

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA APOPTOSE INDUZIDA
PELO COMPLEXO DE RUTÊNIO COM TIMINA EM CÉLULAS DE CARCINOMA
DE CÓLON HUMANO HCT116**

SUELLEN LAILA ROCHA SILVA

Salvador – Bahia

2019

IGM

SUELLEN LAILA ROCHA SILVA

**Estudo das vias de sinalização envolvidas na apoptose induzida pelo complexo de rutênio
com timina em células de carcinoma de cólon humano HCT116**

2019

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**ESTUDO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA APOPTOSE INDUZIDA
PELO COMPLEXO DE RUTÊNIO COM TIMINA EM CÉLULAS DE CARCINOMA
DE CÓLON HUMANO HCT116**

SUELLEN LAILA ROCHA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para
obtenção do título de Mestre.

Salvador – Bahia

2019

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

S586e Silva, Suellen Laila Rocha.
Estudo das vias de sinalização envolvidas na apoptose induzida pelo complexo de rutênio com timina em células de carcinoma de cólon humano HCT116. / Suellen Laila Rocha. - 2019.
66 f. : il. ; 30 cm.

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

Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. Rutênio. 2. Timina. 3. Células HCT116. 4. Citotoxicidade. 5. Apoptose.
I. Título.

CDU 616-006:615.28

“ESTUDO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA APOPTOSE INDUZIDA PELO COMPLEXO DE RUTÊNIO COM TIMINA EM CÉLULAS DE CARCINOMA DE CÓLON HUMANO HCT116.”

SUELLEN LAILA ROCHA SILVA

Folha de Aprovação

Salvador, 20 de fevereiro de 2019.

Comissão Examinadora

Valéria de Matos Borges

Dra. Valéria de Matos Borges
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

Flávia Oliveira de Lima

Dra. Flávia Oliveira de Lima
Professora titular
UEFS

Dalila Lucíola Zanette

Dra. Dalila Lucíola Zanette
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001"

CNPq

IGM/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao dono de toda ciência, sabedoria e poder, Deus, por me guiar em cada momento e me permitir completar mais um importante ciclo.

A minha mãe, Celia, por todos esses anos de cuidado, sacrifícios e amor, pois sem uma base sólida não alcançaria mais essa vitória.

Ao meu pai, Elias (*in memoriam*), por me dar meu primeiro microscópio quando tinha 6 anos de idade, por ser minha inspiração maior em ser cientista e pelo amor incondicional que me dedicou.

Ao meu marido Suélito Júnior por todo apoio e cumplicidade, por fazer a minha vida mais completa e feliz.

Ao meu irmão e família por alegrarem meus dias e se procurarem em ajudar no que for possível.

A minha cadela Fiona por me tirar dos momentos de tédio e sempre arrancar um sorriso do meu rosto.

A todos os amigos e colegas, os que estão perto e os que estão longe, os que conheci a pouco e os de longa data, por fazerem parte de quem eu sou.

Ao meu orientador, Dr. Daniel Pereira Bezerra, por toda paciência e dedicação em me ensinar.

À Dr^a Milena Botelho Pereira Soares, coordenadora do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (FIOCRUZ/BA), e todos os colegas do LETI onde realizei este trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia em saúde e medicina investigativa e ao IGM/FIOCRUZ por me proporcionar essa oportunidade de especialização com alta qualidade e excelência.

A biblioteca do IGM.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SILVA, Suellen Laila Rocha. Estudo das vias de sinalização envolvidas na apoptose induzida pelo complexo de rutênio com timina em células de carcinoma de cólon humano HCT116. 2019. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer se caracteriza pela proliferação descontrolada de células levando a formação de tumores que podem gerar metástase. Essa doença tornou-se um problema de saúde pública devido ao seu grande e crescente número de casos, além do alto impacto financeiro sobre a sociedade. Os quimioterápicos representam a principal forma de tratamento; entretanto, apresentam diversos efeitos colaterais, além do surgimento de resistência, tornando necessário o desenvolvimento de novos fármacos. Recentemente, nosso grupo de pesquisa sintetizou um complexo de rutênio com timina $[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2(\text{Thy})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (onde PPh = trifenilfosfino, Thy = timina and bipy = 2,2'-bipiridina) (CRT) com potente atividade citotóxica, capaz de ligar-se ao DNA e induzir a apoptose mediada por caspases em células de leucemia.

OBJETIVO: Neste estudo, nós investigamos as vias de sinalização envolvidas na apoptose induzida pelo complexo Ru(II)-timina em células de carcinoma de cólon humano HCT116, bem como avaliamos seu efeito em modelo de xenotransplante.

MATERIAL E MÉTODOS: Para verificar a participação das vias MAPKs e p53 na morte celular induzida por CRT, foi utilizado o ensaio de anexina V/PI em células HCT116 pré-tratadas com os inibidores farmacológicos de JNK (SP 600125), p38 (PD 169316), ERK1/2 (U-0126) e p53 (pifitrina- α cíclica), e quantificada a fluorescência por citometria de fluxo. As MAPKs fosforiladas, bem como p53, MDM2 e histona H2AX foram avaliadas através de ELISA sanduiche fosfo-específico. A atividade antitumoral *in vivo* foi avaliada em camundongos C.B-17 SCID transplantados com células HCT116 e tratados com CRT nas doses de 1 e 2 mg/kg/dia, por via intraperitoneal, uma vez por dia durante 15 dias consecutivos.

RESULTADOS: O complexo Ru(II)-timina aumentou significativamente a porcentagem de células HCT116 em apoptose. O co-tratamento com os inibidores farmacológicos de JNK/SAPK, p38 MAPK e MEK, que inibem a ativação de ERK1/2, causou uma redução acentuada da porcentagem de células em apoptose induzida pelo complexo. Além disso, o CRT induziu um aumento de fosfo-JNK2 (T183/Y185), fosfo-p38 α (T180/Y182) e fosfo-ERK1 (T202/Y204) em células HCT116. O tratamento com o complexo aumentou significativamente a expressão da fosfo-histona H2AX (S139), um marcador de dano ao DNA. A expressão de fosfo-p53 (S15) e MDM2 não foi alterada, e o co-tratamento com o inibidor de p53 (pifitrina- α cíclico) não reduziu a apoptose induzida pelo CRT em células HCT116, indicando que o complexo Ru(II)-timina induz apoptose através de dano ao DNA, pela ativação da via de sinalização JNK/p38/ERK1/2 de maneira independente de p53. No modelo *in vivo*, o CRT (1 e 2 mg/kg/dia) apresentou inibição do crescimento de células HCT116 em 32,6-40,1%, e não apresentou toxicidade significativa nos parâmetros analisados.

CONCLUSÃO: Assim, observou-se que o complexo Ru(II)-timina é um promissor candidato a agente antitumoral.

Palavras-chave: Rutênio, Timina, HCT116, MAPK, Citotoxicidade, Apoptose.

SILVA, Suellen Laila Rocha. Study of signaling pathways involved in apoptosis induced by ruthenium complex with thymine in human colon carcinoma HCT116 cells. 2019. 68 f. Dissertation (Master) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cancer is characterized by the uncontrolled proliferation of cells leading to the formation of tumors that can generate metastasis. This disease has become a public health problem due to its large and growing number of cases besides the high financial impact on society. Chemotherapeutic agents represent the main form of treatment; however, they present several side effects, besides the appearance of resistance, making necessary the development of new drugs. Recently, our research group synthesized a ruthenium complex with thymine [Ru (PPh₃)₂(Thy)(bipy)]PF₆ (where PPh = triphenylphosphino, Thy = thymine and bipy = 2,2'-bipyridine) (CRT) with potent cytotoxic activity, with potential cytotoxic activity, capable of binding to DNA and inducing caspase-mediated apoptosis in leukemia cells. **AIM:** In this study, we investigated the signaling pathways involved in the Ru(II)-thymine complex-induced apoptosis in human colon carcinoma HCT116 cells, as well as its effect in a xenograft tumor model. **MATERIAL AND METHODS:** To verify the involvement of the MAPKs and p53 pathways in CRT-induced cell death, the annexin V/PI assay was performed on HCT116 cells pretreated with the pharmacological inhibitors of JNK (SP 600125), p38 (PD 169316), ERK1/2 (U-0126) and p53 (cyclic α -pifythrin), and quantified fluorometry by flow cytometry. Phosphorylated MAPKs as well as p53, MDM2 and histone H2AX were evaluated by phospho-specific ELISA sandwich. In vivo antitumor activity was evaluated in SCID C.B-17 mice transplanted with HCT116 cells and treated with CRT at doses of 1 and 2 mg/kg/day intraperitoneally once daily for 15 consecutive days. **RESULTS:** The Ru(II)-thymine complex significantly increased the percentage of HCT116 cells in apoptosis. Co-treatment with the pharmacological inhibitors of JNK/SAPK, p38 MAPK and MEK, which inhibit the activation of ERK1/2, caused a marked reduction in the percentage of cells in apoptosis induced by the complex. In addition, CRT induced an increase of phospho-JNK2 (T183/Y185), phospho-p38 α (T180/Y182) and phospho-ERK1 (T202/Y204) in HCT116 cells. Treatment with the complex increased significantly the phosphohistone H2AX (S139) expression, a DNA damage marker. The expression of phospho-p53 (S15) and MDM2 were not changed, and the co-treatment with a p53 inhibitor (cyclic pifithrin- α) did not reduce the complex-induced apoptosis in HCT116 cells, indicating that the Ru(II)-hymine complex induces DNA damage mediated apoptosis by JNK/p38/ERK1/2 activation via a p53-independent signaling. In the in vivo model, CRT (1 and 2 mg/kg/day) showed inhibition of HCT116 cell growth in 32.6-40.1%, and showed no significant toxicity in the analyzed parameters. **CONCLUSION:** Thus, it has been observed that the Ru(II)-thymine complex is a promising candidate for antitumor agent.

Key words: Ruthenium, Thymine, HCT116, MAPK, Cytotoxicity, Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de transformação	19
Figura 2: Características das células cancerígenas.....	20
Figura 3: Cinco tumores com maior incidência estimada para 2018.	24
Figura 4: Ativação das MAPKs.	27
Figura 5: p53 e suas funções.....	30
Figura 6: Estrutura da timina, equilíbrio tautomérico e anions	34
Figura 7: Estrutura química do complexo de rutênio(II)-timina.	35
Figura 8: Efeito do complexo Ru(II)-timina (CRT) na morte celular de células HCT116 com e sem pré-tratamento com inibidores de MAPK.....	43
Figura 9: Efeito do complexo Ru(II)-timina (CRT) na expressão de fosfo-JNK2 (T183/Y185), fosfo-p38 α (T180/Y182) e fosfo-ERK1 (T202/Y204).....	44
Figura 10: Efeito do inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica) na apoptose induzida pelo complexo Ru(II)-timina (CRT) em células HCT116.....	46
Figura 11: Efeito do complexo Ru(II)-timina (CRT) na fosfo-histona H2AX (S139), fosfo-p53 (S15) e MDM2.....	47
Figura 12: Atividade antitumoral in vivo do Ru(II)-timina (CRT).....	48
Figura 13: Análise histológica representativa dos tumores.....	49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Efeito do complexo Ru(II)-timina (CRT) no corpo e peso relativo dos órgãos de camundongos C.B-17 SCID50
- Tabela 2.** Efeito do tratamento sobre parâmetros hematológicos do sangue periférico de camundongos C.B-17 SCID.....51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
ADR	Adriamicina
ANOVA	Do Inglês <i>analysis of variance</i> (Análise de variância)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDK	Ciclina dependente de quinase
CIS	Cisplatina
CI ₅₀	Concentração inibitória média de 50%
CTL	Controle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
E.P.M.	Erro padrão da média
ECs	Células endoteliais
ERK ½	<i>Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2</i> (proteínas cinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular)
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
ETOP	Etoposídeo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GSK	Glicogênio sintase quinase
GST	Genes supressores de tumor
GTP	Trifosfato de guanosina
IR	Radiação ionizante
IDH	Índice de desenvolvimento humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JNK	<i>c-Jun amino-terminal kinases</i> (cinases c-Jun amino-terminal)
K _b	Constante de dissociação da base
LPS	Lipopolissacárideos
LLC-B	Leucemia linfocítica crônica de células B
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (proteína cinase ativada por mitógeno)

MEC	Matriz extracelular
MEK	Do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
miRNA	MicroRNA
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI	Iodeto de Propídio
p53	Proteína p53
RNA	Ácido ribonucleico
TCA	Ácido tricarboxílico
Ti	Timina
Tyr	Tirosina
Thr	Treonina
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	CÂNCER	17
2.2	VIAS DE SINALIZAÇÃO.....	26
2.3	COMPLEXOS DE RUTÊNIO.....	31
3	OBJETIVOS	36
3.1	GERAL	36
3.2	ESPECÍFICOS.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	SÍNTESE DO COMPLEXO.....	37
4.2	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA.....	37
4.3	MARCAÇÃO PARA ANEXINA V / IODETO DE PROPÍDIO	38
4.4	ELISA FOSFO-ESPECÍFICO	39
4.5	<i>IN VIVO</i>	39
4.5.1	<i>Animais</i>	39
4.5.2	<i>Ensaio de atividade antitumoral in vivo</i>	39
4.5.3	<i>Avaliação toxicológica sistêmica</i>	40
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	RESULTADOS	42
5.1	O COMPLEXO RU (II)-TIMINA CAUSA MORTE CELULAR APOPTÓTICA MEDIADA POR DANO AO DNA ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO JNK/P38/ERK1/2 INDEPENDENTE DE P53 EM CÉLULAS HCT116.	42
5.2	RU(II)-TIMINA INIBE O CRESCIMENTO DE CÉLULAS HCT116 EM MODELO DE XENOENXERTO.....	48
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A proliferação descontrolada de células, além da capacidade de invadir órgãos e tecidos, conhecida por metástase (CAO *et al.*, 2011), são as principais características do conjunto de doenças denominadas de câncer. O processo de formação dos tumores inicia-se quando ocorrem mutações ou modificações epigenéticas em um ou mais genes relacionados à proliferação celular, como proto-oncogenes e genes supressores de tumor, ou ainda em genes de reparo do DNA. Essas mutações podem ser herdadas nos casos em que o câncer é hereditário ou podem ser provocadas por fatores ambientais, como radiações ou fumo, no caso de câncer esporádico. As neoplasias malignas são a segunda causa de mortalidade em todo o mundo, e há um crescente número de casos. No Brasil, as estimativas indicam a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos por ano para 2018 e 2019 (INCA, 2017).

A sinalização através das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) é fundamental na regulação de várias respostas biológicas, inclusive as que estão envolvidas no desenvolvimento do câncer, como proliferação, diferenciação, apoptose, transformação oncogênica, invasão e metástase (KIM, 2015), e pode ser ativada por diversos quimioterápicos como doxorrubicina e cisplatina. A partir da descoberta dos complexos baseados em platina, o desenvolvimento de antitumorais baseados em complexos de metais de transição como complexos de rutênio tem se tornado de grande interesse devido ao seu potencial citotóxico e por possuírem algumas vantagens como a capacidade de formar complexos com vários ligantes, estabilidade, ligações fortes com o DNA, vários estados de oxidação e baixa toxicidade (MALINA, 2001).

Complexos de metais de transição contendo compostos semelhantes a bases do DNA têm sido bastante estudados e são interessantes no desenho racional de fármacos, pois acabam interferindo na replicação e transcrição, já que as bases são reconhecidas pela DNA polimerases e usadas na síntese da dupla fita de DNA (JOHNSON, 1999). A timina é uma dessas bases, pertence ao grupo das pirimidinas e pode ser desprotonada, apresentando espécies monoanônicas e dianiônicas, por isso possuem grande versatilidade estrutural para reagir com íons metálicos de

diferentes modos. Recentemente, nosso grupo de pesquisa sintetizou um complexo de rutênio com timina $[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2(\text{Thy})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (onde PPh = trifenilfosfina, Thy = timina and bipy = 2,2'-bipiridina) com potente atividade citotóxica, que foi capaz de induzir morte celular por apoptose (CORREA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017). No presente trabalho estudamos o papel das vias de sinalização MAPK e p53 na apoptose induzida por esse complexo metálico, bem como avaliamos se o mesmo possui capacidade de inibir o crescimento do tumor *in vivo*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER

As palavras câncer, tumores malignos e neoplasias malignas são sinônimos utilizados para denominar um conjunto de doenças que têm como principais características a proliferação descontrolada de células e a capacidade de invadir órgãos e tecidos, podendo espalhar-se por todo organismo no fenômeno conhecido como metástase (CAO *et al.*, 2011).

Desde a antiguidade pode-se encontrar registros de casos da doença. O primeiro foi descrito em um papiro egípcio de 1600 a.C. onde foram relatados oito casos de tumores de mama. O médico grego Hipócrates em 400 a.C. deu origem ao termo câncer pois percebeu que vasos sanguíneos de tumores se assemelhavam ao formato das patas de caranguejos e os nomeou de carcinomas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010). Atualmente os cânceres são classificados de acordo com o tipo de célula e tecido dos quais se originam. Os carcinomas são formados a partir de células epiteliais; os sarcomas se originam de tecidos mesenquimal como osso ou células musculares; as leucemias surgem a partir da medula óssea, responsável por produzir as células do sangue; o linfoma é um câncer que começa nas células do sistema linfático; já melanomas se desenvolvem a partir dos melanócitos, e geralmente ocorre na pele; ainda temos os cânceres derivados de células do sistema nervoso e muitos outros (BRASIL, 2013).

