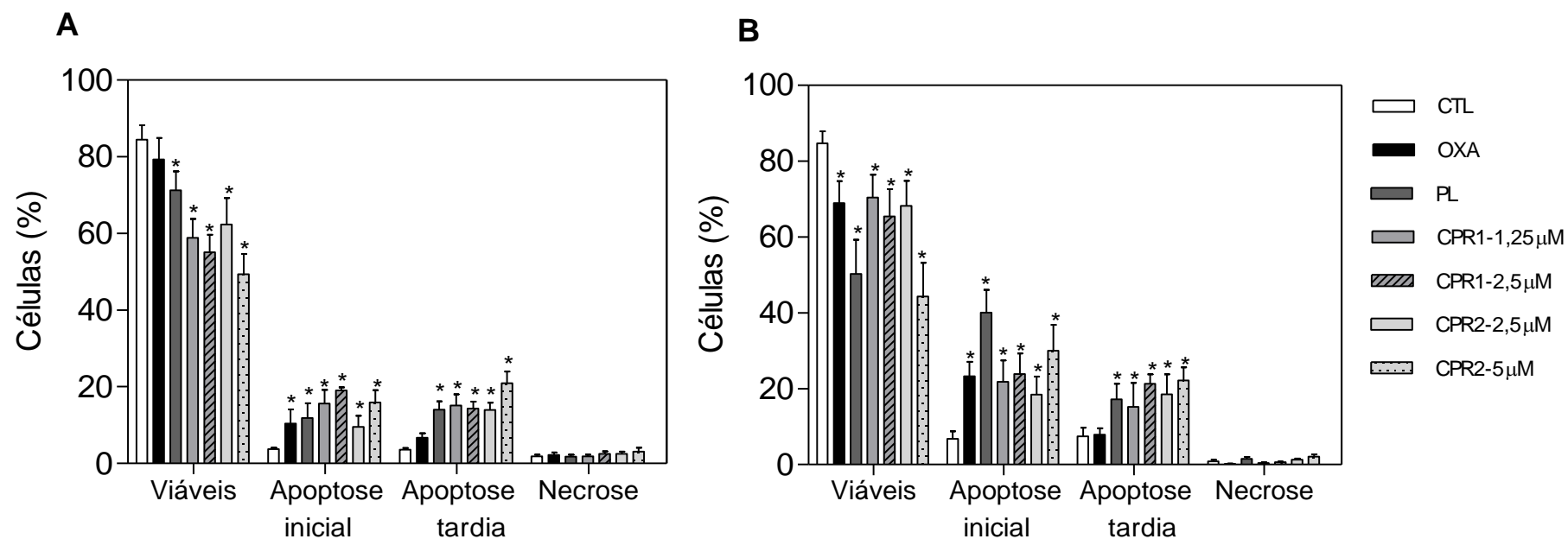


Figura 19. Efeito dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante sobre a externalização de fosfatidilserina em células HCT116 após 24 (A) e 48 (B) h de incubação determinando por citometria de fluxo usando anexina V-FITC/IP. O controle negativo foi tratado com o veículo (mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. A piplartina (PL, 10 μ M), doxorrubicina (DOX, 1 μ M) e oxaliplatina (OXA, 3 μ M) foram utilizadas como controles positivo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os *debris* celulares foram excluídos das análises. Os valores respondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

5.3.5 Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria

A figura **20** apresenta os resultados da determinação do potencial transmembrânico mitocondrial em células da linhagem HCT116 tratadas com os complexos. Os resultados demonstraram que o tratamento com os complexos reduziu significativamente o potencial transmembrânico mitocondrial. A piplartina, usada como controle negativo, também reduziu significativamente o potencial transmembrânico mitocondrial.

5.3.6 Ensaio de quantificação de espécies reativas de oxigênio

Podemos observar na figura **21** as células HCT116 tratadas por 1 h e 3 h com os complexos de rutênio CPR1 e CPR2 em diferentes concentrações que aumentaram significativamente os níveis de espécies reativas de oxigênio após 1h de incubação. A piplartina, doxorubicina, oxaliplatina e peróxido de hidrogênio, usados como controles positivos, também apresentaram um aumento significativo nos níveis de espécies reativas de oxigênio após 1 e 3 h de incubação em células HCT116.

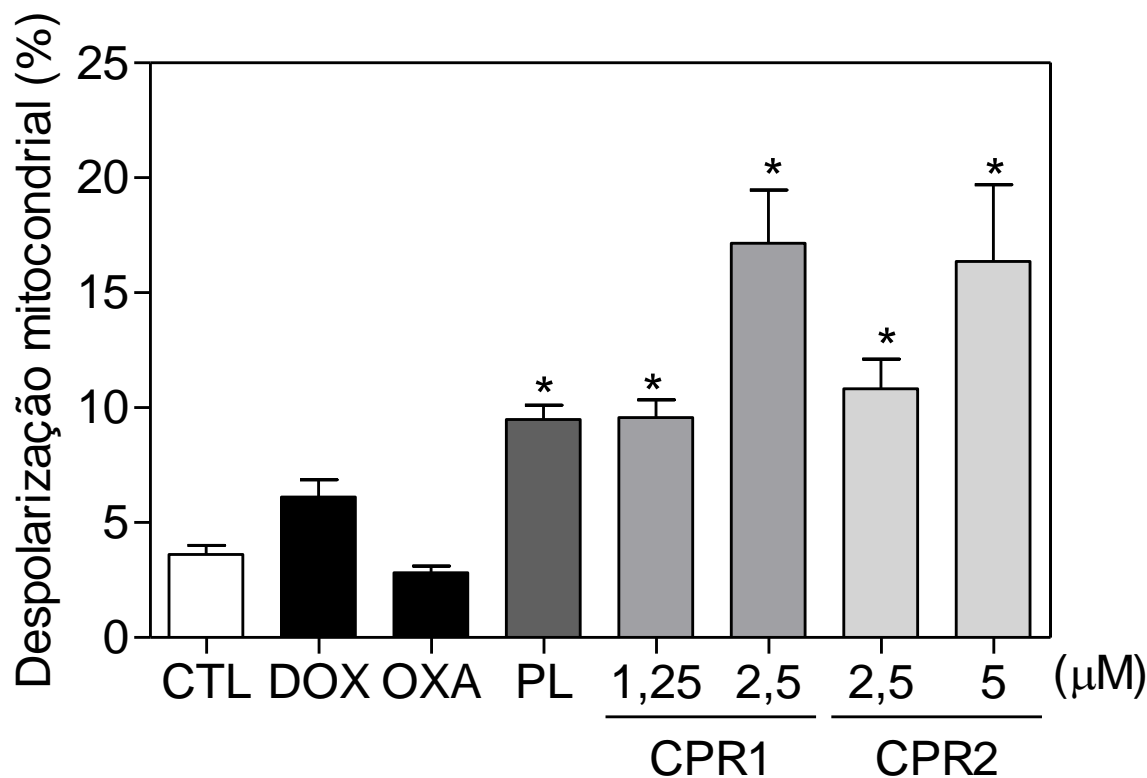


Figura 20. Efeito dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante sobre o potencial transmembrânico de células HCT116 determinado por citometria de fluxo usando rodamina 123. O controle negativo foi tratado com o veículo (mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. A piplartina (PL, 10 µM), doxorubicina (DOX, 1 µM) e oxaliplatina (OXA, 3 µM) foram utilizadas como controles positivo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os *debris* celulares foram excluídos das análises. Os valores respondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

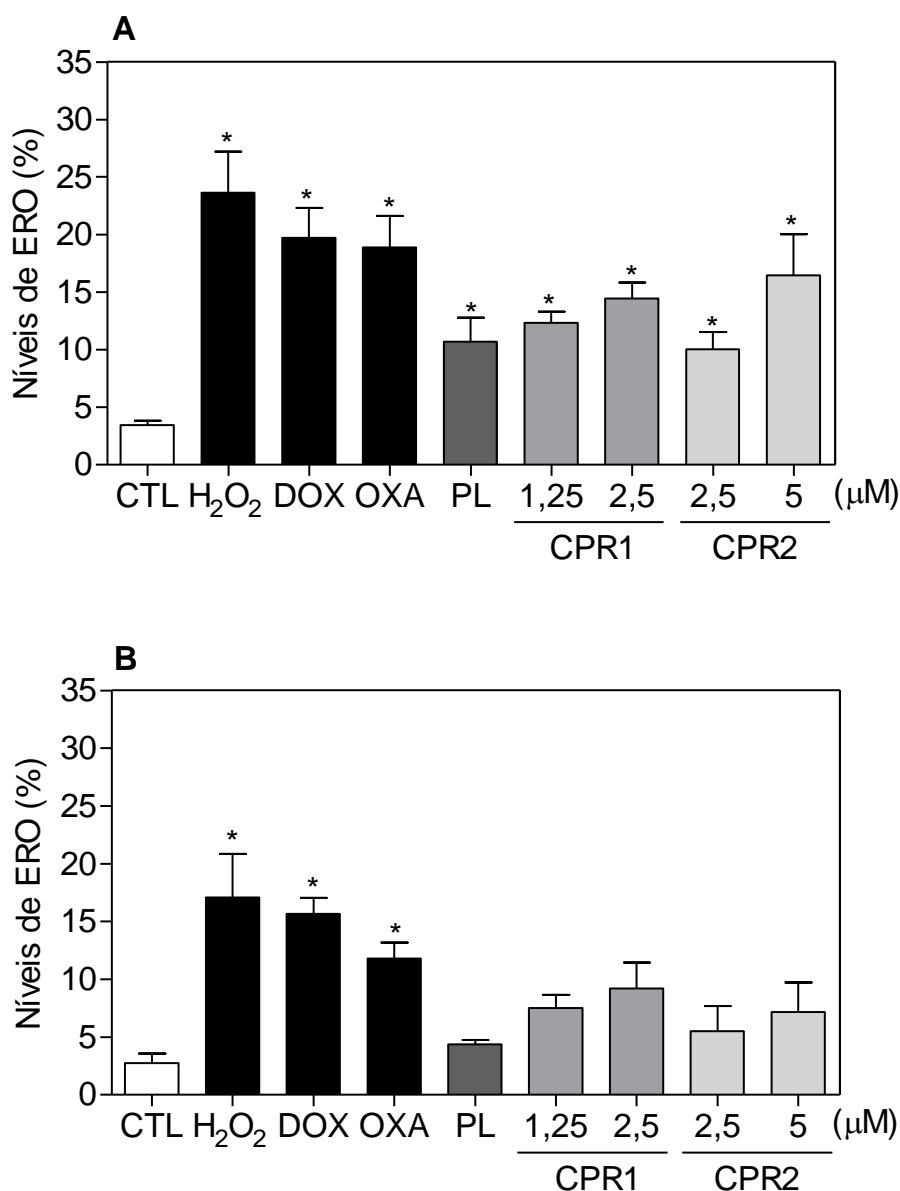


Figura 21. Efeito dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células HCT116 após 1 (A) e 3 (B) h determinado por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado com o veículo (mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 200 μM), piplartina (PL, 10 μM), doxorubicina (DOX, 1 μM) e oxaliplatina (OXA, 3 μM) foram utilizadas como controles positivo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os *debris* celulares foram excluídos das análises. Os valores respondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

5.3.7 Avaliação da expressão gênica

O efeito dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante sobre a expressão de 92 genes envolvidos em diferentes mecanismos celulares, incluindo proliferação celular, ciclo celular, apoptose, estresse oxidativo, metástase e angiogênese, foi detectado após 12 h de incubação em células HCT116 por PCRarray utilizando a placa TaqMan® *Array Human Molecular Mechanisms of Cancer*.

Um total de 34 genes tiveram a expressão gênica alterada após o tratamento com os complexos (tabela 6). Entre eles, os genes CDKN2A (QR = 2,5), FOS (QR = 11,9), JUN (QR = 3,7), NFKBIA (QR = 2,0), PTEN (QR = 2,0) e TP53 (QR = 3,5) estavam aumentados após o tratamento com CPR1, enquanto o gene SHC1 (QR = 0,4) teve expressão reduzida. Após o tratamento com CPR2, FADD (QR = 74,1) e JUN (QR = 2,3) estavam entre os genes com expressão aumentada, enquanto CCND1 (QR = 0,5) estava entre os genes com expressão reduzida. Doxorrubicina e piplartina também induziram mudanças em diferentes genes, incluindo regulação positiva de FOS (QR = 11,8), JUN (QR = 4,1), NFKBIA (QR = 2,3) e TP53 (QR = 3,3) para doxorrubicina e FOS (QR = 31,0), JUN (QR = 3,8) e NFKBIA (QR = 2,0) para piplartina, que também reduziu a expressão do gene SHC1 (QR = 0,2).

Tabela 6. Efeito dos complexos de rutênio contendo a piplartina como ligante sobre a expressão gênica de células HCT116

Gene	Descrição	QR			
		DOX	PL	CPR1	CPR2
BCL2	BCL2, regulador de apoptose	3,1	1,1	2,4	0,8
CCND1	ciclina D1	1,1	0,7	1,2	0,5
CDH1	caderina 1	7,1	2,5	3,7	1,1
CDKN2A	inibidor de cinase dependente de ciclina 2A	1,8	1,6	2,5	1,2
CYCS	citocromo c, somático	1,0	1,0	2,0	1,0
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico	0,8	1,2	1,3	11.276,3
FADD	Fas associado ao domínio de morte	1,1	0,4	0,6	74,1
FN1	fibronectina 1	3,6	2,0	3,8	N.d.
FOS	Fos proto-oncogene, subunidade do fator de transcrição AP-1	11,8	31,0	11,9	N.d.
FYN	FYN proto-oncogene, Src família tirosina cinase	1,3	1,7	2,5	1,8
FZD1	receptor de classe Frizzled 1	1,0	1,0	2,3	0,9
GUSB	glucuronidase beta	5,0	5,2	4,5	2,9
IGF1R	receptor de factor 1 de crescimento semelhante a insulina	1,4	2,1	2,3	0,7
ITGA2B	subunidade alfa 2b da integrina	4,5	3,0	3,1	0,1
ITGAV	subunidade alfa V da integrina	1,3	1,0	1,4	1.149,0
JUN	Jun proto-oncogene, subunidade do fator de transcrição AP-1	4,1	3,8	3,7	2,3
KDR	receptor de domínio de inserto de quinase	N.d.	8,3	4,4	1,4
MAP2K1	quinases de proteína quinase ativadas por mitógeno 1	0,7	0,8	0,8	2.107,2
MAP3K5	quinases de proteína quinase ativadas por mitógeno 5	1,0	0,6	0,3	4,3
MAPK3	proteína quinase 3 ativada por mitógeno	2,8	1,7	2,0	1,9
MAX	fator X associado ao MYC	N.d.	3,1	3,6	0,9
NFKBIA	Inibidor de NFκB alfa	2,3	2,0	2,0	0,9
PIK3R1	fosfoinositide-3-quinase 1	2,0	2,4	2,5	1,3
PTEN	fosfatase e tensina	1,8	0,5	2,0	0,8
PTK2	proteína tirosina quinase 2	1,2	0,6	1,6	2,4
PTK2B	proteína tirosina quinase 2 beta	3,4	2,3	2,3	1,0
RAC1	substrato C3 da toxina botulínica relacionado ao Ras 1 (família rho, pequena proteína Rac1 de ligação ao GTP)	0,9	0,7	1,1	2,7
RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serina/treonina cinase	2,0	0,6	2,0	0,9
SHC1	proteína de adaptador SHC 1	0,6	0,2	0,4	N.d.
SMAD4	membro da família SMAD 4	1,0	0,9	1,4	2,1
SOS1	fator de troca de nucleotídeo guanina SOS Ras/Rac 1	0,7	0,9	1,2	0,2
SPP1	fosfoproteína 1 segregada	1,2	1,3	2,5	10,1
TGFBR2	Receptor do fator de crescimento de transformação beta 2	0,9	1,2	2,4	1,1
TP53	proteína supressora de tumor p53	3,3	1,2	3,5	1,5

As células HCT116 foram tratadas com 2,5 µM do CPR1 e 5 µM do CPR2 durante 12 h. O controle negativo foi tratado com o veículo (0,1% de uma solução contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) utilizado para diluir os compostos testados. Doxorubicina (DOX, 1 µM) e piplartina (PL, 10 µM) foram utilizadas como controles positivo. Os valores representam a quantificação relativa (QR) em comparação com o calibrador (células tratadas com o controle negativo, QR = 1,0). Os genes foram considerados com expressão aumentada se QR ≥ 2 e foram considerados com expressão reduzida se QR ≤ 0,5. N.d. Não determinado.

6 DISCUSSÃO

A quimioterapia convencional para o tratamento do câncer enfrenta desafios sérios e constantes na pesquisa, tais como danos às células normais, resistência aos fármacos e efeitos secundários tóxicos, tornando a descoberta de novos fármacos desafios atuais na área oncológica. Dentro desta perspectiva, este trabalho estudou o potencial citotóxico de novos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante. É importante ressaltar que no presente trabalho dois novos complexos de rutênio foram sintetizados e avaliados quando a sua atividade citotóxica em células tumorais pela primeira vez.

A piplartina exibe potente efeito inibidor do crescimento em diferentes tipos de células tumorais (BEZERRA et al., 2006, 2007; RAJ et al., 2011). Estudos demonstraram que a piplartina é tóxica tanto para células tumorais do cólon HT-29 como para HCT116 e menos tóxica para as células de cólon normais NCM460. Além disso, induziu apoptose em HT-29, com indução de condensação da cromatina e clivagem da caspase-3 e aumentando a fosforilação de ERK de modo dependentes de tempo e da concentração (RANDHAWA et al., 2013). Resultados semelhantes demonstraram que a piplartina aumentou a morte das células MCF-7 (câncer de mama humano) de uma forma dependente da concentração enquanto não afetou a viabilidade das células MCF-10A (células epiteliais de mama). Em seguida, foi avaliado a apoptose em células MCF-10A e MCF-7 através da marcação dupla de anexina V e IP, revelando-se que os índices de apoptose foram 21,9% em células MCF-7 e 6,7% em células MCF-10A, respectivamente. Além disso, a piplartina aumentou significativamente a proporção de células MCF-7 em sub-G₁, mas não nas células MCF-10A apresentando também a clivagem de PARP, uma característica de morte celular por apoptose. Após o tratamento com piplartina, os níveis de PARP clivados aumentaram em células MCF-7, mas não em células MCF-10A (LEE et al., 2015). Estes resultados corroboram com os dados encontrados para os efeitos citotóxicos da piplartina em células HCC (carcinoma hepatocelular humano), onde demonstrou uma redução significativa na viabilidade celular de várias células de HCC (HepG2, Huh7, LM3), causando

pouco efeito em hepatócitos primários de ratos e células hepáticas L-02 normais. O número de células apoptóticas revelado pela marcação com anexina V aumentou significativamente após 24 h de tratamento em células HepG2 (CHEN Y et al., 2015). Em outros estudos, a piplartina aumentou a atividade citotóxica em células de leucemia mielóide primária obtidas de pacientes por meio da ativação de ambas as vias de morte celular (apoptóticas e autofágicas). Ocorreu um aumento dos níveis de ERO em BMMNCs (*Bone marrow mononuclear cells*) obtidos de pacientes com leucemias mielóides, enquanto que o pré-tratamento com o antioxidante N-acetil-L-cisteína aboliu o aumento de ERO. Apresentou um aumento da expressão das proteínas apoptóticas (caspase-3) e proteínas autofágicas (beclin-1 e LC3B) e fosforilação de p38 e JNK (XIONG et al., 2015).

Com relação aos fármacos à base de metais, a cisplatina tem um grande destaque e, apesar de suas limitações com os efeitos colaterais e resistência, é um estímulo forte para o desenvolvimento de novos complexos metálicos antitumorais, incluindo os complexos de rutênio (JUNGWIRTH et al., 2011). Estudos com complexos de rutênio corroboram com nossos estudos, pois demonstraram que a morte celular para estes compostos é principalmente através de apoptose dependente de caspase (FRIK et al., 2014). Os complexos de rutênio são atualmente o foco de interesse devido à sua potencial aplicação como agentes quimioterápicos. Quatro complexos de Ru(II)DMSO, possuindo flavonas substituídas, apresentaram atividades anticancerígenas contra a linhagem MCF-7 (SINGH et al., 2017). Pesquisas realizadas por Wan e colaboradores, complexaram quatro novos complexos de polipiridilo de rutênio (II) e a atividade citotóxica e a capacidade de inibir a invasão celular destes complexos foram observados em células HepG2 via disfunção mitocondrial mediada por ERO, mostrado pelo aumento dos níveis de ERO, uma diminuição do potencial transmembrana mitocondrial, ativação de caspases e proteínas da família Bcl-2 (WAN et al., 2016). Pesquisas *in vitro* e *in vivo* com complexos rutênio carbonilo contra células de HCC inibiram o crescimento celular e exibiram menor toxicidade em relação às células normais de fígado humano L02. Os complexos também induziram a fragmentação do DNA e a condensação nuclear, que foram predominantemente desencadeadas através

da ativação de membros da família de caspases. Além disso, o tratamento das células HCC com esses complexos de rutênio exibiram potente eficácia quando testadas *in vivo* em um modelo xenográfico (LICONA, et al., 2017). Neste presente trabalho, ambos os complexos de rutênio contendo piplartina mostraram atividade citotóxica até 12 vezes mais potente que a piplartina livre.

A piplartina também já foi testada em células gástricas AGS e HGC27, a qual suprimiu a proliferação, reduziu a formação de colônias com monocamadas, inibiu a invasão celular, a capacidade de migração, induzindo apoptose e suprimindo o crescimento tumoral *in vivo* de células de carcinoma gástrico (ZHANG et al., 2017). Outros autores demonstraram que a piplartina é um agente desestabilizante da tubulina. Este resultado foi confirmado por imunofluorescência e microscopia confocal, que mostraram que os microtúbulos em células tumorais MCF-7 foram despolimerizados quando tratados com piplartina (MEEGAN et al., 2017). Vários trabalhos de pesquisa foram relatados que a piplartina também é capaz de induzir a morte celular pela via apoptose. Em especial, a piplartina reduziu o número de células viáveis e induziu apoptose em células HCT116 pela via de sinalização JNK (LI et al., 2015). Piplartina induziu apoptose e autofagia através da modulação da via PI3K/Akt/mTOR em células de câncer de pulmão humano (WANG et al., 2015) A apoptose induzida por piplartina suprimiu a atividade de ligação de DNA do NF- κ B de forma dependente da concentração em células de câncer de pulmão não pequenas células (ZHENG et al., 2016b). Em relação aos complexos de rutênio, eles também podem induzir a apoptose de células cancerosas através de vias mediadas por receptores de morte, mitocôndrias e/ou estresse do retículo endoplasmático.

Roh e colaboradores (2014) avaliaram a citotoxicidade da piplartina e sua combinação com cisplatina em células de câncer de cabeça e pescoço *in vitro* e *in vivo*. O efeito da piplartina, isoladamente e em combinação com cisplatina, foi avaliado em células de câncer de cabeça e pescoço, no qual aumentou a acumulação de ERO, induziu morte celular através de ERO envolvendo JNK e PARP. A piplartina também aumentou a citotoxicidade induzida pela cisplatina em células de um modo sinérgico *in vitro* e *in vivo* (ROH et al., 2014).

Níveis mais elevados de espécies reativas de oxigênio intracelular são frequentemente observados em células tumorais caracterizado por uma elevada atividade metabólica, hipóxia e, em geral, condições redutoras. Conseqüentemente, a interferência com a homeostase redox de células cancerosas parece ser uma abordagem atraente e promissora para a terapia quimioterápica (ALVAREZ et al., 2010). Estudos anteriores indicam que ERO desempenha um papel chave na citotoxicidade da piplartina em células tumorais (LIU et al., 2013; RAJ et al., 2011). Através da ligação direta a glutatona S-transferase pi 1 e carbonil redutase 1, enzimas envolvidas no equilíbrio do estresse oxidativo, a piplartina pode diminuir seletivamente o nível de glutatona reduzida e aumentar o nível de glutatona oxidada, conduzindo à acumulação de ERO e subseqüentemente apoptose em células tumorais (RAJ et al., 2011). Adicionalmente, também foi observado uma depleção de glutatona, uma redução na razão glutatona reduzida/oxidada e um acúmulo de ERO intracelular mediada pela piplartina em células MCF-7, mas não em células MCF-10A (LEE et al., 2015).

O mecanismo molecular subjacente ao efeito citotóxico dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante foi avaliado ao nível da expressão de mRNA de vários genes de alvos. Em especial, observou-se o aumento da expressão de CDKN2A, FOS, JUN, NFKBIA, TP53 e FADD, e redução da expressão de SHC1 e CCND1. Curiosamente, o gene CCND1 (ciclina D1) está envolvido na transição G₁/S do ciclo celular. Além disso, o gene CDKN2A (inibidor de cinase dependente de ciclina 2A) foi regulado positivamente. demonstraram que a piplartina é capaz de reduzir os níveis de ciclina D1 em linhagem celular de carcinoma embrionário de rato. O complexo de rutênio com benzimidazol também tem sido relatado como inibidor da ciclina D1 (JYOTHI et al., 2009; LAI et al., 2015).

