



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PAPEL DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO MAPK (JNK, p38 E ERK1/2) E p53 NA
APOPTOSE INDUZIDA POR COMPLEXOS DE RUTÊNIO COM PIPLARTINA EM
CÉLULAS DE CARCINOMA DE CÓLON HUMANO HCT116**

INGRID RAYSSA SOUZA BALIZA DIAS

Salvador – Ba

2019

IGM

INGRID RAYSSA SOUZA BALIZA DIAS

Papel das vias de sinalização MAPK (JNK, p38 e ERK1/2) e p53 na apoptose induzida por complexos de rutênio com pipartina 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**

**PAPEL DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO MAPK (JNK, p38 E ERK1/2) E p53 NA
APOPTOSE INDUZIDA POR COMPLEXOS DE RUTÊNIO COM PIPLARTINA EM
CÉLULAS DE CARCINOMA DE CÓLON HUMANO HCT116**

INGRID RAYSSA SOUZA BALIZA DIAS

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra

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

Salvador – Ba

2019

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

D541p Dias, Ingrid Rayssa Souza Baliza.
Papel das vias de sinalização MAPK (JNK, p38 e ERK1/2) e p53 na apoptose induzida por complexos de rutênio com piplartina em células de carcinoma de colón humano HCT116. / Ingrid Rayssa Souza Baliza Dias. - 2019.
75 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. MAPK. 2. Rutênio. 3. Células HCT116. 4. Citotoxicidade, 5. Apoptose.

I. Título.

CDU 616-006:615.28

" PAPEL DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO MAPK (JNK, P38 E ERK1/2) E P53 NA APOPTOSE INDUZIDA POR COMPLEXOS DE RUTÊNIO COM PIPLARTINA EM CÉLULAS DE CARCINOMA DE CÓLON HUMANO HCT116."

INGRID RAYSSA SOUZA BALIZA DIAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 19 de fevereiro de 2019.

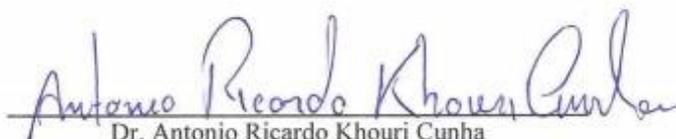
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Luiz Antonio Rodrigues de Freitas
Professor Adjunto
UFBA



Dra. Dalila Luciola Zanette
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dr. Antonio Ricardo Khouri Cunha
Pesquisador
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

FAPESB

FIOCRUZ/IGM

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais, pela dedicação e presença constante, pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus irmãos, Igor e Iana, pelo apoio, força e incentivo.

À meu marido, Cássio, pela presença, apoio e compreensão.

A meus avós (*in memoriam*) e a todos os meus familiares pelo incentivo.

Meus agradecimentos as minhas amigas da faculdade, Clarice, Icanaã, Mariana B., Paula, Raíza, Sara e Suellen, companheiras de trabalhos e de vida, que fizeram parte da minha formação e que continuarão presentes em minha vida.

Ao meu orientador, Dr. Daniel Pereira Bezerra, pela oportunidade e apoio incondicional na elaboração deste trabalho.

À equipe do LETI, pela convivência diária, empatia e colaboração para a realização desse trabalho.

Aos colegas da pós-graduação pelo companheirismo durante toda a jornada.

À banca de qualificação pelos conselhos, orientação e correção que levou ao aperfeiçoamento do trabalho.

Aos professores por compartilharem seus conhecimentos.

As secretárias acadêmicas Iumara, Simone e Noélia e equipe sempre dispostas a ajudar.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia em saúde e medicina investigativa.

À biblioteca pelo suporte concedido.

Ao IGM/FIOCRUZ Bahia, pela estrutura e suporte necessários para a execução deste trabalho e pela bolsa concedida.

Meu agradecimento ao CNPq e a FAPESB, órgãos financiadores deste projeto.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

DIAS, Ingrid Rayssa Souza Baliza. Papel das vias de sinalização MAPK (JNK, p38 e ERK1/2) e p53 na apoptose induzida por complexos de rutênio com piplartina em células de carcinoma de colón humano HCT116. 2019. 75 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer é uma doença multifatorial iniciada por mutações genéticas que causam um descontrole na proliferação celular, estas células cancerosas proliferam em desafio aos controles normais do organismo. Dentre os tratamentos para essa doença, a quimioterapia é um dos métodos mais eficazes; entretanto, os fármacos disponíveis atualmente apresentam limitações relacionados a alta toxicidade e ao desenvolvimento de resistência. A piplartina (piperlongumina) é uma molécula derivada de plantas que tem recebido intenso interesse devido às suas características anticancerígenas que visam o estresse oxidativo. A fim de potencializar os efeitos citotóxicos em células cancerígenas, tem sido utilizada a associação de compostos naturais com metais de transição, como o rutênio. Recentemente, nosso grupo de pesquisa sintetizou dois novos complexos de rutênio contendo a piplartina como ligante, os quais aumentaram a expressão de genes das vias MAPK e p53. **OBJETIVO:** Assim, o presente trabalho visou estudar o papel destas vias de sinalização na apoptose induzida por esses complexos, bem como avaliar sua eficácia *in vivo*. **MATERIAL E MÉTODOS:** Para verificar a participação das vias MAPK e p53 na morte celular induzida pelos complexos, 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 a fluorescência celular foi quantificada por citometria de fluxo. Fosfo-JNK2 (T183/Y185), fosfo-ERK1 (T202/Y204), fosfo-p38 α (T180/Y182), fosfo-p53 (S15), MDM2 e fosfo-histona H2AX (S139) foram quantificados pela técnica de ELISA sanduíche. A citotoxicidade dos complexos foi também avaliada em modelo 3D de esferoides multicelulares de câncer formados a partir de células HCT116. A atividade antitumoral *in vivo* foi avaliada em camundongos CB17 SCID transplantados com células HCT116 e tratados com os complexos na dose de 15 μ mol/kg, por via intraperitoneal, uma vez por dia durante 15 dias consecutivos. **RESULTADO:** O pré-tratamento com inibidores de JNK, MEK e p38 reduziu a apoptose induzida pelos complexos, indicando que a apoptose causada pelos complexos é mediada por essas vias, assim como a apoptose induzida pelos complexos foi prevenida pelo pré-tratamento com o inibidor de p53, indicando morte celular apoptótica mediada por uma via dependente de p53. O tratamento com os complexos induziu fosforilação de p53 e H2AX após 24 horas de incubação e de JNK2, ERK1 e p38 α após 15 e 30 minutos de incubação. Descobrimos, também, que ambos os complexos são mais potentes do que a piplartina no modelo de cultura 3D com células HCT116. Os complexos CPR1 e CPR2 apresentaram taxas de inibição do crescimento tumoral *in vivo* de 35,06% e 29,71 %, respectivamente. **CONCLUSÃO:** Em conclusão, os complexos apresentaram maior citotoxicidade do que piplartina no modelo 3D e foram capazes de induzir apoptose mediada pela via MAPK por uma via dependente de p53 em células HCT116, bem como diminuir o seu crescimento tumoral em modelo de xenotransplante.

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

DIAS, Ingrid Rayssa Souza Baliza. Role of MAPK signaling pathways (JNK, p38 and ERK1/2) and p53 in the apoptosis induced by ruthenium complexes with piplartine in HCT116 human colon carcinoma cells. 2019. 75 f. il. Dissertation (Master in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) - Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, BA, 2019

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cancer is a multifactorial disease initiated by genetic mutations that cause a lack of control in the cell proliferation, these cancer cells proliferate in defiance of the body's normal controls. Among the treatments for this disease, chemotherapy is one of the most effective methods; however, currently available drugs have limitations related to high toxicity and the development of resistance. Piplartine (piperlongumine) is a plant-derived molecule that has received intense interest because of its anticancer properties that target oxidative stress. In order to potentiate cytotoxic effects in cancer cells, the association of natural compounds with transition metals, such as ruthenium, has been used. Recently, our research group synthesized two new ruthenium complexes containing piplartine, which increased gene expression of the MAPK and p53 pathways. **OBJECTIVE:** Thus, the present work aims to study the role of these signaling pathways in the apoptosis induced by these complexes, as well as to evaluate their effectiveness *in vivo*. **MATERIAL AND METHODS:** To verify the role of the MAPKs and p53 pathways in the complexes-induced cell death, we used the annexin V/PI assay in HCT116 cells pre-treated with the pharmacological inhibitors of JNK (SP 600125), p38 (PD 169316), ERK1/2 (U-0126) and p53 (cyclic pifithrin- α), and cell fluorescence was measured by flow cytometry. Phospho-JNK2 (T183/Y185), phospho-ERK1 (T202/Y204), phospho-p38 α (T180/Y182), phospho-p53 (S15), MDM2 e phospho-histone H2AX (S139) were measured by sandwich ELISA in cell lysates. The cytotoxicity of the complexes were evaluated in the 3D model of multicellular cancer spheroids formed from HCT116 cells. *In vivo* antitumor activity was evaluated in CB17 SCID mice xenografted with HCT116 cells and treated with the complexes at dose of 15 μ mol/kg, by intraperitoneal route, once a day for 15 consecutive days. **RESULTS:** Pre-treatment with inhibitors of JNK, MEK and p38 reduced the apoptosis caused by the complexes, indicating that apoptosis is mediated by these pathways. Similarly, the apoptosis induced by the complexes was prevented by pretreatment with the p53 inhibitor, indicating that the apoptosis is mediated by a p53-dependent pathway. Treatment with the complexes induced phosphorylation of p53 and H2AX after 24 hours of incubation and JNK2, ERK1 and p38 α after 15 and 30 minutes of incubation. We found that both complexes are more potent than piplartine in the 3D model of HCT116 cells. The complexes CPR1 and CPR2 showed *in vivo* tumor growth inhibition rates of 35.06% and 29.71%, respectively. **CONCLUSION:** In conclusion, the complexes presented higher cytotoxicity than piplartine in the 3D model and were able of inducing MAPK-mediated apoptosis by a p53-dependent pathway, as well as decreasing its tumor growth in xenograft model.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Características do tumor	16
Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma	18
Figura 3. Diagrama esquemático simplificado da via de sinalização MAPK	19
Figura 4. Estrutura da piplartina	22
Figura 5. Estrutura de KP1019 (A) e NAMI-A (B)	30
Figura 6. Estrutura piano-stool	32
Figura 7. Efeito do inibidor de JNK (SP 600125) na apoptose induzida pelos complexos de rutênio com piplartina em células HCT116 determinadas por citometria de fluxo usando coloração anexina V-FITC/PI	41
Figura 8. Efeito do inibidor de p38 MAPK (PD 169316) na apoptose induzida pelos complexos de rutênio com piplartina em células HCT116 determinadas por citometria de fluxo usando coloração anexina V-FITC/PI	43
Figura 9. Efeito do inibidor MEK (U-0126) na apoptose induzida pelos complexos de rutênio com piplartina em células HCT116 determinadas por citometria de fluxo usando coloração anexina V-FITC/PI.....	45
Figura 10. Efeito do inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica) na apoptose induzida pelos complexos em células HCT116 determinadas por citometria de fluxo usando coloração anexina V-FITC/PI.....	47
Figura 11. Quantificação dos níveis de fosfo-JNK2 (T183/Y185)	48
Figura 12. Quantificação dos níveis de fosfo-p38 α (T180/Y182)	48
Figura 13. Quantificação dos níveis de fosfo-ERK1 (T202/Y204).....	49
Figura 14. Quantificação dos níveis de fosfo-p53 (S15) e MDM2.....	49
Figura 15. Quantificação dos níveis de fosfo-histona H2AX (S139).....	50
Figura 16. Efeito dos complexos no modelo 3D de esferoides multicelulares de câncer formados a partir de células HCT116.....	51
Figura 17. Efeito dos complexos de rutênio contendo a piplartina como ligante sobre a massa tumoral em camundongos CB17 SCID inoculados com células HCT116.....	52