O câncer é uma doença essencialmente genética, pois alterações em grupos de genes responsáveis por regular o crescimento e a proliferação celular são necessárias para que ocorra o processo de carcinogênese. Entre estes genes estão principalmente os oncogenes e os genes supressores de tumor (GST) (NCI, 2015). Os mecanismos que conduzem a alterações nesses genes podem ser tanto desencadeados por fatores extrínsecos (como o tabaco, agentes infecciosos, produtos químicos e radiação) quanto intrínsecos (mutações metabólicas, mutações hereditárias, hormônios e condições imunológicas) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

A grande maioria dos casos de câncer (cerca de 90-95%) são causados por fatores ambientais. O risco de desenvolver a doença depende, entre outros, da condição social, exposição ambiental e características biológicas do indivíduo. Cerca de 100 fatores físicos, químicos e biológicos já foram descritos pela Organização Mundial da Saúde como carcinogênicos. Entre os fatores físicos, por exemplo, a exposição à radiação ultravioleta está associada ao desenvolvimento de carcinoma de pele (MASSARI *et al.*, 2007). Quanto aos fatores químicos podemos citar os hidrocarbonetos aromáticos e tabaco, entre outros (VEGLIA *et al.*, 2007). Fumar é diretamente responsável por aproximadamente 30% de todas as mortes relacionadas com o câncer (SASCO *et al.*, 2004) e é a principal causa de muitas neoplasias malignas, incluindo os cânceres de pulmão, laringe e esôfago. Também desempenha um importante papel no desenvolvimento de outros cânceres, como o de bexiga, leucemia mielóide, pâncreas, colo do útero e de estômago (WHO, 2007). Outro hábito frequente na população, que é um relevante fator de risco para o desenvolvimento de tumores malignos, é o consumo de álcool, sendo causa principal do aparecimento de tumores malignos na cavidade oral, laringe, faringe, esôfago, fígado, cólon e reto (SCHÜTZE *et al.*, 2011). Vários estudos indicam que há um efeito sinérgico de álcool e de tabaco, aumentando ainda mais o risco de desenvolver câncer (MORENO-LOPEZ *et al.*, 2000).

As neoplasias malignas de origem hereditária representam 5-10% dos cânceres em humanos e se caracterizam por alterações genéticas germinativas, ou seja, que são transmitidas de uma célula progenitora à suas descendentes, existindo um padrão de herança autossômico dominante. Herda-se apenas uma única cópia defeituosa do gene, e para que haja a transformação em célula tumoral deve haver a perda do segundo alelo (não mutante) em uma célula somática. A presença desse alelo mutante está relacionada à instabilidade genômica que predispõe os pacientes a diferentes tumores primários precoces (NAGY *et al.*, 2004). Alguns dos casos mais conhecidos de síndromes de câncer hereditário são: a síndrome de câncer de mama e ovário originadas principalmente de mutações nos genes BRCA-1 e 2 (LYNCH *et al.*, 2008); síndrome de polipose hereditária onde o gene APC é mutado levando a estimulação da proliferação, migração e a degradação do complexo de adesão celular; a síndrome de Lynch-hereditária sem polipose que apresentam mutações

envolvendo genes implicados na reparação de incompatibilidades (FOULKES, 2008); e o retinoblastoma que é causado por mutações no gene RB1 que é um GST.

Múltiplos sistemas controlam e protegem as células de mamíferos contra efeitos potencialmente nocivos de mutações em genes ligados ao processo de carcinogênese, e somente quando vários desses genes estão mutados é que um câncer invasivo consegue se desenvolver (VOGELSTEIN e KINZLER, 2004). Desta forma, o processo de formação do tumor, também conhecido como carcinogênese, é bastante complexo e se dá em três estágios: a iniciação, onde há um agente carcinogênico que provoca modificações em alguns de seus genes; promoção, na qual essas células sofrem uma transformação lenta e gradual para célula maligna; e por fim na progressão há a multiplicação descontrolada das células com perfil maligno culminando no aparecimento de manifestações clínicas da doença (KUMAR *et al.*, 2004; SPANDIDOS, 2007). A progressão se dá quando alterações genéticas iniciais na célula são acompanhadas pelo acúmulo de mutações adicionais que confirmam uma vantagem complementar de crescimento aos descendentes genéticos e esses sejam selecionadas durante a expansão do clone maligno tornando-se dominantes no interior do tumor (COOPER, 2001), podemos observar o processo de transformação na figura 1.

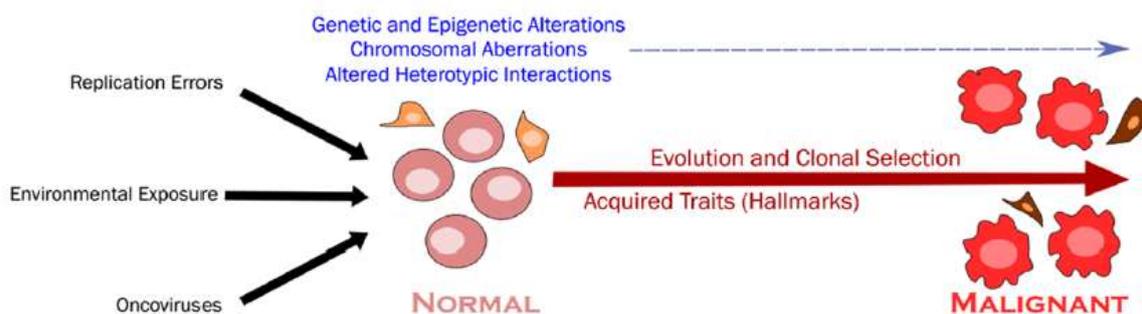


Figura 1: Processo de transformação. Diferentes danos atuam continuamente em células levando a alterações genética e epigenética, aberrações cromossômicas e interações heterotípicas que passam por uma seleção clonal evolutiva levando a malignidade e aquisição das características do câncer. Fonte: FOUAD, 2017.

As células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico, adquirindo uma sucessão de características que lhes permitem tornar-se

tumorigênicas e, finalmente, malignas. Essas características foram inicialmente descritas por Hanahan e Weinberg em 2000 e revisadas em 2017 por Fouad, quando foram divididas em sete, assim como mostrado na figura 2. A primeira seria o crescimento seletivo e a vantagem proliferativa, que se dá pela permissividade do crescimento obtida através da ativação de oncogenes e pela falta de resposta a inibição do crescimento dada pela inativação de GST. Uma segunda característica é a resposta alterada a uma gama de estresses que as células neoplásicas enfrentam, como hipoxia, escassez de nutrientes e danos ao DNA, a adaptação e a alteração da resposta a esses estresses favorecem a sobrevivência e propagação das células (FOUAD, 2017).

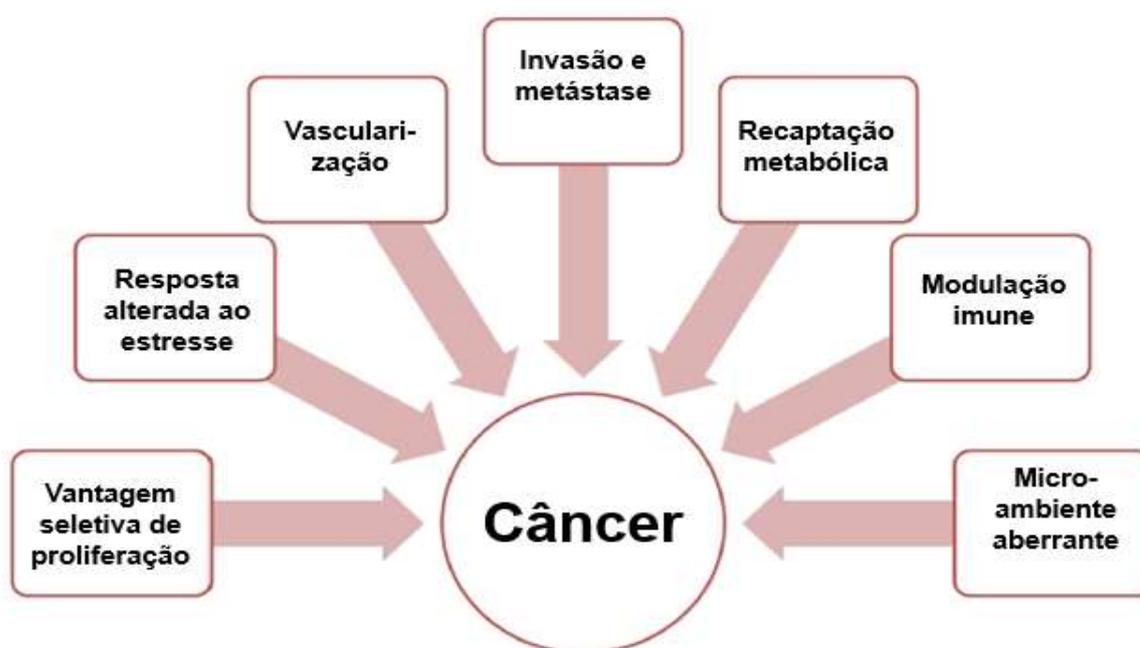


Figura 2: Características das células cancerígenas. Fonte: adaptado de FOUAD, 2017.

A vascularização, em especial a angiogênese é outra importante marca; esse é o processo pelo qual ocorre a brotação, divisão celular, migração e montagem de células endoteliais (ECs) de vasos pré-existentes para irrigar o tumor. A quarta característica é uma das mais conhecidas e danosas no câncer, é a capacidade de invadir o tecido circundante e espalhar-se para locais distantes, formando tumores secundários, em um processo conhecido como metástase. A metástase representa cerca de 90% das mortes relacionadas ao câncer (STEEG, 2006) e envolve uma cascata de eventos, entre eles a invasão da matriz extracelular (MEC), incluindo a

membrana basal e as células estromais; intravasas a vasculatura tumoral; sobreviver ao transporte na circulação, extravasar no parênquima de órgãos distantes; sobreviver e manipular o novo microambiente para formar micrometástases, que podem se transformar em macrometástases (MASSAGUÉ, 2016; VALASTYAN, 2011).

Recaptação metabólica é a quinta marca e fornece uma vantagem seletiva durante a iniciação e a progressão de tumores (DEBERARDINIS, 2016; CAIRNS, 2016). As alterações metabólicas no câncer que conferem essa vantagem podem ser resumidas em seis: absorção desregulada de glicose e aminoácidos, modos oportunistas de aquisição de nutrientes, utilização de intermediários do ciclo de glicólise e ácido tricarboxílico (TCA), aumento da demanda de nitrogênio, alterações na regulação de genes orientados por metabólitos e interações metabólicas com o microambiente (PAVLOVA e THOMPSON, 2016).

A sexta característica é um microambiente alterado. Os tumores são extremamente complexos, a comunicação parácrina contínua entre células cancerígenas e o estroma cria um microambiente tumoral rico e dinâmico em todos os estágios da carcinogênese. Por fim, temos a modulação da resposta imune. Existem três fases para eliminá-la ou modular a doença, são elas a eliminação, o equilíbrio e a fuga. Na eliminação, as respostas imunes inatas e adaptativas cooperam para erradicar os tumores em desenvolvimento. Depois há a fase de equilíbrio, onde algumas células podem apresentar mutações que darão origem a novas variantes mais resistentes à pressão imune. Na fase de fuga alguns clones conseguem evitar a detecção e eliminação imune através de alterações genéticas e epigenéticas e assim crescer de forma descontrolada (MALLADI, 2016). As células neoplásicas ainda podem paralisar os componentes citotóxicos do sistema imunológico através da secreção de fatores imunossupressores ou recrutamento de células inflamatórias imunossupressoras (WELTE, 2016). Assim, a modulação imunológica desempenha um papel chave durante a iniciação e a progressão do câncer.

Além desses marcadores, são relatados na literatura características morfológicas típicas de células tumorais, como por exemplo, a mitose atípica, cromatina abundante, núcleos aberrantes (SIEBER *et al.*, 2003), polimorfismo

(células diferem em tamanho e número), aneuploidia (quantidade anormal de cromossomos), citoplasma geralmente basófilo e citoesqueleto desorganizado (JUNQUEIRA *et al.*, 2005).

Modificações estruturais no genoma ou epigenéticas resultam em um crescimento celular acelerado (BRASIL, 2013). Os mecanismos através dos quais os proto-oncogenes são ativados em oncogenes incluem mutações pontuais, amplificação gênica, translocações cromossômicas e modificações epigenéticas que permitem a sobre-expressão de oncoproteínas, levando a uma proliferação celular descontrolada (CROCE, 2008). Essas são mutações de ganho funcional, pois resultam em propriedades funcionais novas ou alteradas para a proteína codificada e são geneticamente dominantes sobre o segundo alelo normal. Alguns dos primeiros oncogenes descobertos foram os envolvidos na transmissão de sinais de proliferação celular, como os receptores de fatores de crescimento que se tornam constitutivamente ativados em células malignas.

Os genes supressores de tumor formam uma família de genes que atuam como reguladores do ciclo celular, mantendo a integridade do DNA, a senescência celular e o controle da morte por apoptose. Sua desativação ou perda durante a tumorigênese permite o crescimento maligno de células (VOGELSTEIN e KINZLER, 2004). O gene p53 é um importante GST que é estimulado por estresse celular como radiação ionizante, hipóxia, carcinógenos e estresse oxidativo. Esse gene encontra-se mutado em 30-50% dos cânceres humanos, seja por mutações ou pela desregulação de suas vias associadas. Outro GST bastante conhecido é o RB1 que suprime o complexo E2F-DP que participa da ativação da transcrição dos genes exigidos na síntese do DNA. A sua desativação causada por mutações, comum a muitos tipos diferentes de tumor, assegura um estímulo contínuo para a proliferação celular (ELLISEN, 2015).

Os genes que codificam enzimas de reparo também são importantes no desenvolvimento do câncer, pois erros introduzidos durante a replicação podem levar a mutações no DNA. As enzimas de reparo removem e corrigem essas mutações. A perda dessas enzimas leva a um risco aumentado de danos permanentes ao DNA e favorece a progressão tumoral. Como exemplos podem citar as mutações deletérias em BRCA1 ou BRCA2 que codificam enzimas de reparo.

Perda de função dessa enzima aumenta instabilidade genética nas células afetadas, levando a carcinogênese (RICHARD, 2016).

As modificações epigenéticas são alterações não hereditárias que influenciam a expressão gênica. Dois tipos principais de modificações que foram identificados por terem papel importante no processo de progressão tumoral. Essas envolvem a metilação do DNA e a metilação ou acetilação de histonas (TING, 2006). A metilação do DNA ocorre em regiões reguladoras dos genes conhecidas como ilhas CpG, que são alvo das enzimas DNA metiltransferases. Nas células normais, essas regiões são pouco metiladas, levando a uma expressão gênica ativa. Já em células cancerígenas, esses genes encontram-se hipermetilados, resultando no silenciamento de genes supressores de tumores, como o CDKN2A e MLH1 (TING, 2006).

Os microRNAs (miRNAs) também desempenham um importante papel na regulação da expressão gênica e influenciam no processo de carcinogênese. As células tumorais apresentam expressão alterada de muitos miRNAs em comparação com células normais. Esses são pequenas moléculas de RNA não codificante com cerca de 16 a 29 nucleotídeos que agem através da capacidade de fazer par com as moléculas de RNA que codificam proteínas celulares regulando uma ampla variedade de processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação e sobrevivência de células (WIEMER, 2007) e assim os próprios miRNAs possivelmente atuam como oncogenes ou GST. No caso das leucemias linfocíticas crônicas de células B (LLC-B), por exemplo, há uma perda na região cromossômica 13q14 e de alguns miRNAs conhecidos como miR-15a e miR-16-1 (CALIN *et al.*, 2002). Acredita-se que esses miRNAs funcionem como inibidores do fator de sobrevivência BCL2 e sejam silenciados na maioria dos casos de LLC-B, potencializando a sobrevivência das células tumorais. Também podemos citar a família de miRNAs let-7 que pode atuar como supressor tumoral através da inibição do proto-oncogene RAS; a expressão desses miRNAs tem uma correlação inversa com a expressão do RAS em câncer de pulmão (JOHNSON, 2005).

Quanto aos miRNAs potencialmente oncogênicos podemos citar o cluster miR-17-92 que é amplificado em linfomas e acelera a tumorigenicidade por um processo ainda indefinido, além dos miR-372 e miR-373, que são superexpressos

nos carcinomas testiculares e neutralizam a inibição de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) mediada pela p53, provavelmente através da inibição direta da expressão do supressor tumoral LATS2 (VOORHOEVE, 2006).

No ano de 2018 foram estimados 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes em todo mundo (BRAY, 2018). Devido ao crescente número de casos e óbitos, essa doença se tornou um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde ocorrerão 80% dos 27 milhões de casos novos estimados para o planeta em 2025 (WHO, 2007). Esse impacto nos países de baixa e média renda se deve a grande incidência de infecções causadoras de câncer como a hepatite e o vírus do papiloma humano (HPV), a detecção em fase tardia e a falta de acesso ao tratamento (PLUMMER, 2016). Entre os cânceres viscerais, os mais incidentes no mundo são pulmão (2.094 milhões), mama (2.089 milhões), colorretal (1,8 milhões), próstata (1,3 milhões) e estômago (1 milhão) (BRAY, 2018). O impacto econômico do câncer é significativo e está aumentando, em 2010 esse custo foi de aproximadamente 1,16 trilhão de dólares (STEWART, 2014).

No Brasil, as estimativas indicam a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer e 190 mil mortes por ano para o biênio 2018-2019. Excluindo-se o câncer de pele não melanoma, que corresponde a 85 mil casos/ano, os tumores mais frequentes no país são o de próstata (68 mil) em homens e mama (60 mil) em mulheres (INCA, 2017). A figura 3 apresenta os 5 tumores com maior incidência estimada para 2018/2019, excluindo-se o câncer de pele não melanoma.

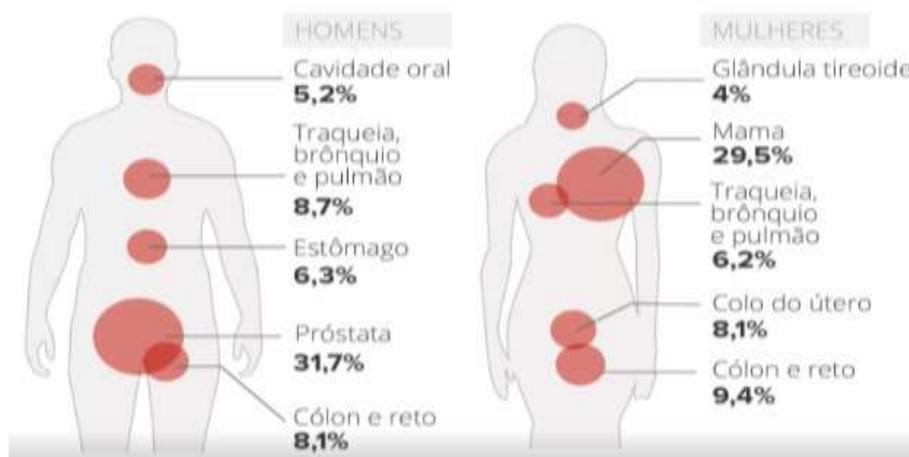


Figura 3: Cinco tumores com maior incidência estimada para 2018. Fonte: INCA, 2017.