A proteína codificada pelo gene FADD (Fas associado ao domínio de morte) medeia os sinais apoptóticos das células. O gene FOS (Fos proto-oncogene) codifica proteínas que podem dimerizar com proteínas da família JUN (proto-oncogene JUN, subunidade do fator de transcrição AP-1) e leva à formação do complexo do fator de transcrição AP-1, que está envolvido na transcrição de algumas proteínas pró-apoptóticas (DHANASEKARAN; 2007,

TURJANSKI et al., 2007). Além disso, a via JNK-AP-1 está envolvida na expressão aumentada de genes pró-apoptóticos, incluindo Fas-L e Bak (FAN E CHAMBERS, 2001). Vários genes relacionados com a apoptose foram também associados a efeitos da piplartina e/ou de complexos de rutênio (LI et al., 2015; WANG et al., 2015; LAI et al., 2016; ZHENG et al., 2016a; ZHENG et al., 2016b; ZHANG et al., 2014). Além disso, Li e colaboradores (2015) demonstraram que a piplartina pode induzir apoptose celular em células HCT116 através da sinalização JNK.

O gene NFKBIA (inibidor de NFκB) codifica um membro da família de inibidores de NFκB. Interessantemente, foi relatado que a piplartina pode levar à morte celular apoptótica pela inibição de NFκB em células de câncer do pulmão não pequenas células (ZHENG et al., 2016a). Como citado acima, nesse trabalho os complexos de rutênio contendo piplartina como ligante também foram capazes de aumentar a expressão do gene NFKBIA, sugerindo a inibição dessa via de sinalização.

O gene TP53 (proteína supressora de tumor p53) codifica uma proteína supressora de tumores. Curiosamente, a morte celular induzida pela piplartina tem sido observada tanto por vias dependente como independente de p53 (RAJ et al., 2011). Os complexos de tiazolo arenorutênio também podem induzir a morte celular pela sinalização p53 em células de câncer do ovário resistentes à cisplatina e sensíveis à cisplatina (GROZAV et al., 2015). Como citado acima, nesse trabalho os complexos de rutênio contendo piplartina como ligante também foram capazes de aumentar a expressão do gene TP53, sugerindo a ativação dessa via de sinalização.

O gene SHC1 (proteína adaptadora SHC 1) pertence à família Shc de mamífero, composta pelas isoformas p52Shc, p46Shc e p66Shc. Curiosamente, p66Shc tem papel antioxidante no citoplasma. A piplartina e vários complexos de rutênio têm sido relatados como indutores de ERO (RAJ et al., 2011; ZENG et al., 2016). Aqui, também observamos que complexos de rutênio contendo piplartina como ligante induzem ERO.

Estudos com a *piper longum* L. que tem como principais constituintes medicinais a piperina, pipernonalina e piperlongumina em seus frutos também apresentou propriedades antitumorais. O piperato de potássio (GBK), um

derivado da piperina, foram testados em células de câncer de mama e inibiu seletivamente a transição de fase G1-S, parada de G1 foi correlacionada com a indução da expressão de p27, que é um inibidor para cinases dependentes de ciclina e inibição da ciclina A, ciclina E e expressão de ciclina B, indução de apoptose celular dependente de mitocôndria nas células tumorais testadas. Um efeito sinérgico na inibição da proliferação das células tumorais testadas foi encontrado quando o GBK foi combinado com medicamentos de quimioterapia etoposídeo fosfato ou cisplatina in vitro (FAN et al., 2017).

7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que os complexos de rutênio contendo a piplartina como ligante, CPR1 e CPR2, possuem potencial citotóxico promissor *in vitro*. Os resultados sobre os mecanismos de ação, a níveis celular e molecular, sugerem que estes compostos promovem morte celular por apoptose possivelmente com envolvimento de ERO, inibição de NFκB e ativação de p53 em células HCT116. Os resultados demonstram que apesar dos complexos de rutênio contendo piplartina como ligante serem mais potente do que a piplartina, o mecanismo de ação parece ser semelhante. Os resultados obtidos contribuem para melhor compreensão dos efeitos desses compostos como moléculas úteis para o tratamento do câncer.

8. REFERÊNCIAS

ABID, M.; SHAMSI, F.; AZAM, A. Ruthenium complexes: an emerging ground to the development of metallopharmaceuticals for cancer therapy. **Mini Rev. Med. Chem.**, v.16, n.10, p. 772-786, 2016.

ALPAY, M. et al. Antileukemic effects of piperlongumine and alpha lipoic acid combination on Jurkat, MEC1 and NB4 cells in vitro. **J. Can. Res. Ther.**, v. 12, n.2, p. 556-560, 2016.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, 2005, v. 28, n. 1.

ALVAREZ, H.M. et al. Tetrathiomolybdate inhibits copper trafficking proteins through metal cluster formation. **Science**, v.327, n.5963, p.331-334, 2010.

AODAH, A. et al. Preformulation Studies on Piperlongumine. **Plos one**, v.11, n. 3, 2016.

AYYAGARI, V.N. et al. Evaluation of the cytotoxicity of the Bithionol – cisplatin combination in a panel of human ovarian cancer cell lines. **BMC Cancer**, p.17-49, 2017.

BARRETO, J.N. et al. Antineoplastic agents and the associated myelosuppressive effects: a review. **J. Pharm. Pract.**, v.27, n.5, p. 440-446, 2014.

BEZERRA, D.P. et al. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piperine, two alkaloid amides from Piper. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.39, n.6, p.801-807, 2006.

BEZERRA, D.P. et al. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicol In Vitro**, v.21, n.1, p.1–8, 2007.

BEZERRA, D.P. et al. Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of Piper tuberculatum, in yeast and mammalian V79 cells. **Mutation Res.**, v.652, n. 2, p.164–174, 2008.

BEZERRA, D.P. et al. Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.48, n.3, p.453–463, 2013.

BLAZEVIC, A. et al. Electronic state of sodium *trans*-[tetrachloridobis(1*H*-indazole)ruthenate(III)] (NKP-1339) in tumor, liver and kidney tissue of a SW480-bearing mouse. **Sci Rep**, v.7, n. 40966, 2017.

CALABRESI, P.; CHABNER, B.A. **Chemotherapy of neoplastic diseases. The pharmacological basis of therapeutics.** 10. ed. New York: MCGRAW-HILL, 2001. p. 1381-1459.

CAMMAROTA, F.; LAUKKANEN, M.O. Mesenchymal stem/stromal cells in stromal evolution and cancer progression. **Stem Cells Int**, 2016.

CASTELLARIN, A. et al. Pharmacological activities of ruthenium complexes related to their no scavenging properties. **Int. J. Mol. Sci.**, v.17, n.8, p.1254, 2016.

CHAMMAS, R. In: HOFF, P.M.G. (ed). **Tratado de oncologia.** São Paulo: Atheneu, 2013. p. 3-8.

CHEN, D. et al. Metal complexes, their cellular targets and potential for cancer therapy. **Curr. Pharm. Des.**, v.15, n.7, p.777 -791, 2009.

CHEN, Y. et al. Piperlongumine selectively kills hepatocellular carcinoma cells and preferentially inhibits their invasion via ROS-ER-MAPKs-CHOP. **Oncotarget**, v.6, n.8, p. 6406-6421, 2015.

CONNORS, T. Anticancer Drug Development: The Way Forward. **Oncologist**, v.1, n.3, p. 180-181, 1996.

COOPER G.M. **The Cell: a molecular approach.** 2 ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.

COSTA-LOTUFO, L.V. et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virt. Quim.**, v.2, n. 1, p.47-58, 2010.

CRAGG, G.M.; PEZZUTO, J.M. Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. **Med. Princ. Pract.**, v.2, supl.25, p. 41-59, 2016.

CROCE, C.M. Oncogenes and cancer. **N. Engl. J. Med.**, p. 502-511, 2008.

DA SILVA E.N. et al. Synthesis, characterization, cytotoxic activity, and interactions with ct-dna and bsa of cationic ruthenium (II) complexes containing Dppm and quinoline carboxylates. **Bioinorg. Chem. Appl.**, 2017, 2562780.

DAYAL, S. et al. RNase L Suppresses Androgen Receptor Signaling, Cell Migration and Matrix Metalloproteinase Activity in Prostate Cancer Cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v.18, n.3, 2017.

DHANASEKARAN, D.N.; JOHNSON, G.L. MAPKs: function, regulation, role in cancer and therapeutic targeting. **Oncogene**, v. 26, p. 3097–3099, 2007.

DEO, K.M. et al. Transition metal intercalators as anticancer agents—recent advances. **Int. J. Mol. Med. Sci.**, v.17, n.11, p. 1818, 2016.

DIAS, R.B. et al. Principles of Cancer Pathogenesis and Therapies: a brief overview. In: DE SOUZA, D.P. (ed.). **Bioactive Essential Oils and Cancer**, 2015.

FAN, L. et al. The synthetic antihyperlipidemic drug potassium piperate selectively kills breast cancer cells through inhibiting G1-S-phase transition and inducing apoptosis. **Oncotarget**, 2017.

FAN, M.; CHAMBERS, T.C. Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. **Drug Resist. Updat**, v. 4, p. 253–267, 2001.

FOFARIA, N.M. et al. Nanoemulsion formulations for anti-cancer agent piplartine--Characterization, toxicological, pharmacokinetics and efficacy studies. **Int. J. Pharm.**, v.498, n.1-2, p. 12-22, 2016.

FRIK, M. et al. In Vitro and in vivo evaluation of water-soluble iminophosphorane ruthenium (II) compounds. A potential chemotherapeutic agent for triple negative breast cancer. **J. Med. Chem.**, v. 57, n. 23, p. 9995-10012, 2014.

GALLATTI, T.F. et al. Heterobimetallic [Ru(II)/Fe(II)] complexes: On the formation of trans- and cis-[RuCl₂(dppf)(diimines)]. **J. Organoet. Chem.**, v. 692, p. 5447-5452, 2007.

GALI-MUHTASIB, H. et al. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. **Apoptosis**, v.20, n.12, p. 1531-1562, 2015.

GALLUZI, L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death Differ**, v. 22, n. 1, p. 58-73, 2015.

GREENWELL, M.; RAHMAN, P.K.S.M. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. **Int. J. Pharm. Sci. Res.**, v.6, n.10, p. 4103-4112, 2015.

GROZAV, A. et al. Synthesis, anticancer activity, and genome profiling of thiazolo arene ruthenium complexes. **J. Med. Chem.**, v. 58, p. 8475-8490, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n.5, p. 646-674, 2011.

INCA. **Instituto Nacional do Câncer**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acesso em: 02 set 2016.

JUNGWIRTH, U. et al. Anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes. **Antioxid. Redox. Signal**, v. 15, n. 4, p. 1085-1127, 2011.

JYOTHI, D. et al. Diferuloylmethane augments the cytotoxic effects of piplartine isolated from Piper chaba. **Toxicol. In Vitro**, v. 23, n. 6, p. 1085–1091, 2009.

KOBYLINSKA, L.I. et al. Differential pro-apoptotic effects of synthetic 4-thiazolidinone derivative Les-3288, doxorubicin and temozolomide in human glioma U251 cells. **Croatian Med. J.**, v. 58, n. 2, p. 150-159, 2017.

KAPUVÁRI, B. et al. Studying the tumor growth inhibitory effect of modified GnRH-III-anthracycline bioconjugates in subcutaneous vs. orthotopic models in vivo. **Magy Onkol.**, v. 59, n. 4, p. 310–318, 2015.

KIM, I. et al. Anticancer activities of self-assembled molecular bowls containing a phenanthrene-based donor and Ru(II) acceptors. **Int. J. Nanomedicine**, p. 143- 153, 2015.

KIMURA, E.T.; BAÍA, G.S. Rede ONSA e o Projeto Genoma Humano do Câncer: contribuição ao genoma humano. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 4, p. 325-329, 2002.

KONG, E.H. et al. Piplartine induces caspase-mediated apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. **Oncol. Rep.**, v. 20, n. 4, p. 785–792, 2008.

LAI, H. et al. Antiangiogenic ruthenium (II) benzimidazole complexes, structure-based activation of distinct signaling pathways. **Metallomics**, v. 7, p. 439-447, 2015.

LEE, H.N. et al. Heme Oxygenase-1 determines the differential response of breast cancer and normal cells to piperlongumine. **Mol. Cells**, v. 38, n. 4, p. 327-335, 2015.

LEE, J.A. Prevention and the pleasure principle. **Lancet Oncol.**, v. 2, p. 122, 2001.

LENTZ, F. et al. Central European Society for Anticancer Drug Research-EWIV. Pharmacokinetics of a novel anticancer ruthenium complex (KP1019, FFC14A) in a phase I dose-escalation study. **Anticancer Drugs**, v. 20, p. 97-103, 2009.

LEIJEN, S. et al. Phase VII study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. **Invest. New Drugs**, v. 33, p. 201-214, 2015.

Li, W. et al. JNK signaling pathway is involved in piperlongumine-mediated apoptosis in human colorectal cancer HCT116 cells. **Oncol. Lett.**, v. 10, p. 709-715, 2015.

LICONA, C. et al. A ruthenium anticancer compound interacts with histones and impacts differently on epigenetic and death pathways compared to cisplatin. **Oncotarget**, v.8, n.2, p. 2568-2584, 2017.

LIU, J.M. et al. Piperlongumine selectively kills glioblastoma multiforme cells via oxygen species accumulation dependent JNK and p38 activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 437, n.1, p. 87-93. 2013.

LU, Y. et al. Ruthenium complexes induce hepG2 human hepatocellular carcinoma cell apoptosis and inhibit cell migration and invasion through regulation of the Nrf2 pathway. **Int. J. Mol. Sci.**, v.17, n.5, p.775, 2016.

MARKOWSKA, A. et al. Noble metals in oncology. **Contemp. Oncol.**, v.19, n.4, p. 271-175, 2015.

MEEGAN, M.J. et al. Piperlongumine (piplartine) and analogues: Antiproliferative microtubule-destabilising agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v.125, p. 453-463, 2017.

MOLTZAHN, F.; THALMANN, G.N. Cancer stem cells in prostate cancer. **Transl. Androl. Urol.**, v.2, n.3, p.242-253, 2013.

NAIR, R.S. et al. Molecular trail for the anticancer behavior of a novel copper carbohydrazone complex in BRCA1 mutated breast cancer. **Mol. Carcinog.**, 2017.

NOOR, H.; BHARAT, B.A. Cancer-linked targets modulated by curcumin. **Int. J. Biochem. Mol. Biol.**, v.3, n.4, p. 328-351, 2012.

OMS. **Organização Mundial da Saúde, 2016**. Disponível em: www.brasil.gov.br. Acesso em: 02 set 2016.

QUEIROZ, S.L. et al. The reactivity of five-coordinate Ru(II) (1,4-bis(diphenylphosphino)butane) complexes with the N-donor ligands: ammonia, pyridine, 4-substituted pyridines, 2,2'-bipyridine, bis(o-pyridyl)amine, 1,10-phenanthroline, 4,7-diphenylphenanthroline and ethylenediamine. **Inorganica Chim. Acta**, v. 267, p. 209-221, 1998.

RAJ, L. et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. **Nature**, v. 475, n.7355, p. 231–234, 2011.

RANDHAWA, H. et al. Activation of ERK signaling and induction of colon cancer cell death by piperlongumine. **Toxicol. In Vitro**, v.27, n.6, p. 1626-1633, 2013.

RELÓGIO, A. P. et al. Ras-mediated deregulation of the circadian clock in cancer. **PLoS Genet**, 2014.

RIVOIRE, W.A. et al. Molecular basis of cervical oncogenesis. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.47, n.2, p. 179-188, 2001.

ROH, J.L. et al. Piperlongumine selectively kills cancer cells and increases cisplatin antitumor activity in head and neck cancer. **Oncotarget**, v.5, n.19, p. 9227-9238, 2014.

SINGH, A.K. et al. Synthesis, characterization and biological evaluation of ruthenium flavanol complexes against breast cancer. **Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.**, v.180, p.97-104, 2017.

SPANO, D. et al. Molecular networks that regulate cancer metastasis. **Semin. Cancer Biol.**, v.22, p. 234–249, 2012.

SPRECKELMEYER, S.; ORVIG, C.; CASINI, A. Cellular transport mechanisms of cytotoxic metallodrugs: an overview beyond cisplatin. **Molecules**, v.19, n.10, p.15584-15610, 2014.

SUN, J. et al. Ruthenium (II) complexes interact with human serum albumin and induce apoptosis of tumor cells. **Biol. Trace Elem. Res.**, v.163, n.1-2, p. 266-274, 2015.

TENG, Y.C. et al. Hepatocellular carcinoma mouse models: Hepatitis B virus-associated hepatocarcinogenesis and haploinsufficient tumor suppressor genes. **World J. Gastroenterol.**, v.22, n.1, p. 300-325, 2016.

TURJANSKI, A.G.; VAQUÉ, J.P.; GUTKIND, J.S. MAP kinases and the control of nuclear events. **Oncogene**, v. 26, p. 3240–3253, 2007.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M., Plantas medicinais: cura segura? **Quim Nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.

WAN, D. et al. Synthesis, characterization and anticancer effect of the ruthenium (II) polypyridyl complexes on HepG2 cells. **J. Photochem. Photobiol. B.** v. 165, p. 246-255, 2016.

WANG, F. et al. Piperlongumine induces apoptosis and autophagy in human lung cancer cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.**, v. 28, p. 362-373, 2015.

WANG, Y. et al. Piperlongumine suppresses growth and sensitizes pancreatic tumors to gemcitabine in a xenograft mouse model by modulating the NF-kappa B pathway. **Cancer Prev. Res.**, v.9, n.3, p. 234-244, 2016.

WANG, Y.H. et al. Anticancer principles from medicinal *piper* (胡椒 Hú Jiāo) Plants. **J. Tradit Complement Med.**, v.4, n.1, p. 8-16, 2014.

WEIDMANN, A.G.; KOMOR, A.C.; BARTON, J.K. Targeted chemotherapy with metal complexes. **Comments Mod. Chem. A. Comments Inorg Chem.**, v.34, n.3-4, p.114-123, 2014.

XIONG, X.X. et al. Piperlongumine induces apoptotic and autophagic death of the primary myeloid leukemia cells from patients via activation of ROS-p38/JNK pathways. **Acta Pharmacol. Sin.**, v.36, n.3, p. 362-374, 2015.

ZENG, L. et al. Ruthenium (II) complexes with 2-phenylimidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline derivatives that strongly combat cisplatin-resistant tumor cells. **Sci. Rep.**, v. 6, n. 19449, 2016.

ZHANG, B. et al. Elevated PRC1 in gastric carcinoma exerts oncogenic function and is targeted by piperlongumine in a p53-dependent manner. **J. Cell Mol. Med.**, v. 20, n. 10, p. 1-13, 2017.

ZHENG, J. et al. Piperlongumine inhibits lung tumor growth via inhibition of nuclear factor kappa B signaling pathway. **Sci. Rep.**, v. 6, n. 26357, 2016a.

ZHENG, N. et al. Vitamin E derivative based multifunctional nanoemulsions for overcoming multidrug resistance in cancer. **J. Drug Target**, v. 24, n. 7, p. 663-669, 2016b.

9. APÊNDICE

Tabela 1. Efeito dos complexos de rutênio contendo a piplartina como ligante sobre a expressão gênica de células HCT116

Genes	Valores de QR			
	DOX	PL	CPR1	CPR2
ABL1	0,912	1,144	1,302	0,863
AKT1	1,840	1,285	1,469	0,642
AKT2	3,877	1,068	1,663	0,592
APC	0,908	1,236	0,972	0,576
BAX	3,274	2,160	1,572	0,739
BCAR1	1,809	0,705	1,687	0,596
BCL2	3,090	1,049	2,367	0,748
BCL2L1	2,391	0,822	1,936	0,739
BCL2L11	1,152	1,536	1,710	0,904
BID	1,757	0,528	0,743	0,671
BRAF	0,513	1,512	1,072	0,781
CASP8	1,043	0,915	1,583	0,930
CASP9	0,530	1,065	N.d.	0,828
CCND1	1,124	0,669	1,153	0,461
CCND2	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
CCND3	1,438	1,144	1,447	0,723
CCNE1	0,894	1,418	1,075	0,893
CDC42	1,271	2,542	1,755	1,411
CDH1	7,107	2,494	3,659	1,098
CDK2	1,257	0,722	1,467	0,693
CDK4	0,983	0,873	1,390	0,898
CDKN1A	2,853	2,847	1,331	0,996
CDKN1B	0,766	1,545	1,039	0,783
CDKN2A	1,793	1,575	2,469	1,153
CDKN2B	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.

COL1A1	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
CRK	0,867	0,381	1,184	0,758
CTNNB1	0,939	1,026	1,131	0,877
CYCS	0,993	0,954	1,961	1,043
DVL1	1,252	0,913	1,576	N.d.
E2F1	1,018	0,764	1,631	0,736
EGFR	0,831	1,173	1,294	11.276,298
ELK1	1,263	0,625	1,275	0,628
ERBB2	2,605	1,273	1,941	1,006
FADD	1,049	0,369	0,556	74,142
FAS	2,372	1,371	1,496	1,037
FASLG	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
FGF2	0,625	0,854	1,120	1,003
FN1	3,575	1,952	3,841	N.d.
FOS	11,834	30,985	11,943	N.d.
FYN	1,248	1,675	2,474	1,169
FZD1	0,994	0,953	2,253	0,860
GRB2	0,761	1,219	0,961	0,693
GSK3B	1,342	1,249	1,191	0,738
HGF	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
HRAS	0,691	0,928	0,777	0,561
IGF1	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
IGF1R	1,389	2,082	2,283	0,677
ITGA2B	4,514	2,963	3,092	0,135
ITGAV	1,265	0,993	1,426	1.149,015
ITGB1	0,489	0,784	0,838	0,579
ITGB3	5,579	N.d.	N.d.	1,243
JUN	4,073	3,837	3,708	2,306
KDR	N.d.	8,270	4,404	1,408
KIT	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
KRAS	0,951	0,133	0,886	0,979
LEF1	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.

MAP2K1	0,681	0,759	0,822	2.107,239
MAP3K5	1,006	0,609	0,308	4,314
MAPK1	0,903	1,098	1,305	1,062
MAPK14	0,786	1,009	1,008	1,145
MAPK3	2,758	1,726	2,014	1,853
MAPK8	1,185	0,887	1,411	0,623
MAX	N.d.	3,051	3,614	0,912
MDM2	1,479	0,901	0,794	1,272
MYC	0,876	0,271	1,065	0,796
NFKB1	0,784	0,870	1,288	0,699
NFKB2	1,250	0,818	1,340	1,536
NFKBIA	2,326	1,989	2,007	0,894
NRAS	0,556	0,600	1,178	0,923
PIK3CA	0,409	0,910	0,880	0,565
PIK3R1	1,999	2,352	2,456	1,299
PTEN	1,750	0,501	2,037	0,776
PTK2	1,182	0,616	1,561	2,357
PTK2B	3,368	2,265	2,270	1,024
RAC1	0,845	0,731	1,059	2,676
RAF1	2,027	0,574	1,951	0,909
RB1	0,532	1,314	1,003	0,821
RELA	0,862	1,240	1,390	0,845
RHOA	0,900	0,979	1,129	1,017
SHC1	0,640	0,243	0,436	N.d.
SMAD4	0,963	0,942	1,409	2,050
SOS1	0,741	0,851	1,161	0,188
SPP1	1,165	1,338	2,500	10,094
SRC	1,383	1,076	1,584	0,801
TCF3	1,135	0,774	N.d.	0,608
TGFB1	0,495	0,947	0,911	0,868
TGFBR1	1,216	0,545	1,324	0,781
TGFBR2	0,914	1,177	2,358	1,085

TP53	3,250	1,182	3,478	1,466
VEGFA	0,610	1,245	1,664	1,321
WNT1	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.

As células HCT116 foram tratadas com 2,5 μ M do CPR1 e 5 μ M do CPR2 durante 12 h. O controle negativo foi tratado com o veículo (0,1% de uma solução contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) utilizado para diluir os compostos testados. Doxorrubicina (DOX, 1 μ M) e piplartina (PL, 10 μ M) foram utilizadas como controles positivos. A expressão gênica foi detectada utilizando a placa TaqMan® Array Human Molecular Mechanisms of Cancer 96. Os genes GAPDH, 18S e HPRT1 foram utilizados como genes endógeno para normalização. Os valores representam a quantificação relativa (QR) em comparação com o calibrador (células tratadas com o controle negativo, QR = 1,000). Os genes foram considerados com expressão aumentada se $QR \geq 2$ e foram considerados para ser com expressão reduzida se $QR \leq 0,5$. N.d. Não determinado.