Figura 18. Análise histológica representativa dos tumores de camundongos CB17 SCID inoculados com células HCT116 corados com hematoxilina e eosina e analisados por microscopia óptica	55
Figura 19. Resumo do mecanismo de ação dos complexos de rutênio com piplartina nas células HCT116.	61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Efeito dos complexos no modelo 3D de esferoides multicelulares de câncer formados a partir de células HCT116.....51
- Tabela 2.** Efeito dos complexos de rutênio contendo a piplartina como ligante sobre a massa corpórea e a massa úmida dos órgãos de camundongos inoculados com células HCT116.53
- Tabela 3.** Efeito dos complexos de rutênio contendo a piplartina como ligante sobre os parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos inoculados com células HCT116.54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μmol	Micromole
3D	Tridimensional
5-FU	5-fluorouracil
ANOVA	Do Inglês <i>analysis of variance</i> (Análise de variância)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATO	Trióxido de arsênio
CI_{50}	Concentração inibitória média de 50%
CO_2	Dióxido de Carbono
CPR1	Complexos de rutênio contendo a piplartina 1
CPR2	Complexos de rutênio contendo a piplartina 2
CRX	Complexo de rutênio com xantoxilina
CTL	Controle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
E.P.M.	Erro padrão da média
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2</i> (proteínas cinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GST	Genes supressores de tumor
GTP	Trifosfato de guanosina
IL-1 β	Interleucina 1 beta
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JNK	<i>c-Jun amino-terminal kinases</i> (cinases c-Jun amino-terminal)

MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (proteína quinase ativada por mitógeno)
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
N.d.	Não determinado
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
p53	Proteína supressora de tumor p53
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico humano, do inglês: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PI	Iodeto de Propídio
PL	Piplartina
RAF	Proteína quinase específica da serina/treonina
RNA	Ácido ribonucleico
RODM	Molécula direta orgânica de rutênio
SBCAL	Sociedade Brasileira de ciência em animais de laboratório
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
WT	<i>Wild Type</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	CÂNCER	16
3.2	VIAS DE SINALIZAÇÃO	18
3.3	PIPLARTINA.....	22
3.4	COMPLEXOS METÁLICOS	27
3	OBJETIVOS	33
3.1	GERAL	33
3.2	ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	OBTENÇÃO DO COMPOSTO	34
4.2	OBTENÇÃO E TRATAMENTO DAS CÉLULAS	34
4.3	MARCAÇÃO PARA ANEXINA V/IP	35
4.3.1	<i>Ensaio de reversão com inibidores farmacológicos</i>	35
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ALVO – ELISA FOSFO-ESPECÍFICA ..	35
4.5	ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS COMPLEXOS NO MODELO 3D	36
4.6	ENSAIO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>in vivo</i>	37
4.6.1	<i>Animais</i>	37
4.6.2	<i>Modelo xenográfico</i>	37
4.6.3	<i>Avaliação toxicológica sistêmica</i>	38
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5	RESULTADOS ALCANÇADOS	39
5.1	EFEITOS DOS INIBIDORES DE JNK, P38 E MEK.	39
5.2	EFEITO DO INIBIDOR DE P53	45
5.3	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ALVO	47
5.4	ATIVIDADE CITOTÓXICA DO COMPLEXO NO MODELO 3D.....	50
5.5	ENSAIO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>in vivo</i>	52
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença multifatorial e sua formação é um processo complexo com diversos passos, sendo iniciada por mutações genéticas que causam um descontrole na proliferação celular. O que o caracteriza é sua capacidade de invadir tecidos, pois as células malignas rompem a membrana basal e podem penetrar cavidades corpóreas, vasos sanguíneos e linfáticos, permitindo a disseminação das células malignas pelo corpo, processo denominado metástase, desse modo podem surgir outros tumores derivados de um tumor primário (HANAHAN e WEINBERG, 2000; COTRAN, 2010).

Segundo o INCA, as causas do câncer são variadas e estão inter-relacionadas. Essas causas podem ser externas (relacionadas ao meio ambiente, hábitos e costumes) ou internas (relacionadas à genética do indivíduo) com relação ao organismo (INCA, 2017).

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, o qual causou 8,8 milhões de mortes em 2015 e espera-se que em 2030 a incidência mundial seja de 27 milhões de novos casos. De acordo com o INCA, existem 20 milhões de pessoas com câncer no mundo e no Brasil a estimativa é de 600 mil casos novos por ano para o biênio 2018-2019 (OMS, 2017; INCA, 2017).

Dentre os tratamentos para essa doença, a quimioterapia é um dos métodos mais eficazes, entretanto, os fármacos disponíveis atualmente apresentam limitações relacionadas à alta toxicidade e ao desenvolvimento de resistência. A natureza é uma fonte imensurável de compostos bioativos, seja de origem animal ou vegetal. Em especial, as plantas são as principais fontes de novos medicamentos anticâncer (COTREAU *et al.*, 2000). Uma dessas moléculas derivadas de produtos naturais é a piplartina (piperlongumina) que é um alcalóide encontrado em algumas espécies de *Piper* (Piperaceae) (PARMAR *et al.*, 1987). Em estudos anteriores, realizados pelo nosso e por outros grupos de pesquisa, ela apresentou efeitos citotóxicos e antitumorais em diversos modelos experimentais (COSTA *et al.*, 2017; DE CARVALHO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018; OLIVEIRA, *et al.*, 2019). A fim de potencializar os efeitos citotóxicos em células tumorais, tem sido utilizada a associação de compostos naturais com metais de transição, incluindo complexos de platina, tal como cisplatina, carboplatina e oxaliplatina; entretanto, eles têm

apresentado efeitos colaterais graves, incluindo nefrotoxicidade e neurotoxicidade. Por outro lado, entre outros complexos de metais de transição, o rutênio tem se apresentado como um anticancerígeno potente e seletivo (ABID *et al.*, 2016). Conseqüentemente, várias moléculas orgânicas estão sendo usadas como ligantes para formar complexos com rutênio visando a melhoria de sua atividade citotóxica.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa sintetizou dois novos complexos de rutênio contendo a piplartina como ligante, os quais aumentaram a expressão de genes das vias MAPK e p53 (COSTA *et al.*, 2017). Assim, o presente trabalho visa estudar o papel dessas vias de sinalização na apoptose induzida por esses complexos, bem como avaliar sua eficácia *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CÂNCER

As células cancerígenas apresentam muitos padrões morfológicos, como núcleos aberrantes, cromatina abundante e mitose atípica. A formação do câncer é um processo complexo de múltiplos passos e que pode levar várias décadas até que um tumor primário seja estabelecido. Isso se deve a sustentação da sinalização proliferativa, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular programada, permitindo a imortalidade replicativa, induzindo a angiogênese e ativando a invasão e a metástase, (HANAHAN e WEINBERG, 2000); instabilidade e mutação do genoma, reprogramação do metabolismo energético, evasão da destruição imunológica e a promoção da inflamação, como mostra a **figura 1** (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Fouad e Aanei revisaram os trabalhos de Hanahan e Weinberg e sugeriram que a formação do câncer se deve ao crescimento seletivo e vantagem proliferativa, resposta ao estresse alterada favorecendo a sobrevivência global, vascularização, invasão e metástase, resgate metabólico, microambiente de cumplicidade e modulação imunológica (FOUAD e AANEI, 2017).



Figura 1. Características do tumor. Fonte: Adaptado de HANAHAN e WEINGERG, 2011.

A maioria dos cânceres parece originar-se de uma única célula que sofreu uma mutação somática, mas a progênie destas células deve sofrer outras mudanças, provavelmente necessitando várias mutações adicionais, antes de se tornarem cancerosas. Este fenômeno de progressão do tumor reflete a operação da evolução por mutação e seleção natural entre células somáticas. A velocidade do processo é acelerada por agentes mutagênicos (iniciadores tumorais) e certos agentes não-mutagênicos (promotores de tumores) que afetam a expressão do gene, estimulam a proliferação celular e alteram o balanço entre as células mutantes e não-mutantes (ALBERTS *et al.*, 2010).