Pode-se perceber alterações no perfil das enfermidades que acometem a população, a partir dos anos 60 as doenças infecciosas e parasitárias deixaram de ser a principal causa de morte, passando a ser as doenças do aparelho circulatório e neoplasias malignas. O principal fator para essa mudança é o envelhecimento da população, além de ações de promoção e recuperação da saúde (INCA, 2015). O investimento no tratamento e diagnóstico da doença também tem crescido, somente no ano de 2015, os custos econômicos diretos do câncer no Brasil (considerando cirurgia oncológica, radioterapia, quimioterapia e iodoterapia) foram de R\$ 3.280,25 bilhões.

Quando se fala de câncer de colón e reto, estimam-se 17.380 casos novos em homens e 18.980 em mulheres por ano para o biênio 2018-2019. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,83 e 17,9 casos novos a cada 100 mil homens e 100 mil mulheres, respectivamente. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto em homens no Nordeste é de 7,98/100 mil, sendo o terceiro câncer mais frequente e o segundo em mulheres com 9,52/100 mil casos (INCA, 2017). Esse tipo de câncer também tem uma relevância a nível mundial uma vez que é a terceira neoplasia maligna mais comumente diagnosticada e a segunda principal causa de morte por câncer, provocando 881 mil óbitos em 2018 (BRAY, 2018). É interessante notar que as maiores taxas de incidência desse tipo de neoplasia maligna são provenientes de países da Europa, América do Norte e Austrália que possuem um índice de desenvolvimento humano (IDH) elevado, sendo uma doença do “estilo de vida”, mais presente em populações com hábito alimentar rico em consumo de carnes vermelhas e carnes processadas; pouca ingestão de frutas, legumes e verduras; alta prevalência de obesidade e sobrepeso, inatividade física, consumo de álcool e tabagismo (FERLAY *et al.*, 2013).

Entre os principais tratamentos para as neoplasias estão a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia (KATZUNG, 2003), terapia de fotorradiação (KUSUZAKI *et al.*, 2007) e imunoterapia (HERR e MORALES, 2008). Normalmente é realizada uma terapia combinada, onde são associados mais de um tipo de tratamento.

2.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO

As proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são uma família de serina/treonina quinases pertencentes ao grupo das proteínas-quinase juntamente com as ciclina dependente de quinase (CDK), glicogênio sintase quinase (GSK) e CDK-Like quinases (HANKS *et al.*, 1988). As vias de sinalização MAPKs são altamente conservadas evolutivamente, desde as plantas e leveduras até os mamíferos (WIDMANN *et al.*, 1999). Os membros da superfamília MAPK se dividem de acordo com a similaridade da sequência primária de aminoácidos e modo de ativação. De maneira geral foram identificados três grupos principais: a família cinase regulada por sinal extracelular (ERK 1-8), cinase e N-terminal c-Jun cinase (JNK 1-3) e p38s (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ) (PEARSON *et al.*, 2001; WIN *et al.*, 2018).

A ativação das MAPK necessita de uma dupla fosforilação em dois resíduos conservados de treonina (Thr) e tirosina (Tyr) para que haja a ativação completa (CANAGARAJAH *et al.*, 1997; PEARSON *et al.*, 2001) e se dá através de uma cascata de sinalização em três camadas, que consiste em uma MAPK efetora, uma MAPK ativadora (MEK, MKK ou MAPK quinase) e um ativador MEK (MEK kinase [MEKK] ou MAPK quinase quinase [MKKK]) (SCHAEFFER e WEBER, 1999). Estímulos extracelulares (mitógeno) na membrana celular levam a ativação de pequenas GTPases e várias proteínas quinases que fosforilam e ativam uma MKKK que fosforila diretamente MKK em seu resíduo de serina e treonina, que, uma vez ativada, fosforila MAPK, ativando-a (PEARSON *et al.*, 2001). A capacidade de MAPKs específicas reconhecerem e ativarem diferentes MAPKs depende dos motivos tripeptídicos distintos que existem nos sítios de fosforilação, já que Thr e Tyr são separados por um único aminoácido, contribuindo assim para a especificidade dos mecanismos moleculares pelos quais cada família MAPK pode ser ativada. Os ERKs exibem Thr-Glutâmico-Tyr em seu sítio de ativação; JNKs apresenta Thr-Prolina-Tyr; e p38 possui Thr-glicina-Tyr (WIDMANN *et al.*, 1999; PEARSON *et al.*, 2001).

Uma vez que MAPK encontra-se ativada, interage e fosforila uma variedade de substratos citoplasmáticos que culminam na modulação de fatores de transcrição

que conduzem a expressão de genes específicos, desempenhando um papel essencial na transdução de sinal, modulando a transcrição de genes no núcleo em resposta a mudanças no ambiente celular, como mostrado na figura 4. Dessa forma, a sinalização através dessa via é fundamental na regulação de várias respostas biológicas como a progressão do ciclo celular, resposta ao estresse e metabolismo (CARGNELLO *et al.*, 2011) podendo atuar tanto de maneira pró-oncogênica (proliferação, transformação oncogênica, invasão e metástase) ou na supressão tumoral (através da indução de senescência e ubiquitinação/degradação de proteínas necessárias para a atividade do ciclo celular, sobrevivência e apoptose) (KIM, 2015). Mutações causadas pelo câncer levam à desregulação dessa via com consequente aumento da malignidade tumoral. As MAPKs são, portanto, uma via crítica para a sobrevivência, disseminação e resistência de células cancerosas (DE LUCA *et al.*, 2012; BUROTTO *et al.*, 2014).

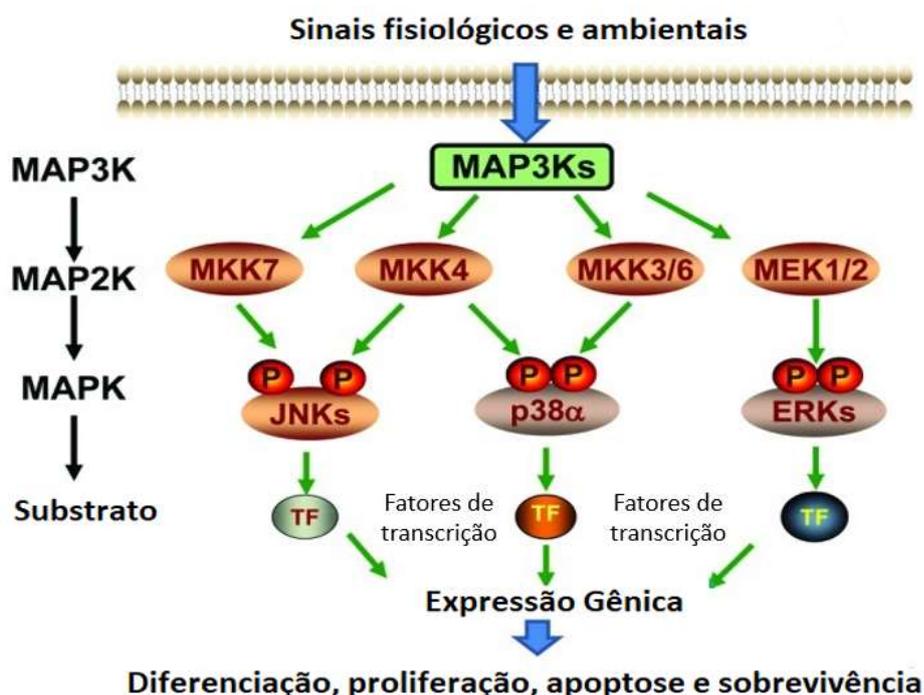


Figura 4: Ativação das MAPKs. Fonte: Adaptado de WANG e XIA, 2012.

As neoplasias requerem que as células adquiram as características da tumorigênese (FOUAD, 2017) e a desregulação de processos celulares (JOHNSON *et al.*, 1996). Anormalidades na sinalização MAPK interferem em quase todos esses processos, e desempenham um papel crítico no desenvolvimento e progressão do câncer (BRADHAM e MCCLAY, 2006). Assim, têm se tentado desenvolver novas

estratégias terapêuticas que sejam capazes de restaurar a função MAPK adequada em células tumorais (SEBOLT-LEOPOLD, 2000; ENGLISH e COBB, 2002).

As quinase JNK, ERK e p38 estão envolvidas na carcinogênese (KIM, 2015; LEI, 2014). A família ERK quinase é ativada principalmente por fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico e age em numerosos alvos citoplasmáticos e nucleares para promover crescimento e divisão celular (GAESTEL, 2006). Embora ERK1/2 tenham sido descritos como um fator pró-sobrevivência, a especificidade da ativação ou a inibição dos efetores downstream determina a consequência de sua ativação sobre a sobrevivência celular e em algumas circunstâncias podem funcionar de forma pró-apoptótica (LU, 2006). Quando ocorrem estímulos danosos ao DNA a via ERK1/2 é ativada em células primárias e várias linhagens celulares sensibilizando-as para a apoptose induzida por esses danos (TANG, 2002).

A família JNK quinase é ativada em resposta a citocinas, fatores de crescimento, patógenos, fármacos anticancerígenos (cisplatina, adriamicina ou etopósido), estresse e citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (CHEN *et al.*, 1996; JOHNSON *et al.*, 1996; ZANKE *et al.*, 1996). Encontra-se relacionado à transformação de oncogenes e vias do fator de crescimento. Irregularidades na atividade de JNK foram associadas, entre outras doenças ao câncer (BUBICI, 2014; FEY, 2012; JOHNSON, 2002). Múltiplos papéis das moléculas de sinalização JNK como antiapoptótica e proapoptóticas têm sido relatados. Acredita-se que as várias funções da via JNK na apoptose dependem do tipo de célula, de diferenças de maturação ou diferenciação, do número de passagem e do estado do ciclo celular. Foi mostrado que JNK é necessária para a apoptose induzida por agentes quimioterapêuticos (YU *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 1999; LAURENT e JAFFREZOU, 2001; STADHEIM e KUCERA, 2002). Nas células neoplásicas, essa via altera a expressão de genes e estabelece a sensibilidade celular aos estímulos apoptóticos, possivelmente por promover a entrada no ciclo celular e aumentar a sensibilidade aos antineoplásicos.

A quinase p38, é ativada em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares, incluindo choque osmótico, citocinas inflamatórias, lipopolisacarídeos (LPS), anisomicina, luz UV e fatores de crescimento; está ligada a asma, auto-

imunidade e inflamação (FEY, 2012). É um importante mediador da apoptose induzida por radiação e sua inibição reduziu a ativação da caspase (MUNSHI, 2013). Na maioria dos casos, p38 são ativadas juntamente com JNKs (WERLEN *et al.*, 2003). Igualmente a via de JNK, o envolvimento do p38 na apoptose é diversificado pois promove a morte celular (SARKAR *et al.*, 2002; PORRAS *et al.*, 2004) ou também aumentam a sobrevivência (LIU *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2002), crescimento celular (JURETIC *et al.*, 2001) e diferenciação (YOSIMICHI *et al.*, 2001).

As MAPK foram a primeira grande via proto-oncogênica a ser caracterizada no melanoma com a descoberta da quinase BRAF mutante em quase 50% das amostras de tumor (JOHNSON, 2015). Além de mutações NRAS e NF1 presente em 15-20% dos casos. O primeiro componente da via MAPK é a família Ras que se liga ao trifosfato de guanosina (GTP), adotando a conformação ativa, permitindo-lhe fosforilar e ativar a próxima quinase na cascata de sinalização, Raf (que possui três isoformas tecido específicas: ARAF, BRAF e CRAF) (KWONG, 2010). Ocorrem etapas sucessivas de fosforilação e ativação de quinase que amplifica o sinal proliferativo, levando de Ras a RAF e MEK e então culminando na ativação da quinase efetora ERK. Mutações nos vários componentes desta via foram encontrados em uma variedade de cânceres (BUROTTA, 2015). Por exemplo, o RAS é encontrado mutado em quase um terço dos cânceres em humanos (KEYSE, 2008) com maior destaque no câncer colorretal, de pâncreas e pulmonar. Enquanto que NRAS, uma isoforma de Ras, está mutada em 15-20% dos melanomas.

Além das MAPK, a proteína p53 também desempenha um importante papel na carcinogênese pois é um regulador negativo do ciclo celular que direciona a expressão de uma grande variedade de genes que controlam a resposta celular aos danos no DNA e a outros estresses celulares. Entre esses genes está o CDKN1A (p21), que codifica um inibidor de quinases dependente de ciclina, que regula o ciclo celular (EL-DEIRY, 1993). A ativação de p53 provoca uma interrupção na fase G1 do ciclo celular, permitindo que as células façam o reparo nos danos do DNA antes de passarem para a fase S e da replicação do DNA ou ainda sua ativação pode resultar na apoptose quando o dano é irreparável. Assim, ao haver mutações no gene TP53, o ciclo celular defeituoso não será reparado, podendo levar ao câncer (PRIVES e HALL, 1999). As diversas funções desse gene estão apresentadas na figura 5.



Figura 5: p53 e suas funções. Fonte: Adaptado de PFLAUM et al., 2014.

A p53 também é um alvo da cascata de p38. Ela é ativada através da via p38 e é um substrato direto para essa MAPK, enquanto que MDM2 (envolvida na degradação de p53) foi identificada como alvo de MK2. A fosforilação de MDM2 por MK2 leva a ativação de MDM2 e aumento da degradação da p53 (GAESTEL, 2006). Dessa maneira, compreender a estrutura e as bases moleculares das vias de sinalização associadas a p53, e como elas apresentam-se desreguladas em diferentes tipos de cânceres é fundamental para o desenvolvimento de estratégias anticancerígenas direcionadas (JOERGER e FERSHT, 2016).

Já se sabe que as vias da MAPK e p53 podem ser ativadas em resposta a alguns medicamentos. Por exemplo, a doxorubicina (DOX), que é um potente quimioterápico, têm seu efeito citotóxico associado a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), as EROs induzem a ativação de vias de sinalização com as MAPK. Foi mostrado que a DOX desencadeia a ativação de ERK, JNK e p38 em culturas primárias de hepatócitos de ratos mesmo na ausência de estresse oxidativo (NAVARRO, 2006). Também se evidenciou que a ativação de ERK2 pela DOX leva à fosforilação de p53 em Thr55, aumentando a atividade de p53 transcricional (YEH, 2001). A cisplatina (CIS) é outro quimioterápico muito utilizado, que ativa a MAP quinase quinase-quinase ASK1 e a MAPKK SEK1 (ou MKK4) e MKK3/MKK6, que por sua vez ativam JNK1/SAPK e p38 antes de ativarem as pró-caspases que iniciarão a apoptose em carcinoma de ovário humano (OVCAR-3) e linhagem de rim embrionário humano (293T) (CHEN, 1999). Além disso, a fosforilação de p53

induzida pela CIS, o aumento da meia-vida de p53 e a acumulação da expressão de genes downstream a p53, como p21WAF-1 e MDM2 em células de carcinoma de ovário (A2780), são bloqueadas pela inibição de ERK1/2 (PERSONS, 2000). A ativação de ERK aumenta a morte celular induzida por CIS no osteossarcoma e em linhagens de neuroblastoma (WOESSMANN, 2002) e medeia a parada do ciclo celular e apoptose em resposta à etopósido, adriamicina e radiação ionizante mesmo independente de p53 (TANG, 2002). Dessa maneira, é importante que se entenda como esses quimioterápicos atuam nessas vias e, baseado nisso, desenvolver novas terapias mais eficazes.

2.3 COMPLEXOS DE RUTÊNIO

A química de compostos inorgânicos oferece uma série de opções para o desenho de fármacos que não seriam possíveis pela química orgânica. Um amplo número de coordenação e geometrias, os diferentes estados redox disponíveis, várias propriedades termodinâmicas e cinéticas, bem como as propriedades intrínsecas dos íons metálicos podem resultar em uma variedade de reações em sistemas biológicos (URSZULA *et al.*, 2015). Assim, ao longo da história, muitos compostos contendo metais têm sido utilizados para tratar uma ampla variedade de desordens (CHEN *et al.*, 2009) e a cada dia vêm ganhando preferência como ferramentas de diagnóstico e agentes anticancerígenos (YAN *et al.*, 2005) sendo uma linha de investigação importante e promissora.

A descoberta da citotoxicidade de compostos contendo platina impulsionou o estudo de complexos de metais de transição como possíveis agentes anticancerígenos, sendo um marco para a química inorgânica medicinal (BERTINI *et al.*, 1994). Desde então o desenvolvimento de compostos com propriedades antitumorais contendo platina ou outros metais tem sido motivado, tanto pelo sucesso terapêutico da cisplatina, quanto visando superar limitações como a resistência e os graves efeitos colaterais (MOMEKOV e MOMEKOVA, 2006).

Os fármacos clássicos baseados em metais possuem ligantes não bioativos, como a cisplatina, enquanto os complexos antitumorais não clássicos apresentam ligantes com atividade farmacológica, como compostos naturais, nucleosídeos,

aglutinantes de DNA ou inibidores enzimáticos (QIN *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2014). Complexos metálicos que apresentam solubilidade em água e capacidade de ligação a nucleobases, fragmentos de DNA, aminoácidos, péptidos e proteínas atualmente recebem atenção especial principalmente devido a sua utilidade clínica, inclusive no tratamento do câncer (FERNANDEZ, 2010).

O rutênio é capaz de formar complexos com os mais variados ligantes e é bastante estável, o que amplia as possibilidades de aplicações biológicas. Apresenta estrutura octaédrica que proporciona a formação de ligações fortes com o DNA. Além disso, têm demonstrado efeito inibitório sobre a enzima topoisomerase e indução de espécies reativas de oxigênio (MARKOWSKA *et al.*, 2015; ZENG *et al.*, 2016). Outra propriedade interessante do rutênio é que este possui uma ampla variedade de coordenações; vários estados de oxidação (Ru (II), Ru (III) e Ru (IV)) em condições fisiológicas; lenta taxa de substituição de ligante (LEVINA *et al.*, 2009); a possibilidade de aplicação em terapia fotodinâmica e baixa toxicidade (MALINA, 2001). Os compostos de rutênio (III) podem agir como pró-fármacos, já que podem ser reduzidos a derivados de rutênio (II) em tumores sólidos, onde há um ambiente de hipóxia que funciona como meio redutor. Acredita-se que a atividade antitumoral deles se deva à redução *in vivo* para espécies de rutênio (II), mais reativas. Dentro deste quadro, há um interesse crescente por compostos de rutênio mais estáveis no estado de oxidação +2 (HUXHAM *et al.*, 2003; SCOLARO *et al.*, 2005).