10. Anexo

Tabela 1. Genes da placa *TaqMan Array Human Molecular Mechanisms of Cancer* (Life Technologies®)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S Hs99999901_s1	GAPDH Hs99999905_m1	HPRT1 Hs99999909_m1	GUSB Hs99999908_m1	ABL1 Hs01104728_m1	AKT1 Hs00178289_m1	AKT2 Hs01086102_m1	APC Hs00181051_m1	BAX Hs00180269_m1	BCAR1 Hs00183953_m1	BCL2 Hs99999018_m1	BCL2L1 Hs00236329_m1
B	BCL2L1 Hs00197982_m1	BID Hs00609632_m1	BRAF Hs00269944_m1	CASP8 Hs01018151_m1	CASP9 Hs00154260_m1	CCND1 Hs00765553_m1	CCND2 Hs00153380_m1	CCND3 Hs00236949_m1	CCNE1 Hs01026536_m1	CDC42 Hs00741586_mH	CDH1 Hs01023894_m1	CDK2 Hs01548894_m1
C	CDK4 Hs00175935_m1	CDKN1A Hs00355782_m1	CDKN1B Hs00153277_m1	CDKN2A Hs00923894_m1	CDKN2B Hs00365249_m1	COL1A1 Hs00164004_m1	CRK Hs00180418_m1	CTNNB1 Hs00355045_m1	CYCS Hs01588973_m1	DVL1 Hs00182896_m1	E2F1 Hs00153451_m1	EGFR Hs01076078_m1
D	ELK1 Hs00428286_g1	ERBB2 Hs01001580_m1	FADD Hs00538709_m1	FAS Hs00531110_m1	FASLG Hs00181225_m1	FGF2 Hs00266645_m1	FN1 Hs01549976_m1	FOS Hs00170630_m1	FYN Hs00176628_m1	FZD1 Hs00268943_s1	GRB2 Hs00157817_m1	GSK3B Hs00275656_m1
E	HGF Hs00300159_m1	HRAS Hs00610483_m1	IGF1 Hs01547656_m1	IGF1R Hs00609566_m1	ITGA2B Hs01116228_m1	ITGAV Hs00233790_m1	ITGB1 Hs00559595_m1	ITGB3 Hs01001469_m1	JUN Hs99999141_s1	KDR Hs00911700_m1	KIT Hs00174029_m1	KRAS Hs00364282_m1
F	LEF1 Hs00212390_m1	MAP2K1 Hs00605615_mH	MAP3K5 Hs00178726_m1	MAPK1 Hs01046830_m1	MAPK14 Hs00176247_m1	MAPK3 Hs00385075_m1	MAPK8 Hs01548508_m1	MAX Hs00811070_m1	MDM2 Hs99999008_m1	MYC Hs99999003_m1	NFKB1 Hs00765730_m1	NFKB2 Hs00174517_m1
G	NFKBIA Hs00153283_m1	NRAS Hs00180035_m1	PIK3CA Hs00180679_m1	PIK3R1 Hs00381459_m1	PTEN Hs01920652_s1	PTK2 Hs00178587_m1	PTK2B Hs00169444_m1	RAC1 Hs01025984_m1	RAF1 Hs00234119_m1	RB1 Hs01078066_m1	RELA Hs00153294_m1	RHOA Hs00357608_m1
H	SHC1 Hs00427539_m1	SMAD4 Hs00929647_m1	SOS1 Hs00362308_m1	SPP1 Hs00960942_m1	SRC Hs00178494_m1	TCF3 Hs00413032_m1	TGFB1 Hs00998133_m1	TGFBR1 Hs00610318_m1	TGFBR2 Hs00234253_m1	TP53 Hs01034249_m1	VEGFA Hs00900055_m1	WNT1 Hs00180529_m1

Novel piplartine-containing ruthenium complexes: synthesis, cell growth inhibition, apoptosis induction and ROS production on HCT116 cells

Cinara O. D'Sousa Costa^{1,*}, João H. Araujo Neto^{2,*}, Ingrid R.S. Baliza¹, Rosane B. Dias¹, Ludmila de F. Valverde¹, Manuela T.A. Vidal¹, Caroline B.S. Sales³, Clarissa A.G. Rocha¹, Diogo R.M. Moreira¹, Milena B.P. Soares^{1,4}, Alzir A. Batista² and Daniel P. Bezerra¹

¹Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ/BA), Salvador, Bahia, 40296-710, Brazil

²Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo, 13561-901, Brazil

³Department of Biomorphology, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, 40110-902, Brazil

⁴Center of Biotechnology and Cell therapy, Hospital São Rafael, Salvador, Bahia, 41253-190, Brazil

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Daniel P. Bezerra, **email:** danielpbezerra@gmail.com

Keywords: piplartine, piperlongumine, ruthenium complexes, ROS, apoptosis

Received: May 01, 2017

Accepted: September 29, 2017

Published:

Copyright: D'Sousa Costa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Piplartine (piperlongumine) is a plant-derived molecule that has been receiving intense interest due to its anticancer characteristics that target the oxidative stress. In the present paper, two novel piplartine-containing ruthenium complexes [Ru(piplartine)(dppf)(bipy)](PF₆)₂ (1) and [Ru(piplartine)(dppb)(bipy)](PF₆)₂ (2) were synthesized and investigated for their cellular and molecular responses on cancer cell lines. We found that both complexes are more potent than metal-free piplartine in a panel of cancer cell lines on monolayer cultures, as well in 3D model of cancer multicellular spheroids formed from human colon carcinoma HCT116 cells. Mechanistic studies uncovered that the complexes reduced the cell growth and caused phosphatidylserine externalization, internucleosomal DNA fragmentation, caspase-3 activation and loss of the mitochondrial transmembrane potential on HCT116 cells. Moreover, the pre-treatment with Z-VAD(OMe)-FMK, a pan-caspase inhibitor, reduced the complexes-induced apoptosis, indicating cell death by apoptosis through caspase-dependent and mitochondrial intrinsic pathways. Treatment with the complexes also caused a marked increase in the production of reactive oxygen species (ROS), including hydrogen peroxide, superoxide anion and nitric oxide, and decreased reduced glutathione levels. Application of N-acetyl-cysteine, an antioxidant, reduced the ROS levels and apoptosis induced by the complexes, indicating activation of ROS-mediated apoptosis pathway. RNA transcripts of several genes, including gene related to the cell cycle, apoptosis and oxidative stress, were regulated under treatment. However, the complexes failed to induce DNA intercalation. In conclusion, the complexes are more potent than piplartine against different cancer cell lines and are able to induce caspase-dependent and mitochondrial intrinsic apoptosis on HCT116 cells by ROS-mediated pathway.

INTRODUCTION

Colon and rectal carcinoma is a disease with high frequency and lethality. In 2012, 1.4 million new cases were diagnosed and almost 694,000 deaths estimated worldwide [1]. Current chemotherapeutic drugs are an important form of treatment, but they have clinically serious toxicities and the cancer cells still can acquire resistance to them; therefore, the development of novel cytotoxic agents remains a great challenge [2].

Piplartine (piperlongumine) is an alkaloid, which is found in some *Piper* species. We and along with other research groups have been investigating the anticancer potential of piplartine, and some antineoplastic characteristics have been assigned to this molecule, including potent cytotoxic, genotoxic, antitumor, antiangiogenic and antimetastatic properties, as well as attractive good bioavailability and safety [3–18]. Historically, much attention has been given to this molecule after its cytotoxicity and ability to induce the production of reactive oxygen species (ROS) selectively in cancer cells were published by Raj et al. [12]. Later, the anticancer potential of piplartine and its analogs, alone or in combination, including combination with paclitaxel, cisplatin, gemcitabine and curcumin, have been extensively explored [10, 16, 19–21]. These studies reported the ability of piplartine to induce apoptosis and/or autophagy through modulation of the PI3K/Akt/mTOR, NF- κ B, JAK1,2/STAT3 and/or JNK pathways in cancer cells [14, 15, 22–24]. In addition, piplartine is a direct TrxR1 inhibitor and can inhibit cell migration/invasion via ROS/ER/MAPKs/CHOP axis [25, 26].

Several ruthenium complexes exhibit potent cytotoxic activity to cancer cells [27–29]. Moreover, selected ruthenium complexes are under phase I or II clinical trials, with promising results [30, 31]. Interestingly, the structure of the ligands bound to the metal is important for the activity of these complexes. Consequently, several organic molecules have been used as ligands to form complexes with ruthenium, aiming at improving their cytotoxic activity. Therefore, we have investigated for the first time the cellular and molecular responses of two novel piplartine-containing ruthenium complexes [Ru(piplartine)(dppf)(bipy)](PF₆)₂ (**1**) and [Ru(piplartine)(dppb)(bipy)](PF₆)₂ (**2**) (dppf = 1,1'-bis(diphenylphosphino) ferrocene; dppb = 1,4-bis(diphenylphosphino)butane and bipy = 2,2'-bipyridine), on human colon carcinoma HCT116 cells.

RESULTS

Synthesis of novel piplartine-containing ruthenium complexes

The novel piplartine-containing ruthenium complexes were obtained using two different precursors

of type [RuCl₂(N-N)(P-P)] (N-N = 2,2'-bipyridine (bipy); P-P = 1,1'-bis(diphenylphosphino) ferrocene (dppf) for complex **1** (heterometallic), and 1,4-bis (diphenylphosphino)butane (dppb) for complex **2** (monometallic), as indicated in Figure 1. Silver hexafluorophosphate was employed in order to sequester the precursor's chlorido, allowing the coordination of the piplartine ligand to the metal center, and forming the insoluble AgCl salt, which was easily removed by filtration. The employment of dry non-coordinating solvent (acetone or dichloromethane), during the syntheses of the complexes is necessary to avoid the formation of byproducts of the reaction. Both complexes were prepared in good yields, 87% for complex **1** and 88% for complex **2**, as orange solids, stable under light and air.

The piplartine molecule is an uncharged ligand and its coordination to the Ru(II) precursors results in dicationic complexes, which precipitate in the salt form with two hexafluorophosphate anion (PF₆⁻) acting as counterions. The formation of dicationic complexes was confirmed by molar conductivity measurements, performed in acetone, displaying typical solution of 2:1 electrolyte, with conductivity range [32] between 160–200 S cm² mol⁻¹. The elemental analyses of the complexes are consistent with their proposed formulas.

The infrared spectra of the complexes show the typical ν (C=O) carboxyl stretching frequencies, at 1650 cm⁻¹ for complex **1**, 1651 cm⁻¹ for complex **2**, while the metal-free piplartine ligand displays this stretching mode at 1686/cm. The difference between the metal-free and coordinated ν (C=O) piplartine values ($\Delta\nu = 36$ cm⁻¹) is indicative of a bidentate binding mode of the ligand, through the carbonyl groups [33]. Strong bands are present in the spectra of the piplartine and of the precursor complexes in the region of 1600–1300 cm⁻¹, characteristics of ν C=N and ν C=C stretching vibrations. The complexes **1** and **2** exhibit ν Ru-P stretching bands in the range of 520–508 cm⁻¹. Also, the ν Ru-N and ν Ru-O stretching vibrations occur as weak bands in the region of low energy, around 450–350 cm⁻¹. For both complexes, the characteristic P-F stretch of the PF₆⁻ counterion are at 843 cm⁻¹. Most of the vibrational modes observed in the infrared spectra of the complexes are characteristic of the diphosphine/bipyridine ligands, occurring practically at the same frequencies observed for the precursors of type *cis*-[RuCl₂(P-P)(N-N)] [34–37].

The electrochemical behavior of the complexes **1** and **2** are similar to those found for other Ru(II)/diphosphine/diimine complexes [34–36]. These experiments were performed by cyclic (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) techniques, in dichloromethane solutions. The DPV oxidation of the complexes and of the metal-free piplartine are represented in Figure 2. The complex **1**, which is a bimetallic compound, exhibits three oxidation processes: the first one, which is quasi-reversible ($I_{pa}/I_{pc} = 1.2$, $E_{pa} = 0.88$ V)

belongs to the Fe(II)/Fe(III) oxidation, while the second one, irreversible, with $E_{pa} = 1.37$ V, belongs to the oxidation process of the pipartine. This process is also observed for the metal-free ligand (Figure 2). The third process, a irreversible process, is assigned to one-electron Ru(II)/Ru(III), with $E_{pa} 1.68$ V (Table 1). The complex **2** exhibits two processes, the first one, irreversible, at 1.48 V (E_{pa}), belongs to the oxidation of the pipartine ligand and the second one, quasi-reversible, at 1.62 V (E_{pa}), belongs to the Ru(II)/Ru(III). The process assigned to pipartine refers to the oxidation of the trimethoxybenzene group, where the proposed mechanism involves the formation of free radicals [38]. The E_{pa} value of Ru(II)/Ru(III) oxidation processes for the precursor *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] is observed around 0.65 V [34, 39], clearly indicating that the substitution of the two chloridos by a uncharged chelate ligand (pipartine), stabilizing the Ru(II) center by

approximately 1.0 V. This stabilization is plausible, due to the replacement of two σ and π donor chlorido ligands by an uncharged chelating pipartine, which increases the oxidation potential of the metal center.

An important aspect observed to the novel pipartine-containing ruthenium complexes is the presence of isomers generated from the position of the pipartine ligand, as shown in Figure 3. For one isomer, the coordinated oxygen – O_a is *trans* to the nitrogen from the bipyridine ligand, while the O_b is *trans* to the phosphorous atom from the diphosphine. The second isomer has the opposite, the O_a *trans* to the phosphorous atom from diphosphine and the O_b, *trans* to the nitrogen from the bipyridine. The presence of the two isomers was observed by using the multiatomic NMR technique, by the duplication of signals in the spectra. Thus, in the ³¹P{¹H} NMR spectra of the complexes **1** and **2**, two pairs

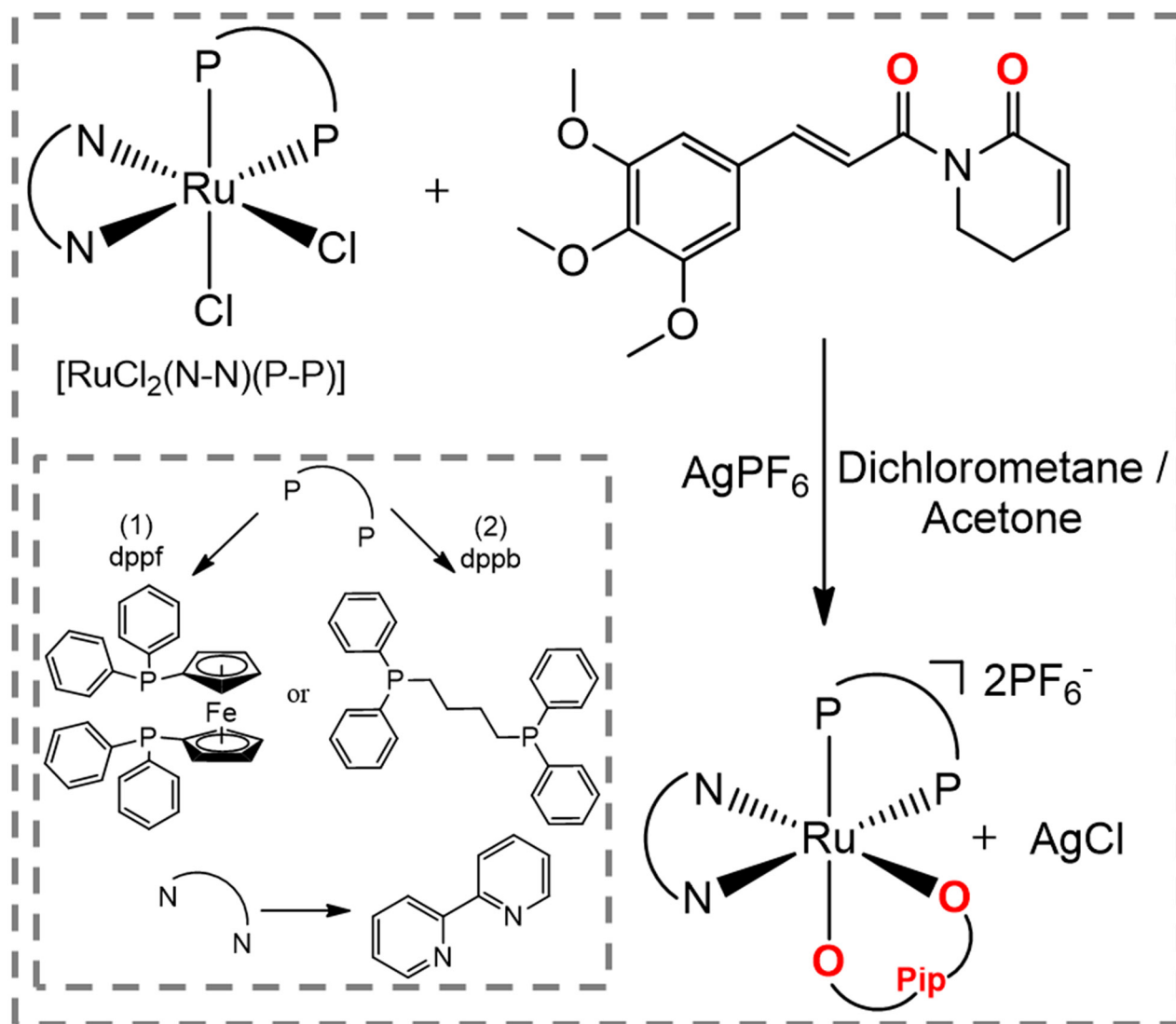


Figure 1: Route for the synthesis of complexes [Ru(pipartine)(dppf)(bipy)](PF₆)₂ (**1**) and [Ru(pipartine)(dppb)(bipy)](PF₆)₂ (**2**).

Table 1: Attributions of vibrational frequencies (cm) corresponding to the carboxyl group in the metal-free and coordinated piplartine, ^{31}P (^1H) shift NMR (d_6 -acetone) and electrochemical data

	$\nu\text{C=O}$ (cm)	$\Delta\nu$ (cm)	$\delta\ ^{31}\text{P}(^1\text{H})$ (ppm)	$^2J_{\text{P-P}}$ (Hz)	$E_{\text{pa}}/E_{\text{pc}}$ (V) Fe(II)/Fe(III)	$E_{\text{pa}}/E_{\text{pc}}$ (V) Ru(II)/ Ru(III)	$E_{\text{pa}}/E_{\text{pc}}$ (V) piplartine
Piplartine	1686	-	-	-	-	-	1.33 / -
1	1650	36	39.1; 39.3 43.1; 45.9	29.6 30.3	0.88 / 0.75	1.62 / -	1.37 / -
2	1651	35	39.4; 42.3 41.0; 41.7	32.6 34.9	-	1.62 / 1.50	1.48 / -

of doublets were observed, where each pair is consistent with an AB pattern with specific J -coupling (Table 1). This system indicates the presence of two inequivalent phosphorus atoms for each isomer. The signals, in the region of 39 to 45 ppm for complex **1** and 39 to 41 ppm for complex **2** (Figure 4), are consistent with a geometry where one of the nitrogens of the 2,2'-bipyridine is *trans* to one phosphorus atom of dppb/dppf, for both complexes [40], and the second one is *trans* to oxygen of carboxyl

groups, O_a or O_b (isomers), as shown in Figure 3. For both complexes the integral for the phosphorous signals is the same, showing that isomers ratio at the final product is 1:1.

The ^1H NMR spectra of the complexes, in d_6 -acetone, display signals correspondent to the hydrogen atoms of the ligands diphosphine, bipyridine and piplartine, exhibiting several duplicate signals, confirming the presence of the isomers in solution [41]. The metal-free ligand, piplartine, displays two broad singlets, at

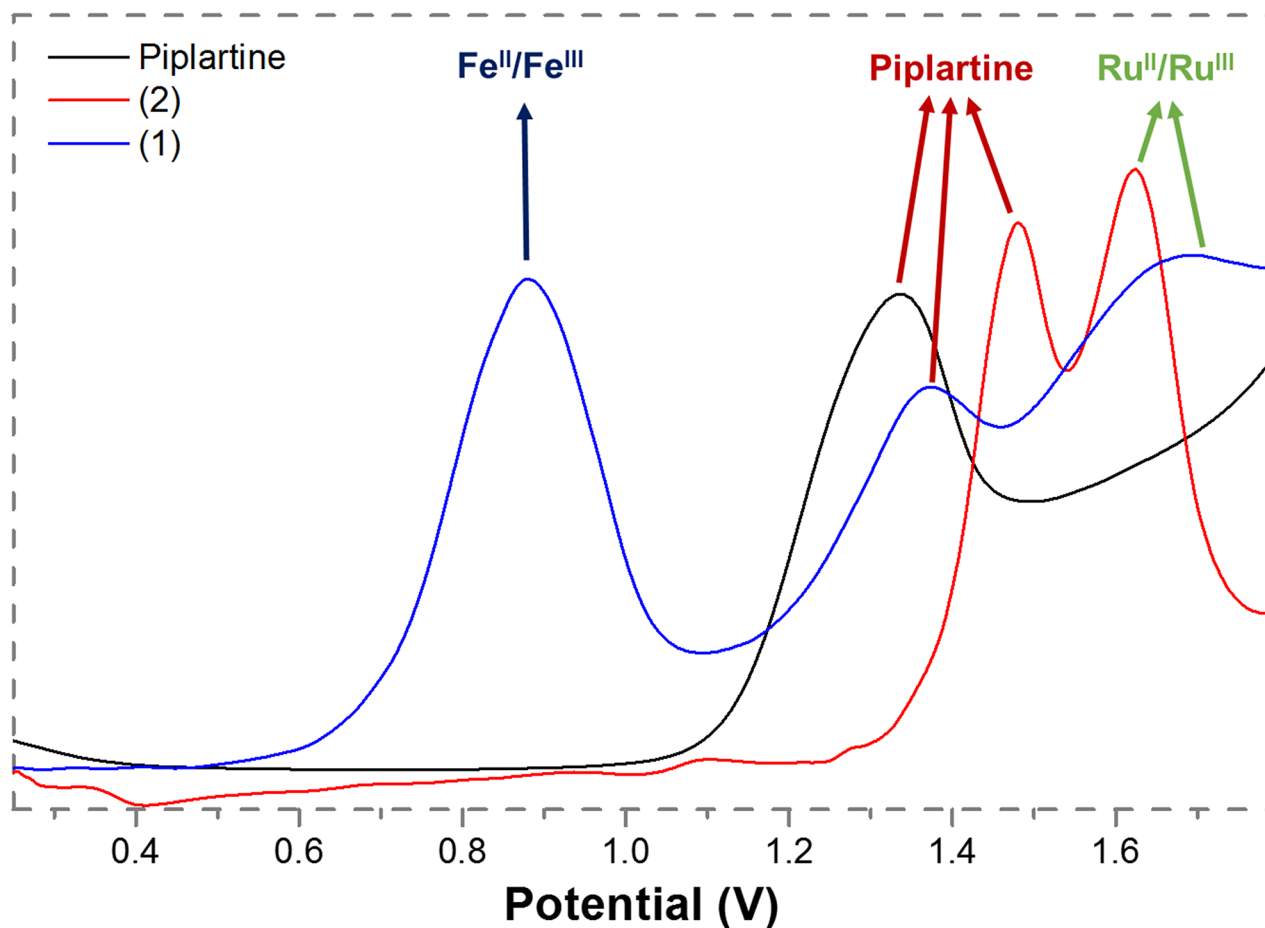


Figure 2: Differential pulse voltammograms of complexes 1 and 2 (dichloromethane solution, working and auxiliary electrodes were stationary Pt, and the reference electrode was Ag/AgCl , 0.10 M Bu_4NClO_4).

3.78 and 3.90 ppm, refer to the methoxy groups present in the molecule. For the complexes **1** and **2**, these signals present similar chemical shift, however both signal are duplicate, as shown in Figure 5. The aromatic

hydrogens of the phenyl group of the dppf (**1**) and of the dppb (**2**) ligands are in the typical range 6.0–7.9 ppm. The complex **1** exhibits the expected shielded aromatic signals corresponding to the hydrogens of the ferrocene

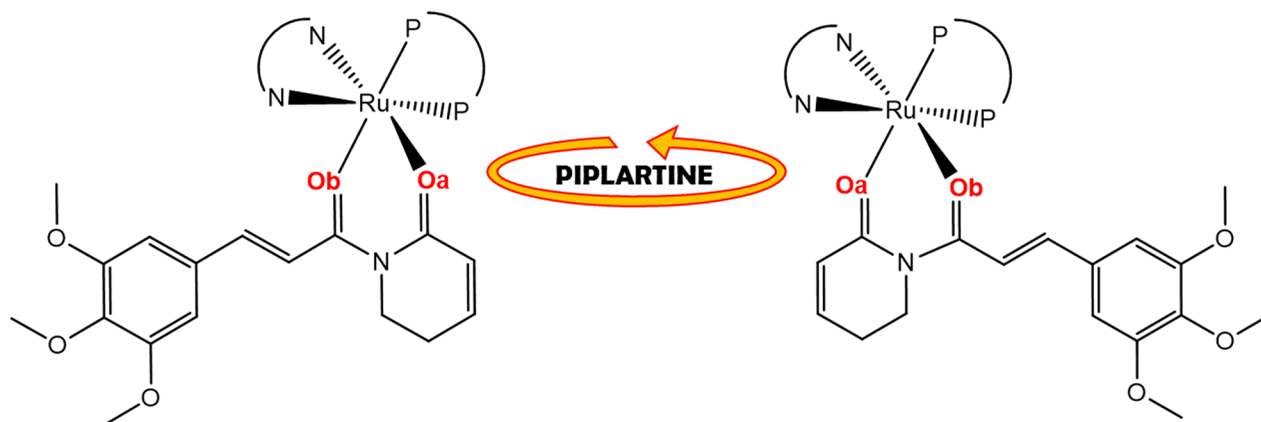


Figure 3: Representation of isomers resulting from bond rotation of piplartine around the metal center.