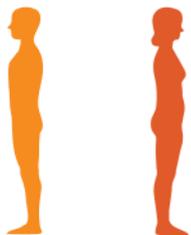
As causas do câncer são variadas, podendo ser externas ou internas com relação ao organismo. São consideradas causas externas fatores relacionados ao meio ambiente, hábitos e costumes ou internas, fatores relacionados à genética do indivíduo. Essas causas estão inter-relacionadas (INCA, 2017).

As causas externas estão relacionadas com a quantidade de agentes cancerígenos que as pessoas são expostas no dia a dia, o que causa um impacto significativo nas estatísticas de incidência do câncer. Esses agentes são divididos em três classes: físicos, como as radiações ultravioletas e ionizantes; químicos, como o amianto, os componentes do fumo de tabaco, as aflatoxinas (contaminantes dos alimentos) e o arsênio (contaminante da água); e biológicos, como determinados vírus, bactérias e parasitos. O envelhecimento é outro fator importante, pois com o aumento da idade, provavelmente vão se acumulando fatores de risco de determinados tipos de câncer combinados com a perda de eficácia dos mecanismos de reparo celular. Estima-se que cerca de 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais, podemos dizer que o “estilo de vida” é um fator crucial para o surgimento das neoplasias malignas (INCA, 2009; OMS, 2017).

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável por quase uma em cada seis mortes, causando, em 2015, 8,8 milhões de mortes (OMS, 2017). Dados globais apresentados pelo INCA relatam que existem 20 milhões de pessoas com câncer no mundo, chegando a 190 mil mortes por ano. Em 2025 o impacto do câncer será de 80% entre os países em desenvolvimento, já em 2030, espera-se uma incidência mundial de 27 milhões de novos casos. A estimativa para o Brasil, no biênio 2018-2019, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer por ano. Os tipos mais frequentes em homens são os de pele não

melanoma, próstata, pulmão, intestino, estômago e cavidade oral. Nas mulheres, os cânceres de pele não melanoma, de mama, intestino, colo do útero, pulmão e estômago figuraram entre os principais (INCA, 2017).

Ainda segundo o INCA, o câncer colorretal abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso (o cólon) e o reto. Esse tipo de câncer é tratável e curável na maioria dos casos, se for detectado precocemente, sem que tenha se espalhado para outros órgãos. A estimativa para 2018 foi de 36.360 novos casos, sendo 17.380 homens e 18.980 mulheres e o número de morte por esse tipo de câncer em 2013 foi de 15.415, sendo 7.387 homens e 8.024 mulheres (**figura 2**). O tratamento inicial é a cirurgia, a qual tem por objetivo a retirada da parte do intestino afetada e os nódulos linfáticos próximos à região. Em seguida podem ser utilizados outros tratamentos isolados ou associados a fim de diminuir a reincidência do tumor, como a radioterapia e a quimioterapia. O tratamento vai depender do tamanho, localização e extensão do tumor (INCA, 2017).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens		Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2017.

3.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO

As MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos) representam uma família de quinases serina/treonina e tirosina pertencentes ao grupo CMGC e regulam diversas atividades celulares relacionadas ao desenvolvimento do câncer, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose, inflamação e imunidade (HANKS, 1988; KIM, 2015). Em particular, JNK (quinase c-Jun N-terminal), ERK (quinase regulada por sinal extracelular) e p38 são os principais subgrupos envolvidos na carcinogênese. A via ERK é ativada principalmente por fatores de crescimento,

como o fator de crescimento epidérmico, enquanto que a sinalização JNK e p38 são ativadas por vários estímulos de estresse, incluindo radiação ultravioleta, espécies reativas de oxigênio (ERO) e citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina (IL-1 β) (revisado por PELUSO *et al.*, 2017). Na **figura 3** podemos observar o desenho esquemático dessas vias.

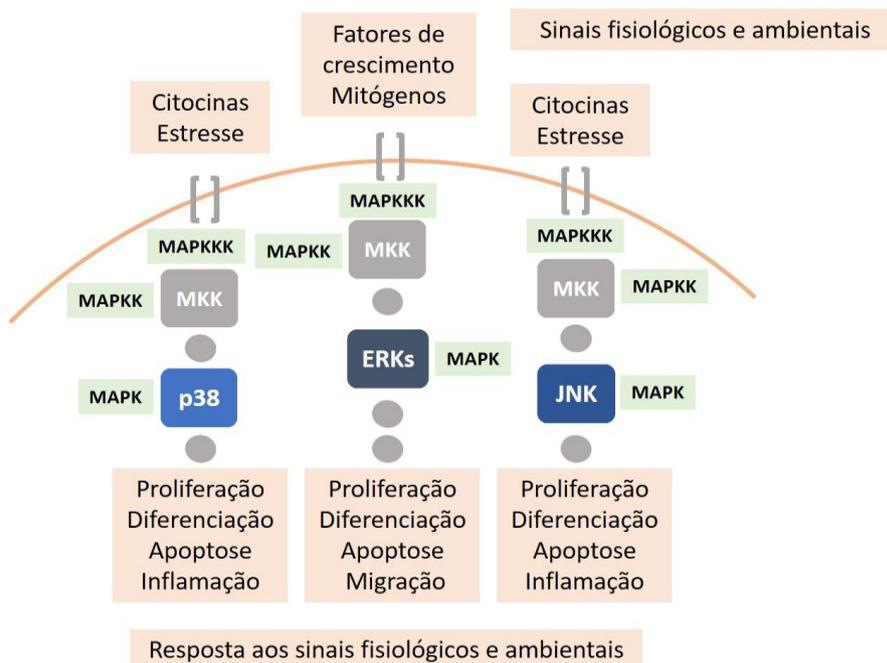


Figura 3. Diagrama esquemático simplificado da via de sinalização MAPK. Adaptado de WANG e XIA, 2012.

A via MAPK canônica exerce seus efeitos através da fosforilação e ativação de proteínas sequenciais em sua cascata de quinase. O primeiro componente da via MAPK é a família Ras de pequenas GTPases, que atuam como interruptores 'on' ou 'off' quando estimulados por sinais *upstream*. Fatores externos de crescimento ativam as proteínas receptoras transmembranas e faz com que Ras se ligue ao trifosfato de guanosina (GTP), adotando sua conformação ativa, e assim, permitindo fosforilar e ativar a próxima quinase na cascata de sinalização, conhecida como Raf (uma proteína quinase específica da serina/treonina). Isto é repetido em etapas sucessivas de fosforilação ativando quinases que amplificam o sinal proliferativo, essa sucessão vai de Ras→RAF→MEK culminando na ativação da quinase efetora ERK. ERK atua em inúmeros objetivos citoplasmáticos e nucleares para promover o crescimento e a divisão celular (GAESTEL, 2006; KWONG e CHIN, 2010).

As JNK, também conhecidos como MAPKs ativados por estresse (KYRIAKIS, 2001), foram inicialmente descobertos pela sua capacidade de fosforilar o proto-

oncogene c-Jun (TURJANSKI, 2007). As JNKs são codificadas por três genes, JNK1, JNK2 e JNK3, que produzem pelo menos 10 subtipos de proteínas (DAVIS, 2000). Os subtipos JNK1/2 são expressos de forma ubíqua, enquanto os JNK3s são restritos principalmente ao testículo e ao cérebro. As JNKs são caracterizadas pela bi-fosforilação em um motivo Tre-Gli-Tir localizado em uma região conhecida como o laço de ativação e são ativadas pelas quinases MKK4 e MKK7. Essas proteínas desempenham papéis importantes na apoptose, proliferação, diferenciação e inflamação. Além de c-Jun, os alvos adjuvantes incluem vários fatores de transcrição, proteínas quinases e a proteína supressora de tumor p53 (BAGLEY, 2010). O mecanismo pelo qual o grupo JNK é ativado por estímulos externos não é tão bem entendido como no caso de ERKs. Seguindo o padrão distinto de ativação de ERK e JNK por receptores celulares, uma descoberta inesperada foi que, como Ras regula ERKs, dois membros da família Rho de GTPases, Rac1 e Cdc42, iniciam uma cascata de quinase independente que rege a atividade de JNK (COSO *et al.*, 1995). Estudos mostram que JNK1 e JNK2 estão envolvidos na sensibilização à morte celular induzida por cisplatina após a inibição de p38 MAPK e o aumento dos níveis de ERO mediado pela ativação de JNK (PEREIRA *et al.*, 2013).

A p38 MAPK é amplamente expressa em muitos tipos de células, incluindo células imunes, inflamatórias e endoteliais. Existem quatro subtipos p38 (p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ), cada um codificado por um gene separado (LEE *et al.*, 1994; SCHIEVEN, 2005). A p38 α MAPK é ativada através da bi-fosforilação no motivo Tre-Gli-Tir, levando ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β . A ativação é alcançada por MAPK quinases específicas, MKK3 e MKK6 (FRESHNEY *et al.*, 1994). Em alguns casos, a p38 também pode ser ativada pelo MKK4, que é mais conhecida como ativadora da JNK. Uma vez ativadas, as proteínas p38 podem transladar do citosol para o núcleo, onde eles fosforilam os resíduos de serina/treonina de seus muitos substratos. Além do seu papel nas respostas ao estresse, a via p38 também desempenha um papel na regulação da apoptose, progressão do ciclo celular, crescimento e diferenciação. Isto deve-se, em parte, à capacidade de uma ampla gama de estímulos extracelulares como fatores de crescimento (como GMCSFD, fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento semelhante a insulina 1, PDGF e fator de crescimento nervoso) e hormônios que ativam essa via. Esses estímulos alimentam esta via ativando

diferentes MAPKKs, incluindo TAK1, ASK1/2, DLK, MEKK4, TAO1/2/3 e MLK2/3 (ZARUBIN e HAN, 2005; KRENS *et al.*, 2006).