Por ser um metal de transição do grupo 8, mesmo grupo químico do ferro, o rutênio e o ferro são moléculas muito semelhantes, principal motivo para sua baixa toxicidade e acúmulo nas células tumorais, uma vez que o rutênio pode se ligar a biomoléculas responsáveis pela solubilização, transporte e detoxificação do ferro em mamíferos como a transferrina e albumina. Já que as células tumorais têm grande necessidade de ferro, apresentam maior expressão de receptores de transferrina nas suas superfícies, fazendo com que tenham maior absorção e acúmulo do rutênio (ALLARDYCE e DYSON, 2001).

O desenho de fármacos à base de rutênio segue, de modo geral, as seguintes opções: (i) construção de complexos com alvos seletivos e específicos; (ii) explorar os potenciais alvos e mecanismos; (iii) avaliação da relação estrutura-atividade; (iv)

explorar pró-fármacos ativados por luz; e (v) explorar o acúmulo e ativação do rutênio nos tecidos tumorais usando sistema de entrega de nano-fármacos (ZENG *et al.*, 2017). Assim, esses complexos têm sido objeto de grande atenção por terem propriedades antimetastática e baixa toxicidade.

Diversos agentes baseados em rutênio estão atualmente em testes clínicos de fase I ou II e têm apresentado resultados promissores (LENTZ *et al.*, 2009; LEIJEN *et al.*, 2015). Entre esses estão os Ru (III) NAMI-A e KP1019 que podem discriminar as células saudáveis das células cancerosas por características como hipóxia e alto metabolismo celular (BERGAMO e SAVA, 2011). Estes complexos mostram baixa citotoxicidade e toxicidade, mecanismos de ação alternativos fornecendo interações mais elaboradas e intrincadas com o DNA dupla hélice, não apenas formando ligações coordenadas, mas também ligações de hidrogênio e intercalação entre pares de bases de DNA (PEACOCK *et al.*; 2008). Além de apresentar atividade contra diversos tipos de câncer (AIRD *et al.*, 2002). Outros complexos como organometálicos de rutênio(II)-arenos (RM175 e RAPTA) também têm se mostrado promissores (BERGAMO *et al.*, 2010; WEISS *et al.*, 2015). Apesar dos estudos e esforços realizados, nenhuma droga baseada em rutênio foi comercializada até o momento.

Estudos de interação *in vitro* com nucleotídeos resultaram na ligação entre rutênio e DNA, o que ocorre principalmente no N7 da guanina (KÜNG *et al.*, 2001). Os complexos de rutênio podem se ligar ao DNA por meio de ligações eletrostáticas, intercalações, ligações covalentes e não-covalentes (ZHANG *et al.*, 2010). Resultados interessantes são observados também com os complexos de rutênio (II) coordenados com N-heterocíclicos, uma vez que esses compostos possibilitam mimetizar moléculas biológicas essenciais para o metabolismo como ácidos nucléicos, proteínas, enzimas e alcaloides; dentre os ligantes N-heterocíclicos destacam-se os ligantes piridínicos e bipyridínicos (KAIM, 2013). A bipyridina é derivada do acoplamento de dois anéis piridínicos e pode existir na forma de seis isômeros, o isômero que mais se destaca é o 2,2'-bipyridina, por ser um ligante quelante formador de compostos de coordenação relativamente estáveis com a maioria dos íons de metais de transição. São capazes de estabilizar espécies de alto e baixo estado de oxidação, sendo assim é um dos ligantes mais estudados na

química de coordenação, resultando em complexos estáveis. Os ligantes bipyridínicos são excelentes na construção de complexos metálicos, de fórmula geral $[M(\text{bpy})_3]$ e $[M(\text{bpy})_2]$, que vai depender da geometria de coordenação preferencial do centro metálico (LE BOZEC e RENOARD, 2000; MORENO *et al.*, 2003).

Os análogos de nucleosídeos têm sido amplamente utilizados, existem pelo menos 15 aprovados pelo FDA usados para tratar vários tipos de câncer, que representam quase 20% dos quimioterápicos. Complexos de metais de transição contendo compostos semelhantes a bases do DNA têm sido estudados para entender como os metais são capazes de interagir com o DNA (GARCÍA, 2008; NATH, 2009). Esse tipo de complexo é uma estratégia bastante interessante no desenho racional de moléculas bioativas pois podem atuar como um “cavalo de tróia” nas células tumorais, interferindo na replicação e transcrição, uma vez que essas bases são reconhecidas pelas DNA polimerases e usadas na síntese da dupla fita de DNA (JOHNSON, 1999).

Uma das quatro bases que são utilizadas na construção da fita de DNA é a timina (Ti), ela pertencente ao grupo das pirimidinas, bases que apresentam um anel simples na sua estrutura química. Na figura 6, podemos observar a estrutura molecular de Ti com numeração de átomos. Essa base pode existir em equilíbrio sob duas formas, a mais estável, que é a cetônica e a enólica é menos estável (GANGULI, 1994).

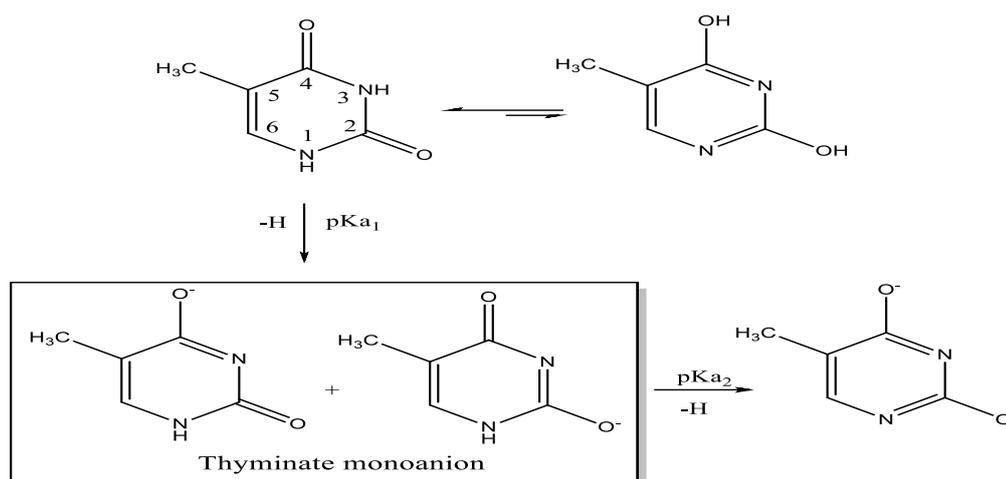


Figura 6: Estrutura da timina, equilíbrio tautomérico e anions (desprotonados a partir de N3 e N1).
Fonte: CORREA *et al.*, 2017.

A molécula de timina pode ser desprotonada, apresentando espécies monoanônicas e dianiônicas. Quando o átomo de N3 é desprotonado, existem duas possibilidades para formar espécies monoanônicas (GANGULI, 1994), com carga negativa localizada no C4-O⁻ ou no grupo C2-O. Graças a essa versatilidade estrutural essa base apresenta muitas possibilidades de reagir com íons metálicos em diferentes modos, o que torna de interesse analisar o potencial citotóxico e mecanismo de ação de complexos de rutênio com timina. Recentemente, nosso grupo de pesquisa sintetizou um complexo de rutênio com timina [Ru(PPh₃)₂(Thy)(bipy)]PF₆ (onde PPh = trifetilfosfina, Thy = timina and bipy = 2,2'-bipiridina), mostrado na figura 7, que apresentou potente atividade citotóxica e foi capaz de induzir morte celular por apoptose (CORREA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Assim, dada a grande importância das MAPKs e p53 no desenvolvimento do câncer, bem como o potencial apresentado pelos complexos de rutênio para serem novos quimioterápicos, decidimos estudar o papel das vias de sinalização MAPK e p53 na apoptose induzida pelo complexo de rutênio com timina.

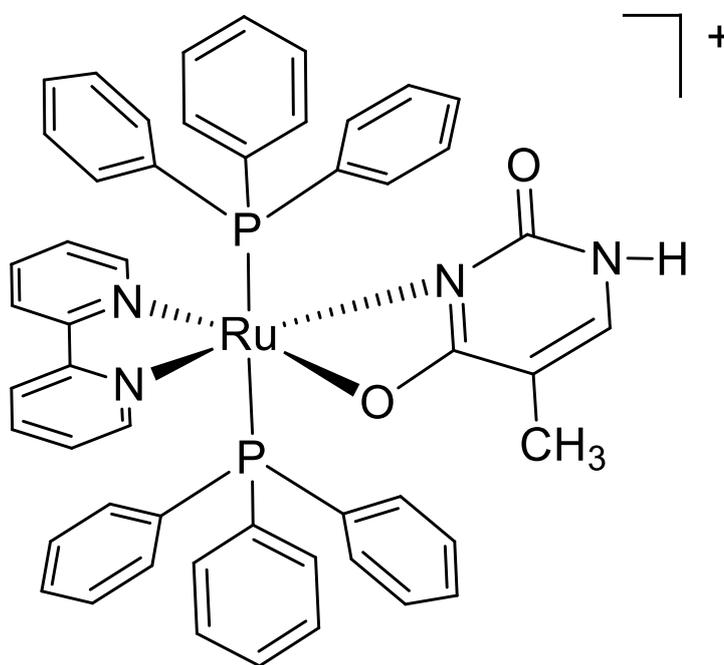


Figura 7: Estrutura química do complexo de rutênio(II)-timina.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Estudar as vias de sinalização envolvidas na apoptose induzida pelo complexo de rutênio com timina $[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2(\text{Thy})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ em células de carcinoma de cólon humano HCT116 e seu efeito em modelo de xenoenxerto utilizando camundongos C.B-17 SCID.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito dos inibidores de JNK, p38, ERK1/2 e p53 na apoptose induzida pelo complexo de rutênio com timina em células HCT116;
- ✓ Quantificar os níveis de phospho-ERK1 (T202/Y204), phospho-JNK2 (T183/Y185), phospho-p38 α (T180/Y182), phospho-p53 (S15), MDM2 e phospho-histona H2AX (S139) em células HCT116 tratadas com CRT;
- ✓ Avaliar a eficiência antitumoral *in vivo* do complexo de rutênio com timina em modelo xenográfico com células HCT116.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DO COMPLEXO

O complexo de rutênio com timina $[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2(\text{Thy})(\text{bipy})]\text{PF}_6$ (CRT) foi sintetizado pelo Dr. Prof. Alzir Azevedo Batista e pelo Dr. Rodrigo de Souza Corrêa no Laboratório de Química Inorgânica da UFSCAR (Universidade Federal de São Carlos) conforme descrito anteriormente (CORREA et al., 2018). Resumidamente, dissolveu-se a nucleobase de timina (23 mg; 0,18 mmol) num balão de Schlenk com 50 mL de uma mistura de diclorometano/metanol (1:1 v/v) contendo trietilamina (10 μL) e KPF₆ (0,12 mmol; 15,0 mg). Em seguida, adicionou-se 100 mg (0,12 mmol) do precursor $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{bipy})]$. A solução foi mantida sob refluxo e atmosfera inerte, e agitada durante 48 h. A solução final foi concentrada a 2 mL e adicionou-se 10 mL de água para precipitar um pó laranja. Os sólidos foram removidos por filtração, lavados com água morna, éter dietílico separadamente e secos sob vácuo. O complexo foi caracterizado por espectroscopia, por análises de espectrometria e cristalografia de raio X.

4.2 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA

A linhagem de células tumorais HCT116 (carcinoma de cólon humano) foi obtida da *American Type Culture Collection* - ATCC (Rockville, Maryland, U.S.A.). A linhagem celular foi cultivada em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. O crescimento celular foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido e a troca do meio de cultivo ocorreu sempre que o limite de confluência das células fosse alcançado, ou houvesse necessidade de repor nutrientes. Para a manutenção foi utilizada uma solução de tripsina EDTA a 0,25% (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) para destacar as células das garrafas de cultura. Todos os experimentos foram conduzidos com células em fase exponencial de crescimento. A linhagem foi testada

para micoplasma usando um kit de detecção de micoplasma por coloração com Hoechst (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a fim de evitar o uso de células contaminadas.

4.3 MARCAÇÃO PARA ANEXINA V / IODETO DE PROPÍDIO

O procedimento de detecção de apoptose e necrose por Anexina V-FITC/Iodeto de Propídio consiste na ligação da anexina V-FITC à fosfatidilserina, na membrana das células que estão iniciando o processo de apoptose e a ligação do iodeto de propídeo ao DNA das células na morte celular por necrose ou estágios de apoptose tardia. As células foram plaqueadas na concentração de $0,7 \times 10^5$ cél/mL e incubadas por 48 horas com a substância teste. Após os tratamentos, as células foram centrifugadas e posteriormente lavadas com salina. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados ao precipitado de células 400 μ L de tampão de ligação. Em seguida foram acrescentados 5 μ L de Anexina V-FITC e 5 μ L de iodeto de propídeo. As células foram então incubadas em temperatura ambiente por 15 min, após esse período, foi realizada a aquisição dos dados em citômetro de fluxo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostras.

No ensaio de prevenção da apoptose com inibidores farmacológicos, foram utilizados inibidor de MEK (MAP quinase quinase, MKK) (U-0126; Cayman Chemical), inibidor de JNK/SAPK (c-Jun N-terminal quinase) (SP 600125; Cayman Chemical), inibidor de p38 MAPK (PD 169316; Cayman Chemical) e inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica; Cayman Chemical). Para avaliação da prevenção da apoptose, as células foram pré-tratadas 2h antes com 5 μ M de U-0126, 5 μ M de SP 600125, 5 μ M de PD 169316 ou 10 μ M de pifitrina- α cíclica, seguida pela incubação com o controle negativo, controle positivo e o complexo por 48h. As células foram então tripsinizadas e a metodologia de anexina V/IP foi adotada, conforme descrito acima.

4.4 ELISA FOSFO-ESPECÍFICO

As proteínas alvo fosfo-JNK2 humano (T183/Y185), fosfo-p38 α (T180/Y182), fosfo-ERK1 (T202/Y204), fosfo-p53 (S15), MDM2 total e fosfo-histona H2AX (S139) foram quantificadas no lisado celular utilizando kits de ELISA tipo sanduíche (R & D Systems, Inc. Minneapolis, MN, EUA). As análises foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, as células foram lisadas em uma solução buffer contendo 100mM de tris, pH 7,4, 150mM de NaCl, 1mM de EGTA, 1mM de EDTA, 1% de triton X-100 e 0,5% de desoxicolato de sódio mais coquetel inibidor de fosfatase, coquetel inibidor de protease e PMSF 1mM imediatamente antes de usar (todos comprados da Sigma-Aldrich Co.). A quantificação total de proteínas foi realizada em cada amostra pelo ensaio de proteínas Pierce (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) usando BSA como padrão. Absorbância a 450nm foi medida usando o leitor de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

4.5 *IN VIVO*

4.5.1 Animais

Foram utilizados um total de 95 camundongos CB17 SCID (machos e fêmeas entre 20-25g) obtidos e mantidos nas instalações do IGM-FIOCRUZ. Os animais ficaram alojados em gaiolas com acesso livre a comida e água. Todos eles estavam submetidos a um ciclo de luz-escuro de 12 em 12h e foram tratados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal da SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) sob o número 06/2015.

4.5.2 Ensaio de atividade antitumoral *in vivo*

Para este ensaio, as células tumorais HCT116 a uma concentração de 2×10^7 células por 500 μ L foram injetadas subcutaneamente na axila dianteira

esquerda de camundongos CB17 SCID. O complexo de rutênio com timina foi dissolvido inicialmente em DMSO 5% e administrados nos camundongos por via intraperitoneal uma vez ao dia durante 15 dias consecutivos. O tratamento foi iniciado um dia após a inoculação do tumor. Os camundongos foram divididos, randomicamente, em 5 grupos: grupos controle negativo (DMSO 0,5%, n=23), controle positivo (DOX 0,8mg/kg, n=22 e 5-FU 15mg/kg, n=10) e grupos do tratamento com CRT1 (n=10) e 2mg/kg/dia (n=20). No dia 16, os camundongos foram anestesiados e amostras de sangue periférico foram coletadas da artéria braquial para análises hematológicas. Em seguida foram eutanasiados por deslocamento cervical para que os tumores fossem excisados e pesados. O efeito do tratamento foi expresso como a porcentagem de inibição do controle.

4.5.3 Avaliação toxicológica sistêmica

Para avaliar o efeito do complexo sobre o peso dos animais, os camundongos foram pesados no início e fim do tratamento. Houve constante monitoramento ao longo do estudo, quanto ao aparecimento de possíveis anomalias como alterações na motricidade, tremores, tônus musculares, deambulação, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia, irritabilidade e morte. Ao término do tratamento os animais foram sacrificados e os seguintes órgãos foram coletados: pulmões, fígados, rins e coração. Esses órgãos foram pesados e analisados através de observação de possíveis sinais de lesões graves ou variações de cor e hemorragia, seguido de fixação em solução de formol a 10% para obtenção de cortes com 3 micrometros que foram corados com hematoxilina e eosina tendo sua análise histológica realizada por meio de microscopia de luz.

A análise hematológica foi realizada com o equipamento Advia 60 Bayer que é capaz de avaliar os seguintes parâmetros: contagem de leucócitos, hemácias e plaquetas; hematócrito (HCT), hemoglobina (HB), volume corpuscular médio (VCM) e contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, monócitos, granulócitos).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. 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 5.01 (Intuitive Software for Science) foi utilizado para a realização de todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 O COMPLEXO RU (II)-TIMINA CAUSA MORTE CELULAR APOPTÓTICA MEDIADA POR DANO AO DNA ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO JNK/P38/ERK1/2 INDEPENDENTE DE P53 EM CÉLULAS HCT116

A avaliação do padrão de morte celular através da marcação com Anexina V/PI após pré-tratamento com inibidores farmacológicos de MEK (U-0126), inibidor de JNK/SAPK (SP 600125), inibidor de p38 MAPK (PD 169316) e inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica), seguido do tratamento com o complexo de rutênio com timina a 4 μ M por 48h foi realizada para determinar se essas vias estavam ou não envolvidas na morte celular induzida pelo complexo.