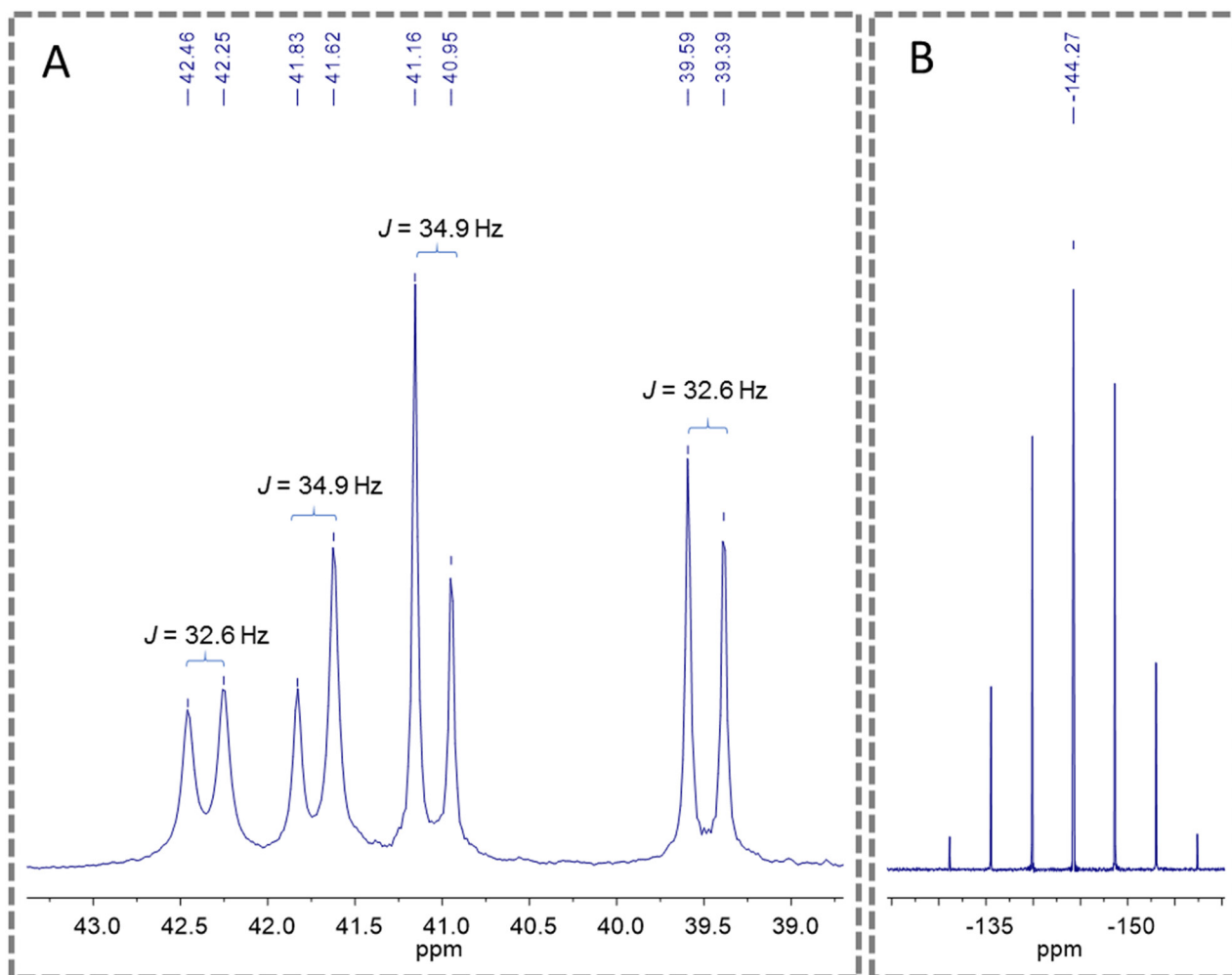


Figure 4: $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of the complex **2** (d_6 -acetone), where (A) show the doublets of the phosphorous of diphosphine and (B) show the multiplet signal of PF_6^- .

rings of the dppf ligand at 4.3 – 5.3 ppm. In addition, both complexes exhibited the expected duplicated deshielded doublets corresponding to the ortho hydrogens of the 2,2'-bipyridinic ligand at 8.45 – 9.05 ppm for complex 1 and 8.55 – 8.85 ppm for complex 2.

The ^{13}C NMR spectra of the complexes display four signals around 170 – 175 ppm, typical of the coordinated C=O group. This signal is deshielded,

compared with the observed for the metal-free piplartine ligand in where they occur at 165 and 168 ppm, indicating that oxygen of carboxyl group is coordinated to the metal. In agreement with the previously NMR techniques ($^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ and ^1H NMR) employed, all signals are also duplicate, due the presence of isomers, as shown to the coordinated carbonyl ^{13}C NMR signals in Figure 5.

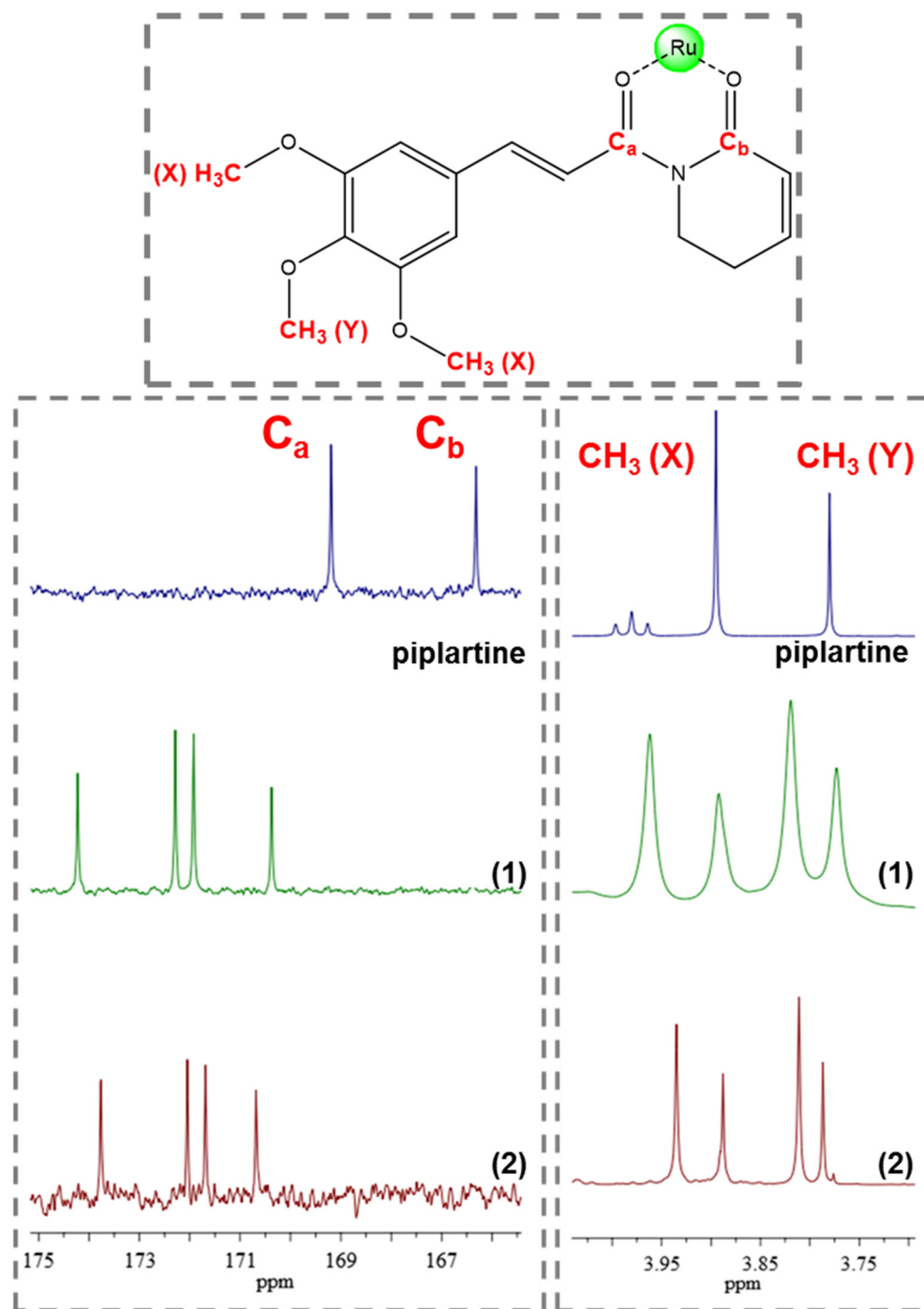


Figure 5: ^{13}C and ^1H NMR spectrum of complexes 1 and 2 with amplification in the region of methoxyl group displaying the signal duplication, indicative of isomers (d_6 -acetone).

Table 2: Cytotoxic activity of piplartine-containing ruthenium complexes

Cells	IC ₅₀ in μM				
	DOX	OXA	PL	1	2
Cancer cells					
HCT116	0.2 0.1 - 0.3	4.1 2.3 - 5.5	6.4 3.2 - 9.5	1.7 1.5 - 2.0	5.5 4.7 - 6.4
HepG2	0.2 0.2 - 0.3	2.2 1.3 - 3.8	6.3 4.4 - 8.8	1.7 1.4 - 2.2	1.9 1.4 - 3.5
HSC-3	0.5 0.3 - 0.6	3.3 1.4 - 7.8	7.4 3.1 - 11.3	0.6 0.5 - 0.9	1.3 0.8 - 2.3
SCC-4	2.1 1.7 - 2.6	7.7 4.6 - 13.0	15.5 11.3 - 19.8	3.2 2.2 - 4.8	5.4 3.9 - 7.3
SCC-9	2.6 2.0 - 3.3	N.d.	16.5 14.2 - 19.0	4.4 3.3 - 5.9	6.8 5.3 - 8.8
HL-60	0.2 0.2 - 0.3	0.6 0.1 - 0.8	13.3 4.1 - 18.7	3.4 1.8 - 6.3	4.5 2.9 - 7.0
K-562	1.0 0.6 - 1.8	1.0 0.1 - 1.3	18.6 11.6 - 23.9	3.5 2.9 - 4.4	5.8 4.9 - 6.7
B16-F10	0.02 0.01 - 0.07	2.2 1.2 - 4.1	10.6 6.9 - 16.1	2.8 2.0 - 3.8	4.1 3.0 - 5.4
Non-cancer cells					
MRC-5	1.3 1.0 - 1.5	1.3 1.0 - 2.2	17.3 11.3 - 25.5	3.4 2.8 - 4.0	6.3 4.3 - 9.2
PBMC	5.4 3.1 - 9.4	9.4 6.5 - 11.4	34.2 28.1 - 43.9	1.8 1.1 - 3.2	3.2 1.8 - 5.9

Data are presented as IC₅₀ values in μM and their respective 95% confidence interval obtained by nonlinear regression from at the least three independent experiments performed in duplicate, measured by alamar blue assay after 72h of incubation. Cancer cells: HCT116 (human colon carcinoma); HepG2 (human hepatocellular carcinoma); HSC-3 (human oral squamous cell carcinoma); SCC-4 (human oral squamous cell carcinoma); SCC-9 (human oral squamous cell carcinoma); HL-60 (human promyelocytic leukemia); K-562 (human chronic myelogenous leukemia); and B16-F10 (murine melanoma). Non-cancer cells: MRC-5 (human lung fibroblast) and PBMC (human peripheral blood mononuclear cells). Doxorubicin (DOX), oxaliplatin (OXA) and piplartine (PL) were used as the positive controls. N.d. Not determined.

The $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR technique is also a versatile tool to study the stability of the complexes **1** and **2** in different solvents. The complexes display instability when dissolved in coordinating solvents (DMSO, methanol or DMF). Thus, when the complexes are dissolved in these solvents the ligand piplartine is quickly and completely labilized from the metal center. Therefore, in noncoordinating solvents (acetone, dichloromethane or chloroform) the complexes present stability, for at least 72 h. In an acetone/water (1:9) mixture, labilization of piplartine occurs gradually (red arrow), and after 24 h the complete labilization of piplartine is observed, showing the presence of only one species in solution [probably the $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{dppb})$

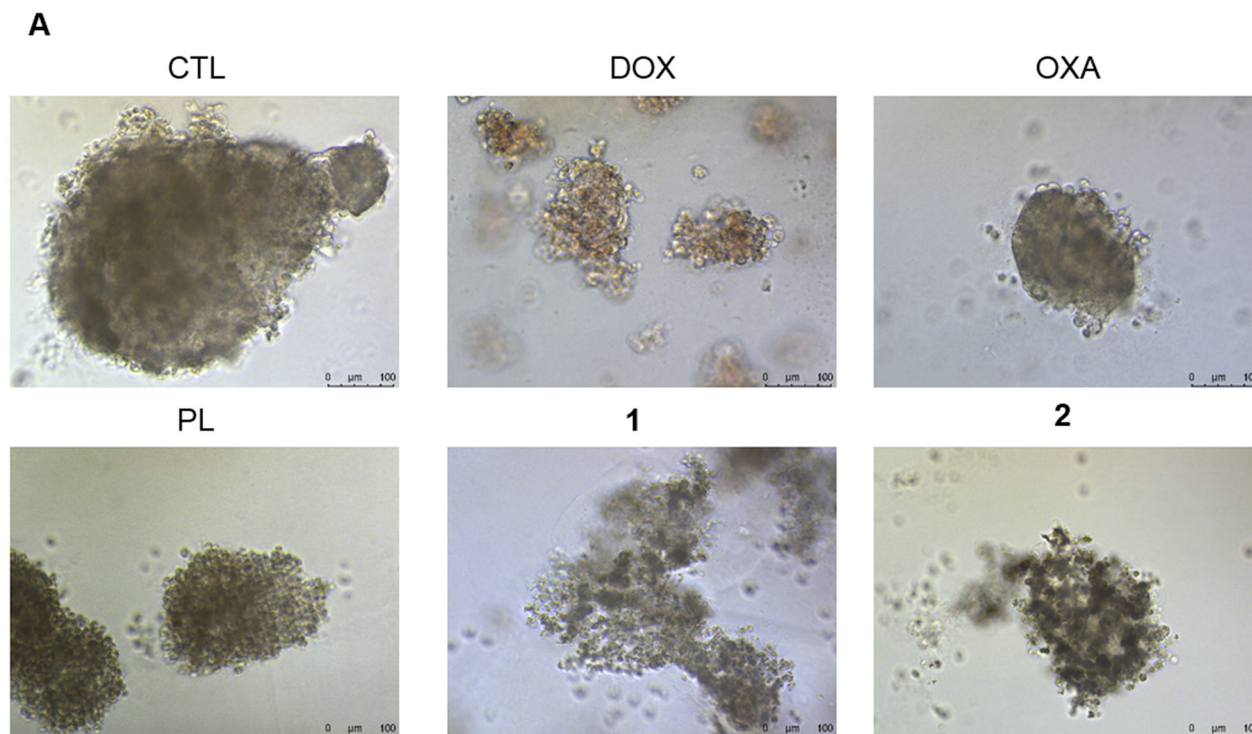
(bipy)]²⁺ species (orange arrow) (Supplementary Figure 1)], which displays only a pair of doublets, at about 37 and 48 ppm.

The HPLC chromatogram of complex **2** shows the instability of this compound in the eluent used, displaying different peaks, which can be attributed to the isomers of complex **2** or the solvolysis/hydrolysis products such as the metal-free piplartine, $[\text{Ru}(\text{dppb})(\text{bipy})(\text{MeOH})_2]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{dppb})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ or $[\text{Ru}(\text{dppb})(\text{bipy})(\text{MeOH})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ species and other byproducts (Supplementary Figure 2). The HPLC experiments were performed using methanol/water solution (57/43) as mobile phase at isocratic model and the column ODS-C18 (5 mm; 250 x 4.6 mm; Shimadzu).

Piplartine-containing ruthenium complexes display potent cytotoxicity against a panel of cancer cell lines

The cytotoxicity of both piplartine-containing ruthenium complexes was screened against a panel of different histological types of cancer cell lines (HCT116, HepG2, HSC-3, SCC-4, SCC-9, HL-60, K-562 and B16-F10) and against two non-cancer cells (MRC-5 and PBMC) after 72h of incubation using the alamar blue assay. Table 2 shows the results obtained. Both complexes presented cytotoxic activity more potent than metal-free

piplartine. Complex 1 presented IC_{50} values ranging from 0.6 to 4.4 μ M for cancer cell lines HSC3 and SCC9, respectively. Complex 2 presented IC_{50} values ranging from 1.3 to 6.8 μ M for cancer cell lines HSC3 and SCC9, respectively. On the other hand, piplartine presented IC_{50} values ranging from 6.3 to 18.6 μ M for cancer cell lines HepG2 and K562, respectively. Complex 1 was more potent than metal-free piplartine on HCT116 (4-fold), HepG2 (4-fold), HSC3 (12-fold), SCC4 (5-fold), SCC9 (4-fold), HL-60 (4-fold), K562 (5-fold) and B16-F10 (4-fold). Complex 2 was more potent than metal-free piplartine on HepG2 (3-fold), HSC3 (6-fold), SCC4 (3-fold), SCC9 (2-



B

Spheroids	IC_{50} in μ M				
	DOX	OXA	PL	1	2
HCT116	6.3	9.3	22.1	7.3	8.3
	1.3 – 11.1	1.6 – 17.6	14.1 – 28.5	4.1 – 13.1	6.0 – 11.6

Figure 6: Effect of piplartine-containing ruthenium complexes in 3D *in vitro* model of cancer multicellular spheroids formed from HCT116 cells. (A) Cells examined by light microscopy (bar = 100 μ m) at the highest concentration tested. (B) IC_{50} values in μ M and their respective 95% confidence interval obtained by nonlinear regression from at the least three independent experiments performed in duplicate, measured by alamar blue assay after 72h of incubation. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested. Doxorubicin, oxaliplatin and piplartine were used as the positive controls.

fold), HL-60 (3-fold), K562 (3-fold) and B16-F10 (3-fold). Doxorubicin presented IC_{50} values ranging from 0.02 to 2.6 μM for cancer cell lines B16-F10 and SCC9, respectively. Oxaliplatin presented IC_{50} values ranging from 0.6 to 7.7 μM for cancer cell lines HL-60 and SCC4, respectively. The precursors of type $[\text{RuCl}_2(\text{N-N})(\text{P-P})]$ (N-N = diimines; P-P = diphosphines) had been previously tested and exhibited only weak cytotoxicity ($IC_{50} > 15 \mu\text{M}$) [42, 43], and was not tested in the present paper.

The IC_{50} value for non-cancer cells was 3.4 and 1.8 μM for the complex 1, 6.3 and 3.2 μM for the complex

2 and 17.3 and 34.2 μM for piplartine for MRC-5 and PBMC cells, respectively. In addition, the IC_{50} value for non-cancer cells was 1.3 and 5.4 μM for doxorubicin, 1.3 and 9.4 μM for oxaliplatin for MRC-5 and PBMC cells, respectively. The Supplementary Table 1 shows the selectivity index calculated. The SI was calculated using the following formula: $SI = IC_{50} [\text{non-cancer cells}] / IC_{50} [\text{cancer cells}]$. The SI is a well-characterized method to estimate the therapeutic range of a drug and to identify drug candidates for further studies. Although the complexes were more cytotoxic to non-cancer cells

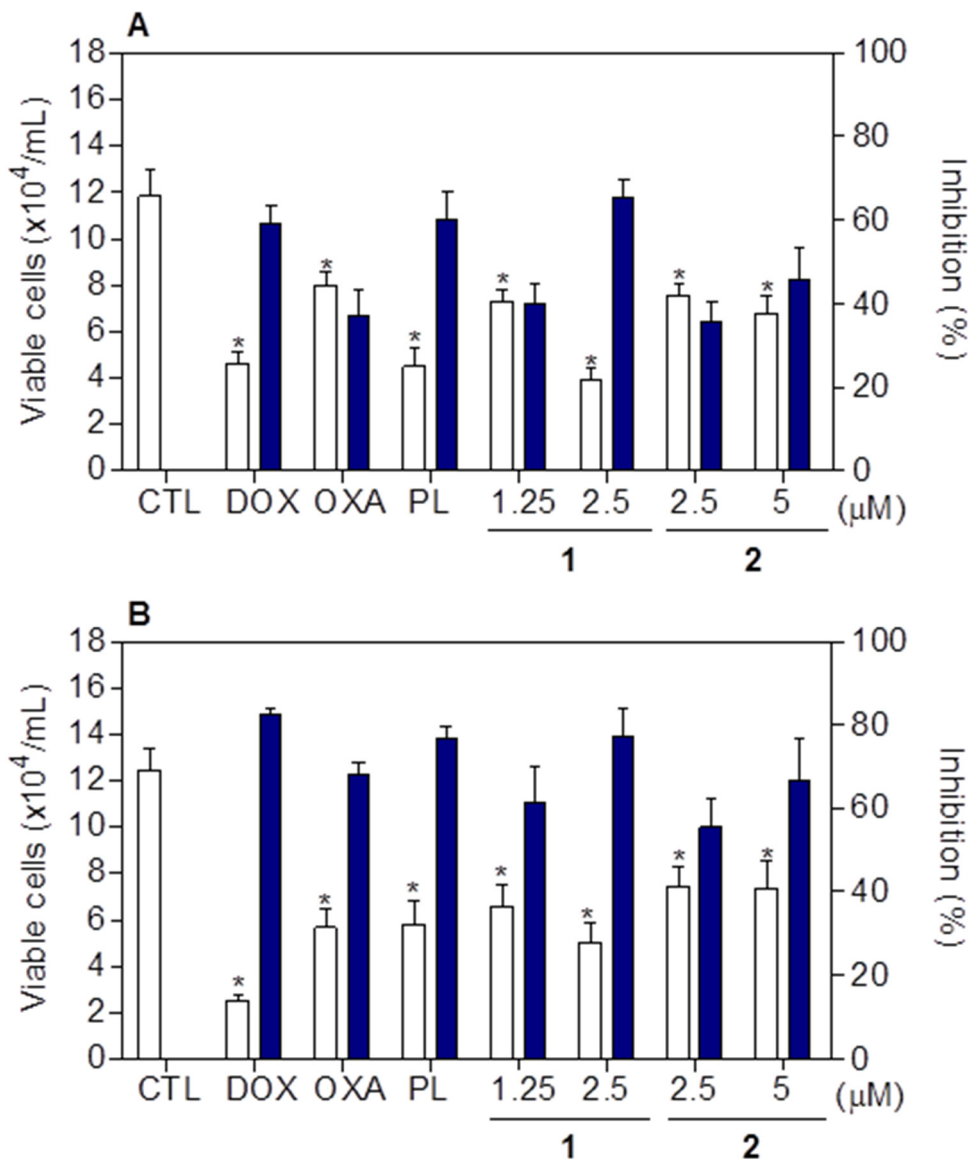


Figure 7: Effect of piplartine-containing ruthenium complexes in the cell viability of HCT116 cells determined by trypan blue staining after 24 (A) and 48 (B) h of incubation. The white bars represent number of viable cells ($\times 10^4$ cells/mL) and the blue bars represent cell inhibition (%). The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested. Doxorubicin (DOX, 1 μM), oxaliplatin (OXA, 3 μM) and piplartine (PL, 10 μM) were used as the positive controls. Data are presented as the mean \pm S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA followed by Student Newman-Keuls test.

Table 3: Effect of piplartine-containing ruthenium complexes in the DNA content of HCT116 cells

Treatment	Concentration (µM)	DNA content (%)			
		Sub-G ₀ /G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
After 24h of incubation					
CTL	-	5.0 ± 0.9	46.6 ± 1.8	18.7 ± 1.6	28.0 ± 1.6
DOX	1	5.2 ± 1.4	22.1 ± 2.4	9.8 ± 0.8*	59.0 ± 2.8*
OXA	3	14.3 ± 3.6	38.4 ± 5.4	16.9 ± 2.0	25.4 ± 2.1
PL	10	20.3 ± 1.8*	22.7 ± 0.6	21.4 ± 2.3	21.5 ± 2.9
1	1.25	9.1 ± 2.4	42.5 ± 1.7	21.9 ± 2.5	22.4 ± 1.1
	2.5	31.8 ± 1.4*	28.6 ± 5.9	11.5 ± 2.5	12.7 ± 1.7*
2	2.5	8.8 ± 1.4	45.1 ± 1.3	18.7 ± 1.8	22.9 ± 1.9
	5	23.6 ± 7.9*	41.0 ± 4.6	15.6 ± 1.8	19.0 ± 2.9
After 48h of incubation					
CTL	-	3.9 ± 0.8*	47.5 ± 3.3	20.1 ± 2.6	22.9 ± 1.1
DOX	1	21.8 ± 5.4*	15.8 ± 2.0*	10.4 ± 1.1*	49.0 ± 5.9*
OXA	3	14.8 ± 1.3*	44.2 ± 2.2	17.4 ± 1.9	21.2 ± 1.0
PL	10	33.9 ± 5.8*	27.0 ± 2.9*	16.4 ± 2.2	21.9 ± 0.9
1	1.25	13.5 ± 1.0	39.4 ± 1.8	20.1 ± 1.4	21.5 ± 0.8
	2.5	45.8 ± 8.8*	30.0 ± 5.8*	13.5 ± 1.5	9.0 ± 3.2*
2	2.5	15.7 ± 3.1	33.7 ± 4.2*	21.2 ± 2.6	20.5 ± 2.5
	5	31.9 ± 4.2*	18.0 ± 2.7*	18.0 ± 1.3	15.7 ± 2.6

Data are presented as the mean ± S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested. Doxorubicin (DOX), oxaliplatin (OXA) and piplartine (PL) were used as the positive controls. Ten thousand events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis. * $p < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA followed by Student Newman-Keuls Test.

than piplartine, they exhibit selectivity index similar to piplartine and the positive controls doxorubicin and oxaliplatin, which are clinically useful drugs in the treatment of cancer.

In a new set of experiment, human colon carcinoma HCT116 cell line was used as a cellular model, since it was among the most sensitive cell lines to the complexes tested.

In complementary to 2D cell monolayer cultures, we also assessed the cytotoxicity of piplartine-containing ruthenium complexes in an *in vitro* three-dimensional (3D) model of cancer multicellular spheroids formed from HCT116 cells. The cells in the spheroids showed morphological changes, indicating an effective drug permeability and cytotoxicity in the 3D culture (Figure 6A). After 72 h treatment, the IC₅₀ of the complexes **1** and **2** were estimated to be 7.3 and 8.3 µM, respectively (Figure 6B), while piplartine presented IC₅₀ of 22.1 µM. Based on this, the complexes **1** and **2** were approximately

3 and 2 fold more potent than metal-free piplartine, respectively. Doxorubicin and oxaliplatin showed IC₅₀ of 6.3 and 9.3 µM, respectively.