A via p53 é altamente conservada na evolução e sua função é definida como um ponto de controle ou revisão que mantém a integridade genética e protege o organismo do desenvolvimento do câncer. Embora os componentes da via nuclear sejam conservados na evolução, sua regulação fina está sob intensa pressão evolutiva, especialmente nos domínios carboxi e amino-terminal de p53, que variam amplamente na sequência entre as espécies, enquanto que o domínio de ligação ao DNA do núcleo é relativamente invariante (BELYI *et al.*, 2010). Esses domínios variáveis interagem com um grande número de proteínas parceiras que criam uma rede de sinalização muito complexa, que envolve muitas modificações pós-traducionais (MEEK e ANDERSON, 2009). Esta rede de sinalização é distorcida na maioria dos cânceres, criando potenciais alvos específicos de tumor para terapia (revisado por WASYLISHEN e LOZANO, 2016).

O p53, também chamado de "guardião do genoma", é ativado em resposta a sinais de estresse - dano do DNA, ativação de oncogenes, estresse ribossômico e hipóxia - e leva à supressão de crescimento induzindo a parada do ciclo celular ou morte celular. A função prevalente do supressor de tumor p53 é o controle da transcrição de genes alvos que regulam numerosos processos celulares, incluindo o ciclo celular e a apoptose (VOGELSTEIN, 2000; HORN e VOUSDEN, 2007; RILEY *et al.*, 2008; BECKERMAN, 2010). Nas células não estressadas, a atividade de p53 é normalmente mantida em controle pelo seu regulador negativo, Mdm2, uma E3 (ubiquitina ligase), que se liga a p53 e visa a degradação proteossômica (TOLEDO e WAHL, 2006).

Existem alguns fármacos descritos que induzem efeitos pró-apoptóticos a partir da ativação das vias MAPK, como por exemplo, a doxorrubicina (DOX), a qual aumenta a fosforilação de p38, JNK1 e JNK2 de maneira dose e tempo dependentes. Esse trabalho também mostrou que DOX desencadeia a ativação de ERK, JNK e p38 em culturas primárias de hepatócitos de ratos machos Sprague Dawley independentemente do dano oxidante (NAVARRO *et al.*, 2006). Outro trabalho investigou o envolvimento da ativação da sinalização de ERK como consequência do p53 não funcional na sensibilidade das células à doxorrubicina e descobriu-se que a quimiossensibilidade aumentada de células que não possuem

função p53 é devido a níveis elevados de EGFR que ativa ERK. Além disso, foi observado que, independentemente do status da p53, a pERK contribui para a morte celular induzida por doxorrubicina (KUMARI *et al.*, 2017).

3.3 PIPLARTINA

A piplartina (PL) (figura 4), também conhecida como piperlongumina, é um alcalóide/amida encontrado em algumas espécies de *Piper* (Piperaceae) (PARMAR *et al.*, 1987), como a pimenta-longa (*Piper longum* L. - Piperaceae). Ela é amplamente utilizada na medicina Ayurveda, que é usada para tratar doenças, incluindo tumores. Entre as propriedades farmacológicas relatadas da piplartina incluem as atividades: citotóxica, genotóxica, antitumoral, antiangiogênica, antimetastática, antiparasitária, antinociceptiva, ansiolítica, antidepressiva, antiaterosclerótica, antidiabética, antibacteriana, antifúngica, leishmanicida, tripanocida e esquistossomicida. Entre elas, a propriedade mais promissora e que tem sido amplamente investigada é a anticancerígena, onde este composto apresenta seletividade citotóxica contra células cancerosas por indução de estresse oxidativo e excelente biodisponibilidade oral em camundongos, além de inibir o crescimento tumoral em camundongos e apresentar uma fraca toxicidade sistêmica (revisado por BEZERRA *et al.*, 2013). Sua estrutura pode ser observada na **figura 4**.

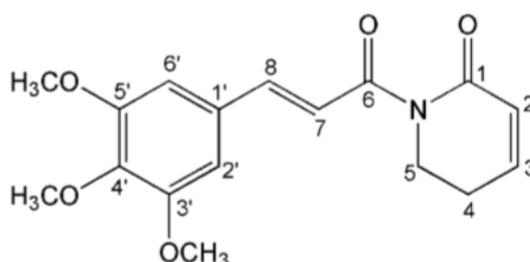


Figura 4. Estrutura da piplartina. Fonte: PISKA *et al.*, 2018.

A atividade citotóxica da piplartina em relação a diversas linhagens celulares tumorais foi descrita em muitos estudos. A piplartina é capaz de matar células cancerosas de vários tipos histológicos, incluindo hematológicos, cólon, melanócitos, pulmão, mama, sistema nervoso central (SNC), pancreático, nasofaríngeo, ósseo, bexiga, renal e próstata. Também foi observado, utilizando doses na faixa micromolar, que a piplartina apresentou citotoxicidade seletiva sobre células

cancerígenas com fraca atividade em células normais (revisado por BEZERRA *et al.*, 2013).

Os primeiros estudos antitumorais realizados com a piplartina avaliaram as células de leucemia humana, HL-60 e K-562, demonstrando que a piplartina pode suprimir o crescimento da leucemia e reduzir a sobrevivência celular, provocando a morte celular por apoptose e/ou necrose dependentes da caspase, foi observado também uma citotoxicidade fraca em linfócitos normais (PMBC) (BEZERRA *et al.*, 2007). Em um estudo posterior, realizado com células da linhagem celular V79 (derivada de fibroblastos de *hamster* chinês), foram demonstrados os efeitos da piplartina no progresso do ciclo celular, onde a interrupção aconteceu em G₂/M seguida de apoptose dependente de mitocôndria, sendo observado a condensação de cromatina, fragmentação de DNA internucleossomal e perda de potencial de membrana mitocondrial (BEZERRA *et al.*, 2008b).

Outros estudos também foram realizados para identificar o mecanismo de ação da piplartina. Foram examinados os efeitos antiproliferativos na linhagem de câncer de próstata humano PC-3, na qual também foi relatada a parada do ciclo celular na fase G₂/M, além da diminuição da expressão de cdc-2 concentração-dependente, que se correlaciona com a parada do ciclo celular da fase G₂/M, porém, a expressão da ciclina B1, molécula importante para a transição G₂/M, não foi alterada. As alterações nos níveis de Bax foram indetectáveis, mas os níveis de bcl-2, um inibidor da via de intrínseca da apoptose, diminuíram significativamente, sugerindo que a piplartina induz apoptose através de *down-regulation* do bcl-2. A ativação da caspase-3 e poli(ADP-ribose) polimerase, proteínas efetoras da apoptose, também foi encontrada (KONG *et al.*, 2008).

A piplartina suprimiu a progressão e migração do tumor através da inibição da expressão de Twist e N-caderina em células tumorais tratadas com este composto em cultura. O tratamento também foi capaz de perturbar o complexo p120-ctnvimentina/N-caderina, que desempenha um papel crítico na progressão do tumor, invasão e metástase (LEE e MANDINOVA, 2009).

Outro grupo também demonstrou que o tratamento com a piplartina induziu significativamente a morte celular em células de câncer, mas não em células normais. A morte celular também foi associada à indução da expressão e de acetilação de p53. Surpreendentemente, o tratamento com piplartina matou as

células tumorais com p53 WT e mutante. Em adição, o tratamento com a piplartina reduziu a expressão de diversas proteínas de sobrevivência celular como Bcl2, survivina e XIAP; promoveu o aumento da expressão de genes pró-apoptóticos, como Bim, PUMA e Noxa, enquanto que os genes de sobrevivência apresentaram níveis de mRNA significativamente reduzidos. Também foi encontrada a ativação do gene CDIP (*cell death involved p53-target*) (revisado por BEZERRA *et al.*, 2013).

Através de uma combinação de marcação isotópica estável por aminoácidos em cultura celular (SILAC) e proteômica quantitativa foram identificados 12 alvos potenciais para o efeito citotóxico da piplartina que foram conservados em duas linhagens celulares, EJ (carcinoma da bexiga humana, p53 mutante) e U2OS (osteossarcoma humano, p53 WT), entre eles sete vias estão envolvidas na resposta celular ao estresse oxidativo. As proteínas alvo identificadas foram: glutathione S-transferase pi 1, GSTp1; carbonil redutase 1, CBR1; glutathione S-transferase zeta 1, GSTZ1; glutathione S-transferase M3, GSTM3; proteína associada a diferenciação de neuroblastos, AHNAK; *pleckstrin homology domain-containing family M member 1*, PLEKHM1; glioxalase I, GLO1; glutathione S-transferase omega 1, GSTO1; Anexina A5, ANXA5; proteína ribossomal S5, RPS5; vimentina, VIM e peroxirredoxina 1, PRDX1. Além disso, verificou-se que a piplartina é capaz de interagir diretamente com o GSTp1, inibir a atividade da glutathione S-transferase, diminuir os níveis de glutathione reduzida e aumentar os níveis de glutathione oxidada nas células tumorais. O peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico foram encontrados entre as espécies reativas de oxigênio induzidas pela piplartina nas células tumorais. Em contraste com os resultados em células cancerosas, a piplartina não provocou aumento nos níveis de ERO em células normais (revisado por BEZERRA *et al.*, 2013).

A piplartina também reduziu a viabilidade celular e induziu a apoptose de forma tempo e concentração dependentes. Também foi observada que a sinalização JNK foi ativada durante o tratamento nas células de carcinoma de colón humano HCT116 (LI *et al.*, 2015).

Em um estudo mais recente, foram investigados pela primeira vez os efeitos da piplartina sobre a tubulina e microtúbulos. Nesse estudo foram utilizadas células de câncer de mama (MCF-7), demonstrando que a piplartina é um agente desestabilizador de tubulina. Este resultado foi confirmado por imunofluorescência e

microscopia confocal, que mostrou que os microtúbulos em células MCF-7 foram despolimerizados quando tratados com piplartina. Também foram sintetizados uma série de análogos da piplartina para explorar relações entre estrutura-atividade, onde o composto 13 tinha o melhor perfil citotóxico desta série, mostrando efeitos potentes nas células MCF-7 e sendo relativamente não tóxico para células epiteliais de mama não-tumorigênicas (MCF-10a) (MEEGAN, 2017).