Através dos *dot plots* obtidos por citometria de fluxo foi possível avaliar o perfil de morte celular com e sem o uso dos inibidores. Observou-se um aumento significativo de células em apoptose após incubação com CRT ($p < 0,05$), em comparação com o controle negativo (DMSO 0,1%), indicando que o complexo provoca morte celular pela via apoptótica. A doxorrubicina, utilizada como controle positivo, também induziu um aumento significativo da morte celular. Quando pré-tratamos as células com o inibidor de MKK, conhecido por inibir a ativação de ERK1/2, inibidor de JNK e inibidor de p38 foi possível notar uma redução significativa da apoptose induzida pelo complexo de rutênio com timina (figura 8A). Para facilitar a visualização desses resultados, a quantificação de células apoptóticas com e sem o inibidor é mostrada na figura 8B.

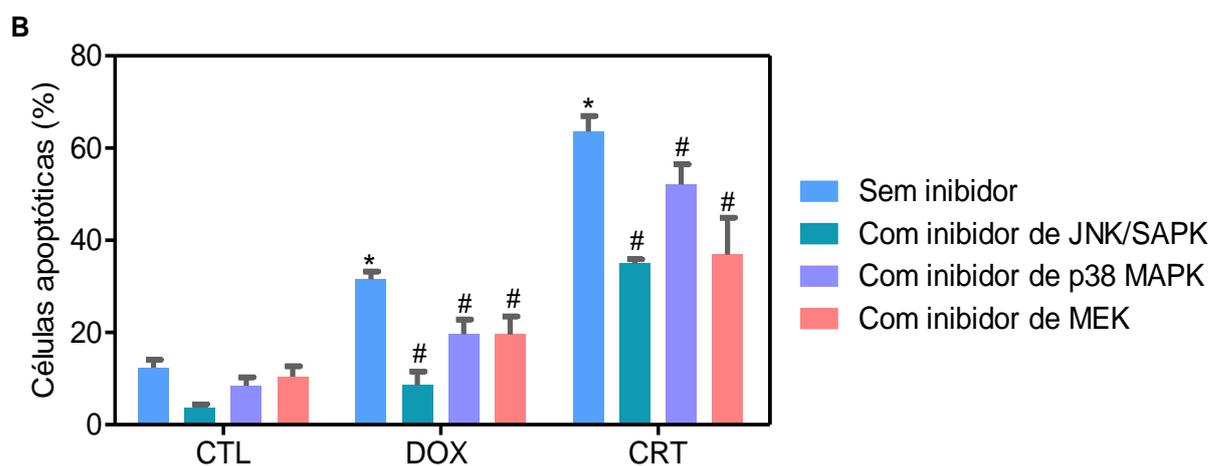
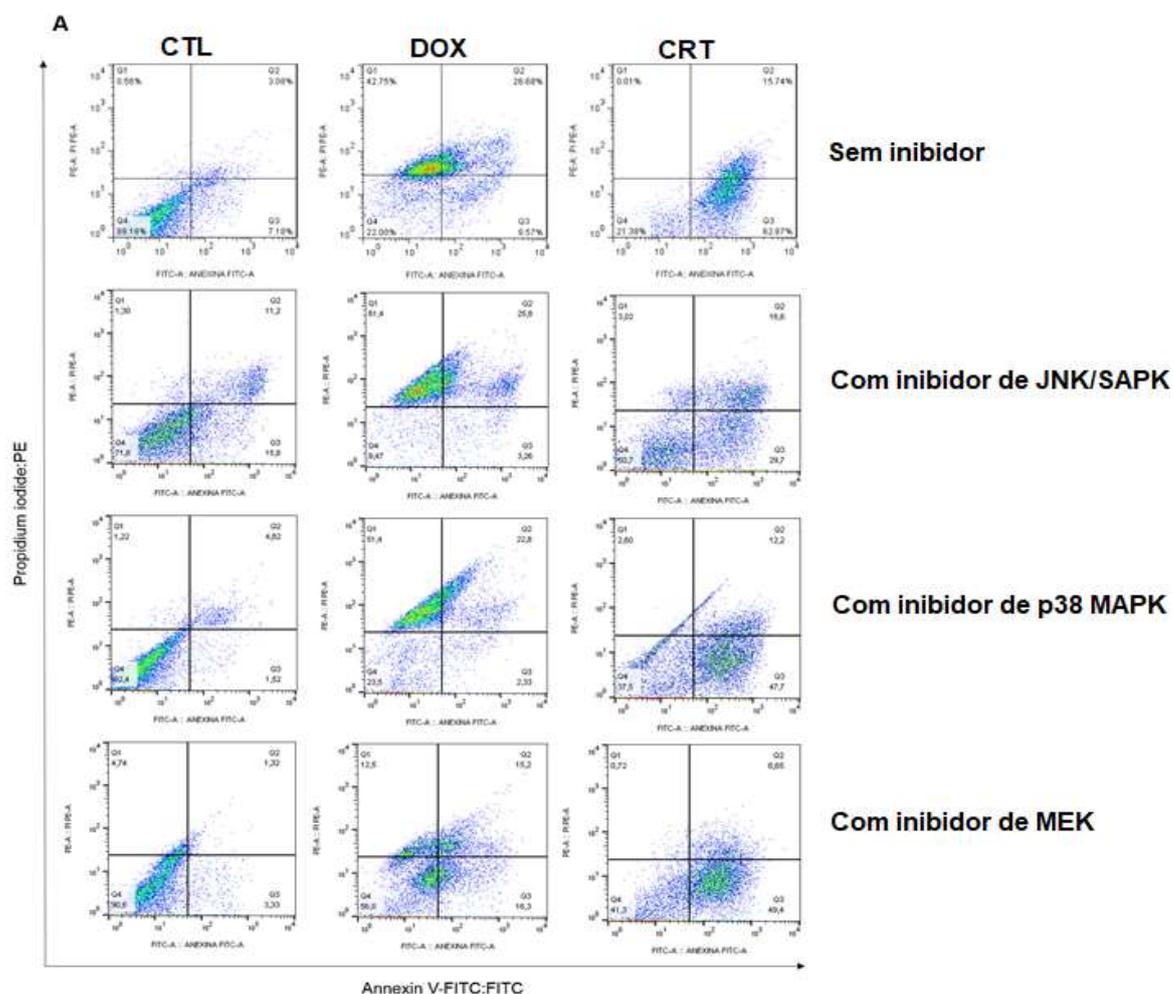
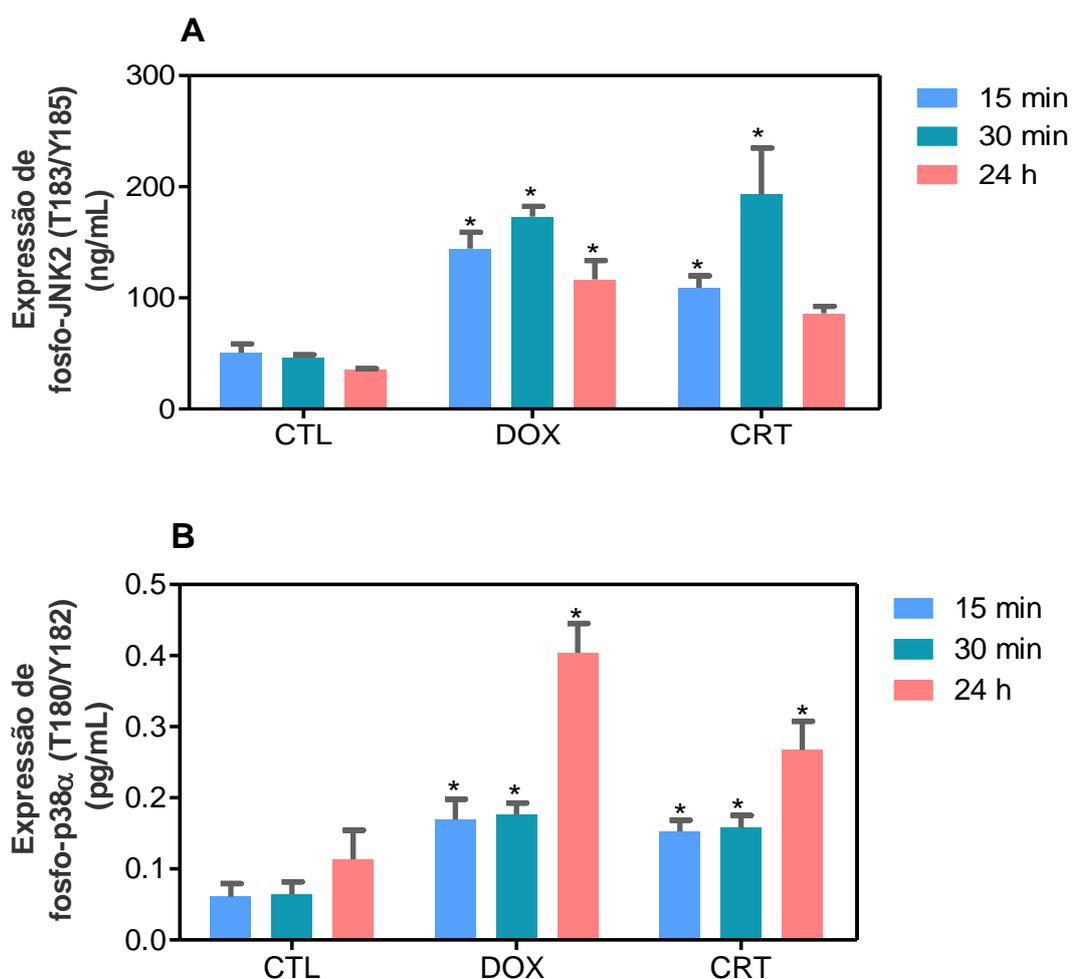


Figura 8: Efeito do complexo Ru(II)-timina (CRT) na morte celular de células HCT116 com e sem pré-tratamento com inibidores de MAPK, determinado por citometria de fluxo utilizando coloração com Anexina V-FITC/PI. **(A)** Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando a porcentagem de células viáveis (anexina V-FITC negativa e PI negativa), apoptose inicial (anexina V-FITC positiva, mas PI negativa), apoptose tardia (anexina V-FITC positiva e células PI positivas) e estágio de necrose (células PI positivas, mas anexinas V-FITC negativas). **(B)** Quantificação de células HCT116 em apoptose (células positivas para anexina V-FITC). O composto SP600125 foi usado a 5 μ M como

inibidor de JNK/SAPK, PD169316 foi usado a 5 μ M como inibidor de p38 MAPK e U-0126 foi usado a 5 μ M como inibidor de MEK. As células foram pré-tratadas por 2h com os inibidores e co-incubadas com o complexo a 4 μ M por mais 48 h. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) usado para diluir o complexo, e doxorubicina (1 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados são apresentados como as médias \pm S.E.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Foram registrados por amostra pelo menos 1×10^4 eventos e detritos celulares foram omitidos da análise. * P <0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. # P <0,05 comparado com o respectivo tratamento sem inibidor por ANOVA, seguido do teste de Student-Newman-Keuls.

Nós também quantificamos a expressões das proteínas MAPK fosforiladas através de ELISA sanduiche em células HCT116 tratadas com o complexo a 4 μ M após tratamento agudo (15 ou 30 min) e tratamento prolongado (24 h). Foi observado um aumento significativo nas expressões fosfo-JNK2 (T183/Y185), fosfo-p38 α (T180/Y182) e fosfo-ERK1 (T202/Y204) nas células HCT116 tratadas com complexo (figura 9 A, B e C).



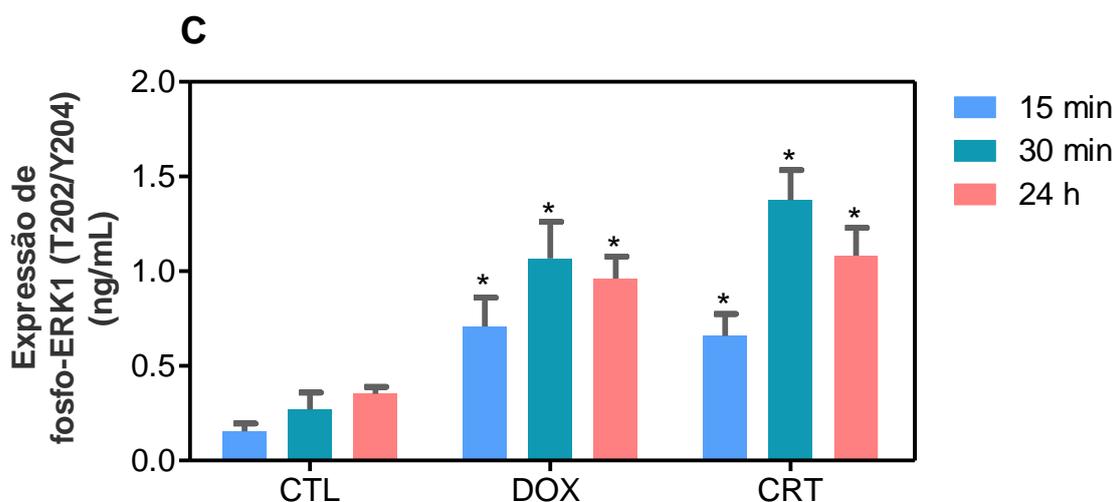


Figura 9: Efeito do complexo Ru(II)-timina (CRT) na expressão de fosfo-JNK2 (T183/Y185), fosfo-p38 α (T180/Y182) e fosfo-ERK1 (T202/Y204), determinadas por ELISA fosfo-específico em células HCT116. (A) Quantificação da expressão de fosfo-JNK2 (T183/Y185). (B) Quantificação da expressão de fosfo-p38 α (T180/Y182). (C) Quantificação da expressão de fosfo-ERK1 (T202/Y204). As células foram tratadas com o complexo a 4 μ M por um período de incubação agudo (15 ou 30 min) ou prolongado (24 h). O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) usado para diluir o complexo, e doxorrubicina (1 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados são apresentados como as médias \pm S.E.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * P < 0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Os danos ao DNA podem ativar a via das MAPK e ter ligação com a sinalização p35, desse modo avaliamos o dano ao DNA através da quantificação da fosforilação da histona H2AX e a ativação da sinalização p53 medindo fosfo-p53 (S15) (como regulador positivo) e MDM2 (como regulador negativo), em células HCT116 tratadas com complexo de Ru(II)-timina a 4 μ M por 24h. O tratamento com o complexo aumentou significativamente a expressão da fosfo-histona H2AX (S139), mas não alterou a expressão de fosfo-p53 (S15) e MDM2 (figura 10). Além disso, o co-tratamento com um inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica) não alterou de forma significativa a morte celular induzida por CRT, mas conseguiu reverter parcialmente a apoptose provocada pela doxorrubicina em células HCT116 (figura 11). Esses dados indicam que a morte celular apoptótica provocada pelo complexo de rutênio com timina é mediada por dano ao DNA e indução da ativação das vias de sinalização JNK/p38/ERK1/2 de modo independente de p53.

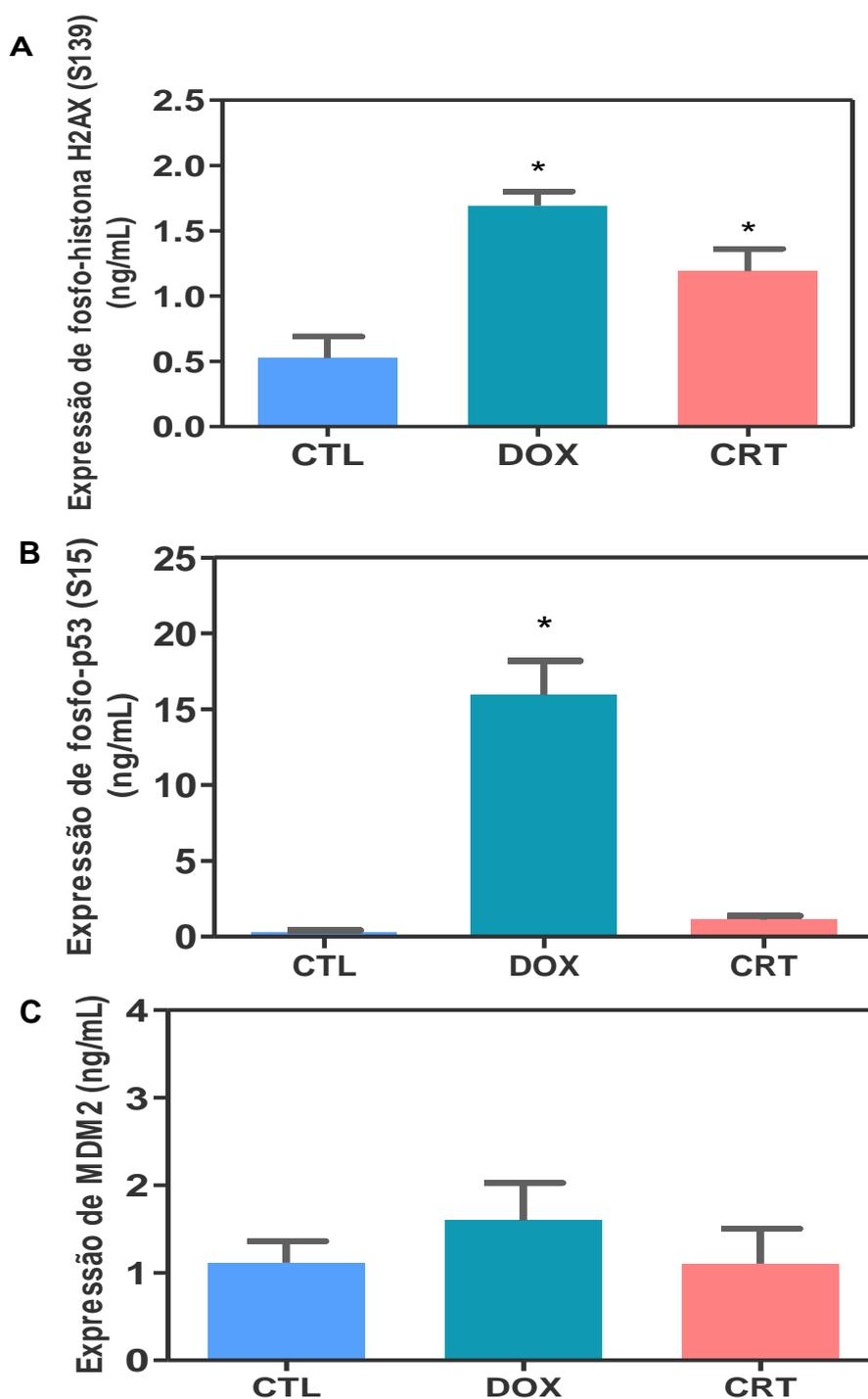


Figura 10: Efeito do complexo Ru(II)-timina (CRT) na fosfo-histona H2AX (S139), fosfo-p53 (S15) e MDM2, conforme determinado por ELISA fosfo-específico em células HCT116. **(A)** Quantificação da expressão de fosfo-histona H2AX (S139). **(B)** Quantificação da expressão de fosfo-p53 (S15). **(C)** Quantificação da expressão de MDM2. As células foram tratadas com o complexo a 4 μ M por 24 h. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) usado para diluir o complexo, e doxorubicina (1 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados são apresentados como as médias \pm S.E.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * P < 0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