Piplartine-containing ruthenium complexes induce caspase-dependent and mitochondrial intrinsic apoptosis on HCT116 cells

Cell viability after treatment with complexes **1** and **2** was determined by trypan blue exclusion assay on HCT116 cells, after 24 and 48h of incubation. Both complexes significantly reduced ($p < 0.05$) the number of viable cells (Figure 7). At concentrations of 1.25 and 2.5 µM, complex **1** reduced the number of viable cells by 40.2 and 65.4% after 24 h, and 61.5 and 77.1% after 48 h, respectively. Complex **2** reduced the number of viable cells by 35.5 and 45.8% at 2.5 and 5 µM after 24h, and 55.5 and 66.9% after 48h, respectively. None of complexes induced significant ($p > 0.05$) increase in the non-viable

cells. Doxorubicin, oxaliplatin and piplartine also reduced the number of viable cells after 24 and 48h of incubation.

Regarding cell morphology, HCT116 cells treated with both complexes at all concentrations induced reduction in the cell volume, chromatin condensation and fragmentation of the nuclei. This effect became more pronounced at the higher concentrations and at the longer time of incubation (Supplementary Figure 3A). Doxorubicin, oxaliplatin and piplartine also induced cell shrinkage, chromatin condensation and nuclear fragmentation. Furthermore, both complexes caused cell shrinkage, as observed by the decrease in forward light scatter (FSC), as well as by nuclear condensation, indicated by a transient increase in side scatter (SCC) (Supplementary Figures 3B, 4A and 4B). These morphological alterations indicate that the complexes were inducing apoptosis.

DNA content was examined by flow cytometry on HCT116 cells (Table 3). All DNA that was sub-diploid in size (sub- G_0/G_1) was considered fragmented. Both complexes at higher concentrations caused a significant DNA fragmentation ($p < 0.05$). Complex 1 led to 31.8 and 45.8% DNA fragmentation at the higher concentration after 24 and 48h, respectively. Complex 2 induced 23.6 and 31.9% DNA fragmentation at the higher concentration after 24 and 48 h, respectively. Piplartine induced 20.3 and 33.9% DNA fragmentation at the higher concentration after 24 and 48 h, respectively. Doxorubicin caused cell cycle arrest at the phase G_2/M that was followed by DNA fragmentation. Oxaliplatin also induced DNA fragmentation.

To determine whether the complexes-induced cytotoxicity results from cell apoptosis induction, we

performed annexin-V/PI double staining to identify the type of the cell death on HCT116 cells (Supplementary Figure 5 and Figure 8). The results clearly showed that both complexes increased the early and late apoptosis in a time- and concentration-dependent manners. None of complexes induced significant increase in necrotic cells. Moreover, co-treatment with a pan-caspase inhibitor, Z-VAD(OMe)-FMK, prevented the complexes-induced increasing of cell death by apoptosis (Supplementary Figure 6 and Figure 9A). In addition, co-treatment with Z-VAD(OMe)-FMK also prevented the reduction of the number of viable cells assessed by trypan blue exclusion assay (Figure 9B). The complexes also induced mitochondrial depolarization on HCT116 cells, as measured by the incorporation of rhodamine 123 using flow cytometry (Figure 10A). Considering that the complexes were causing cell death by apoptosis, we next studied the caspase-3 activation of complexes-induced apoptosis using Ac-DEVD-pNA as the substrate. Both complexes induced activation of caspase-3 on HCT116 cells (Figure 10B). Piplartine also induced increasing in the early and late apoptosis, which was prevented by co-treatment with Z-VAD(OMe)-FMK. Mitochondrial depolarization and activation of caspase-3 were observed on piplartine-treated HCT116 cells.

The cytotoxic activity of the complexes on BAD gene knockout immortalized mouse embryonic fibroblast (BAD KO SV40 MEF) and its parental cell line wild-type immortalized mouse embryonic fibroblast (WT SV40 MEF) was also performed by alamar blue assay after 72 h incubation. The IC_{50} values for piplartine, complexes 1 and 2 were 4.0, 3.2 and 4.0

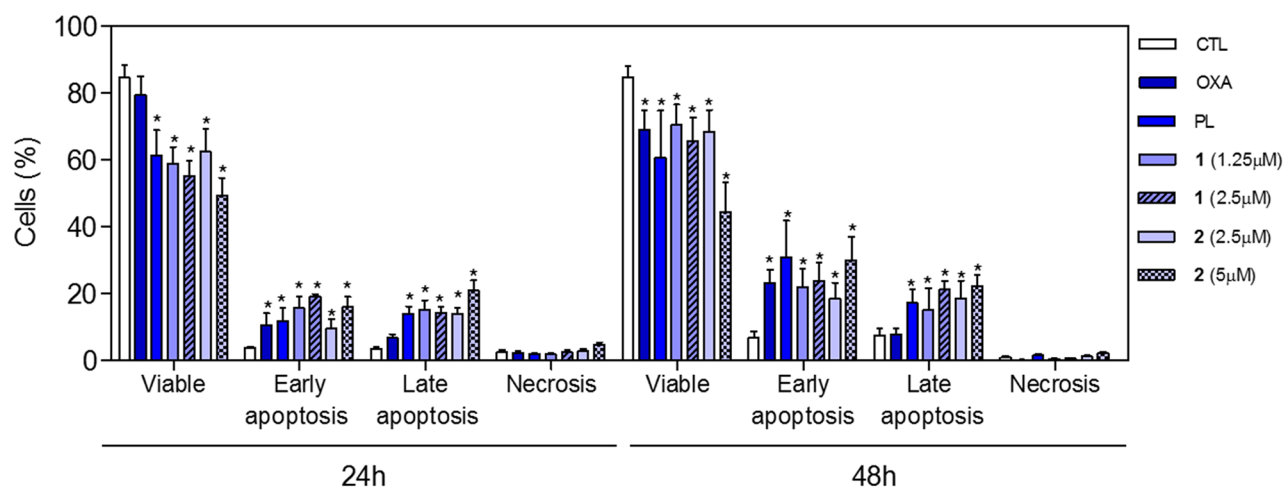


Figure 8: Effect of piplartine-containing ruthenium complexes in the induction of apoptosis on HCT116 cells determined by flow cytometry using annexin V-FITC/PI staining after 24 and 48h of incubation. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested. Doxorubicin (DOX, 1 µM), oxaliplatin (OXA, 3 µM) and piplartine (PL, 10 µM) were used as the positive controls. Data are presented as the mean ± S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. Ten thousand events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis. * $p < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA followed by Student Newman-Keuls test.

μM for BAD KO SV40 MEF cell line, while were 4.5, 2.4 and 6.0 μM for WT SV40 MEF cell line, suggesting that BAD gene is not essential for the cytotoxicity induced by piplartine or its ruthenium-based complexes.

Doxorubicin presents IC_{50} values of 0.41 and 0.04 μM , while 5-fluorouracil presents IC_{50} values of 7.3 and 1.7 μM on BAD KO SV40 MEF and WT SV40 MEF cell lines, respectively.

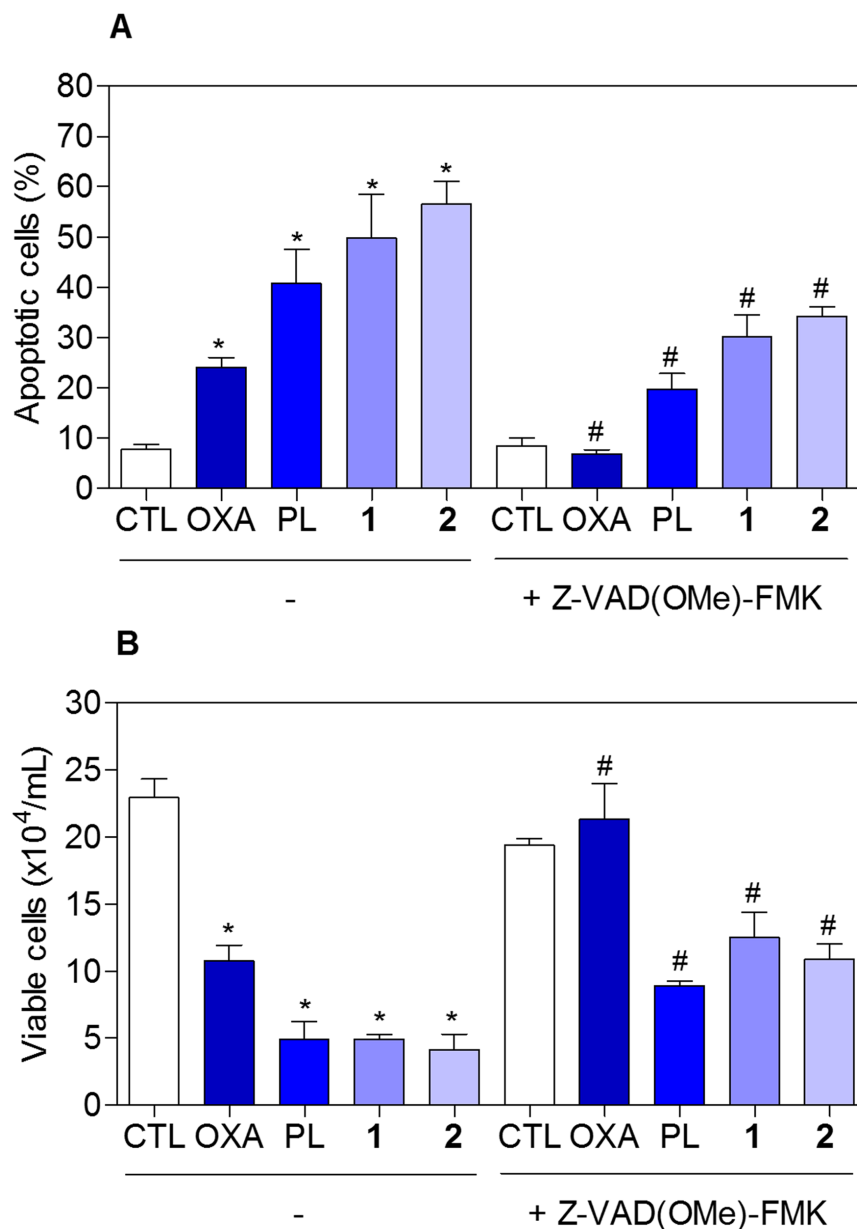


Figure 9: Effect of the pan-caspase inhibitor (Z-VAD(OMe)-FMK) in the apoptosis induced by piplartine-containing ruthenium complexes on HCT116 cells determined by flow cytometry using annexin V-FITC/PI staining. (A) Quantification of apoptotic cells (early + late apoptotic cells) determined by flow cytometry using annexin V-FITC/PI staining. **(B)** Quantification of the cell viability determined by trypan blue staining. The cells were pre-treated for 2 h with 50 μM Z-VAD(OMe)-FMK, then incubated with the complexes in the established concentration (2.5 μM for complex 1 and 5 μM for complex 2) for 48 h. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested. Doxorubicin (DOX, 1 μM), oxaliplatin (OXA, 3 μM) and piplartine (PL, 10 μM) were used as the positive controls. Data are presented as the mean \pm S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. For flow cytometry analysis, 10,000 events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis. * $p < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA followed by Student Newman-Keuls test. # $p < 0.05$ compared with the respective treatment without inhibitor by ANOVA followed by Student Newman-Keuls test.

Piplartine-containing ruthenium complexes increase ROS levels on HCT116 cells

The effect of piplartine-containing ruthenium complexes in intracellular ROS levels on HCT116 cells was determined by flow cytometry using the redox-sensitive fluorescent probe 2',7'-dichlorofluorescein

diacetate (DCF-DA). Treatment with both complexes for 1 h caused a marked increase in ROS levels (Figure 11A). In addition, co-treatment with the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC) fully prevented the increase in the intracellular ROS level induced by the complexes (Figure 11B). Further, co-treatment with catalase, that induces decomposition of hydrogen peroxide, also prevented

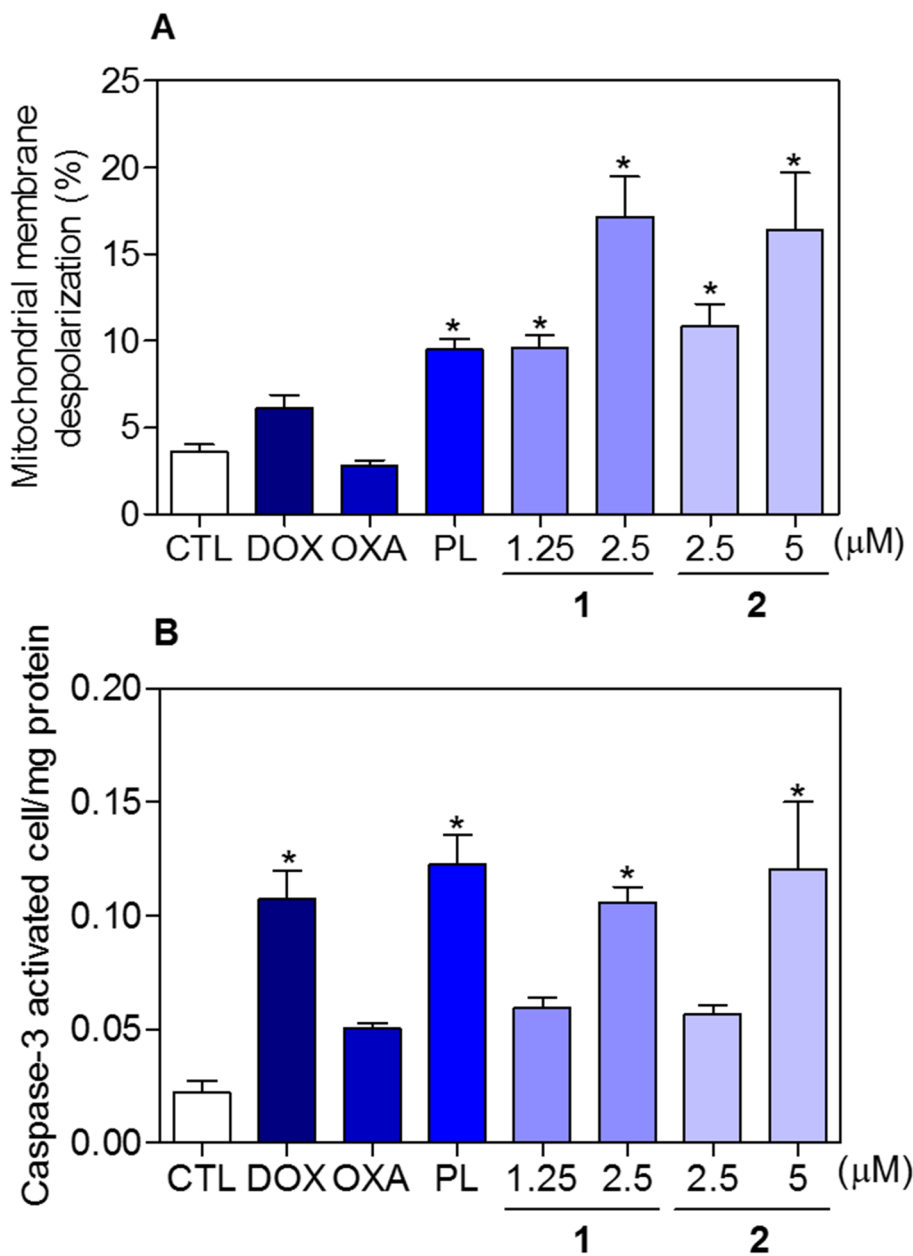


Figure 10: Effect of piplartine-containing ruthenium complexes in the mitochondrial membrane potential and caspase-3 activity on HCT116 cells. (A) Mitochondrial membrane potential determined by flow cytometry using rhodamine 123 staining after 24h of incubation. (B) Caspase-3 activity determined by colorimetric assay after 48h of incubation. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested. Doxorubicin (DOX, 1 μM), oxaliplatin (OXA, 3 μM) and piplartine (PL, 10 μM) were used as the positive controls. Data are presented as the mean ± S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. Ten thousand events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis. * $p < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA followed by Student Newman-Keuls test.

the complexes-induced increase in intracellular ROS levels, indicating the production of hydrogen peroxide induced by the complexes (Figure 11C). In a new set of experiments, we used the fluorescent probe hydroethidine

and the fluorescent probe 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM diacetate) for detect superoxide anion and nitric oxide, respectively. We found that superoxide anion (Figure 12A) and the nitric oxide

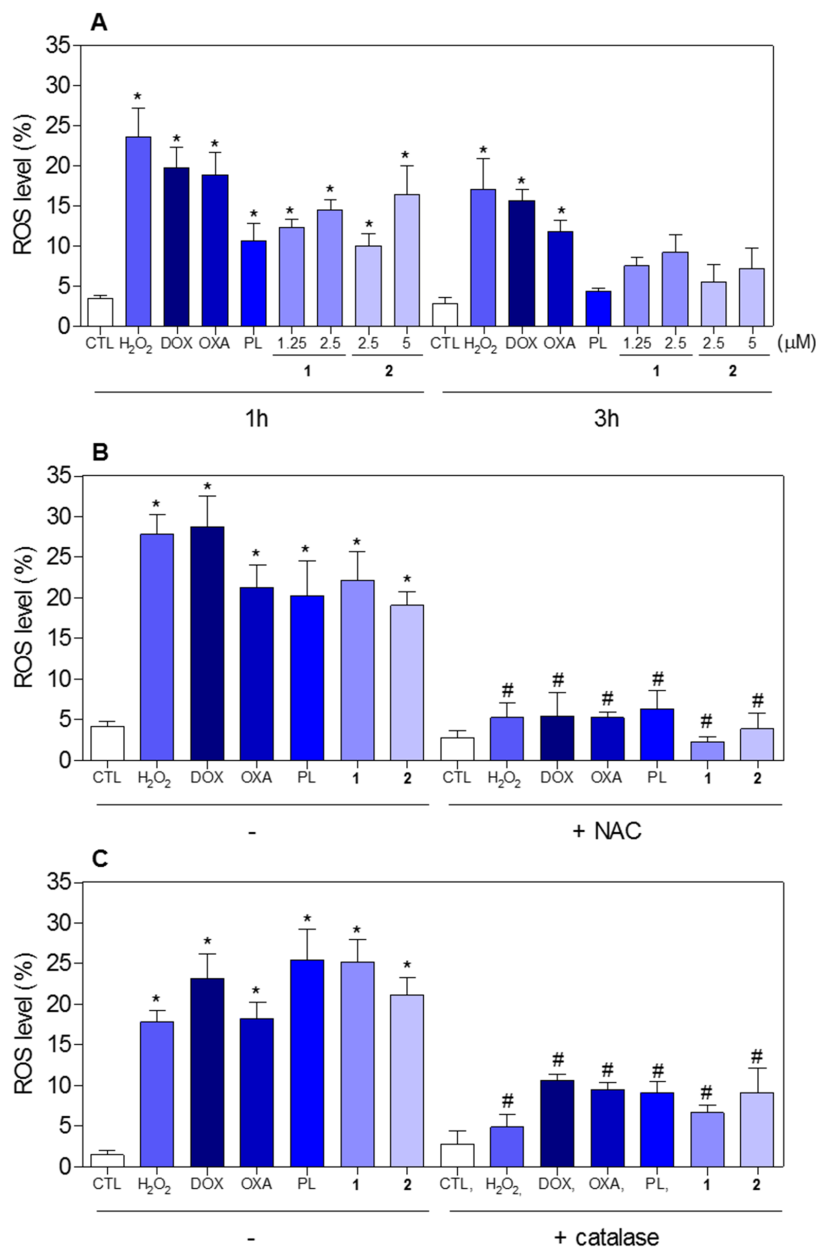


Figure 11: Effect of piplartine-containing ruthenium complexes in the levels of reactive oxygen species (ROS) of HCT116 cells and protection by NAC and catalase determined by flow cytometry using DCF-DA staining. (A) ROS levels of HCT116 cells after 1 and 3h of incubation. (B) ROS levels of HCT116 cells pre-treated with the antioxidant NAC and, then treated with the complexes. (C) ROS levels of HCT116 cells pre-treated with the antioxidant catalase and, then treated with the complexes. For the protection assay, the cells were pre-treated for 1 h with 5 mM NAC or 2,000UI catalase, then incubated with the complexes in the established concentration (2.5 μ M for complex 1 and 5 μ M for complex 2) for 1 h. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested. Hydrogen peroxide (H₂O₂, 200 μ M), doxorubicin (DOX, 1 μ M), oxaliplatin (OXA, 3 μ M) and piplartine (PL, 10 μ M) were used as the positive controls. Data are presented as the mean \pm S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate or triplicate. Ten thousand events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis. * $p < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA followed by Student Newman-Keuls test. # $p < 0.05$ compared with the respective treatment without inhibitor by ANOVA followed by Student Newman-Keuls test.

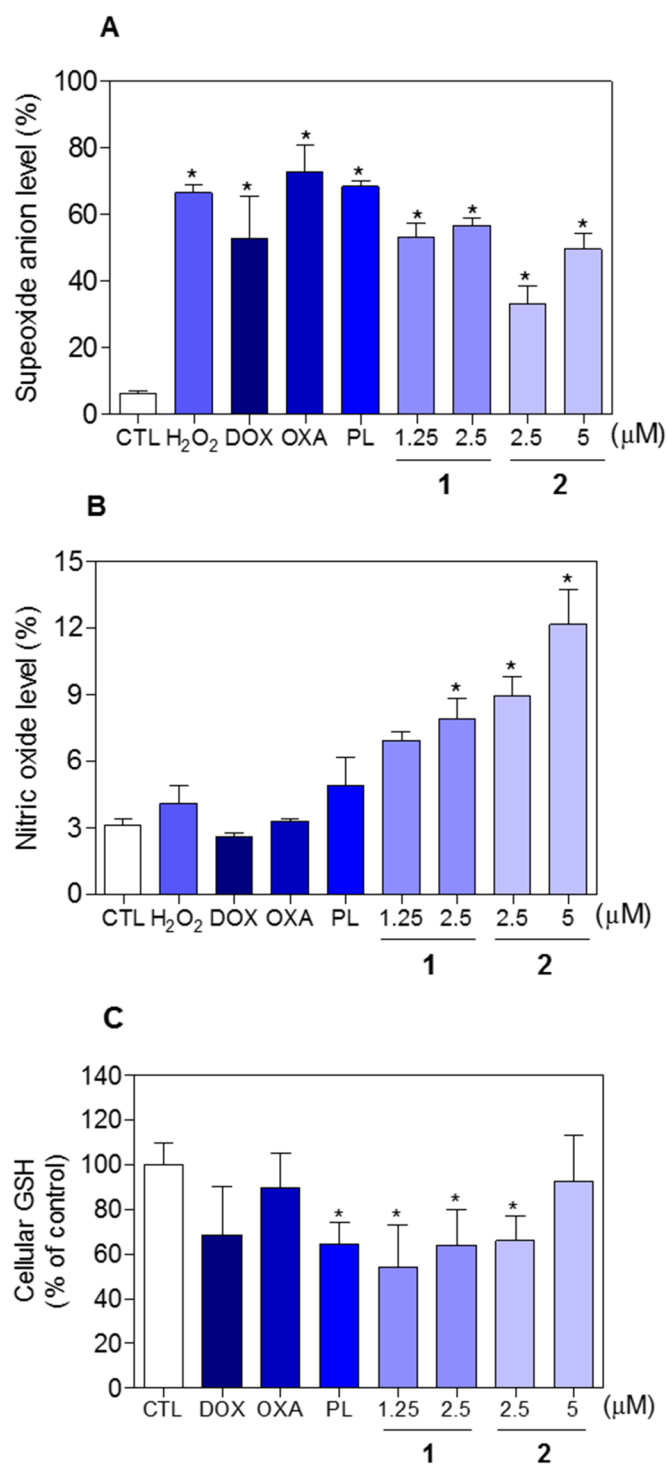


Figure 12: Effect of piplartine-containing ruthenium complexes in the levels of reactive oxygen species (ROS) and reduced glutathione (GSH) of HCT116 cells after 1 h incubation. (A) Superoxide anion level of HCT116 cells determined by flow cytometry using hydroethidine staining. (B) Nitric oxide level of HCT116 cells determined by flow cytometry using DAF-FM diacetate staining. (C) GSH level of HCT116 cells determined by colorimetric assay. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested. Hydrogen peroxide (H₂O₂, 200 µM), doxorubicin (DOX, 1 µM), oxaliplatin (OXA, 3 µM) and piplartine (PL, 10 µM) were used as the positive controls. Data are presented as the mean ± S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. For flow cytometry analysis, 10,000 events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis. * *p* < 0.05 compared with the negative control by ANOVA followed by Student Newman-Keuls test.

(Figure 12B) were also among the ROS induced by the complexes on HCT116 cells. The reduced glutathione (GSH) levels were also decreased in complexes-treated cells (Figure 12C). Furthermore, co-treatment with NAC, prevented the increase of the cell death by apoptosis induced by the complexes (Figure 13A and 13B) and the reduction of the number of viable cells, as assessed by trypan blue exclusion assay (Figure 13C). Piplartine also induced increasing oxidative stress, which was prevented by co-treatment with NAC.