Os modelos de farmacologia e toxicologia em animais portadores de tumores são úteis para direcionar os ensaios clínicos de um novo fármaco. A atividade antitumoral *in vivo* da piplartina foi avaliada pela primeira vez em camundongos *Swiss* transplantados com tumor de sarcoma 180, onde a piplartina foi capaz de inibir o crescimento do tumor a partir da administração de 7 doses de 50 ou 100 mg/kg (BEZERRA *et al.*, 2006). Além disso, quando os animais portadores de tumor foram tratados com piplartina mais 5-FU, a taxa de inibição do tumor aumentou aditivamente (BEZERRA *et al.*, 2008a). Nos experimentos acima não foram observadas alterações significantes nos pesos corporais ou nos pesos dos órgãos dos animais tratados com piplartina. Nos camundongos transplantados com sarcoma 180 e tratados com piplartina foi observado que os parâmetros renais (níveis de ureia) e do fígado (atividade enzimática das transaminases: AST e ALT) permaneceram inalterados. Nas análises histopatológicas, a piplartina não teve efeito no baço ou no fígado dos animais tratados, mas teve o rim como alvo toxicológico (BEZERRA *et al.*, 2006, 2008a).

Em modelos xenográficos, o efeito antitumoral da piplartina foi testado contra as linhagens tumorais EJ (carcinoma da bexiga humana), MDAMB436 (carcinoma de mama humano) e A549 (carcinoma de pulmão humano), além do melanoma B16-F10 inoculado em camundongos C57BL/6. Os animais foram tratados por 21 dias com a dose de piplartina de 1,5 mg/kg/dia. Foram observados efeitos antitumorais. A taxa de inibição foi próxima do controle positivo usado. O tratamento com piplartina também aumentou a expressão de CDKN1A, PUMA e caspase 3 em tumores de células EJ, o que representa o efeito pró-apoptótico da piplartina nos camundongos portadores do tumor. Além disso, o tratamento com piplartina inibiu a formação de vasos sanguíneos em camundongos transplantados com células cancerígenas, como observado pela redução da expressão de VEGF, sugerindo também uma atividade antiangiogênica (revisado por BEZERRA *et al.*, 2013).

Também foi estudado o efeito do tratamento com piplartina em um modelo de rato transgênico de câncer de mama espontâneo MMTV-PyVT. Foi observada uma redução do desenvolvimento do tumor quando os animais foram tratados com piplartina (2,4 mg/Kg) por via intraperitoneal durante 13 dias consecutivos. Mais uma vez, foi encontrada uma inibição da formação de vasos sanguíneos e redução da expressão de CD31 (também conhecida como molécula de adesão de células endoteliais plaquetárias - PECAM-1). Além disso, também foi possível avaliar o potencial antimetastático (revisado por BEZERRA *et al.*, 2013).

A piplartina também foi testada em células de câncer de pulmão (NSCLC) *in vivo* e *in vitro*. A piplartina induziu morte celular apoptótica e suprimiu a atividade de ligação ao DNA de NF- κ B concentração-dependente. Em modelo xenográfico, suprimiu o seu crescimento tumoral dose-dependente (ZHENG *et al.*, 2016).

Os exames toxicológicos *in vivo* da piplartina indicam um bom perfil de segurança (revisado por BEZERRA *et al.*, 2013; BEZERRA *et al.*, 2008a). Outra vantagem é a sua alta absorção pela via gastro-intestinal. Em camundongos, a molécula demonstrou biodisponibilidade de 50-76% após a administração oral (revisado por BEZERRA *et al.*, 2013).

A fim de reduzir os mecanismos de resistência na quimioterapia clínica de câncer, medicamentos anticancerígenos são frequentemente usados em combinação. Curiosamente, a piplartina aumentou a citotoxicidade do 5-fluorouracil (5-FU) em várias linhas celulares (BEZERRA *et al.*, 2008a). Em um trabalho semelhante, foi investigado o tratamento de piplartina combinada com diferuloilmetano (curcumina), um agente anti-inflamatório e anticancerígeno. A combinação com diferuloilmetano aumentou a citotoxicidade induzida por piplartina (JYOTHI *et al.*, 2009).

Em outro estudo, o efeito de reversão da resistência à doxorrubicina pela piplartina sobre células de leucemia humana K562/A02 e o mecanismo subjacente foram investigados. Os resultados indicaram que a piplartina promoveu sensibilidade à doxorrubicina e causou apoptose, acúmulo intracelular de rodamina-123, atividades de caspase-3 e -8 e expressão de espécies reativas de oxigênio, p53, p27 e p-PTEN. Além disso, suprimiu a expressão da glicoproteína-P, MDR1, MRP1, survivina e p-Akt, e as atividades transcricionais do NF- κ B e twist e interromperam o ciclo celular na fase G₂/M. Os resultados indicam que a piplartina tem o potencial

para ser utilizada como um agente terapêutico para a leucemia humana (KANG e YAN, 2015).

Outro estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade da piplartina e da sua combinação com cisplatina em células de câncer de cabeça e pescoço (HNC) *in vitro* e *in vivo*. A piplartina foi citotóxica para as células HNC, independentemente do estado mutacional do p53, e não foi citotóxica para as células normais. Nas células HNC, a piplartina aumentou o acúmulo de ERO, induziu morte celular seletiva por direcionar a resposta de estresse a ERO, levando à indução de vias de morte envolvendo JNK e PARP. A piplartina aumentou a citotoxicidade induzida pela cisplatina em células HNC de maneira sinérgica *in vitro* e *in vivo* (ROH *et al.*, 2015).

Um estudo mais recente apresentou como objetivo o desenvolvimento de um sistema *nanocarrier* para *co-delivery* de paclitaxel e piplartina e investigou o potencial terapêutico a fim de melhorar a eficácia e reduzir a toxicidade. A piplartina facilitou a captação celular de paclitaxel, e o aumento da citotoxicidade foi similarmente exibido. A captação intracelular de paclitaxel em nanopartículas coencapsuladas em relação às células HepG2 foi significativamente maior do que a solução livre. Além disso, o efeito antitumoral de paclitaxel/piplartina-PTNPs no modelo de tumor de xenoenxerto com HepG2 sugeriu que as nanopartículas mostraram uma maior eficácia antitumoral com toxicidade reduzida para outros tecidos em comparação com paclitaxel livre (LIU *et al.*, 2017). Esses trabalhos demonstraram, então, que a piplartina não só possui efeito citotóxico, como também pode aumentar a atividade antitumoral de fármacos quimioterápicos.

3.4 COMPLEXOS METÁLICOS

Os potenciais terapêuticos dos compostos à base de metais remontam à antiguidade. Os antigos assírios, egípcios e chineses sabiam da importância do uso de compostos à base de metais no tratamento de doenças, como o uso de cinábrio (sulfeto de mercúrio). O advento da “ciência teórica”, pelos filósofos gregos (Empédocles e Aristóteles) no século 5 e 4 a.C., impulsionou o conhecimento de compostos baseados em metais como agentes terapêuticos (NORN *et al.*, 2008).

O trióxido de arsênio (ATO) foi usado como antisséptico e também no tratamento de doenças reumáticas, sífilis e psoríase por praticantes da medicina

tradicional chinesa (AGNEW, 2010). Certamente, o ATO estava entre os primeiros compostos sugeridos para uso no tratamento da leucemia durante os séculos XVIII e XIX, até o início do século XX, quando seu uso foi substituído por radiação e quimioterapia citotóxica (WAXMAN e ANDERSON, 2001). O uso terapêutico de ouro e cobre pode ser atribuído à história da civilização, onde os egípcios e chineses eram usuários famosos no tratamento de certas doenças, como a sífilis (FRICKER, 1996).

Geralmente, os metais são componentes essenciais das células (FREZZA *et al.*, 2010). Eles são frequentemente encontrados no domínio catalítico das enzimas e estão envolvidos em múltiplos processos biológicos, desde a troca de elétrons até catálise e papéis estruturais, sendo amplamente utilizados nas atividades celulares (BRUIJNINCX e SADLER, 2008). Esses metais incluem o gálio, o zinco, o cobalto, a prata, o vanádio, o estrôncio, o manganês e o cobre, que são necessários em quantidades vestigiais para desencadear processos catalíticos. Para esse fim, um equilíbrio entre a necessidade celular e a quantidade disponível no corpo é importante para o estado fisiológico normal. Comparativamente, metais, incluindo níquel, cádmio, cromo e arsênico, podem induzir carcinogênese e, portanto, são menos benéficos para o corpo (MOURINO *et al.*, 2012).

As ricas propriedades fotofísicas e fotoquímicas dos complexos metálicos, além de sua química básica de coordenação, tornam eles ideais para uma grande variedade de aplicações biológicas. Embora a indústria farmacêutica em geral tenha evitado os produtos farmacêuticos "heavy metal", com exceção da cisplatina e seus derivados, existem de fato oportunidades reais no desenvolvimento de produtos farmacêuticos de metal de transição, dada a sua alta modularidade, facilidade de síntese em preparo de moléculas de formas e simetrias complexas e a capacidade de monitorar seu destino dentro da célula usando uma variedade de espectroscopias (WEIDMANN *et al.*, 2014).

A descoberta da cisplatina por Barnett Rosenberg, em 1960, foi um marco na história de compostos à base de metal utilizados no tratamento de câncer (KÖPF-MAIER, 1994). Os medicamentos de platina, como cisplatina, carboplatina e oxaliplatina, são os principais suportes dos compostos à base de metal no tratamento do câncer. Muitos outros compostos à base de metal foram sintetizados através do redesenho da estrutura química existente através da substituição do

ligando ou da construção de todo o novo composto com maior segurança e perfil citotóxico (NDAGI *et al.*, 2017). A cisplatina e seus análogos foram desenvolvidos como quimioterápicos "clássicos" e destinam-se a interferir na replicação e/ou nos processos mitóticos das células tumorais alcançando potência ao danificar células cancerosas mais do que células saudáveis (WANG e LIPPARD, 2005). Embora esta abordagem tenha sido frutífera, esses compostos têm causado diversos efeitos colaterais, como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, leucopenia e trombocitopenia, bem como náuseas, vômitos e perda de cabelo (revisado por DECATRIS, *et al.*, 2004).