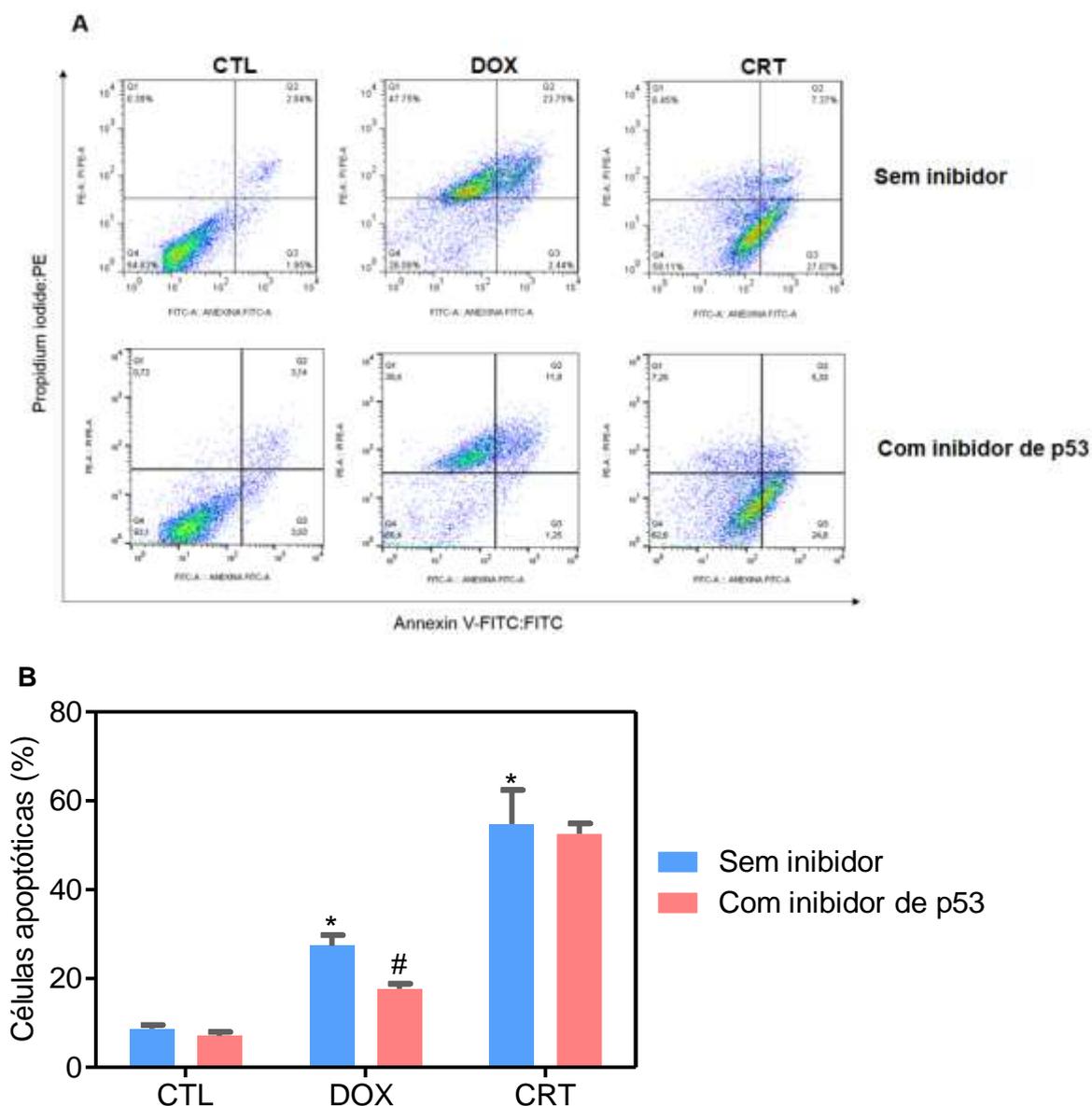


Figura 11: Efeito do inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica) na apoptose induzida pelo complexo Ru(II)-timina (CRT) em células HCT116, determinado por citometria de fluxo utilizando dupla marcação com Anexina V-FITC/PI. **(A)** Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando a porcentagem de células viáveis (anexina V-FITC negativa e PI negativa), apoptose inicial (anexina V-FITC positiva, mas PI negativa), apoptose tardia (anexina V-FITC positiva e células PI positivas) e estagio de necrose (células PI positivas, mas anexinas V-FITC negativas). **(B)** Quantificação de células HCT116 em apoptose (células positivas para anexina V-FITC). O composto pifitrina- α cíclica foi utilizado a 10 μ M como inibidor do inibidor p53. As células foram pré-tratadas por 2h com o inibidor e co-incubadas com o complexo a 4 μ M por mais 48h. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) usado para diluir o complexo, e doxorubicina (1 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados são apresentados como médias \pm S.E.M. de pelo menos três experiências independentes realizadas em duplicado. Pelo menos 1 \times 10⁴ eventos foram registrados por amostra e os debris celulares foram omitidos da análise. * P < 0,05 comparado ao controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. # P < 0,05 comparado ao respectivo tratamento sem inibidor de ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

5.2 RU(II)-TIMINA INIBE O CRESCIMENTO DE CÉLULAS HCT116 EM MODELO DE XENOENXERTO

A atividade antitumoral *in vivo* do complexo de rutênio com timina foi investigada em camundongos CB-17 SCID inoculados com células HCT116 que foram submetidos a tratamento com doses de 1 e 2 mg/kg do complexo, por via intraperitoneal, uma vez por dia durante 15 dias consecutivos.

No 16º dia, o peso médio do tumor dos animais do grupo controle negativo, tratados com o veículo utilizado para diluir o composto (DMSO 5%) foi de $0,75 \pm 0,05$ g. Enquanto nos animais tratados com os controles positivos, doxorrubicina 0,8 mg/kg e 5-FU a 15 mg/kg foram de $0,29 \pm 0,04$ e $0,27 \pm 0,04$ g respectivamente. Os tumores excisados após o fim do tratamento com CRT revelaram alterações estatisticamente significantes em seu peso quando comparados com o controle negativo, sendo de $0,51 \pm 0,10$ g para o CRT 1 mg/kg e de $0,45 \pm 0,04$ g com o CRT a 2 mg/kg (figura 12). A porcentagem de inibição tumoral em resposta ao complexo de rutênio com timina foi significativa nas duas doses testadas (1 mg/kg e 2 mg/kg), sendo de 32,6% e 40% respectivamente. A doxorrubicina apresentou inibição tumoral de 61,8% e o 5-FU teve uma taxa de 62,6% (Figura 12).

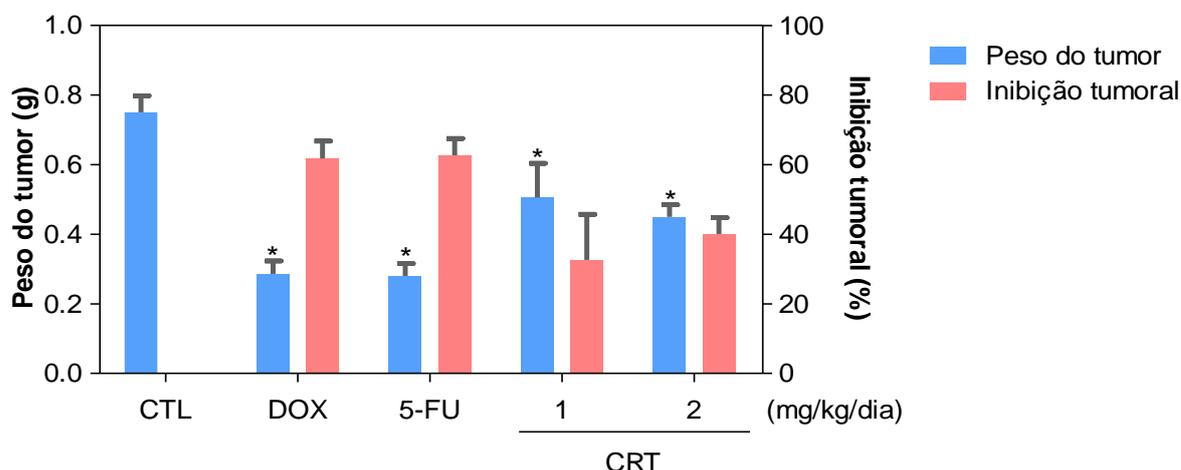


Figura 12. Atividade antitumoral *in vivo* do Ru(II)-timina (CRT) em camundongos SCID C.B-17 inoculados com células HCT116. Quantificação do peso do tumor (g) e taxas de inibição do tumoral (%). O controle negativo (CTL) foi tratado com DMSO 5%, usado para diluir a substância testada. Doxorrubicina (DOX, 0,8 mg/kg/dia) e 5-fluouracil (5-FU, 15 mg/kg) foram usados como controles positivo. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. de 9 a 23 animais. * $P < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

Na análise histológica todos os tumores foram classificados como adenocarcinomas pouco diferenciados, com padrão sólido predominante. Foram encontradas células malignas exibindo um citoplasma grande e núcleos com nucléolos proeminentes. Além disso, linfócitos infiltrantes de tumor foram frequentes em todos os grupos experimentais. No grupo controle (CTL), figuras mitóticas foram frequentes. Áreas de detritos necróticos foram mais evidentes nos grupos tratados com o complexo na dose de 2 mg/kg/dia e 5-fluorouracil (figura 13).

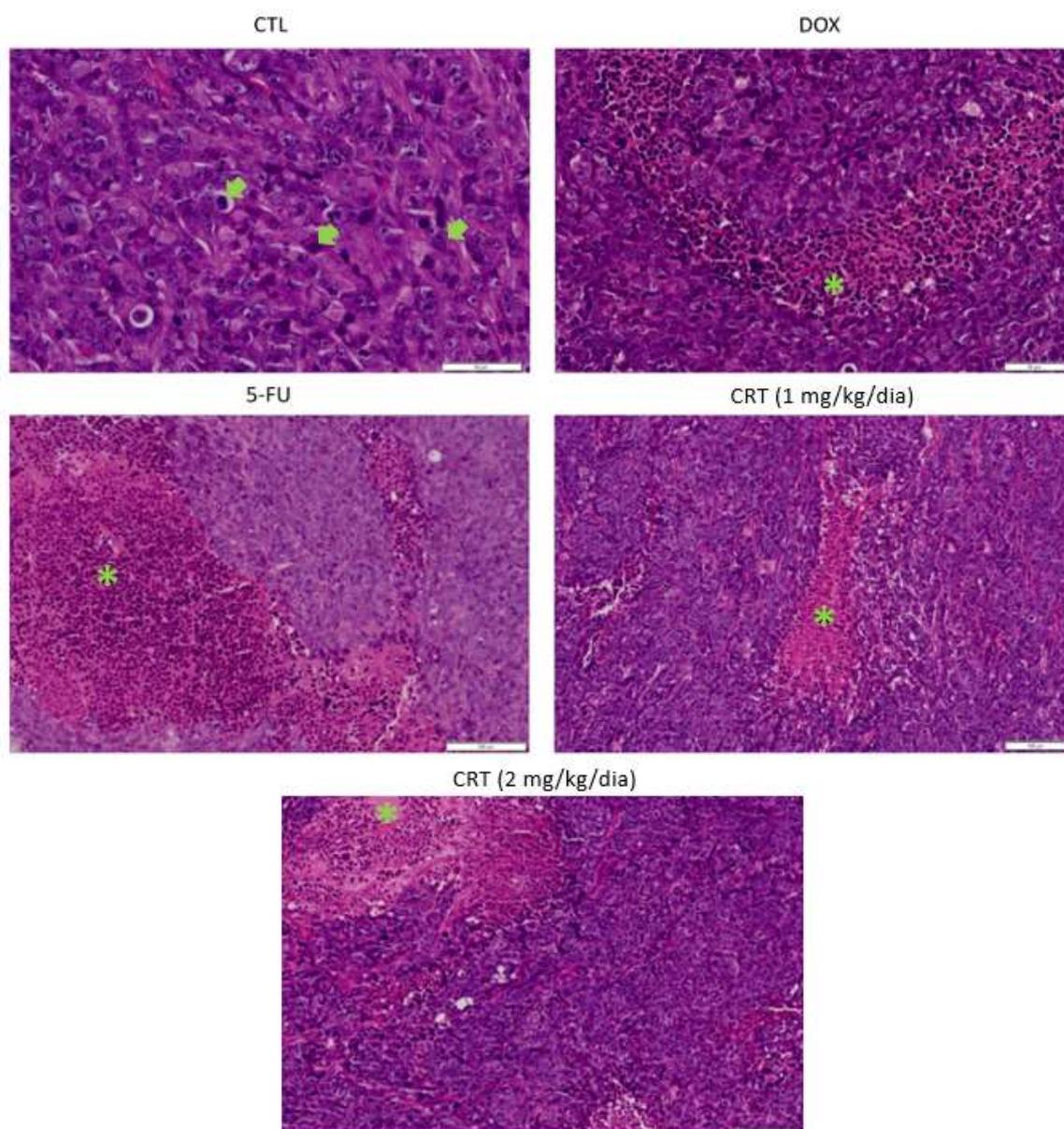


Figura 13. Análise histológica representativa dos tumores corados com hematoxilina e eosina e analisados por microscopia óptica. Os asteriscos representam áreas com necrose tumoral e inflamação. As setas indicam células em mitose. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (5% DMSO) usado para diluir o complexo. Doxorrubicina (DOX, 0,8 mg / kg / dia) e 5-fluorouracil (5-FU, 15 mg / kg / dia) foram utilizados como controles positivos.

Para ter uma noção preliminar da segurança do composto, parâmetros toxicológicos foram avaliados nos camundongos através da observação da diferença no peso corpóreo dos animais e do peso relativo e morfologia do coração, pulmão, fígado e rins. Ao final do tratamento, houve uma redução significativa no peso corpóreo dos grupos tratados com doxorrubicina, 5-FU e CRT 2 mg/kg quando comparados com o início do tratamento. No entanto, não foram observadas alterações significativas no peso relativo dos órgãos de nenhum dos grupos avaliados quando comparados com o grupo controle (CTL) (tabela 1).

Tabela 1. Efeito do complexo Ru(II)-timina (CRT) no corpo e peso relativo dos órgãos de camundongos C.B-17 SCID enxertados com células HCT116.

PARAMETROS	SEM TUMOR	CTL	DOX	5-FU	CRT	CRT
Dose (mg/kg/dia)	-	-	0,8	15	1	2
Sobrevivência	10/10	23/23	14/22	9/10	10/10	20/20
Peso corporal inicial (g)	22,55 ± 0,21	23,48 ± 0,23	20,10 ± 0,91	22,86 ± 0,75	22,25 ± 0,63	21,05 ± 0,41
Peso corporal final (g)	22,62 ± 0,38	21,98 ± 0,41	14,61 ± 0,77*	19,72 ± 0,57*	21,20 ± 0,25	18,92 ± 0,35*
Coração (g/100 g peso corporal)	0,52 ± 0,02	0,57 ± 0,03	0,60 ± 0,03	0,53 ± 0,04	0,56 ± 0,04	0,60 ± 0,02
Pulmão (g/100 g peso corporal)	0,8 ± 0,03	0,78 ± 0,02	0,92 ± 0,04	0,79 ± 0,06	0,77 ± 0,04	0,74 ± 0,02
Fígado (g/100 g peso corporal)	4,52 ± 0,11	4,46 ± 0,11	4,45 ± 0,22	4,56 ± 0,25	4,91 ± 0,36	4,96 ± 0,17
Rins (g/100 g peso corporal)	1,44 ± 0,03	1,50 ± 0,04	1,59 ± 0,10	1,48 ± 0,08	1,48 ± 0,09	1,61 ± 0,04

O grupo sem tumor representa os camundongos C.B-17 SCID sem inoculação de tumor ou qualquer tratamento. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (DMSO 5%) usado para diluir o complexo. Doxorrubicina (DOX, 0,8 mg/kg/dia) e 5-fluorouracil (5-FU, 15 mg/kg/dia) foram utilizados como controles positivos. Os dados são apresentados médias ± E.P.M. de 9 a 23 animais. * P <0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Em relação aos parâmetros hematológicos, apenas uma diminuição nas plaquetas após o tratamento com doxorrubicina foi significativa ($P < 0,05$). Os demais parâmetros hematológicos e os animais tratados com o complexo apresentaram valores similares aos do controle negativo (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito do tratamento sobre parâmetros hematológicos do sangue periférico de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HCT116.

PARAMETROS	SEM TUMOR	CTL	DOX	5-FU	CRT	CRT
Dose	-	-	0,8	15	1	2
Leucócitos totais	3,09 ± 0,93	4,44 ± 0,97	2,96 ± 0,29	5,92 ± 1,86	8,20 ± 0,97	3,35 ± 0,26
Hematócrito	45,11 ± 3,95	49,66 ± 2,90	45,61 ± 4,12	34,76 ± 1,20	38,27 ± 3,18	49,78 ± 3,03
Hemoglobina	12,49 ± 0,61	14,08 ± 0,27	12,28 ± 0,69	11,55 ± 0,15	11,90 ± 1,05	13,81 ± 0,57
Hemácias	8,57 ± 0,78	9,45 ± 0,51	9,12 ± 0,47	7,44 ± 0,72	8,61 ± 0,70	10,01 ± 0,37
Plaquetas	1084 ± 138	1082 ± 66,73	335,6 ± 28,11*	1119 ± 98,10	1341 ± 85,44	1057 ± 86,24
Volume corpuscular médio	54,6 ± 0,26	50,50 ± 2,5	50,86 ± 1,48	43,33 ± 0,33	43,67 ± 0,33	47,78 ± 1,19
Contagem diferencial de leucócitos (%)						
Granulócitos	13,92	23,04	17,89	21,35	21,36	29,65
Linfócitos	68,68	54,31	63,11	63,20	61,96	46,18
Monócitos	14,67	26,76	17,03	15,45	17,81	24,22

O grupo sem tumor representa os camundongos C.B-17 SCID sem inoculação de tumor ou qualquer tratamento. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (DMSO 5%) usado para diluir o complexo. Doxorrubicina (DOX, 0,8 mg/kg/dia) e 5-fluorouracil (5-FU, 15 mg/kg/dia) foram utilizados como controles positivos. Os dados são apresentados como médias ± E.P.M. de 7-14 animais. * $P < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls.