Piplartine-containing ruthenium complexes do not induce DNA intercalation

Some ruthenium complexes can intercalate to DNA, thus we investigated if the piplartine-containing ruthenium complexes are able to induce DNA intercalation. DNA intercalation was assessed by examining the ability of the complexes to displace ethidium bromide from calf thymus DNA (ctDNA). For this, the complexes were added to a DNA-ethidium bromide mixture to assess if the

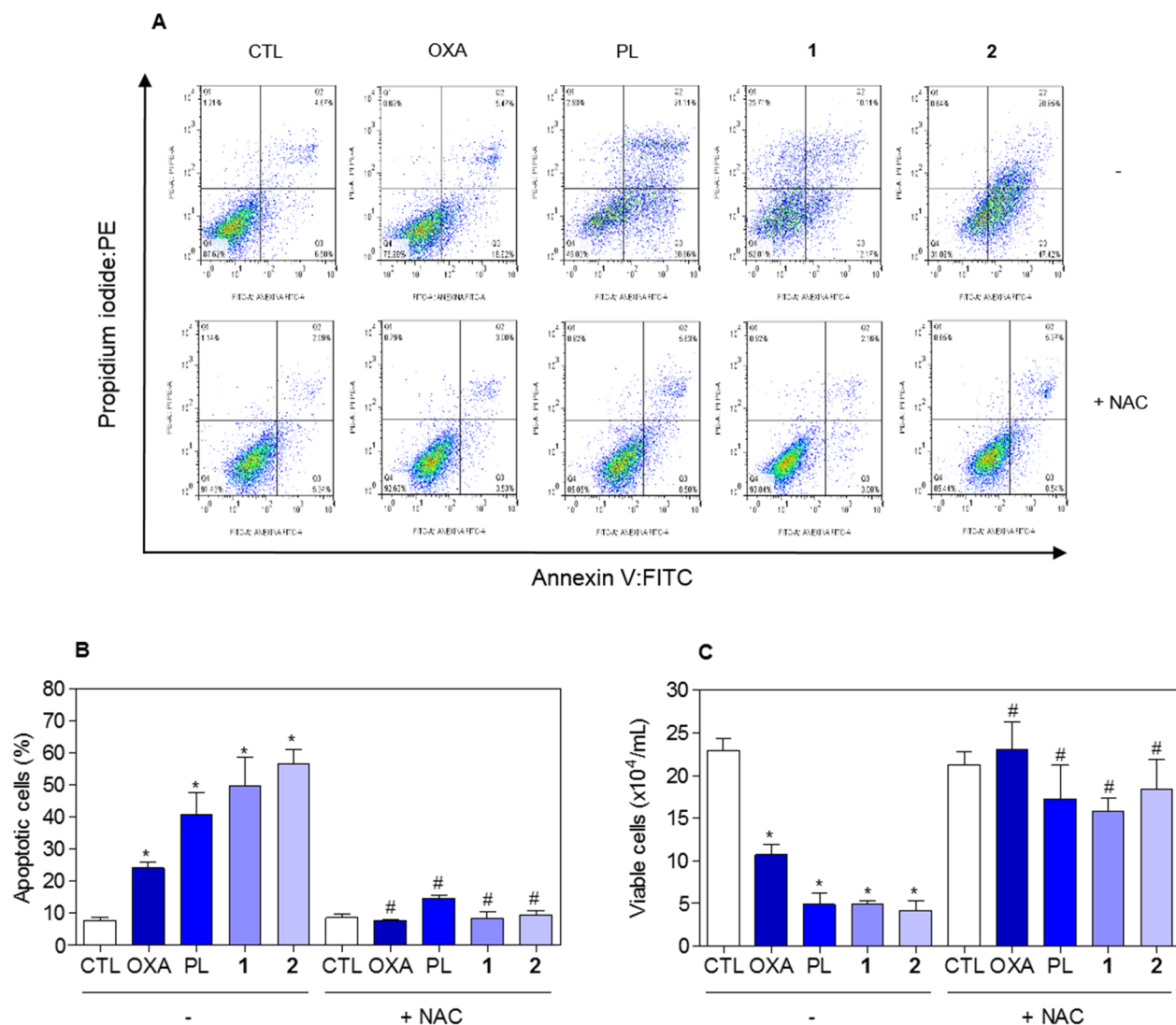


Figure 13: Effect of the antioxidant NAC in the apoptosis induced by piplartine-containing ruthenium complexes on HCT116 cells determined by flow cytometry using annexin V-FITC/PI staining. (A) Representative flow cytometric dot plots showing the percentage of cells in viable, early apoptotic, late apoptotic and necrotic stages. (B) Quantification of apoptotic cells (early + late apoptotic cells) determined by flow cytometry using annexin V-FITC/PI staining. (C) Quantification of the cell viability determined by trypan blue staining. The cells were pre-treated for 1 h with 5 mM NAC, then incubated with the complexes in the established concentration (2.5 μ M for complex 1 and 5 μ M for complex 2) for 48 h. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested. Doxorubicin (DOX, 1 μ M), oxaliplatin (OXA, 3 μ M) and piplartine (PL, 10 μ M) were used as the positive controls. Data are presented as the mean \pm S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. For flow cytometry analysis, 10,000 events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis. * $p < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA followed by Student Newman-Keuls test. # $p < 0.05$ compared with the respective treatment without inhibitor by ANOVA followed by Student Newman-Keuls test.

Table 4: The effect of piplartine-containing ruthenium complexes on gene expression of HCT116 cells

Gene symbol	Description	RQ			
		DOX	PL	1	2
<i>BCL2</i>	BCL2, apoptosis regulator	3.1	1.1	2.4	0.8
<i>CCND1</i>	cyclin D1	1.1	0.7	1.2	0.5
<i>CDH1</i>	cadherin 1	7.1	2.5	3.7	1.1
<i>CDKN2A</i>	cyclin dependent kinase inhibitor 2A	1.8	1.6	2.5	1.2
<i>CYCS</i>	cytochrome c, somatic	1.0	1.0	2.0	1.0
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor	0.8	1.2	1.3	11,276.3
<i>FADD</i>	Fas associated via death domain	1.1	0.4	0.6	74.1
<i>FN1</i>	fibronectin 1	3.6	2.0	3.8	N.d.
<i>FOS</i>	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	11.8	31.0	11.9	N.d.
<i>FYN</i>	FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	1.3	1.7	2.5	1.8
<i>FZD1</i>	frizzled class receptor 1	1.0	1.0	2.3	0.9
<i>GUSB</i>	glucuronidase beta	5.0	5.2	4.5	2.9
<i>IGF1R</i>	insulin like growth factor 1 receptor	1.4	2.1	2.3	0.7
<i>ITGA2B</i>	integrin subunit alpha 2b	4.5	3.0	3.1	0.1
<i>ITGAV</i>	integrin subunit alpha V	1.3	1.0	1.4	1,149.0
<i>JUN</i>	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	4.1	3.8	3.7	2.3
<i>KDR</i>	kinase insert domain receptor	N.d.	8.3	4.4	1.4
<i>MAP2K1</i>	mitogen-activated protein kinase kinase 1	0.7	0.8	0.8	2,107.2
<i>MAP3K5</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1.0	0.6	0.3	4.3
<i>MAPK3</i>	mitogen-activated protein kinase 3	2.8	1.7	2.0	1.9
<i>MAX</i>	MYC associated factor X	N.d.	3.1	3.6	0.9
<i>NFKBIA</i>	NF-κB inhibitor alpha	2.3	2.0	2.0	0.9
<i>PIK3R1</i>	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1	2.0	2.4	2.5	1.3
<i>PTEN</i>	phosphatase and tensin homolog	1.8	0.5	2.0	0.8
<i>PTK2</i>	protein tyrosine kinase 2	1.2	0.6	1.6	2.4
<i>PTK2B</i>	protein tyrosine kinase 2 beta	3.4	2.3	2.3	1.0
<i>RAC1</i>	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	0.9	0.7	1.1	2.7
<i>RAF1</i>	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	2.0	0.6	2.0	0.9
<i>SHC1</i>	SHC adaptor protein 1	0.6	0.2	0.4	N.d.
<i>SMAD4</i>	SMAD family member 4	1.0	0.9	1.4	2.1
<i>SOS1</i>	SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1	0.7	0.9	1.2	0.2
<i>SPP1</i>	secreted phosphoprotein 1	1.2	1.3	2.5	10.1
<i>TGFBR2</i>	transforming growth factor beta receptor 2	0.9	1.2	2.4	1.1
<i>TP53</i>	tumor protein p53	3.3	1.2	3.5	1.5

HCT116 cells were treated with 2.5 μM of complex 1 and 5 μM of complex 2 for 12 h. The negative control was treated with the vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested. Doxorubicin (DOX, 1 μM) and piplartine (PL, 10 μM) were used as the positive controls. After treatment, total RNA was isolated and reverse transcribed. Gene expression was detected using the 96-wellplate TaqMan® Array Human Molecular Mechanisms of Cancer. *GAPDH*, *18S* and *HPRT1* genes were used as endogenous gene for normalization. Values represent the relative quantitation (RQ) compared with the calibrator (cells treated with the negative control, RQ = 1.0). The genes were considered to be upregulated if RQ ≥ 2 and were considered to be downregulated if RQ ≤ 0.5. N.d. Not determined.

complexes compete with ethidium bromide and intercalate into DNA. If the complexes displace ethidium bromide from DNA, the fluorescence intensity of ethidium bromide decrease. None of complexes were able to decrease the ethidium bromide fluorescence, indicating that they are not strong DNA intercalators. Doxorubicin, a known DNA intercalator, significantly reduced fluorescence in this assay (data not shown).

Piplartine-containing ruthenium complexes alter gene expression on HCT116 cells

The effect of piplartine-containing ruthenium complexes on the expression of 92 genes involved in different cellular mechanisms, including cell proliferation, cell cycle, apoptosis, oxidative stress, metastasis and angiogenesis, was detected after 12h of incubation on HCT116 cells by PCR array using a 96-well plate TaqMan® Array Human Molecular Mechanisms of Cancer. A total of 31 genes were upregulated and 5 genes were downregulated after the treatment with piplartine-containing ruthenium complexes (Table 4). Among them, the genes *CDKN2A* (RQ = 2.5), *FOS* (RQ = 11.9), *JUN* (RQ = 3.7), *NFKBIA* (RQ = 2.0), *PTEN* (RQ = 2.0) and *TP53* (RQ = 3.5) were upregulated in the cells treated with the complex **1**, while the gene *SHC1* (RQ = 0.4) was downregulated. After the treatment with the complex **2**, *FADD* (RQ = 74.1) and *JUN* (RQ = 2.3) were among the genes upregulated, while *CCND1* (RQ = 0.5) was among the genes downregulated. Doxorubicin and piplartine also induced change in different genes, including the upregulation of *FOS* (RQ = 11.8), *JUN* (RQ = 4.1), *NFKBIA* (RQ = 2.3) and *TP53* (RQ = 3.3) for doxorubicin and *FOS* (RQ = 31.0), *JUN* (RQ = 3.8) and *NFKBIA* (RQ = 2.0) for piplartine that also reduced the expression of the gene *SHC1* (RQ = 0.2).

Interestingly, complex **2** increased substantially the expression of *EGFR* gene (RQ = 11,276.3). The activation of this class of receptor leads to cell proliferation, which is target of the class of drugs tyrosine kinase inhibitors. Although this being an unexpected effect, the increase of *EGFR* gene expression on cancer cells can take it more susceptible to tyrosine kinase inhibitors, indicating a potential synergic effect of complex **2** with this class of drugs.

DISCUSSION

Piplartine is a well characterized cytotoxic agent, able to induce ROS selectively in different cancer cells, leading to cell death by apoptosis [3–18]. Many piplartine analogs have been synthesized and evaluated against cancer cells; however, this class of compounds has never been employed as ligand for composition of metal complexes. In this present paper, two novel

piplartine-containing ruthenium complexes were designed, synthesized and evaluated for their cytotoxic potential.

The ruthenium complexes produced in our study were tested against cancer cells, showing potent cytotoxic activity. Other studies have shown that complexes of ruthenium with different ligands can induce cytotoxic activity in micromolar or molar range against several cancer cell lines [44–46]. Moreover, piplartine is able to kill cancer cells of different histological types, including hematological, colon, melanocyte, lung, breast, central nervous system, pancreatic, nasopharyngeal, osseous, bladder, renal, and prostate in micromolar range [10, 12, 18]. In the present work, both piplartine-containing ruthenium complexes showed cytotoxic activity up to 12 fold higher than metal-free piplartine. In 3D culture that mimics the *in vivo* cancer tissue, the piplartine-containing ruthenium complexes were also more potent in inducing cytotoxicity than metal-free piplartine.

Regarding their mechanism of action, the piplartine-containing ruthenium complexes were shown to induce caspase-dependent and mitochondrial intrinsic apoptosis on HCT116 cells as observed by cell shrinkage, internucleosomal DNA fragmentation without alter the cell membrane permeabilization, externalization of phosphatidylserine, loss of mitochondrial transmembrane potential and marked activation of caspase-3. In addition, the apoptosis induction and the reduction of the number of viable cells were prevented by pre-treatment with Z-VAD(OMe)-FMK, a pan-caspases inhibitor.

Several studies have shown that piplartine induces cell death by triggering apoptosis pathway. Piplartine was shown to reduce the number of viable cells and induces cell apoptosis on HCT116 cells by JNK signaling pathway [23], and induces apoptosis and autophagy through modulation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in human lung cancer cells [22]. It can also induce apoptotic cell death and suppress the DNA binding activity of NF- κ B in a concentration-dependent manner in non-small cell lung cancer cells [15]. The ruthenium complexes can also induce apoptosis of cancer cells through pathways mediated by death receptor, mitochondria and/or endoplasmic reticulum stress. The binding behavior of ruthenium complexes with DNA, especially with Gquadruplex DNA may play an important role in the DNA damage of cancer cells [44–51]. In our study, however, the piplartine-containing ruthenium complexes failed to induce DNA intercalation, despite being able to induce cell death by apoptosis.

As mentioned above, piplartine induces ROS increase and apoptotic cell death on cancer cells [10, 12]. Additionally, piplartine induces a lethal endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction by inhibiting TrxR1 activity and increasing intracellular ROS levels [25]. It is well-known that ruthenium (II) complexes can induce apoptosis through ROS-mediated pathway

in cancer cells [44, 46]. Therefore, since ruthenium complexes and piplartine have been described as ROS inductor agents, we measured the ROS level in cells treated with piplartine-containing ruthenium complexes. In fact, piplartine-containing ruthenium complexes were also able to increase ROS level, assigned to nitric oxide, superoxide anion and hydrogen peroxide. GSH levels were also decreased in complexes-treated cells. Interestingly, the pre-treatment with the antioxidant NAC prevented the apoptosis induction and the reduction of the number of viable cells caused by both piplartine-containing ruthenium complexes, indicating ROS-mediated apoptosis cell death pathway.

The molecular mechanism underlying the cytotoxic effect of piplartine-containing ruthenium complexes was assessed at the level of mRNA expression of several genes. In special, it was observed the increasing of the expression of *CDKN2A*, *FOS*, *JUN*, *NFKBIA*, *TP53* and *FADD*, and reduction of the expression of *SHC1* and *CCND1*. *CCND1* (cyclin D1) gene is involved in the cell cycle G₁/S transition. Moreover, *CDKN2A* (cyclin dependent kinase inhibitor 2A) gene was upregulated. Jyothi et al. [16] demonstrated that piplartine is able to reduce the protein levels of cyclin D1 in the mouse embryonal carcinoma cell line. Ruthenium benzimidazole complex also have been reported as a cyclin D1 inhibitor [44]. The protein encoded by *FADD* (Fas associated via death domain) gene mediates cell apoptotic signals. *FOS* (Fos proto-oncogene) gene encode proteins that can dimerize with proteins of the JUN (Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit) family leading to the formation of the transcription factor complex AP-1, which is involved in the transcription of some pro-apoptotic proteins [52, 53]. Furthermore, JNK-AP-1 pathway is involved in the increase of the expression of pro-apoptotic genes, including Fas-L and Bak [54]. In fact, several apoptotic-related genes have been also associated with the effect of ruthenium complexes and/or piplartine on cancer cells [22, 23, 44, 46, 48, 51]. In addition, Li et al. [23] demonstrated that piplartine can induce apoptosis on HCT116 cells by JNK signaling pathway. In this present work, we also observed that piplartine-containing ruthenium complexes are able to induce caspase-dependent and mitochondrial intrinsic apoptosis on HCT116 cells. *NFKBIA* (NF-κB inhibitor alpha) gene encodes a member of NF-κB inhibitor family. As mentioned above, piplartine can lead to apoptotic cell death by NF-κB inhibition in non-small cell lung cancer cells [15]. The *TP53* (tumor protein p53) gene encodes a tumor suppressor protein. Interestingly, cell death induced by piplartine has been observed by both dependent and independent p53 signaling [12]. Thiazolo arene ruthenium complexes also can induce cell death by p53 signaling in cisplatin-sensitive and cisplatin resistant ovarian cancer cells [55]. The gene *SHC1* (SHC adaptor protein 1) belong to the mammalian Shc family, composed by p52Shc, p46Shc and p66Shc isoforms. Curiously, p66Shc

has antioxidant action on the cytoplasm. As mentioned above, piplartine and several ruthenium complexes have been reported as ROS inducers [10, 12, 46]. Here, we also observed that piplartine-containing ruthenium complexes induce ROS.

The similarity between the mechanism of action of piplartine and their ruthenium-based complexes suggests that the complexes can be acting as carriers of piplartine, increasing its bioavailability mainly due to the lability of the coordinated molecule from the complexes, in the presence of water. The ability of release ligands through the aquation reaction has already been reported to other ruthenium compounds, such as NAMI/NAMI-A complexes [31, 56].

In conclusion, the novel piplartine-containing ruthenium complexes **1** and **2** display more potent cytotoxicity than metal-free piplartine against different cancer cell lines and are able to induce caspase-dependent and mitochondrial intrinsic apoptosis on HCT116 cells by ROS-mediated pathway. No DNA intercalation was observed with piplartine-containing ruthenium complexes. Additionally, the level of mRNA expression of several genes, including cell proliferation, cell cycle, apoptosis and oxidative stress were regulated under treatment. Thus, the novel piplartine-containing ruthenium complexes are more potent than metal-free piplartine, and, similar piplartine, target the oxidative stress.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of novel piplartine-containing ruthenium complexes

General

All procedures involving solutions of the complexes were performed under inert atmosphere (argon). The solvents used in the manipulations were purified by standard methods. The RuCl₃·3H₂O, 1,4-bis(diphenylphosphino)butane (dppb), 1,1-bis(diphenyl phosphino)ferrocene (dppf), 2,2'-bipyridine (bipy), were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) and the piplartine was purchased from Cayman Chemical Company (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). The precursors *cis*-[RuCl₂(dppb)(bipy)] and *cis*-[RuCl₂(dppf)(bipy)], were prepared according to published procedures [34, 39].

The vibrational spectroscopy in the infrared region was recorded on a FT-IR Bomem Michelson 102 spectrometer in the 4000 – 350 cm⁻¹ region using KBr pellets. Conductance data were performed in dry acetone, using a Micronal model B-330 connected to a platinum electrode, with 0.089/cm constant cell, using 1 mM solutions of the complexes, at room temperature. The elemental analyses were performed with EA 1108 CHNS microanalyser (Fisons Instruments), in the

Microanalytical Laboratory of the Chemistry Department of the Federal University of São Carlos. Electrochemical experiments (cyclic and pulse voltammetry) were carried out at 25 °C in CH₂Cl₂ containing 0.10 M Bu₄NClO₄ (tetrabutylammonium perchlorate, TBAP), recorded with a Bioanalytical Systems Inc electrochemical analyzer, model BAS-100B/W. The working and auxiliary electrodes were stationary platinum; a system Ag/AgCl in Luggin capillary probe was used as a reference electrode. Under these conditions, the ferrocene couple (Fc⁺/Fc) is oxidized at 0.43 V. The NMR experiments (¹H, ¹³C{¹H}, ³¹P{¹H}, ¹H-¹H gCOSY, ¹H-¹³C{¹H} gHSQC and DEPT-135) were recorded on a Bruker DRX 400 Ultrashield™ (400.132 MHz for hydrogen frequency, 100.623 MHz for carbon frequency and 161.976 MHz for phosphorous frequency), referenced with TMS (tetramethylsilane). In the ¹H, ¹³C{¹H}, ¹H-¹H gCOSY, ¹H-¹³C{¹H} gHSQC and DEPT-135 experiments, 25 mg of final metal complexes were dissolved in deuterated acetone (DMSO-*d*₆, Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA). ³¹P{¹H} stability experiments are reported in relation to H₃PO₄ (85% v/v), using a capillary containing D₂O.

[Ru(piplartine)(dppf)(bipy)](PF₆)₂ (1)

To a Schlenk flask containing 10 mL of dichlorometane and 10 mL of acetone, the *cis*-[RuCl₂(dppf)(bipy)] (0.066 mmol) and piplartine (0.099 mmol) were added. After the complete solubilization of the solids, 0.165 mmol of AgPF₆ was added, forming, immediately, a white precipitate. The solution was kept at room temperature and darkness, under an inert atmosphere and under stirring for 1 h. Next, the solvent was reduced to 2 mL, and 10 mL of CH₂Cl₂ was added, to form a white powder (AgCl), which was filtered off. The filtered solution was concentrated to 3 mL and hexane (10 mL) was added to precipitate an orange powder, which was filtered off, washed with hexane, diethyl ether, and dried under vacuum. Yield: 70 mg (87%). Anal. Calc. for [C₆₁H₅₅FeN₃O₅P₂Ru](PF₆)₂; exp. (calc) C, 51.76 (51.64); H, 3.75 (3.91); N, 2.65 (2.96) %. Molar conductance (S cm² mol⁻¹, acetone) 193.9. IR (cm⁻¹): (nCH) 3093, (nCH₂) 2942, (nCH) 2845; (nC=O) 1650; (nC=N) 1598; (nC=C and vC=N) 1544, 1502, 1434, 1421, 1332, 1305; (nC-O) 1122; (nP-C) 1093; (n_{ring}) 1000; (nP-F) 844; (nC-H-cp) 750; (nP-CH) 636; (δP-F) 557; (nRu-P) 520 and 495; (nRu-O + nFe-cp) 474; (nRu-N) 428. ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, *d*₆-acetone, 298 K): δ (ppm) (d, 39.1; 39.3 / 43.1; 45.9, ²J = 29.6 / 30.3 Hz); ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-acetone, 298 K): δ (ppm): 9.00, 8.93 (1H, d, bipy); 8.56, 8.50 (2H, br. s, bipy); 8.30 (0.5H, s, bipy) 8.14 (2H, m, bipy); 7.76–6.87 (28H, m, Ho, Hm and Hp of dppf, 2.5H bipy, 2H, H_{aromatic} of piplartine, 3H H_{double} piplartine); 6.74, 6.11 (1H, d, H_{double} piplartine); 5.20 – 4.42 (8H, m, cp of ferrocene); 4.02 - 3.95 (5H, s+m) (CH₃ + CH₂ of piplartine), 3.88 (1.5H, s), 3.80 (3H, s), 3.76 (1.5H, s) (CH₃ of piplartine); and 2.55 – 2.44 (2H, m,

CH₂ piplartine). ¹³C{¹H} NMR (125.74 MHz, *d*₆-acetone, 298 K): δ (ppm) 174.22, 172.29, 171.92, 170.38 (C=O); 163.50–150.64 (C-Bipy, C-piplartine); 143.53 – 108.16 (C-dppb, C-Bipy, C-piplartine); 81.30 – 73.29 (C-cp ferrocene), 60.93 – 56.83 (CH₃ of piplartine) and 48.70 – 48.40, 25.15 – 24.95 (CH₂ of piplartine).

[Ru(piplartine)(dppb)(bipy)](PF₆)₂ (2)

For the synthesis of this complex the same procedure of complex **1** was used. Yield: 75 mg (88%). Anal. Calc. for [C₅₅H₅₅N₃O₅P₂Ru](PF₆)₂; exp. (calc) C, 50.85 (51.17); H, 4.45 (4.29); N, 3.04 (3.25) %. Molar conductance (S cm² mol⁻¹, acetone) 193.9. IR (cm⁻¹): (vCH) 3061, (vCH₂) 2936, (vCH) 2862; (vC=O) 1651; (vC=N) 1600; (vC=C and vC=N) 1579, 1501, 1463, 1435, 1421, 1328, 1304; (vC-O) 1122; (vP-C) 1096; (v_{ring}) 1002; (vP-F) 842; (vC-H-cp) 743; (vP-CH₂) 698; (δP-F) 557; (vRu-P) 520 and 489; (vRu-O) 491; (vRu-N) 447. ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, *d*₆-acetone, 298 K): δ (ppm) (d, 39.4; 42.3 / 41.0; 41.7, ²J = 32.6 / 34.9 Hz); ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-acetone, 298 K): δ (ppm): 8.79, 8.69 (1H, d, bipy); 8.71, 8.60 (1H, br. s, bipy); 8.38 – 8.33 (1H, d, bipy); 8.25 (1H, d, bipy); 7.06 (1H, s, H_{arom} of piplartine); 6.93 (1H, s, H_{arom} of piplartine); 8.22 – 6.18 (29H, m, Ho, Hm and Hp of dppb, bipy, H_{double} of piplartine); 3.94 (3H, s), 3.89 (1.5H, s), 3.81 (3H, s), 3.79 (1.5H, s) (CH₃ of piplartine); 4.12 – 4.01, 3.59 – 3.45, 3.18 – 2.98, 2.75 – 2.14 and 1.58 (12H, m, CH₂ of dppb and CH₂ of piplartine). ¹³C{¹H} NMR (125.74 MHz, *d*₆-acetone, 298 K): δ (ppm) 173.76, 172.05, 171.69, 170.68 (C=O); 162.35–150.09 (C-Bipy, C-piplartine); 143.51 – 108.11, (C-dppb, C-Bipy, C-piplartine); 60.80 – 56.77 (CH₃ of piplartine) and 48.52 – 48.14 (CH₂ of piplartine) and 28.90 – 23.31 (CH₂ of piplartine and CH₂ of dppb).