Recentemente, os complexos de rutênio tem sido objeto de grande atenção no campo da química medicinal devido ao renovado interesse em fornecer uma alternativa à cisplatina como agentes antitumorais com propriedades antimetastáticas seletivas e baixa toxicidade sistêmica (KOSTOVA, 2006). Os compostos de rutênio desenvolvidos para este propósito são conhecidos por causar efeitos colaterais menos graves. O rutênio pode formar complexos octaédricos que dão oportunidade para explorar mais ligandos em comparação com complexos de platina(II) que apenas formam complexos planares quadrados. Uma das abordagens para o design do medicamento com rutênio é o desenvolvimento de uma molécula direta orgânica de rutênio (RODM). Neste caso, a molécula orgânica se liga ao local ativo de uma enzima e o íon de rutênio ligado se liga a resíduos próximos da mesma enzima. A vantagem dessa abordagem é que existe um alvo biológico conhecido de um composto do qual estudos enzimológicos podem ser realizados, como estudos de taxa de inibição enzimática (PAGE, 2012).

Outras abordagens incluem terapia dirigida e abordagem multinuclear. A capacidade do rutênio para formar arquitetura multinuclear e supramolecular também foi explorada no planejamento de fármacos. Isso inclui complexos de cluster de rutênio, intercaladores de DNA de rutênio e compostos de metais misturados com rutênio e platina (PAGE, 2012). Na terapia direcionada, o rutênio é quimicamente ligado a um composto orgânico com alvo biológico conhecido que direciona o fármaco para as células, aumentando assim a potência do composto. A peculiaridade do rutênio como um dos complexos metálicos menos tóxicos é atribuída, em parte, à capacidade do complexo Ru(III) de imitar a proteína sérica de ligação de ferro, reduzindo assim a concentração de rutênio no plasma livre e

aumentando a concentração que atinge células cancerígenas em comparação com células saudáveis (ALLARDYCE, 2016).

Na década de 1970, Clarke e colaboradores relataram que os complexos de pentaaminina-(purina)-rutênio(III) eram capazes de inibir o DNA e a síntese proteica em células de carcinoma de nasofaringe *in vitro* (KELMAN *et al.*, 1977), o que despertou interesse em complexos de rutênio como potenciais fármacos anticâncer (CLARKE, 1980). Durante a década seguinte, Mestroni e colaboradores desenvolveram complexos Ru(II) hexacoordenados com dimetilsulfóxido e ligantes de cloreto, particularmente, *cis*- e *trans*-RuCl₂(dimetilsulfóxido)₄, que exibiram atividade anticancerígena *in vitro* e *in vivo*. Os complexos mostraram interagir *in vitro* e *in vivo* com o DNA, seu alvo mais provável (MESTRONI *et al.*, 1989). Já na década de 1990, Keppler e colaboradores (1994) publicaram a síntese e caracterização estrutural do [ImH][*trans*-RuCl₄(Im)₂], o ICR, o qual apresentou interessantes propriedades antitumorais em modelos animais. Também nessa década, Sava e colaboradores publicaram trabalhos sobre as propriedades antitumorais e antimetastáticas do Na[*trans*-RuCl₄(DMSO)Im], o NAMI (SAVA *et al.*, 1991; 1992; 1994; 1995). Atualmente, existem dois medicamentos anticâncer baseados em Ru em ensaios clínicos fase II: ImH[*trans*-RuCl₄(DMSO)Im], o NAMI-A, desenvolvido por Mestroni, Alessio e colaboradores, e [indH][*trans*-RuCl₄(ind)₂], o KP1019, desenvolvido por Keppler e colaboradores, como mostra a **figura 5** (revisado por PIZARRO e SADLE, 2009; ANG *et al.*, 2011).

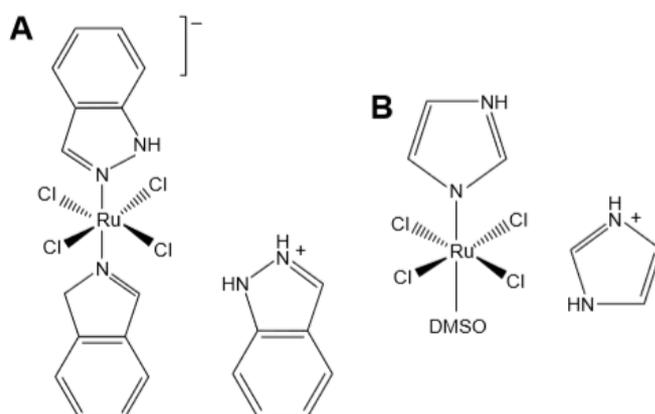


Figura 5. Estrutura de KP1019 (A) e NAMI-A (B). Fonte: NDAGI *et al.*, 2017.

Indubitavelmente a interação do KP1019 com o DNA é fator importante para sua ação citotóxica. Dados experimentais mostram que as lesões ao DNA, induzidas pelo KP1019, são diferentes daquelas promovidas pela cisplatina, uma vez que foi

observada inibição dos mecanismos de reparo do DNA, levando ao aumento da atividade antiproliferativa do KP1019, o que não ocorre para a cisplatina (MALINA, *et al.*, 2001; ALESSIO, *et al.*, 1997).

O Na[*trans*-RuCl₄(Im)(dmsO)] (Im = imidazol), conhecido por NAMI (*New Anti-tumor Metastasis Inhibitor*), possui um efeito antimetastático não apresentado pela cisplatina e seus análogos (SAVA *et al.*, 1999). O NAMI-A é derivado do NAMI pela substituição do contra-íon Na⁺ por ImH⁺, sendo ambos os primeiros fármacos anti-câncer de rutênio a entrarem em fase de testes clínicos (SAVA e BERGAMO, 2000; BERGAMO *et al.*, 2002). O NAMI-A é mais estável que o NAMI e estes exibem propriedades farmacológicas similares (SAVA *et al.*, 1998). Ambos podem ser administrados oralmente e são ativos contra vários tipos de tumores como carcinoma pulmonar de Lewis, melanoma B16 e carcinoma mamário MCa (SAVA *et al.*, 1995). Estes complexos apresentam baixa toxicidade, não afetando o crescimento de tumores primários e não exibindo citotoxicidade contra células tumorais *in vitro*, porém, o NAMI-A é mais ativo contra processos metastáticos (FRAUSIN *et al.*, 2005).

No entanto, em contraste com os outros fármacos anticâncer baseados em metal, acredita-se que a atividade antimetastática do NAMI-A seja devido aos efeitos combinados no controle da angiogênese (possivelmente porque interfere no metabolismo do NO *in vivo*) (MORBIDELLI *et al.*, 2003; VACCA *et al.*, 2002) e propriedades anti-invasivas em relação a células tumorais e vasos sanguíneos (BERGAMO *et al.*, 1999).

Os complexos de rutênio possuem outra classe com ligantes arilazopiridil (azpy), apresentando promissora atividade citotóxica, estruturalmente dependente. Três dos cinco possíveis isômeros do [RuCl₂(azpy)₂] (α , β e γ) têm sido reportados como potenciais antineoplásicos. Os isômeros α e γ apresentaram citotoxicidade maior que o isômero β (HOTZE, *et al.*, 2004).

Recentemente, foi explorado o potencial dos complexos Ru(II) (areno) [(h₆-areno)Ru(X)(Y)(Z)] como fármacos antitumorais. Eles possuem estruturas características de “*piano-stool*” (**figura 6**, onde X–Y é um ligante quelante neutro e Z é monoaniônico). Nestes complexos, o rutênio já está em seu estado de oxidação mais baixo (2⁺), o que pode ser importante para a citotoxicidade do fármaco *in vivo*. O ligante areno, ligando-se com o eletrôn doador η^6 e π -aceitador, confere

estabilidade ao estado de oxidação 2⁺. A presença de um ligante quelante, X–Y, parece fornecer estabilidade adicional a toda a estrutura. O ligante Z é o "grupo abandonador" e permite a ativação da molécula: se lábil, pode fornecer um local de coordenação para biomoléculas. Pequenas variações do areno e das "pernas" do *stool* proporcionam versatilidade à molécula e a possibilidade de ajuste fino de suas propriedades farmacológicas (PIZARRO e SADLE, 2009).

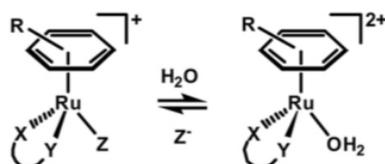


Figura 6. Estrutura piano-stool. Fonte: PIZARRO e SADLE, 2009.

Estes compostos monofuncionais se coordenam ao N7 da guanina no DNA, o que é complementado pela ligação intercalativa do areno, assim como por uma ligação de hidrogênio entre os ligantes bidentados e o C6O da guanina (CHEN *et al.*, 2002). Areno-complexos *half-sandwich* contendo iodo e fenilazopiridina em sua esfera de coordenação mostraram-se inertes quanto à substituição em solução aquosa, mas apresentaram alta citotoxicidade em células de câncer de ovário e pulmão (DOUGAN, *et al.*, 2008).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa sintetizou um complexo de platina contendo piplartina. O complexo exibiu citotoxicidade mais potente do que a piplartina em um painel de diferentes células cancerígenas e desencadeou a apoptose mediada por estresse oxidativo e pela via de sinalização ERK/p38 em células de leucemia promielocítica aguda humana HL-60 (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Nosso grupo de pesquisa também sintetizou dois novos complexos de rutênio contendo a piplartina como ligante. Esses complexos apresentaram citotoxicidade mais potente que a piplartina em diversas linhagens celulares e induziram morte celular por apoptose mediada por ERO em células de carcinoma de colón humano HCT116. Também foi observado aumento da expressão de genes relacionados a via de sinalização MAPK e p53 em células HCT116 (COSTA *et al.*, 2017). Assim, nesse trabalho decidimos investigar o papel das vias de sinalização MAPK (JNK, p38 e ERK1/2) e p53 na apoptose induzida por complexos de rutênio com piplartina em células HCT116.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar o papel das vias de sinalização MAPK (JNK, p38 e ERK1/2) e p53 na apoptose induzida por complexos de rutênio com piplartina em células de carcinoma de colón humano HCT116.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito dos inibidores de JNK (SP 600125), p38 (PD 169316), ERK1/2 (U-0126) e p53 (pifitrina- α cíclica) na apoptose induzida por complexos de rutênio com piplartina em células HCT116;
- ✓ Quantificar os níveis de fosfo-JNK2 (T183/Y185), fosfo-ERK1 (T202/Y204), fosfo-p38 α (T180/Y182), fosfo-p53 (S15), MDM2 e fosfo-histona H2AX (S139) em células HCT116 tratadas com complexos de rutênio com piplartina;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos complexos de rutênio com piplartina em células HCT116 cultivadas em modelo 3D;
- ✓ Avaliar a eficiência antitumoral *in vivo* de complexos de rutênio com piplartina em modelo de xenotransplante com células HCT116.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO COMPOSTO

Os complexos de rutênio [Ru(piplartina)(dppf)(bipy)](PF₆)₂ (CPR1) e [Ru(piplartina)(dppb)(bipy)](PF₆)₂ (CPR2) foram sintetizados conforme descrito anteriormente (COSTA *et al.*, 2017). A obtenção e caracterização desses complexos de rutênio foram realizados pelo prof. Dr. Alzir Azevedo Batista e Dr. João Honorato de Araújo Neto da Universidade Federal de São Carlos.