Análises morfológicas do fígado, rins, pulmões e corações foram realizadas em todos os grupos. Os corações dos animais não mostraram alterações em qualquer grupo. Nos pulmões, a arquitetura do parênquima foi parcialmente mantida em todos os grupos, observando-se espessamento do septo alveolar com diminuição do espaço aéreo, variando de áreas focais a generalizadas nos tecidos. Análises histopatológicas revelaram inflamação predominantemente de células mononucleares, edema, congestão e hemorragia, variando de leve a grave. Nos fígados, a arquitetura acinar e a veia centrolobular foram preservadas em todos os grupos. Áreas focais de inflamação e necrose de coagulação foram observadas em todos os grupos experimentais. Outras descobertas, como o congestionamento e degeneração hidrópica também foram encontrados em todos os grupos, variando de leve a moderada. Nos rins, a arquitetura do tecido estava preservada em todos os grupos experimentais. Alterações histopatológicas incluíram congestão vascular e espessamento da membrana basal do glomérulo renal com diminuição do espaço urinário em todos os rins, variando de leve a moderado.

6 DISCUSSÃO

Devido às suas propriedades bioquímicas únicas e versáteis, os complexos a base de rutênio têm se mostrado candidatos promissores para novas terapias contra o câncer como alternativa à cisplatina e seus derivados (ZENG *et al.*, 2017). Isto porque ainda há uma busca por medicamentos que ofereçam melhor viabilidade e diferentes mecanismos de ação, afim de superar a resistência inerente ou adquirida à cisplatina, e serem um tratamento ativo para tumores que não respondem à quimioterapia atual (PIZZARRO *et al.*, 2009). Diversos estudos com complexos de rutênio têm mostrado que esses são inibidores potentes do crescimento de várias células cancerígenas, como células de melanoma, ovário e mama (BETANZOS *et al.*, 2012; LIDA *et al.*, 2016), tanto *in vitro* como *in vivo*. Devido a essas propriedades, vários desses complexos estão em estudos clínicos de fase I ou II, como é o caso do NAMI-A e KP1019, que têm seu provável mecanismo de ação relacionado à redução do complexos de rutênio(III) a Ru(II) (KUHN *et al.*; 2015; LEIJEN *et al.*, 2015). Esses complexos demonstram como os metais de transição podem atuar como um suporte para estruturas interessantes que interrompem a função normal do DNA e enganam a estratégia de reparo celular, levando à morte da célula cancerosa (PIZZARRO *et al.*, 2009). Apesar disso, até o momento não há complexos de rutênio sendo utilizado como quimioterápicos antineoplásicos na prática clínica, e os mecanismos que promovem a atividade antineoplásica desses compostos permanecem especulativos e inexplorados.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo mostramos que o CRT possui atividade citotóxica promissora em diversas linhagens cancerígenas com índices de seletividade equivalentes aos controles positivos; além de ser capaz de induzir apoptose mediada por caspases em linhagens de leucemia promielocítica humana HL-60 (CORREA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Levando esses fatos em consideração, decidimos estudar as vias de sinalização envolvidas na apoptose induzida pelo complexo de rutênio com timina. Para isso utilizamos a linhagem HCT116 que estava entre uma das mais sensíveis a esse composto. A concentração de CRT testada foi 4 µg/mL, definida de acordo com os valores de CI₅₀ nessa linhagem. Desta maneira, neste trabalho estudamos o papel das vias de sinalização

MAPK e p53 na atividade citotóxica do complexo de rutênio com timina, em células HCT116, bem como avaliamos a capacidade antitumoral do CRT *in vivo*. Demonstramos, pela primeira vez, que o complexo causa danos ao DNA e morte celular apoptica em células HCT116 por ativação da via de sinalização JNK/p38/ERK1/2 de maneira independente de p53 e inibe o crescimento tumoral em modelo de xenoenxerto. O desenvolvimento de fármacos capazes de provocar apoptose é de grande interesse já que a grande maioria antineoplásicos utilizados na prática clínica exercem seus efeitos através desta via (BRENES *et al.*, 2007).

Certas proteínas podem ser alvos para complexos de rutênio, especialmente proteínas quinases, dado que essas enzimas desempenham um papel chave nas vias metabólicas associadas a diversos processos celulares, entre eles a proliferação de células cancerosas e morte celular programada (AMAN *et al.*, 2017; BABAK *et al.*, 2015). A família MAPK clássica é composta por JNK/SAPK (isoformas JNK-1, JNK-2 e JNK-3), p38 MAPK (isoformas p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ) e ERK1/2, que são conhecida por mediar muitos dos processos associados com crescimento, sobrevivência e apoptose. Nós encontramos que, o co-tratamento com inibidores farmacológicos dessas MAPKs, preveni significativamente a apoptose induzida pelo Ru(II)-timina, indicando que essa via está envolvida na morte celular provocada pelo complexo. Além disso, realizamos a quantificação das proteínas alvo JNK2 fosforilada (T183/Y185), p38 α (T180/Y182) e ERK1 (T202/Y204) e mostramos que essas vias tiveram sua expressão significativamente aumentada, confirmando que elas foram ativadas nas células HCT116 tratadas com CRT.

Quantificou-se a expressão da histona H2AX fosforilada que é um dos primeiros eventos em resposta a um dano na dupla fita do DNA. Foi possível notar um aumento significativo na expressão da fosfo-histona H2AX (S139), indicando que este complexo causa dano ao DNA nas células HCT116 tratadas com o complexo. Corroborando com nossos achados, o acúmulo de H2AX fosforilada foi relatado após a exposição à radiação ionizante e a agentes quimioterápicos que produzem quebras diretas da dupla fita, como etoposídeo, doxorubicina e tirapazamina (BANATH *et al.*, 2003). Os níveis de H2AX após tratamento com complexos de rutênio foram significativamente aumentados nas linhagens Du-145 (câncer de próstata), Vero (câncer de fígado) e HT-29 (adenocarcinoma de colón)

(VATANSEVER *et al.*, 2018). Além disso, células MCF-7 tratadas com um complexo de rutênio(III)-guanidina apresentaram níveis aumentados de γ -H2AX (LI *et al.*, 2017).

De fato, vários agentes que provocam danos ao DNA têm como mecanismo de apoptose sugerido, o envolvimento da ativação de JNK, que por sua vez ativa mais fatores pró-apoptóticos por fosforilação (LIU *et al.*, 2005). Por exemplo, o tratamento de células de carcinoma ascítico de Ehrlich-Lette EAC com o composto de rutênio(II)-areno RAPTA-C resultou no acúmulo de fosfo-JNK e seu substrato, sugerindo que seu efeito é pelo menos parcialmente mediado pela modulação da atividade dessa via (CHATTERJEE *et al.*, 2008). Chen e colaboradores (2018) também mostraram que um complexo de rutênio(III) induziu a ativação de p38 e JNK, mas não houve ativação de ERK em células de carcinoma de pulmão humano A549. O KP1019, que é um dos mais estudados compostos contendo rutênio, têm demonstrado atividade antitumoral contra vários tipos de câncer e apresentou como um dos mecanismos de ação a indução de apoptose, pela ativação da via MAPK (SINGH *et al.*, 2014), corroborando com nossos resultados.

A sinalização através de JNK e p38 é ativada por vários estímulos de estresse, incluindo radiação ultravioleta, calor, choque osmótico, espécies reativas de oxigênio (ERO) e citocinas inflamatórias (PELUSO *et al.*, 2017). Segundo estudos, p38 α parece sensibilizar as células para a apoptose por meio de regulação positiva das proteínas pró-apoptóticas e regulação negativa das vias de sobrevivência (PORRAS *et al.*, 2004). Foi mostrado que a p38 é ativada pela doxorubicina e é importante para causar apoptose em fibroblastos e cardiomiócitos, no entanto, outros pesquisadores não encontraram nenhuma mudança na atividade de p38 em células de câncer de mama tratadas com a DOX (GRETHE *et al.*, 2006). Os nossos resultados encontraram a participação da p38 na morte celular provocada por CRT. Outros trabalhos ainda corroboram a p38 como um importante mediador da apoptose induzida por radiação e mostraram que sua inibição reduziu a ativação de caspases (PELUSO *et al.*, 2017).

A via ERK é iniciada por estímulos mitogênicos, como fatores de crescimento, citocinas, estresse metabólico interno, dano ao DNA, concentrações alteradas de proteínas e desempenha um papel importante na regulação do crescimento e

diferenciação celular (GRETHE *et al.*, 2006). Há relatos de que a via ERK possa ser tanto oncogênica, como ter efeitos supressores de tumor, dependendo do microambiente tumoral específico do tecido. Além do local no qual foi ativado, o efeito final da via ERK é modulado pelo tempo, duração e intensidade do seu sinal. A função normal de ERK também é responsável pela supressão tumoral por meio da indução de senescência e da ubiquitinação e degradação de proteínas necessárias para a atividade e sobrevivência do ciclo celular (BUROTTO *et al.*, 2014). Foi demonstrado que estímulos de dano ao DNA, como etoposídeo (ETOP), complexos de platina, adriamicina (ADR), radiação ionizante (IR) e ultravioleta (UV) ativam a via ERK1/2 em linhagens de fibroblastos embrionários de camundongo (MEF), células fetais de pulmão humano (IMR90), fibroblasto embrionário murino (NIH3T3) e em células de câncer de mama (MCF-7) contribuindo para a apoptose (TANG, 2002; WEI, 2010).

A ativação de ERK também desempenha um papel ativo na mediação da apoptose induzida pela cisplatina em adenocarcinoma de cérvix (HeLa) e em células de pulmão humano (A549), pela ativação da caspase 3 que inicia o sinal apoptótico (WANG, 2000; TANG, 2002). Neste estudo, demonstramos que o complexo Ru(II)-timina causa morte celular apoptótica em células HCT116 com ativação de ERK1/2. Corroborando com nossos resultados, a análise da expressão gênica e proteica em células HepG2 tratadas com um complexo de rutênio com xantoxilina indicou que a via ERK1/2 era importante para apoptose induzida por esse composto (CARVALHO *et al.*, 2018). Além disso, a sinalização induzida pelo tratamento com doxorrubicina na via MEK/ERK é pró-apoptótica, corroborando com outras investigações (GRETHE *et al.*, 2006) e com nossos resultados, que mostraram ativação de MKK, precursor que ativa ERK, quando as células foram tratadas com a DOX. Esses dados mostram que os efeitos pró ou anti-apoptóticos das MAPKs são dependentes do tipo e contexto celular.

O papel da via p53 também foi investigado na apoptose mediada pelo Ru(II)-timina uma vez que essa é uma das principais vias que pode ser ativada em resposta a danos celulares, devido ao seu envolvimento no reparo do DNA, na parada do ciclo celular e na indução de apoptose. Observamos que o pré-tratamento com o inibidor de p53 não preveniu a apoptose induzida pelo complexo nem

aumentou a expressão de fosfo-p53 (S15) nas células HCT116, também não houveram alterações nos níveis de expressão de MDM2, regulador negativo de p53, indicando que a apoptose foi ativada por meio de uma via independente de p53. O fato de a p53 estar inativada em mais de 50% de todos cânceres, devido a mutações ou superexpressão de seus reguladores negativos, leva à resistência aos medicamentos e a falhas terapêuticas já que a maioria dos antineoplásicos agem por um mecanismo dependente de p53 (CHOW *et al.*, 2016). A doxorubicina, por exemplo, tem seu mecanismo de ação dependente de p53 (CHOW, 2016), como mostrado também em nossos resultados, e devido a isso são menos eficazes na indução da apoptose em cânceres que têm p53 mutante. Portanto, o complexo Ru(II)-timina é atraente pelo fato de induzir a morte celular independente do estado da p53, o que pode contornar a resistência existente nesses tipos de câncer.

Embora existam relações entre a ativação de ERK e p53 durante o estresse induzido por danos ao DNA, a ativação de ERK pode induzir apoptose por uma via dependente ou independente de p53 (TANG *et al.*, 2002; SINGH *et al.*, 2007). A ativação de ERK em resposta ao ETOP, por exemplo, foi independente de p53 (TANG, 2002), semelhante a nossos achados. Nossos dados corroboram outros estudos, com o trabalho relatado por Chow *et al.* (2016), no qual o Ru (II)-areno contendo azopiridina, iminopiridina, cloroquina, fenantrolina e imidazol induzem citotoxicidade em células H53 do tipo selvagem e p53-nula, indicando uma indução de apoptose independente de p53 por estes compostos. O trabalho de Carvalho e colaboradores (2018) também não encontraram redução significativa com o uso de inibidor da p53 e confirmaram por expressão gênica que o principal gene responsável pela ativação da via p53 (TP53) estava regulado negativamente em carcinoma hepatocelular (HepG2) tratadas com o complexo de rutênio com xantoxilina.

Quanto à capacidade do complexo de rutênio com timina em inibir o crescimento de células tumorais *in vivo*, nós observamos que o complexo foi capaz de reduzir o peso dos tumores de maneira significativa e teve uma inibição tumoral também significativa para ambas as doses testadas (1 e 2 mg/kg) em camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HCT116. Houve uma perda de peso significativa nos controles positivos e no complexo em maior concentração. Esse é

um efeito colateral bastante comum para os quimioterápicos. Apesar dessa perda de peso no grupo CRT 2mg/kg, não houveram diferenças significantes no peso dos órgãos. Vale ressaltar também que os animais do controle positivo tiveram óbitos durante o tratamento enquanto os tratados com CRT não. Os parâmetros hematológicos analisados não apresentaram alterações importantes. Esses dados mostram que, além da atividade antitumoral promissora, o CRT apresentou bons resultados nos testes de toxicidade

Outros complexos de rutênio também apresentaram atividade antitumoral *in vivo* em modelos de xenotransplante, como por exemplo o complexo de rutênio com xantoxilina em células HepG2 (CARVALHO *et al.*, 2018), o complexo de rutênio com um derivado de fenilterpiridina em células de melanoma humano A375 (DENG *et al.*, 2017), o complexo de rutênio com ligante imidazol e metilimidazol em carcinoma pulmonar humano A549 (CHEN *et al.*, 2016 e 2018). Além desses, diversos outros complexos de rutênio(II) mostraram efeito antitumoral tanto em células de osteosarcoma HOS (ZHU *et al.*, 2016), em carcinoma cervical humano HeLa (WANG *et al.*, 2015), como em hepatocarcinoma humano BEL-7402 (WAN *et al.*, 2017). Esses resultados indicam que os complexos de rutênio, especialmente rutênio(II), apresentaram não apenas boa citotoxicidade, mas também notável atividade antitumoral.

O provável mecanismo de ação do complexo de rutênio com timina baseia-se na homologia do rutênio com o ferro, além da sua conjugação com a base nitrogenada timina, que faz com que esse complexo seja importado para o núcleo da célula, onde é adicionado à dupla fita de DNA no lugar de uma timina comum. A inserção dessa base que carrega o rutênio irá provocar um dano grave ao DNA e a partir de então as vias que levam à morte celular programada serão acionadas, como a ativação das MAPKs JNK, ERK 1/2 e p38, e serão responsáveis por fosforilar uma série de substratos que culminarão na apoptose dessas células tumorais. Estas células tem uma demanda muito maior por ferro e ácidos nucleicos do que as células normais devido a sua taxa de replicação aumentada, o que pode conferir certa seletividade a esse complexo. Porém, ainda são necessários mais estudos para tentar encontrar outras vias de indução de morte celular e melhor elucidar os mecanismos pelos quais o CRT conduz à apoptose.

7 CONCLUSÃO

Nós concluímos neste estudo que o complexo de rutênio(II)-timina provoca danos ao DNA que desencadeiam a morte celular por apoptose em células de carcinoma de cólon humano HCT116 através da ativação das MAPKs ERK, JNK e p38 de maneira independente da participação de p53. Além disso, esta molécula reduz o crescimento de células HCT116 em modelo de xenotransplante, indicando que este é um promissor agente antitumoral e um novo candidato à fármaco anticancerígeno.

8 REFERÊNCIAS

- AIRD, R.E. *et al.* In vitro and in vivo activity and cross-resistance profiles of novel Ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer. **Brit. J. Cancer**, v. 86, p. 1652, 2002.
- ALLARDYCE, C.S.; DYSON, P.J. Ruthenium in medicine: Current clinical uses and future prospects. **Platinum Met. Rev.**, v. 45, p. 62-69, 2001.
- AMAN; F. *et al.* **Chemistry – Eur. J.** v 23, n. 20, p. 4893-4902, 2017.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figs.** Atlanta, 2014.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **The history of cancer**, 2010. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/the-history-of-cancer-what-is-cancer>. Acesso em: 16 out 2018.
- BABAK, M. V. *et al.* Target profiling of an antimetastatic RAPTA agent by chemical proteomics: relevance to the mode of action. **Chem. Sci.**, v. 6, n. 4, p. 2449-2456, 2015.
- BERGAMO, A. *et al.* In vivo tumour and metastasis reduction and in vitro effects on invasion assays of the ruthenium RM175 and osmium AFAP51 organometallics in the mammary cancer model. **J. Inorg. Biochem.**, v. 4, n. 1, p. 79–86, 2010.
- BERGAMO, A.; SAVA, G. Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. **Dalton Trans.**, v. 40, n. 31, p. 7817-7823, 2011.
- BERTINI, I. *et al.* **Bioinorganic Chem.** Mill Valley, University Science Books, p. 766, 1994.
- BETANZOS, L.S. *et al.* Photoactivatable organometallic pyridyl ruthenium(II) arene complexes. **Organometallics**, v. 31, n. 9, p. 3466–3479, 2012.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J. Clin.**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- BRASIL, T. R. **Ação in vitro da atividade antineoplásica de diterpenos isolados do epicarpo de *Hymenaea stigonocarpa***. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2013.
- BRENES, O. *et al.* Characterization of cell death events induced by anti-neoplastic drugs cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil on human hepatoma cell lines: Possible mechanisms of cell resistance. **Biomed. & Pharmacoth.**, v. 61, p. 347-355, 2007.