Cells

HCT116 (human colon carcinoma), HepG2 (human hepatocellular carcinoma), HSC-3 (human oral squamous cell carcinoma), SCC-4 (human oral squamous cell carcinoma), SCC-9 (human oral squamous cell carcinoma), HL-60 (human promyelocytic leukemia), K-562 (human chronic myelogenous leukemia), B16-F10 (murine melanoma), MRC-5 (human lung fibroblast), WT SV40 MEF (wild-type immortalized mouse embryonic fibroblast) and BAD KO SV40 MEF (BAD gene knockout immortalized mouse embryonic fibroblast) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultured in RPMI-1640 medium (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) with 10% fetal bovine serum (Life, Carlsbad, CA, USA), 2 mM L-glutamine (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, RJ, Brazil) and 50 µg/mL gentamycin (Life, Carlsbad, CA, USA). Adherent cells were collected by treatment with 0.25% trypsin EDTA solution (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). All cell lines were cultured in flasks at 37°C in 5% CO₂ and sub-cultured every 3–4 days to maintain exponential growth. All cell lines were tested

for mycoplasma using a mycoplasma stain kit (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) to validate the use of cells free from contamination.

Heparinized blood from 20-35 year-old, non-smoker healthy donors who had not taken any drugs for at least 15 days prior to sampling was collected, and the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using a ficoll density gradient in a GE Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden). PBMCs were washed and resuspended at a concentration of 3×10^5 cells/mL in RPMI 1640 medium with 20% fetal bovine serum, 2 mM glutamine and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin at 37°C with 5% CO_2 . Concanavalin A (ConA, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) was used as a mitogen to trigger cell division in T-lymphocytes. ConA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added at the beginning of culture, and the cells were treated with the test compounds after 24 h. Cell viability was examined using trypan blue exclusion assay for all experiments. Over 90% of the cells were viable at the beginning of the culture. The Research Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (Salvador, Bahia, Brazil) approved the experimental protocol (# 031019/2013). All participants signed a written informed consent to participate in the study.

Cytotoxic activity assay

Cell viability was quantified using the alamar blue assay, according to Ahmed et al. [57]. Cells were inserted in 96-well plates for all experiments (7×10^4 cells/mL for adherent cells or 3×10^5 cells/mL for suspended cells in 100 μL of medium). After 24 h, the complexes (in a range of eight different concentrations from 0.19 to 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were dissolved in 0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water and the solution was added to each well and incubated for 72h. Negative controls received the vehicle that was used for diluting the compounds tested. Doxorubicin (purity $\geq 95\%$, doxorubicin hydrochloride, Laboratory IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina), oxaliplatin (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) and piplartine (purity $> 98\%$, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) were used as the positive controls. Four (for cell lines) or 24 h (for PBMCs) before the end of incubation, 20 μL of a stock solution (0.312 mg/mL) of the alamar blue (resazurin, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) were added to each well. Absorbance at 570 nm and 600 nm was measured using the SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), and the drug effect was quantified as the percentage of control absorbance.

3D multicellular spheroids culture

HCT116 cells were cultivated in 3D multicellular spheroids. Briefly, 100 μL of a solution of cells (0.5×10^6 cells/mL) were inserted in 96-well plate with a cell-

repellent surface (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) and cultured in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 3% matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin at 37°C with 5% CO_2 . Spheroids with stable structures and diameters had formed after three days. Then, the complexes (in a range of eight different concentrations varying of 0.19 to 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were dissolved in 0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water and the solution was added to each well and incubated for 72h. Negative control received the vehicle that was used for diluting the compounds tested. In the end of the experiment, morphological changes were examined by light microscopy (Olympus BX41, Tokyo, Japan) using Image-Pro software (Media Cybernetics, Inc. Silver Spring, USA) and the cell viability was determined by alamar blue assay as described above.

To investigate the mechanisms involved in cytotoxic action of the complexes, a new set of experiments was performed. In all experiments, 2 mL of a HCT116 cell solution (7×10^4 cells/mL) was inserted in 24-well plates and incubated overnight to allow the cells to adhere to the plate surface. The cells were then treated for 24 and/or 48 h with the complexes (1.25 and 2.5 μM for complex 1 and 2.5 and 5 μM for complex 2). The negative control was treated with the vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested. The stability of the complexes in the vehicle (70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) was evaluated, which the complexes remained stable. Doxorubicin (1 μM), oxaliplatin (3 μM) and piplartine (10 μM) were used as the positive controls. Cell viability was assessed using trypan blue exclusion assay for all experiments.

Morphological analysis

To evaluate alterations in morphology, cells were cultured under coverslip and stained with may-grunwald-giemsa. Morphological changes were examined by light microscopy using Image-Pro software. In addition, light scattering features was determined by flow cytometry on a BD LSRFortessa cytometer using the BD FACSDiva Software (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) and Flowjo Software 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Ten thousand events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis.

Internucleosomal DNA fragmentation and cell cycle distribution

Cells were harvested in a permeabilization solution containing 0.1% triton X-100 (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA), 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA), 0.1% sodium citrate and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase (Sigma Chemical Co. St Louis,

MO, USA) and incubated in the dark for 15 min at room temperature [58]. Finally, cell fluorescence was measured by flow cytometry as described above.

Annexin-V/PI staining assay

For apoptosis detection, we used a FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) and the analysis were performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells treated were collected after the indicated time, washed twice with cold saline and resuspended in 300 μ L binding buffer. Then, it was added 5 μ L of Annexin V-FITC staining buffer and 5 μ L of propidium iodide. The mixture was incubated in the dark at 37°C for 15 min. Cell fluorescence was measured by flow cytometry as described above.

The protection assay using the pan-caspase inhibitor, Z-Val-Ala-Asp-(OMe)-Fluoromethyl Ketone (Z-VAD(OMe)-FMK, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), was performed. In brief, the cells were pre-treated for 2 h with 50 μ M Z-VAD(OMe)-FMK, then incubated with the complexes in the established concentration for 48 h. The cells were then trypsinized and the FITC Annexin V Apoptosis Detection assay and trypan blue exclusion assay were conducted as described above.

Measurement of the mitochondrial transmembrane potential

Mitochondrial transmembrane potential was determined by the retention of the dye rhodamine 123 [59]. Cells were incubated with rhodamine 123 (5 μ g/mL, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) at 37 °C for 15 min in the dark and washed with saline. The cells were then incubated again in saline at 37 °C for 30 min in the dark and cell fluorescence was determined by flow cytometry as described above.

Caspase-3 activation assay

A caspase-3 colorimetric assay kit (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) was used to investigate caspase-3 activation on complexes-treated HCT116 cells based on the cleavage of Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-pNA and the analysis was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were lysed by incubation with cell lysis buffer on ice for 10 min and then centrifuged. Enzyme reactions were carried out in a 96-well flat-bottom microplate. To each reaction mixture, 5 μ L cell lysate was added. Absorbance at 405 nm was measured using the SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). The results were expressed as specific activity (IU/mg protein) of caspase-3.

Measurement of cellular reactive oxygen species levels

The levels of ROS were measured according to previously described [60] using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA). In brief, cells were treated with the complexes for 1 and 3 h. Then, the cells were collected, washed with saline and resuspended in FACS tubes with saline containing 5 μ M DCF-DA for 30 min. Finally, the cells were washed with saline and the cell fluorescence was determined by flow cytometry as described above.

The protection assay using the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) or catalase (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) was performed. In brief, the cells were pre-treated for 1 h with 5 mM NAC or 2,000 UI catalase, then incubated with the complexes in the established concentration for 1 h. The cells were then trypsinized and the ROS levels were measured as described above. In a new set of experiments, the cells were pre-treated for 1 h with 5 mM NAC, then incubated with the complexes in the established concentration for 48 h. The cells were then trypsinized and the FITC Annexin V Apoptosis Detection assay and trypan blue exclusion assay were conducted as described above.

Measurement of cellular superoxide anion level

Hydroethidine (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) was used to detect cellular superoxide levels after 1 h of treatment with the complexes [61]. The cells were labeled with 10 μ M of hydroethidine for 30 min. Finally, the cells were washed with saline and the cell fluorescence was determined by flow cytometry as described above.

Measurement of nitric oxide production

Nitric oxide generation was detected with DAF-FM diacetate (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) [62]. The cells were labeled with 3 μ M of DAF-FM diacetate for 60 minutes at 37°C. Following staining cells were washed with saline and incubated for an additional 15 minutes at 37°C to allow for complete deesterification of the intracellular diacetates. Then the nitric oxide radical was measured by flow cytometry as described above.

Measurement of cellular GSH level

A quantification kit for reduced glutathione (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) was used to investigate cellular GSH level on complexes-treated HCT116 cells and the analysis was performed according to the manufacturer's instructions. Absorbance at 405 nm

was measured using the SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

DNA intercalation assay

DNA intercalation was assessed by examining the ability of the complexes to displace ethidium bromide from calf thymus DNA (ctDNA, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) [63]. Sexuplicate assays (100 μ L) were conducted in 96-well plates and contained 15 μ g/mL ctDNA, 1.5 μ M ethidium bromide and 5, 10 and 20 μ M of each complexes in saline solution. The vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested was also used as the negative control. Doxorubicin (10 μ M) was used as the positive control. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 320 nm and 600 nm, respectively using the spectraMax Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Gene expression analysis by PCR array

HCT116 cells were plated in bottles tissue culture (7×10^4 cells/mL). After 12h of incubation with the complexes, total RNA was isolated from the cells using the RNeasy Plus mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The RNA was evaluated by fluorimetry (QuBit™, Life Technologies, Camarillo, CA, EUA). RNA reverse transcription was performed using Superscript VILO™ (Invitrogen Corporation, Waltham, MA, USA). A 96-well plate TaqMan® Array Human Molecular Mechanisms of Cancer (ID 4418806, Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA) was used for the gene expression study by qPCR. The reactions were conducted in the ABI ViiA7 (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA). The cycle conditions comprised 2 min at 50 °C, 20 s at 95 °C, then 40 cycles of 3 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. The relative quantification (RQ) of mRNA expression were calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [64] using the Gene Expression Suite™ Software (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA) and the cells treated with the negative control (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) was used as calibrator. The *GAPDH*, *18S* and *HPRT1* genes were used for normalization. All experiments were performed in DNase/RNase free conditions. The genes were considered to be upregulated if $RQ \geq 2$, which means that the gene expression in the compound-treated cells was at least twice that in the negative control-treated cells. Similarly, the genes were considered to be downregulated if $RQ \leq 0.5$, which means that the gene expression in the compound-treated cells was half or less than half that in the negative control-treated cells.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm S.E.M. or IC_{50} values and their 95% confidence intervals (CI 95%) obtained by nonlinear regression. Differences between experimental groups were compared using analysis of variance (ANOVA) followed by the Student–Newman–Keuls test ($p < 0.05$). All statistical analyses were performed using GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, USA).

Abbreviations

3D: three-dimensional; ATCC: american type culture collection; CCND1: cyclin D1; CDKN2A: cyclin dependent kinase inhibitor 2A; ConA: concanavalin A; CV: cyclic voltammetry; ctDNA: calf thymus DNA; DAF-FM diacetate: 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate; DCF-DA: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DPV: differential pulse voltammetry; FADD: fas associated via death domain; FOS: fos proto-oncogene; FSC: forward light scatter; GSH: reduced glutathione; JUN: jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit; NAC: N-acetyl-L-cysteine; NFKBIA: NF- κ B inhibitor alpha; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; PF_6^- : hexafluorophosphate anion; ROS: reactive oxygen species; RQ: relative quantities; SCC: side scatter; SHC1: SHC adaptor protein 1; TBAP: tetrabutylammonium perchlorate; TP53: tumor protein p53; Z-VAD(OMe)-FMK: Z-Val-Ala-Asp-(OMe)-fluoromethyl ketone.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: DRMM, MBPS, CAGR, AAB and DPB. Performed the synthesis and structural characterization of the novel complexes: JHAN. Performed the cellular effect of the novel complexes: COSC and IRSB. Performed the molecular effect of the novel complexes: RBD, LFV, MTAV and CBSS. Analyzed the data: JHAN, AAB, COSC, IRSB, CBSS, CAGR and DPB. Contributed reagents/materials/analysis tools: MBPS, CAGR, AAB and DPB. Wrote the paper: JHAN, AAB and DPB.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the flow cytometry platform of FIOCRUZ-Bahia for the performance flow cytometric data acquisition.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have declared that there is no conflicts of interest.

FUNDING

This work received financial support and fellowships from Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERENCES

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2015; 65: 87-108.
2. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2009; 360: 1408-1417.
3. Bezerra DP, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Lima MA, Elmiro FJ, Costa-Lotufo LV. Antiproliferative effects of two amides, piperine and piplartine, from *Piper species*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2005; 60: 539-543.
4. Bezerra DP, Castro FO, Alves AP, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Lima MA, Elmiro FJ, Costa-Lotufo LV. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006; 39: 801-807.
5. Bezerra DP, Militão GC, Castro FO, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Lima MA, Elmiro FJ, Costa-Lotufo LV. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxicology In Vitro*. 2007; 21: 1-8.
6. Bezerra DP, Castro FO, Alves AP, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Lima MA, Elmiro FJ, Alencar NM, Mesquita RO, Lima MW, Costa-Lotufo LV. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. *Journal of Applied Toxicology*. 2008; 28: 156-163.
7. Bezerra DP, Moura DJ, Rosa RM, Vasconcellos MC, Silva AC, Moraes MO, Silveira ER, Lima MA, Henriques JA, Costa-Lotufo LV, Saffi J. Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. *Mutation Research*. 2008; 652: 164-174.
8. Bezerra DP, Vasconcellos MC, Machado MS, Villela IV, Rosa RM, Moura DJ, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Lima MA, Aquino NC, Henriques JA, Saffi J, Costa-Lotufo LV. Piplartine induces genotoxicity in eukaryotic but not in prokaryotic model systems. *Mutation Research*. 2009; 677: 8-13.
9. Bezerra DP, Pessoa C, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Gouvea DR, Jabor VAP, Lopes NP, Borges KB, Lima MAS, Silveira ER. Sensitive method for determination of piplartine, an alkaloid amide from *piper* species, in rat plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Química Nova*. 2011; 35: 460-465.
10. Bezerra DP, Pessoa C, de Moraes MO, Saker-Neto N, Silveira ER, Costa-Lotufo LV. Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 48: 453-463.
11. Bezerra DP, Ferreira PM, Machado CM, de Aquino NC, Silveira ER, Chammas R, Pessoa C. Antitumor efficacy of *Piper tuberculatum* and piplartine based on the hollow fiber assay. *Planta Medica*. 2015; 81: 15-19.
12. Raj L, Ide T, Gurkar AU, Foley M, Schenone M, Li X, Tolliday NJ, Golub TR, Carr SA, Shamji AF, Stern AM, Mandinova A, Schreiber SL, Lee SW. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature*. 2011; 475: 231-234.
13. Fofaria NM, Srivastava SK. STAT3 induces anoikis resistance, promotes cell invasion and metastatic potential in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*. 2015; 36: 142-150.
14. Yao Y, Sun Y, Shi M, Xia D, Zhao K, Zeng L, Yao R, Zhang Y, Li Z, Niu M, Xu K. Piperlongumine induces apoptosis and reduces bortezomib resistance by inhibiting STAT3 in multiple myeloma cells. *Oncotarget*. 2016; 7: 73497-73508.
15. Zheng J, Son DJ, Gu SM, Woo JR, Ham YW, Lee HP, Kim WJ, Jung JK, Hong JT. Piperlongumine inhibits lung tumor growth via inhibition of nuclear factor kappa B signaling pathway. *Scientific Reports*. 2016; 6: 26357.
16. Jyothi D, Vanathi P, Gowri PM, Rao VRS, Rao JM, Sreedhar AS. Diferuloylmethane augments the cytotoxic effects of piplartine isolated from *Piper chaba*. *Toxicology In Vitro*. 2009; 23: 1085-1091.
17. Moreira FL, Habenschus MD, Barth T, Marques LM, Pilon AC, Bolzani VS, Vessecchi R, Lopes NP, Oliveira AR. Metabolic profile and safety of piperlongumine. *Scientific Reports*. 2016; 6: 33646.
18. Meegan MJ, Nathwani S, Twamley B, Zisterer DM, O'Boyle NM. Piperlongumine (piplartine) and analogues: Antiproliferative microtubule-destabilising agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017; 125: 453-463.
19. Roh JL, Kim EH, Park JY, Kim JW, Kwon M, Lee BH. Piperlongumine selectively kills cancer cells and increases cisplatin antitumor activity in head and neck cancer. *Oncotarget*. 2014; 5: 9227-9238.
20. Wang Y, Wu X, Zhou Y, Jiang H, Pan S, Sun B. Piperlongumine suppresses growth and sensitizes pancreatic tumors to gemcitabine in a xenograft mouse model by modulating the NF-kappa B pathway. *Cancer Prevention Research*. 2016; 9: 234-244.
21. Liu Q, Zhao D, Zhu X, Chen H, Yang Y, Xu J, Zhang Q, Fan A, Li N, Guo C, Kong Y, Lu Y, Chen X. Co-loaded nanoparticles of paclitaxel and piperlongumine for

- enhancing synergistic anti-tumor activities and reducing toxicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. pii: S0022-3549(17)30384-2. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.05.027>.
22. Wang F, Mao Y, You Q, Hua D, Cai D. Piperlongumine induces apoptosis and autophagy in human lung cancer cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2015; 28: 362-373.
 23. Li W, Wen C, Bai H, Wang X, Zhang X, Huang L, Yang X, Iwamoto A, Liu H. JNK signaling pathway is involved in piperlongumine-mediated apoptosis in human colorectal cancer HCT116 cells. *Oncology Letters*. 2015; 10: 709-715.
 24. Song B, Zhan H, Bian Q, Gu J. Piperlongumine inhibits gastric cancer cells via suppression of the JAK1,2/STAT3 signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*. 2016; 13: 4475-4480.
 25. Zou P, Xia Y, Ji J, Chen W, Zhang J, Chen X, Rajamanickam V, Chen G, Wang Z, Chen L, Wang Y, Yang S, Liang G. Piperlongumine as a direct TrxR1 inhibitor with suppressive activity against gastric cancer. *Cancer Letters*. 2016; 375: 114-126.
 26. Chen Y, Liu JM, Xiong XX, Qiu XY, Pan F, Liu D, Lan SJ, Jin S, Yu SB, Chen XQ. Piperlongumine selectively kills hepatocellular carcinoma cells and preferentially inhibits their invasion via ROS-ER-MAPKs-CHOP. *Oncotarget*. 2015; 6: 6406-6421.
 27. Frik M, Martínez A, Elie BT, Gonzalo O, Ramírez de Mingo D, Sanaú M, Sánchez-Delgado R, Sadhukha T, Prabha S, Ramos JW, Marzo I, Contel M. *In vitro* and *in vivo* evaluation of water-soluble iminophosphorane ruthenium (II) compounds. A potential chemotherapeutic agent for triple negative breast Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014; 57: 9995-10012.
 28. Iida J, Bell-Loncella ET, Purazo ML, Lu Y, Dorchak J, Clancy R, Slavik J, Cutler ML, Shriver CD. Inhibition of cancer cell growth by ruthenium complexes. *Journal of Translational Medicine* 2016; 14: 48.
 29. Carter R, Westhorpe A, Romero MJ, Habtemariam A, Gallevo CR, Bark Y, Menezes N, Sadler PJ, Sharma RA. Radiosensitisation of human colorectal cancer cells by ruthenium (II) arene anticancer complexes. *Scientific Reports*. 2016; 6: 20596.
 30. Lentz F, Drescher A, Lindauer A, Henke M, Hilger RA, Hartinger CG, Scheulen ME, Dittrich C, Keppler BK, Jaehde U. Central European Society for Anticancer Drug Research-EWIV. Pharmacokinetics of a novel anticancer ruthenium complex (KP1019, FFC14A) in a phase I dose-escalation study. *Anticancer Drugs*. 2009; 20: 97-103.
 31. Leijen S, Burgers SA, Baas P, Pluim D, Tibben M, van Werkhoven E, Alessio E, Sava G, Beijnen JH, Schellens JH. 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*. 2015; 33: 201-214.
 32. Geary WJ. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. *Coordination Chemistry Reviews*. 1971; 7: 81-122.
 33. Nakamoto K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Wiley-Interscience, New York, 5 edn., 2008.
 34. Queiroz SL, Batista AA, Oliva G, Gambardella MT do Pi, Santos RHA, MacFarlane KS, Rettig SJ, James BR. The reactivity of five-coordinate Ru(II) (1,4-bis(diphenylphosphino)butane) complexes with the N-donor ligands: ammonia, pyridine, 4-substituted pyridines, 2,2'-bipyridine, bis(o-pyridyl)amine, 1,10-phenanthroline, 4,7-diphenylphenanthroline and ethylenediamine. *Inorganica Chimica Acta*. 1998; 267: 209-221.
 35. Barbosa MIF, Corrêa RS, Pozzi LV, Lopes EDO, Pavan FR, Leite CQF, Ellena J, Machado SDP, Poelhsitz GV, Batista AA. Ruthenium(II) complexes with hydroxypyridinecarboxylates: Screening potential metallodrugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Polyhedron*. 2015; 85: 376-382.
 36. Corrêa RS, da Silva MM, Graminha AE, Meira CS, Santos JA, Moreira DR, Soares MB, Von Poelhsitz G, Castellano EE, Bloch C Jr, Cominetti MR, Batista AA. Ruthenium(II) complexes of 1,3-thiazolidine-2-thione: Cytotoxicity against tumor cells and anti-*Trypanosoma cruzi* activity enhanced upon combination with benznidazole. *Journal of inorganic biochemistry*. 2016; 156: 153-163.
 37. Correa RS, de Oliveira KM, Delolo FG, Alvarez A, Mocelo R, Plutin AM, Cominetti MR, Castellano EE, Batista AA. 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*. 2015; 150: 63-71.
 38. Maárquez OP, Márquez J, Ortíz R. Electrochemical oxidation of 1,2-dimethoxybenzene. *Journal of the Electrochemical Society*. 1993; 140: 2163-2166.
 39. Gallatti TF, Bogado AL, Poelhsitz GV, Ellena J, Castellano EE, Batista AA, Araujo MP. Heterobimetallic [Ru(II)/Fe(II)] complexes: On the formation of *trans*- and *cis*-[RuCl₂(dppf)(diimines)]. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2007; 692: 5447-5452.
 40. Valle EMA, Nascimento FB, Ferreira AG, Azevedo AA, Monteiro MCR, Machado SP, Ellena J, Castellano EE, Azevedo ER. Sobre uma degenerescência acidental nos deslocamentos químicos de RMN de ³¹P {¹H} em complexos de rutênio. *Química Nova*. 2008; 31: 807-812.
 41. Villarreal W, Colina-Vegas L, Oliveira CR, Tenorio JC, Ellena J, Gozzo FC, Cominetti MR, Ferreira AG, Ferreira MA, Navarro M, Batista AA. Chiral platinum(ii) complexes featuring phosphine and chloroquine ligands as cytotoxic and monofunctional DNA-binding Agents. *Inorganic chemistry*, 2015; 54: 11709-11720.