4.2 OBTENÇÃO E TRATAMENTO DAS CÉLULAS

A linhagem HCT116 (carcinoma de cólon humano) utilizada neste trabalho foi obtida da *American Type Culture Collection* - ATCC (Rockville, Maryland, U.S.A.). As células foram cultivadas 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 µg/mL de gentamicina, e foram mantidas em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C e acompanhadas diariamente e subcultivadas a cada 3-4 dias para manter o crescimento exponencial. As células foram testadas para micoplasma usando um kit de detecção por coloração com Hoechst (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), e estavam isentas de qualquer contaminação.

Para os ensaios de morte celular, células da linhagem HCT116 (0,7 x 10⁵ células/mL) foram adicionadas à placas de 24 poços por um período inicial de 24 h para aderirem. Após este período, as células foram tratadas por 48 horas com CPR1 (2,5 µM) e CPR2 (5,0 µM) (concentrações estabelecidas previamente com base no valor de Cl₅₀) (COSTA *et al.*, 2017). Doxorrubicina (DOX, 1 µM, pureza ≥ 95%, hidrocloreto de doxorrubicina, Laboratory IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) e piplartina (PL, 10 µM, pureza > 98%, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) foram utilizados como controles positivo e o controle negativo recebeu apenas o veículo (0,1% da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) usado para solubilizar e diluir as substâncias testadas.

4.3 MARCAÇÃO PARA ANEXINA V/IP

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 apoptótico e na ligação do iodeto de propídio ao DNA das células no processo tardio de apoptose ou necrose. As células na concentração de $0,7 \times 10^5$ células/mL, foram incubadas por 24 e 48 horas com as substâncias teste. Após os tratamentos, as células foram centrifugadas e posteriormente lavadas com salina. O sobrenadante foi descartado e ao pellet celular foram adicionados 400 μ L de tampão de ligação e em seguida acrescentados 5 μ L de Anexina V-FITC e 5 μ L de iodeto de propídio. As células foram então incubadas em temperatura ambiente por 15 min, e posteriormente foi feita a aquisição dos dados em citômetro de fluxo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.3.1 *Ensaio de reversão com inibidores farmacológicos*

No ensaio de reversão 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 (cyclic pifithrin- α ; Cayman Chemical) para confirmar o possível mecanismo de citotoxicidade induzido pelo tratamento com os complexos. Para avaliação da reversão, as células foram pré-tratadas 2h antes com 5 μ M U-0126, 5 μ M SP 600125, 5 μ M PD 169316 ou 10 μ M pifitrina- α cíclica, seguida pela incubação com os controles negativos e positivos e com os complexos por 48h. As células foram então tripsinizadas e foram adotadas as metodologias de anexina V/IP conforme descrito acima.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ALVO – ELISA FOSFO-ESPECÍFICA

JNK2 (T183/Y185), p53 (S15) e histona H2AX (S139) fosforilados e MDM2 foram quantificados em lisados celulares usando kits ELISA tipo sanduíche (R & D Systems, Inc. Minneapolis, MN, EUA) e a análise foi realizada de acordo com as

instruções do fabricante. As células foram lisadas numa solução tampão contendo 100 mM de tris, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EGTA, 1 mM de EDTA, 1% de triton X-100 e 0,5% de desoxicolato de sódio mais coquetel inibidor de fosfatase, coquetel inibidor de protease e 1 mM PMSF imediatamente antes do uso (todos da Sigma-Aldrich Co.). A quantificação total de proteína foi realizada em cada amostra pelo ensaio de Pierce usando BSA como padrão. A absorbância a 450 nm foi medida utilizando o Leitor de Microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

4.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS COMPLEXOS NO MODELO 3D

As células HCT116 foram cultivadas em esferoides multicelulares 3D. Foram inseridos 100 μ L de uma solução de células ($0,5 \times 10^6$ células/mL) em uma placa de 96 poços com uma superfície repelente de células (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) e cultivadas em meio RPMI 1640 completo com 3% de matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) a 37°C com 5% de CO₂. Os esferoides com estruturas estáveis e diâmetros se formaram após três dias. Então, os complexos CPR1 e CPR2 (numa gama de oito concentrações diferentes variando de 0,19 a 25 μ g/mL) foram dissolvidos em 0,1% de uma solução contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água e a solução foi adicionada a cada poço e incubado por 72h. O controle negativo recebeu o veículo que foi usado para diluir os compostos testados. Doxorrubicina e piplartina foram utilizados como controles positivo com concentrações variando de 0,003 a 5 μ g/mL. No final do experimento, as alterações morfológicas foram examinadas por microscopia óptica (Olympus BX41, Tóquio, Japão) usando o software Image-Pro (Media Cybernetics, Inc. Silver Spring, EUA) e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de alamar blue.

O método colorimétrico do alamar blue é utilizado para avaliar a citotoxicidade dos complexos e determinar o valor de CI₅₀. O alamar blue (resazurina, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) possui cor azul e não fluorescente, quando as células estão viáveis, por reações enzimáticas, reduzem a resazurina a um composto chamado resofurina, o qual possui cor rosa e fluorescente. Quatro horas antes do término do período de incubação, 20 μ L da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue foi adicionado em cada poço. Os resultados foram mensurados

usando o espectrofotômetro SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) nas absorvâncias de 570 nm e 600 nm e o efeitos dos compostos foram quantificados como a porcentagem da absorvância controle.

4.6 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

4.6.1 *Animais*

Foram utilizados 41 camundongos CB17 SCID, fêmeas, entre 15-20 g, obtidos e mantidos nas instalações do IGM-FIOCRUZ. Os animais ficaram alojados em gaiolas com livre acesso a comida e água. Todos os animais foram mantidos sob um ciclo de luz-escuro de 12:12 h (luzes acesas às 06:00). Os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal de SBCAL (Soceidade Brasileira de ciência em animais de laboratório). O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) aprovou o protocolo experimental (número 006/2015).

4.6.2 *Modelo de xenotransplante*

Para este ensaio, as células tumorais HCT116 foram contadas e utilizadas em uma densidade de 2×10^7 células por 500 μ L e implantadas subcutaneamente na axila esquerda de camundongos CB17 SCID. Os complexos CPR1 e CPR2 foram dissolvidos inicialmente na solução e administrados aos camundongos por via intraperitoneal uma vez por dia durante 15 dias consecutivos. O tratamento foi iniciado um dia após a inoculação do tumor. Os camundongos foram divididos em quatro grupos: grupo 1 – 10 animais tratados com o veículo, solução 5% (70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água); Grupo 2 – 10 animais tratados com piplartina (60 μ mol/kg); grupo 3 – 10 animais tratados com o CPR1 (15 μ mol/kg); grupo 4 – 11 animais tratados com CPR2 (15 μ mol/kg). No dia 16, amostras de sangue periférico dos camundongos foram colhidas para análises hematológicas. Em seguida, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica e os tumores foram excisados e pesados. O efeito do tratamento foi expresso como a porcentagem de inibição do controle.

4.6.3 Avaliação toxicológica sistêmica

Os camundongos foram pesados no início e no fim do tratamento. Além disso, os animais foram observados para identificação de sinais de anomalias ao longo do estudo. Os parâmetros (motricidade, tremores, tônus musculares, deambulação, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia, irritabilidade e morte) foram observados durante os 15 dias de tratamento. Fígados, rins, corações e pulmões foram retirados, pesados e observados para detectar quaisquer sinais de lesões graves ou variações de cor e hemorragia. As análises hematológicas foram realizadas por microscopia de luz. Os parâmetros hematológicos, incluindo contagem total de eritrócitos e leucócitos, assim como uma contagem diferencial de leucócitos, tais como neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, também foram medidos.

Depois de ser fixado em solução de formol a 4%, tumores, fígados, rins, corações e pulmões foram examinados para tamanho ou alterações de cor e hemorragia. Tumores e órgãos foram então cortados em pedaços pequenos, incluídos em parafina e os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina. As análises histológicas foram realizadas sob microscopia de luz.