- BUBICI, C. *et al.* JNK signaling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. **Brit. Jour. Pharm.**, v. 171, p. 24-37, 2014.
- BUROTTO, M. *et al.* The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. **Cancer**, v. 120, n. 22, p. 3446-3456, 2014.
- CAIRNS, R.A. *et al.* The current state of cancer metabolism. **Nat. Rev. Cancer**, v. 16, p. 613-614, 2016.
- CALIN, G.A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 2002.
- CAO, Y. *et al.* Cancer research: past, present and future. **Nat. Rev. Cancer**, v. 11, p. 749–754, 2011.
- CARVALHO, N.C. *et al.* A novel ruthenium complex with xanthoxylin induces S-phase arrest and causes ERK1/2-mediated apoptosis in HepG2 cells through a p53-independent pathway. **Cell Death & Dis.**, v. 9, n. 2, 2018.
- CHATTERJEE, S. *et al.* The ruthenium(II)–arene compound RAPTA-C induces apoptosis in EAC cells through mitochondrial and p53–JNK pathways. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 3, n. 7, p. 1149-55, 2008.
- CHEN, J. *et al.* Cytotoxicity in vitro, cellular uptake, localization and apoptotic mechanism studies induced by ruthenium(II) complex. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 23, n. 2, p. 261-275, 2018.
- CHEN, D. *et al.* Metal complexes, their cellular targets and potential for cancer therapy. **Curr. Pharm.**, v. 15, p. 777–791, 2009.
- CHEN, Z. *et al.* ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. **Oncogene**, v. 18, p. 173–180, 1999.
- CHOW, M.J. *et al.* Structural Determinants of p53-Independence in Anticancer Ruthenium-Arene Schiff-Base Complexes. **Mol. Pharmaceut.**, v. 13, n. 7, p. 2543–2554, 2016.
- COOPER, G.M. **A célula: uma abordagem molecular**. 2.ed., Artmed: Porto Alegre, 2001.
- CORREA, R.S. *et al.* Ru(II)-thymine complexes: new metallodrug candidates against tumor cells. **New J. Chem.**, v. 42, p. 6794-6802, 2018.
- CROCE, C.M. Oncogenes and cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 358, p. 502–511, 2008.
- DE BERARDINIS, R.J. *et al.* Fundamentals of cancer metabolism. **Sci. Adv.**, v. 2, n. 5, 2016.

- DE LUCA, A. *et al.* The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. **Exp. Op. on Therap. Targ.**, v. 16, n. sup2, p. S17-S27, 2012.
- DENG, Z. *et al.* Ruthenium complexes with phenylterpyridine derivatives target cell membrane and trigger death receptors-mediated apoptosis in cancer cells. **Biomaterials**, v. 129, p. 111-126, 2017.
- DOLMANS, D.E. *et al.* Terapia fotodinâmica para câncer. **Nat. Rev. Cancer**, may, 2003.
- EL-DEIRY, W.S. *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. **Cell**, v. 75, n. 4, p. 817-825, 1993.
- ELLISEN, L.W. Molecular genetics of cancer. **ACP Med.**, 2015.
- ENGLISH, J.M. *et al.* Trends. **Pharmacol. Sci.**, v. 23, p. 40–45, 2002.
- FERLAY, J. *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: **IARC Cancer Base**, n. 11, 2013.
- FERNANDEZ, A.G. *et al.* Antitumor activity of new hydridotris (pyrazolyl) borate ruthenium(II) complexes containing the phosphanes PTA and 1-CH₃-PTA. **Dalton Trans.**, n. 42, 2010.
- FEY, D. *et al.* Crosstalk and signaling switched in mitogen-activated protein kinases cascades. **Front. in Phys.**, n. 3, p 1-21, 2012.
- FOUAD, Y.A. *et al.* Revisiting the hallmarks of cancer. **Am. J. Cancer Res.**, n. 7, v. 5, p. 1016-1036, 2017.
- FOULKES, W.D. Inherited susceptibility to common cancers. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, p. 2143–2153, 2008.
- FURGA, B.K. *et al.* **Chem. Sci.**, v. 6, p. 2449–2456, 2015.
- GAESTEL, M. MAPKAP kinases—MKs—two's company, three's a crowd. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 7, fev., 2006.
- GANGULI, S. *et al.* **Can J. Chem.**, v. 72, p. 1120, 1999.
- GARCÍA, B. *et al.* **Inorg, J. Biochem.**, v. 102, 2008.
- GRETHE, S. *et al.* p38 MAPK downregulates phosphorylation of Bad in doxorubicin-induced endothelial apoptosis. **Biochem. and Biophys. Res. Communic.**, v. 347, p. 781–790, 2006.
- HERR, H.W. *et al.* History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. **Jour. Urol.**, v.179, p.53 – 56, 2008.

- HUXHAM, L.A. *et al.* The synthesis, structural characterization, and in vitro anti-cancer activity of chloro(p-cymene) complexes of ruthenium(II) containing a disulfoxide ligand. **Inorg. Chim. Acta**, v. 352, p. 238-246, 2003.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA – INCA. **Estimativas 2018: Incidência do câncer no Brasil**, 2017.
- JOERGER, A.C. *et al.* The p53 pathway: origins, inactivation in cancer, and emerging therapeutic approaches. **Ann. Rev. Biochem.** v. 85, p. 375-404, 2016.
- JOHNSON, D.B. *et al.* Therapeutic advances and treatment options in metastatic melanoma. **JAMA Oncol.**, v. 1, n. 3, p. 380–6, 2015.
- JOHNSON, G. *et al.* Mitogen-activated protein kinase pathways mediate by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v. 298, 2002.
- JOHNSON, S.M. *et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family. **Cell**, v. 120, p. 635, 2005.
- JOHNSON; R. E. *et al.* **Science**, v. 283, 1999.
- JUNQUEIRA, L.C. *et al.* **Biologia Celular e Molecular**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005. p. 332.
- KAIM, W. *et al.* Bioinorganic chemistry: **Inorganic elements in the chemistry of life**. An introduction and guide. 2nd ed. 2013. p. 401.
- KATZUNG, G.B. **Basic and Clinical Pharmacology**, 9th edn. United States of America: McGraw-Hill Medical, 2003. p.1088.
- KEYSE, S.M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. **Can. Met. Rev.**, v. 27, n. 2, p. 253–61, 2008.
- KILPIN, K.J. *et al.* The development of anticancer ruthenium(II) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials. **Chem. Sci.**, v. 4, p. 1410–1419, 2013.
- KIM, E.K. *et al.* Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. **Arch. of tox.**, v. 89, n. 6, p.867-82, 2015.
- KUHN, P.S. *et al.* Improved reaction conditions for the synthesis of new NKP-1339 derivatives and preliminary investigations on their anticancer potential. **Dalton Trans.**, v. 44, n. 2, p. 659–68, 2015.
- KUMAR, V. *et al.* **Pathology Basis of Disease**, 7th edn., China:WB Saunders, 2004. p. 1552.
- KÜNG, A. *et al.* Investigations into the interaction between tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and nucleotides by capillary electrophoresis. **J. Chrom. B: Biomed. Sci. and App.**, v. 759, n. 1, p. 81-89, 2001.

- KUSUZAKI, K. *et al.* Review. Acridine orange could be an innovative anticancer agent under photon energy. **In Vivo**, v. 21, p. 205–214, 2007.
- KWONG, L.N. *et al.* The brothers RAF. **Cell**, v. 140, n. 2, p. 180–200, 2010.
- LE BOZEC, B. *et al.* Dipolar and non-dipolar pyridine and bipyridine metal complexes for nonlinear optics. **Euro. Jour. of Inorg. Chem.**, p. 229–398, 2000.
- LEI, Y.Y. *et al.* Mitogen-activated protein kinase signal transduction in solid tumors. **A.P.J.C.P.**, 2014.
- LEIJEN, S. *et al.* Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. **Invest. New Drugs.**, v. 33, n. 1, p. 201–14, 2015.
- LENTZ, F. *et al.* Pharmacokinetics of a novel anticancer ruthenium complex (KP1019, FFC14A) in a phase I dose-escalation study. **Anticancer Drugs.**, v. 20, p. 97-103, 2009.
- LEVINA, A. *et al.* Recent developments in ruthenium anticancer drugs. **Metallomics**, v. 1, n. 6, p. 458-70, 2009.
- LI, C. *et al.* Cytotoxic (salen) ruthenium(III) anticancer complexes exhibit different modes of cell death directed by axial ligands. **Chem. Sci.**, v. 8, p. 10, 2017.
- LIDA, J. *et al.* Inhibition of cancer cell growth by ruthenium complexes. **J. Trans. Med.**, v. 14, n. 1, 2016.
- LIU, J. *et al.* **Cell Res**, v. 151, p. 36–42, 2005.
- LU, Z. *et al.* ERK1/2 MAP Kinases in Cell Survival and Apoptosis. **IUBMB Life**, v. 58, n. 11, p. 621–631, 2006.
- LUDWIG, G. *et al.* **Dalton Trans.**, v. 42, p. 3771–3774, 2013.
- LYNCH, H.T. *et al.* Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes. **Breast J.**, v. 14, n. 1, p. 3-13, 2008.
- MALINA, J. *et al.* Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by anticancer heterocyclic complexes of ruthenium(III) in cell-free media. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 6, n. 4, p. 435-45, 2001.
- MALLADI, S. *et al.* Metastatic latency and immune evasion through autocrine inhibition of WNT. **Cell**, v. 165, p. 45-60, 2016.
- MANGIAPIA, G. *et al.* **Biomacromolecules**, v. 14, p. 2549–2560, 2013.
- MARKOWSKA, A. *et al.* Noble metals in oncology. **Contemp. Oncol.**, v. 19, n. 4, p. 271-175, 2015.

- MARTINS, P. *et al.* Anticancer Agents. **Med. Chem.**, v. 14, n. 9, p. 1199, 2014.
- MASSAGUÉ, J. *et al.* Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, p. 298-306, 2016.
- MASSARI, L.P. *et al.* Epidermal malignant tumors: pathogenesis, influence of UV light and apoptosis. **Coll. Antropol.**, v. 31, n. 1, p. 83-85, 2007.
- MOMEKOV, G. *et al.* Recent developments in antitumor platinum coordination compounds. **Exp. Opin. Ther. Pat.**, v. 16, 2006.
- MORENO, V. *et al.* DNA interaction and cytotoxicity studies of new ruthenium (II) cyclopentadienyl derivative complexes containing heteroaromatic ligands. **J. Inorg. Biochem.**, v. 105, n. 2, p. 241-249, 2011.
- MORENO-LÓPEZ, L.A. *et al.* Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. **Oral Oncol.**, v. 36, p. 170–174, 2000.
- MUNSHI, A. *et al.* Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response. **Genes & Cancer**, 2013.
- NAGY, R. *et al.* Highly penetrant hereditary cancer syndromes. **Oncogene**, v. 23, p. 6445–6470, 2004.
- NATH, M. *et al.* **A. Inorg. Chem. Comm.**, v. 12, p. 1049, 2009.
- NAVARRO, R. *et al.* Doxorubicin-Induced MAPK Activation in Hepatocyte Cultures Is Independent of Oxidant Damage. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1090, p. 408-18, 2006.
- NCI, 2015. **O que é câncer**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Acesso em: 12 out. 2018.
- OLIVEIRA, M.S. *et al.* Ru(II)-thymine complex causes cell growth inhibition and induction of caspase-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, p. 1609, 2018.
- PAVLOVA, N. N. *et al.* The emerging hallmarks of cancer metabolism. **Cell Metab.**, v. 23, p. 27-47, 2016.
- PEACOCK, A.F.A. *et al.* Medicinal organometallic chemistry: designing metal arene complexes as anticancer agents. **Chem. Asian J.**, v. 3, p. 1890–1899, 2008.
- PEARSON, G. *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocr Rev.** v. 22, n. 2, p. 153-183, 2001.
- PELUSO, L. *et al.* MAPK Signalling Pathway in Cancers: Olive Products as Cancer Preventive and Therapeutic Agents. **Sem. Cancer Biol.**, 2017.

- PERSONS, D.L. *et al.* Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 35778–35785, 2000.
- PFLAUM, J. *et al.* p53 family and cellular stress responses in cancer. **Front. in Oncol.**, v. 4, p. 285, 2014.
- PIZARRO; A.M. *et al.* Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. **Biochimica**, v. 91, n. 10, p. 1198-211, 2009.
- PLUMMER, M. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **Lancet Glob. Health.**, v. 4, n. 9, p. 609-616, 2016.
- PORRAS, A. *et al.* p38 α Mitogen-activated Protein Kinase Sensitizes Cells to Apoptosis Induced by Different Stimuli. **Mol. Biol. Cell.**, v. 15, n. 2, p. 922–933, 2004.
- PRIVES, C. *et al.* The p53 pathway. **J. Pathol.**, v. 187, p. 112–126, 1999.
- QIN, J. R. *et al.* **J. Med. Chem.**, v. 58, n. 1, 2015.
- RICHARD J. H. **Cancer Concepts: A Guidebook for the Non-Oncologist**, Updated ed. Worcester, MA: University of Massachusetts Medical School; 2016.
- SASCO, A.J. *et al.* Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. **Lung Cancer**, v. 45, p. 3–9, 2004.
- SCHAEFFER, H. *et al.* Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers. **Mol. Cell Biol.**, v. 19, n. 4, p. 2435-2444, 1999.
- SCHÜTZE, M. *et al.* Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study. **B.M.J.**, 2011.
- SCOLARO, C. *et al.* Dyson In vitro and in vivo evaluation of ruthenium (II)-arene PTA complexes. **J. Med. Chem.**, v. 48, p. 4161-4171, 2005.
- SEBOLT-LEOPOLD, J.S. **Oncogene**, v. 19, p. 6594–6599, 2000.
- SIEBER, O.M.; et al. Genomic instability: the engine of tumorigenesis. **Nat. Rev.**, v. 3, p. 701-708, 2003.
- SINGH, V. *et al.* Anti-cancer drug KP1019 modulates epigenetics and induces DNA damage response in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 18, v. 6, p.1044-1052, 2014.
- SINGH, S. *et al.* p53 regulates ERK activation in carboplatin induced apoptosis in cervical carcinoma: a novel target of p53 in apoptosis. **FEBS Lett.**, v. 23, n. 2, p. 289-295, 2007.
- SPANDIDOS, D.A. Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis. **J. Buon.**, v.12 Suppl 1, p. S9–12, 2007.

- STEEG, P.S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. **Nat. Med.**, v. 12, p. 895-904, 2006.
- STEWART, B.W. *et al.* World cancer report 2014. Lyon: **Inter. Ag. for Res. on Can.**, 2014.
- TANG, D. *et al.* ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 12710–12717, 2002.
- TING, A.H. *et al.* The cancer epigenome: components and functional correlates. **Genes Dev.**, 2006.
- THORNA, C.F. *et al.* Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. **Pharmacog. Genom.**, v. 21, n. 7, p. 440–446, 2011.
- URSZULA, K. *et al.* Copper(i) complexes with phosphine derived from sparfloxacin. Part I – structures, spectroscopic properties and cytotoxicity. **Dalton Trans.**, v. 28, 2015.
- VALASTYAN, S. *et al.* Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, p. 275-292, 2011.
- VATANSEVER, H.S. *et al.* Apoptotic Properties of Ruthenium Complexes on Different Type of Cancer Cell Lines. **Proceedings**, v. 2, p. 1593, 2018.
- VEGLIA, F. Occupational exposures, environmental tobacco smoke, and lung cancer. **Epidemiology**, v. 18, n. 6, p. 769-775, 2007.
- VOGELSTEIN, B. *et al.* Cancer genes and the pathways they control. **Nat. Med.**, v. 10, p. 789-799, 2004.
- VOORHOEVE, P.M. *et al.* A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. **Cell**, v. 124, p. 1169, 2006.
- Wan, D. *et al.* Complexos polipiridínicos de rutênio (II): síntese, caracterização e estudos de atividade anticancerígena em células BEL-7402. **J. Inorg. Biochem.**, v. 173, p. 1-11, 2017.
- WANG, X. *et al.* Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 39435-3943, 2000.
- WANG, J.Q. *et al.* Um complexo de rutênio (II) inibe o crescimento do tumor in vivo com menos efeitos colaterais em comparação com a cisplatina. **J. Inorg. Biochem.**, v. 146, p. 89-96, 2015.
- WEI, F. *et al.* Both ERK1 and ERK2 kinases promote G2/M arrest in etoposide-treated MCF7 cells by facilitating ATM activation. **Cell Sig.**, v. 22, p. 1783-1789, 2010.

WEISS, A. *et al.* Angiostatic treatment prior to chemo- or photodynamic therapy improves anti-tumor efficacy. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 8990, 2015.

WELTE, T. *et al.* Oncogenic mTOR signalling recruits myeloid-derived suppressor cells to promote tumour initiation. **Nat. Cell. Biol.**, v. 18, p. 632-644, 2016.

WHO. **Cancer control knowledge into action: WHO Guide for effective programmer.** World Health Organization, Geneva, 2007.

WHO. **Cancer.** Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em: 21 set. 2018.

WIEMER, E. A. The role of microRNAs in cancer: no small matter. **Eur. J. Can.**, v. 43, p. 1529, 2007.

WIN, S. *et al.* New insights into the role and mechanism of c-Jun-N-terminal kinase signaling in the pathobiology of liver diseases. **Hepatology.** v. 67, n. 5, p. 2013-2024, 2018.

WOESSMANN, W. *et al.* A. Ras-mediated activation of ERK by cisplatin induces cell death independently of p53 in osteosarcoma and neuroblastoma cell lines. **Can. Chem. Pharm.**, v. 50, p. 397–404, 2000.

YAN, Y.K. *et al.* Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. **Chem. Commun. Camb.**, p 4764–4776, 2005.

YEH, P.Y. *et al.* Nuclear extracellular signal-regulated kinase 2 phosphorylates p53 at Thr55 in response to doxorubicin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 284, p. 880–886, 2001.

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, P. *et al.* DNA binding, cytotoxicity, and apoptotic inducing activity of ruthenium (II) polypyridyl complex. **Acta Bioc. Biophys. Scin.** v.42, p.440-449, 2010.