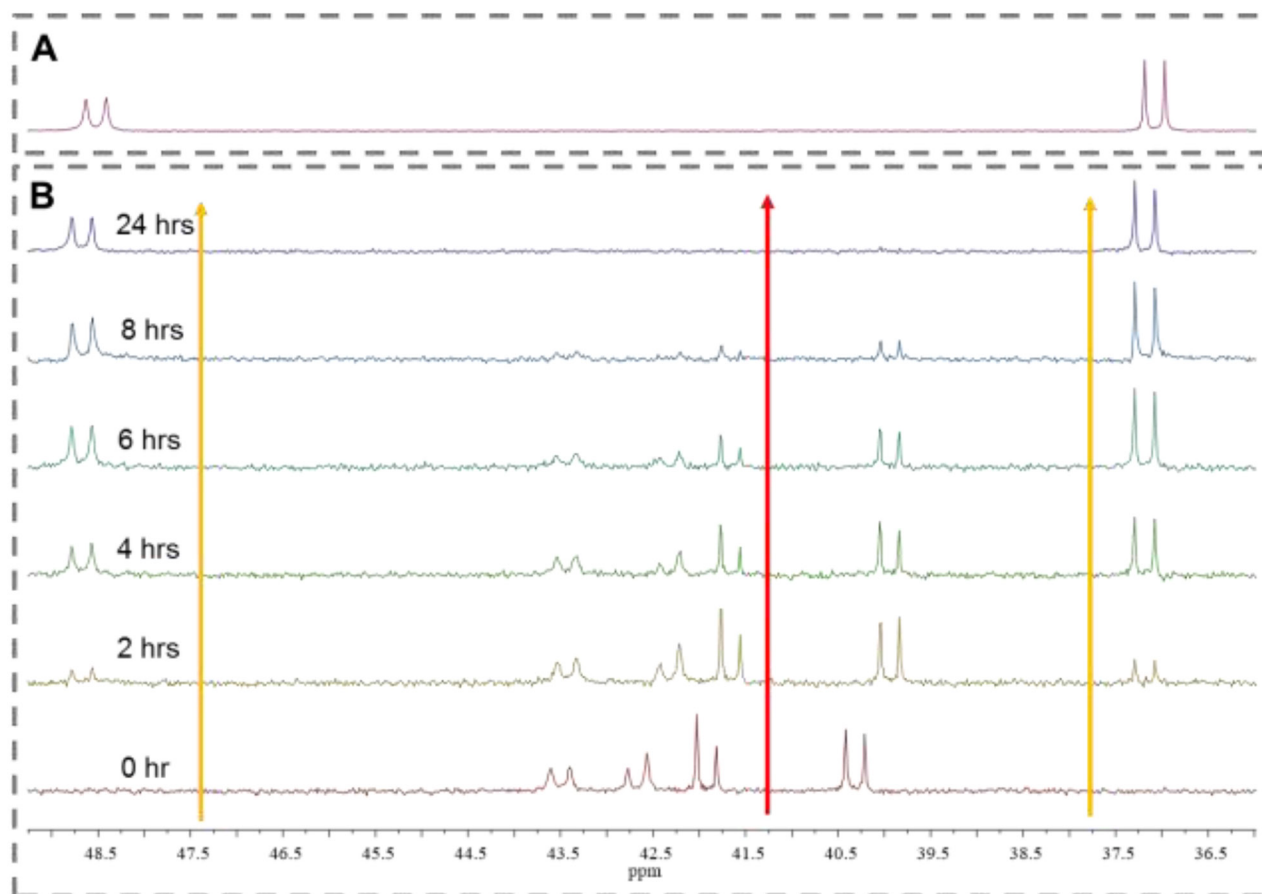
42. Santos ER, Corrêa RS, Ribeiro JU, Graminha AE, Ellena J, Selistre-de-Araujo HS, Batista AA. Ru(II)/bisphosphine/diimine/amino acid complexes: diastereoisomerism, cytotoxicity, and inhibition of tumor cell adhesion to collagen type I. *Journal of Coordination Chemistry*. 2016; 69: 3518-3530.
43. Santos ER, Mondelli MA, Pozzi LV, Corrêa RS, Salistre-de-Araújo HS, Pavan FR, Leite CQF, Ellena J, Malta VRS, Machado SP, Batista AA. New ruthenium(II)/phosphines/diimines complexes: Promising antitumor (human breast cancer) and *Mycobacterium tuberculosis* fighting agents. *Polyhedron*. 2013; 51: 292-297.
44. Lai SH, Li W, Yao JH, Han BJ, Jiang GB, Zhang C, Zeng CC, Liu YJ. Protein binding and anticancer activity studies of ruthenium (II) polypyridyl complexes toward BEL-7402 cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 2016; 158: 39-48.
45. Singh AK, Saxena G, Sahabjada, Arshad M. Synthesis, characterization and biological evaluation of ruthenium flavanol complexes against breast cancer. *Spectrochimica Acta Part A*. 2017; 180: 97-104.
46. Zeng CC, Lai SH, Yao JH, Zhang C, Yin H, Li W, Han BJ, Liu YJ. 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*. 2016; 122: 118-126.
47. Lima AP, Pereira FC, Almeida MA, Mello FM, Pires WC, Pinto TM, Delella FK, Felisbino SL, Moreno V, Batista AA, Silveira-Lacerda EP. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium (II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. *Plos One*. 2014; 9: e105865.
48. Zheng K, Wu Q, Wang C, Tan W, Mei W. Ruthenium (II) complexes as potential apoptosis inducers in chemotherapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2017; 17: 29-39.
49. Tang B, Shen F, Wan D, Guo BH, Wang YJ, Yi QY, Liu YJ. DNA-binding, molecular docking studies and biological activity studies of ruthenium(II) polypyridyl complexes. *RSC Advances* 2017; 7: 34945-34958.
50. Wan D, Tang B, Wang YJ, Guo BH, Yin H, Yi QY, Liu YJ. Synthesis and anticancer properties of ruthenium (II) complexes as potent apoptosis inducers through mitochondrial disruption. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017; 139: 180-190.
51. Zhang Z, Wu Q, Wu XH, Sun FY, Chen LM, Chen JC, Yang SL, Mei WJ. Ruthenium (II) complexes as apoptosis inducers by stabilizing c-myc G-quadruplex DNA. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014; 80: 316-324.
52. Dhanasekaran DN, Johnson GL. MAPKs: function, regulation, role in cancer and therapeutic targeting. *Oncogene*. 2007; 26: 3097-3099.
53. Turjanski AG, Vaqué JP, Gutkind JS. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*. 2007; 26: 3240-3253.
54. Fan M, Chambers TC. Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug Resistance Updates*. 2001; 4: 253-267.
55. Grozav A, Balacescu O, Balacescu L, Cheminel T, Berindan-Neagoe I, Therrien B. Synthesis, anticancer activity, and genome profiling of thiazolo arene ruthenium complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015; 58: 8475-8490.
56. Alessio E. Thirty years of the drug candidate NAMI-A and the myths in the field of ruthenium anticancer compounds: a personal perspective. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2017; 2017: 1549-1560.
57. Ahmed SA, Gogal RM, Walsh JE. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [³H] thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*. 1994; 170: 211-224.
58. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 1991; 139: 271-279.
59. Sureda FX, Escubedo E, Gabriel C, Comas J, Camarasa J, Camins A. Mitochondrial membrane potential measurement in rat cerebellar neurons by flow cytometry. *Cytometry*. 1997; 28: 74-80.
60. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*. 1992; 5: 227-231.
61. Ni Z, Hou S, Barton CH, Vaziri ND. Lead exposure raises superoxide and hydrogen peroxide in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Kidney International*. 2004; 66: 2329-2336.
62. Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: Diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry*. 1998; 70: 2446-2453.
63. Glass LS, Bapat A, Kelley MR, Georgiadis MM, Long EC. Semi-automated high-throughput fluorescent intercalator displacement-based discovery of cytotoxic DNA binding agents from a large compound library. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2010; 20: 1685-1688.
64. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25: 402-408.

Author Query

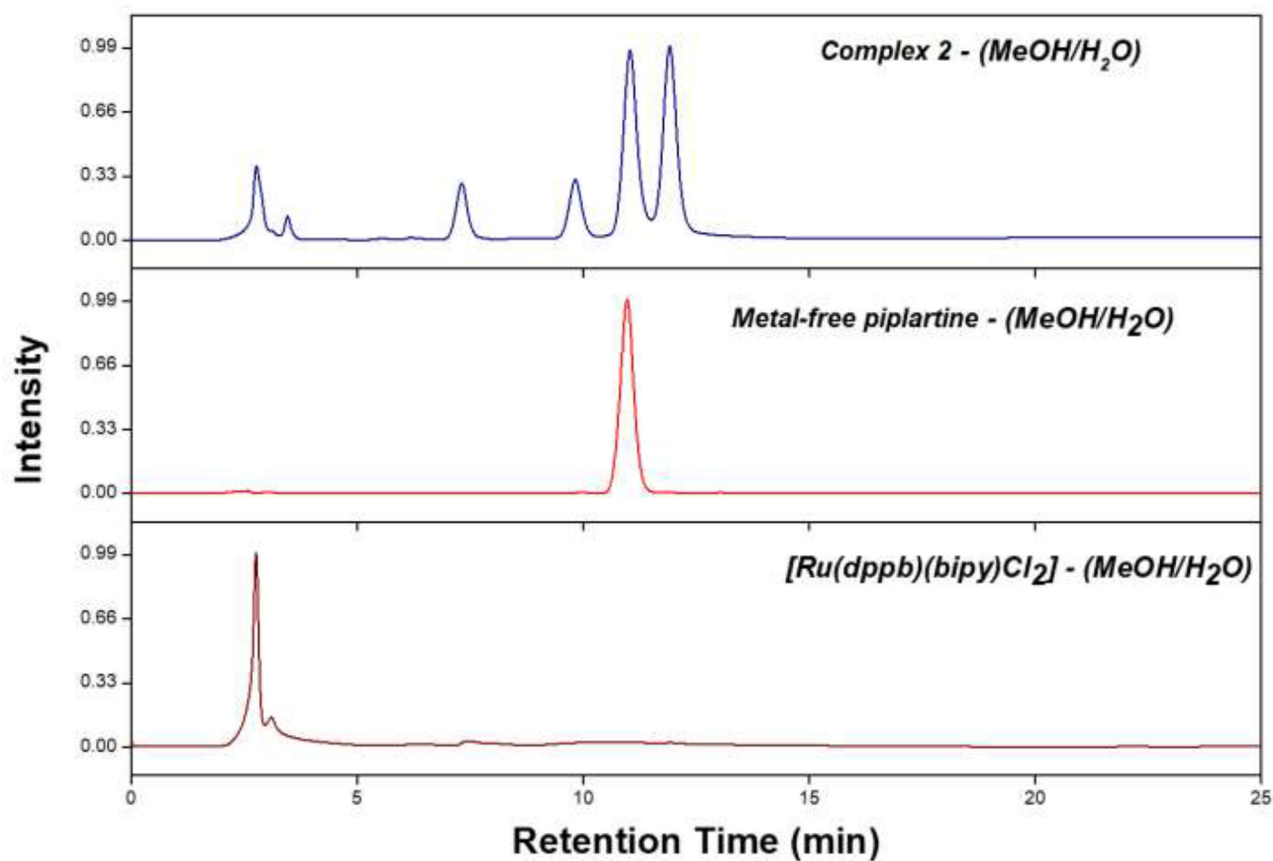
AQ: Supplementary Table 2 callout missing in MS.. kindly check and provide

Novel piplartine-containing ruthenium complexes: synthesis, cell growth inhibition, apoptosis induction and ROS production on HCT116 cells

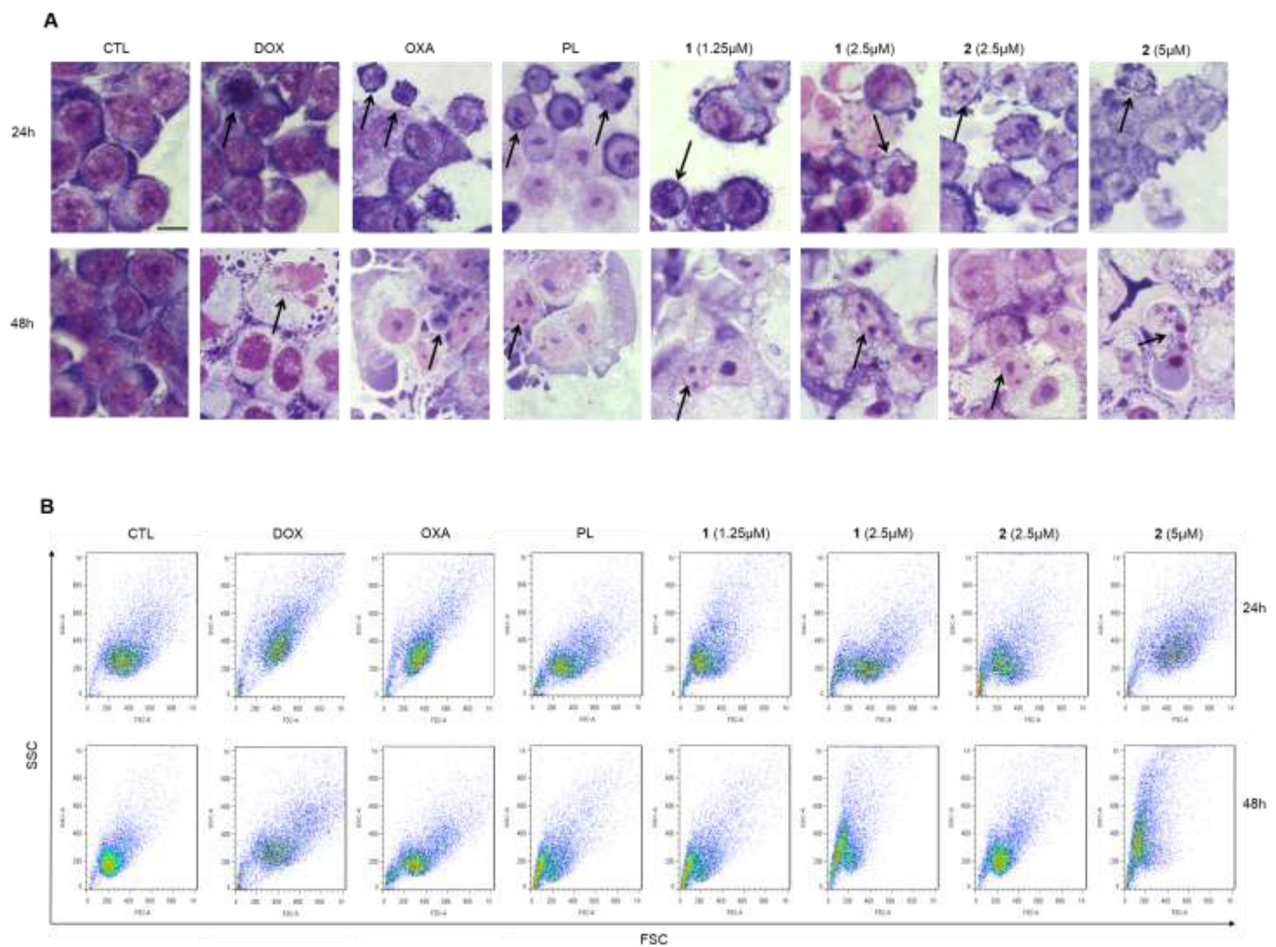
AQ SUPPLEMENTARY MATERIALS



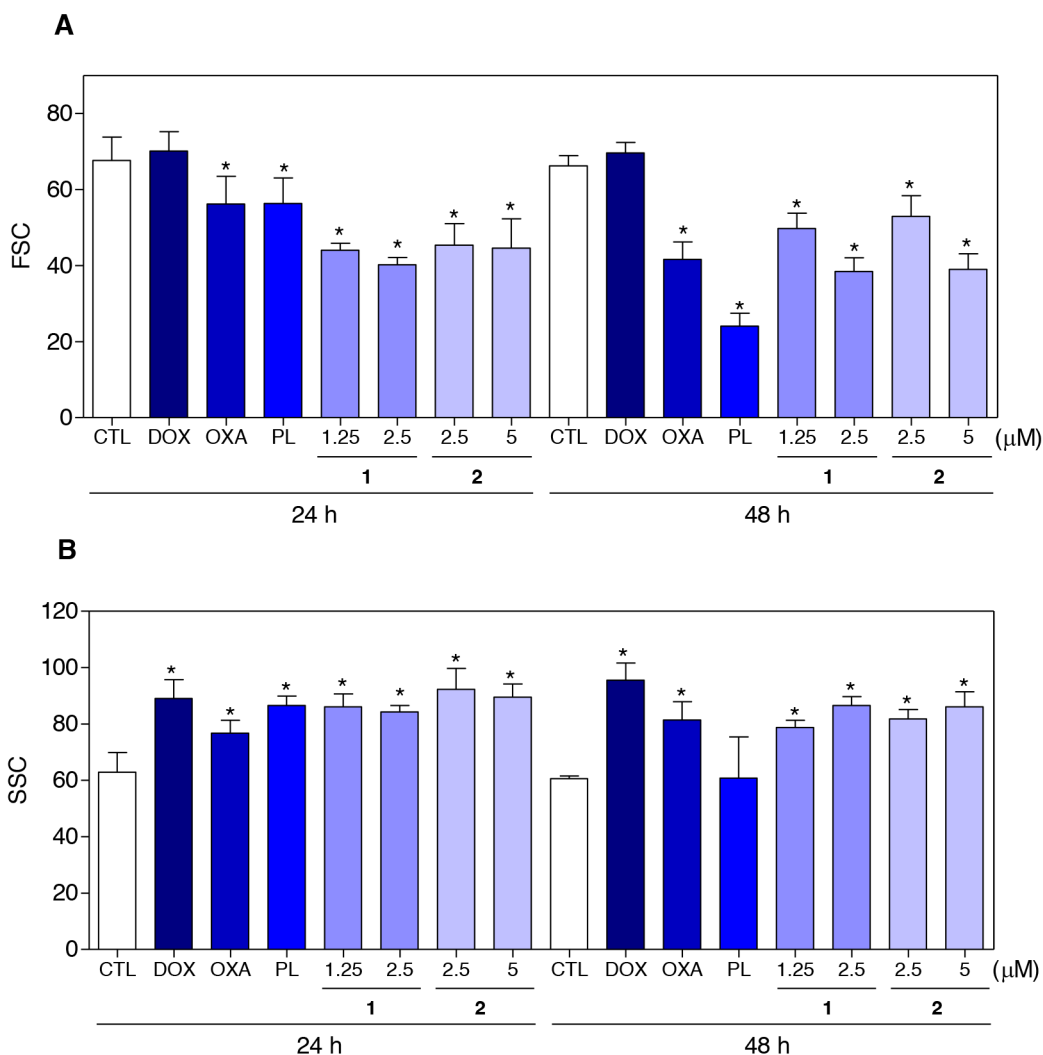
Supplementary Figure 1: (A) $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of the complex $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$ after the addition of AgPF_6 , in the mixture acetone/water (1:9). (B) $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra (0 – 24 h) of complex 2 in the mixture acetone/water (1:9). The red arrow shows the consumption of complex 2 and the yellow arrow show the resulting product.



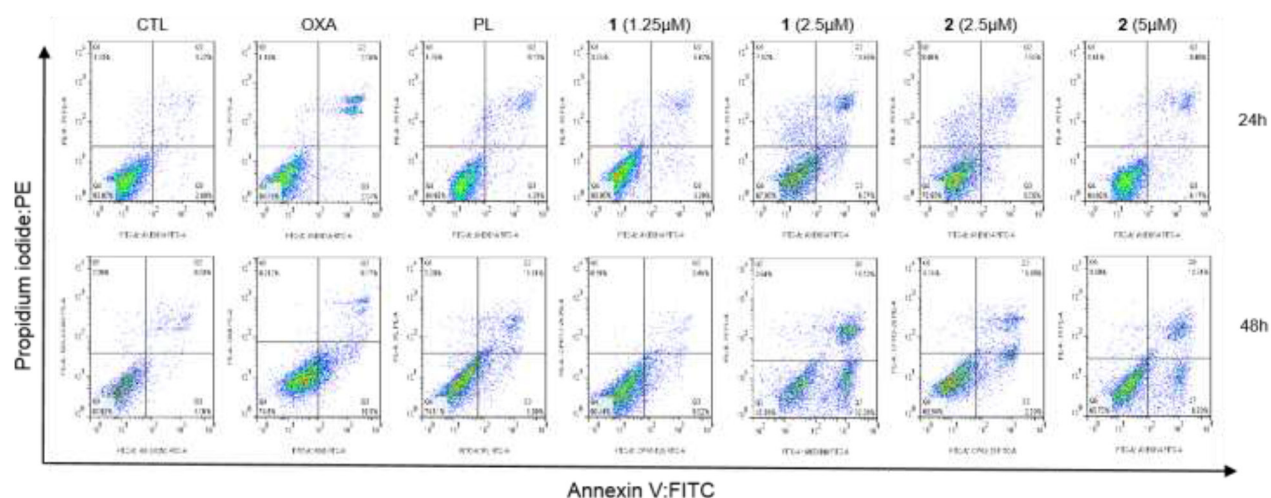
Supplementary Figure 2: HPLC chromatogram of complex 2, precursor [Ru(dppb)(bipy)Cl₂] and metal-free piplartine, using methanol (MeOH)/water (H₂O) (57/43) as mobile phase at isocratic model and the column ODS-C18 (5 mm; 250 x 4.6 mm; Shimadzu).



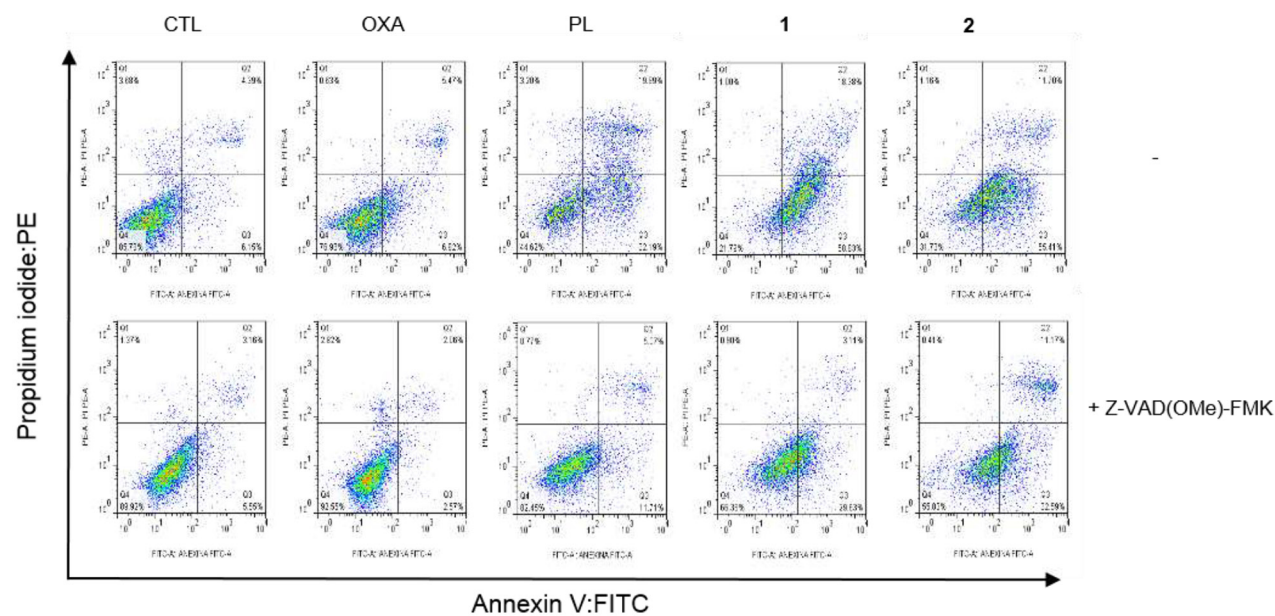
Supplementary Figure 3: Effect of piplartine-containing ruthenium complexes in the morphologic analysis of HCT116 cells after 24 and 48h of incubation. (A) Cells stained with may-grunwald-giemsa and examined by light microscopy (bar = 20 μ m). Arrows indicated cells with fragmented DNA. **(B)** Light scattering features determined by flow cytometry. For flow cytometry analysis, 10,000 events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested. Doxorubicin (DOX, 1 μ M), oxaliplatin (OXA, 3 μ M) and piplartine (PL, 10 μ M) were used as the positive controls. FSC: forward scatter; SSC: side scatter.



Supplementary Figure 4: Effect of piplartine-containing ruthenium complexes in the morphologic analysis of HCT116 cells after 24 and 48h of incubation. (A) Quantification of forward light scatter (FSC) determined by flow cytometry. **(B)** Quantification of side scatter (SSC) determined by flow cytometry. Ten thousands events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested. Doxorubicin (DOX, 1 μM), oxaliplatin (OXA, 3 μM) and piplartine (PL, 10 μM) were used as the positive controls.



Supplementary Figure 5: Effect of piplartine-containing ruthenium complexes in the induction of apoptosis on HCT116 cells determined by flow cytometry using annexin V-FITC/PI staining after 24 and 48h of incubation. The data show the representative flow cytometry dot plots showing the percentage of cells in viable, early apoptotic, late apoptotic and necrotic stages. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested. Doxorubicin (DOX, 1 μ M), oxaliplatin (OXA, 3 μ M) and piplartine (PL, 10 μ M) were used as the positive controls. Ten thousand events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis.



Supplementary Figure 6: Effect of the pan-caspase inhibitor (Z-VAD(OMe)-FMK) in the apoptosis induced by piplartine-containing ruthenium complexes on HCT116 cells determined by flow cytometry using annexin V-FITC/PI staining. The data show the representative flow cytometry dot plots showing the percentage of cells in viable, early apoptotic, late apoptotic and necrotic stages. The cells were pre-treated for 2 h with 50 μ M Z-VAD(OMe)-FMK, then incubated with the complexes in the established concentration (2.5 μ M for complex 1 and 5 μ M for complex 2) for 48 h. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.1% of a solution containing 70% sorbitol, 25% tween 80 and 5% water) used for diluting the compounds tested. Doxorubicin (DOX, 1 μ M), oxaliplatin (OXA, 3 μ M) and piplartine (PL, 10 μ M) were used as the positive controls. Ten thousand events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis.

Supplementary Table 1: Selectivity index of piplartine-containing ruthenium complexes

Cancer cells	Non-cancer cells									
	MRC					PBMC				
	DOX	OXA	PL	1	2	DOX	OXA	PL	1	2
HCT116	6.5	0.3	2.7	2.0	1.1	27.0	2.3	5.3	1.1	0.6
HepG2	6.5	0.6	2.7	2.0	3.3	27.0	4.3	5.4	1.1	1.7
HSC-3	2.6	0.4	2.3	5.7	4.8	10.8	2.8	4.6	3.0	2.5
SCC-4	0.6	0.2	1.1	1.1	1.2	2.6	1.2	2.2	0.6	0.6
SCC-9	0.5	N.d	1.0	0.8	0.9	2.1	N.d	2.1	0.4	0.5
HL-60	6.5	2.2	1.3	1.0	1.4	27.0	15.7	2.6	0.5	0.7
K-562	1.3	1.3	0.9	1.0	1.1	5.4	9.4	1.8	0.5	0.6
B16-F10	65.0	0.6	1.6	1.2	1.5	270.0	4.3	3.2	0.6	0.8

Data are presented the selectivity index (SI) calculated using the following formula: $SI = IC_{50}[\text{non-cancer cells}]/IC_{50}[\text{cancer cells}]$. Cancer cells: HCT116 (human colon carcinoma); HepG2 (human hepatocellular carcinoma); HSC-3 (human oral squamous cell carcinoma); SCC-4 (human oral squamous cell carcinoma); SCC-9 (human oral squamous cell carcinoma); HL-60 (human promyelocytic leukemia); K-562 (human chronic myelogenous leukemia); and B16-F10 (murine melanoma). Non-cancer cells: MRC-5 (human lung fibroblast) and PBMC (human peripheral blood mononuclear cells). Doxorubicin (DOX), oxaliplatin (OXA) and piplartine (PL) were used as the positive controls. N.d. Not determined.

Supplementary Table 2: The effect of piplartine-containing ruthenium complexes on gene expression of HCT116 cells.

See Supplementary File 1