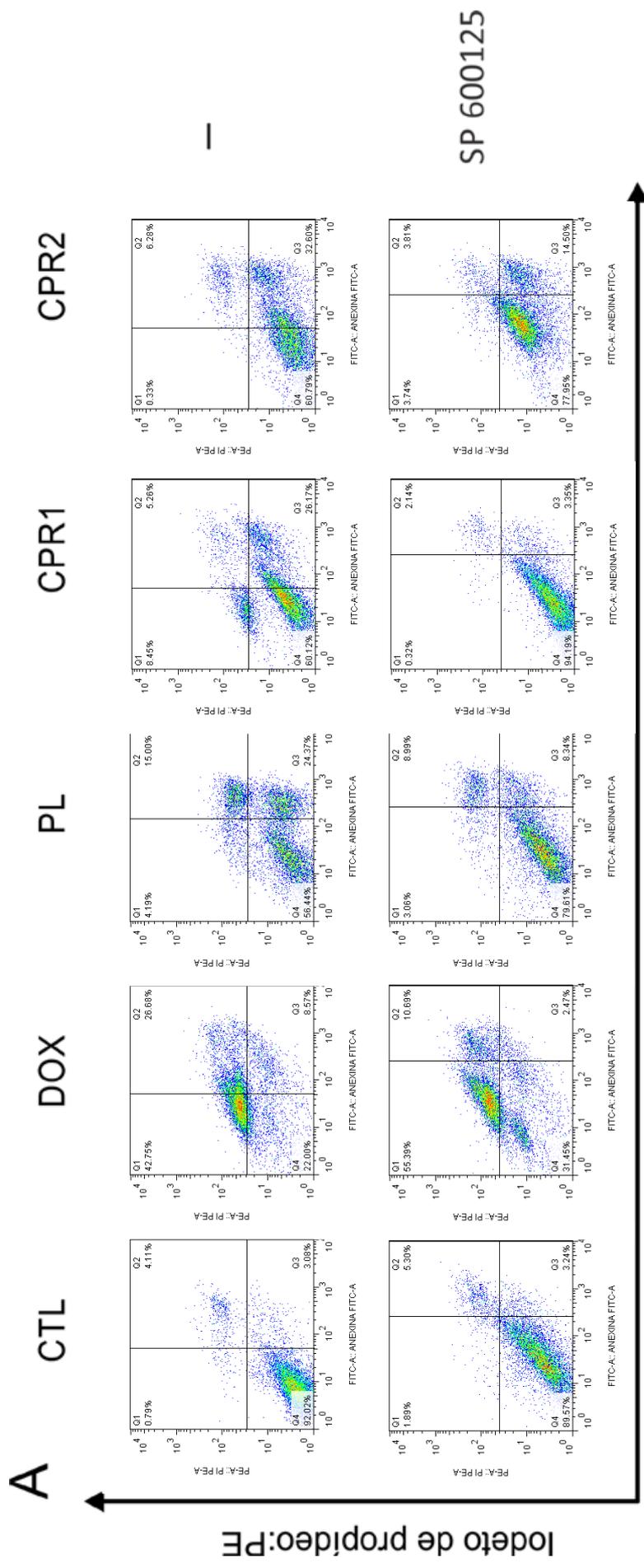
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

5 RESULTADOS

5.1 EFEITOS DOS INIBIDORES DE JNK, P38 E MEK.

JNK, p38 e MEK são membros da superfamília MAP quinase que induzem a expressão de genes imediatos e iniciais em resposta a estresse específico e sinais inflamatórios. Em relação ao papel da sinalização MAPK em células HCT116 tratadas com os complexos de rutênio com piplartina, o pré-tratamento com um inibidor de MEK (U-0126) impediu a apoptose induzida pelos complexos, indicando a ativação da apoptose mediada por ERK1/2 em células HCT116. Do mesmo modo o pré-tratamento com um inibidor de JNK1-3 (SP 600125) e um inibidor de p38 MAPK (PD 169316) foram capazes de prevenir a morte por apoptose induzida pelos complexos, indicando a ativação da apoptose mediada por JNK1-3 e p38, respectivamente (**figuras 7 A/B, 8 A/B e 9 A/B**).



Annexina V:FITC

Índice de propídeo:PE

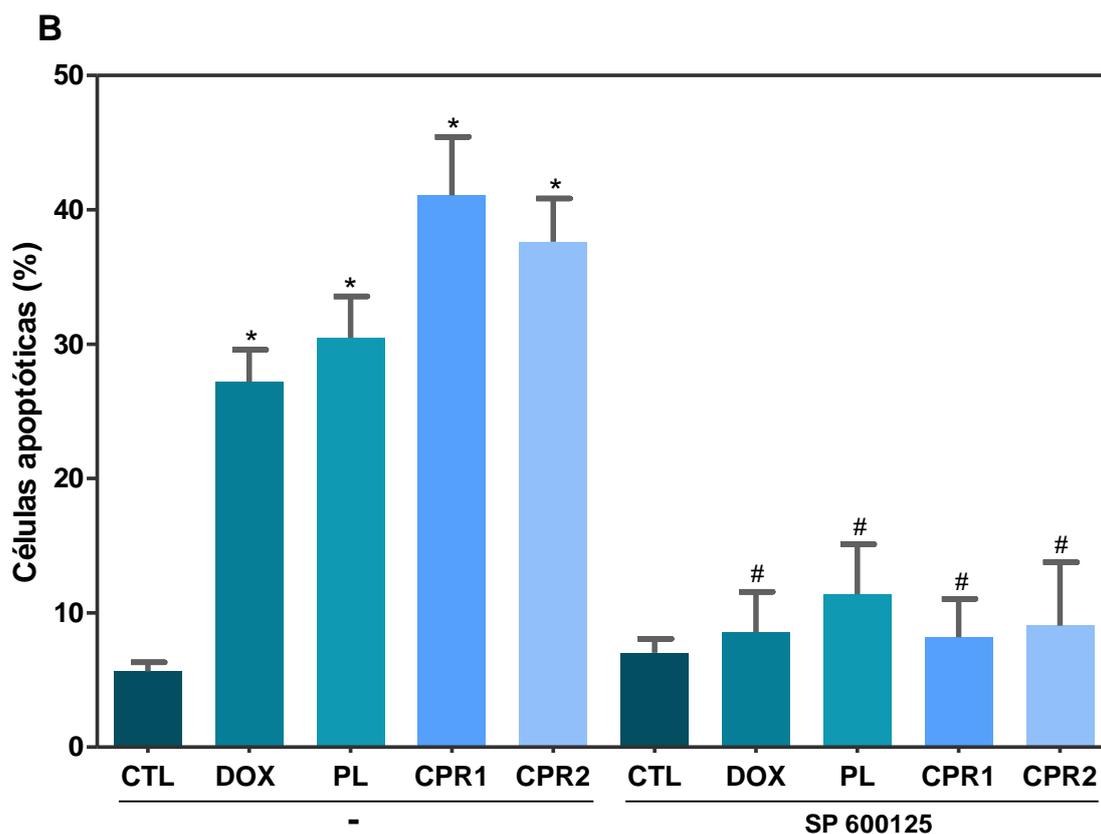
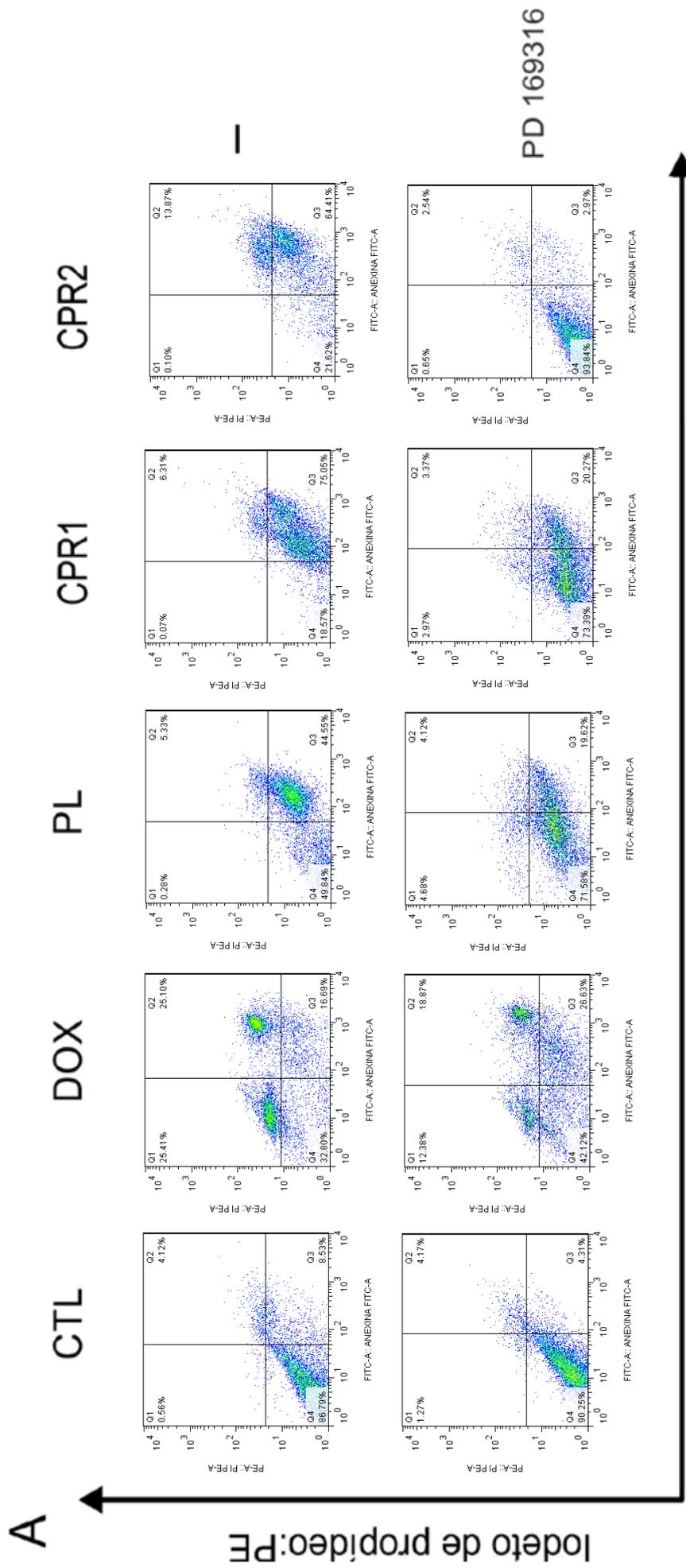


Figura 7. Efeito do inibidor de JNK (SP 600125) na apoptose induzida pelos complexos de rutênio com piplartina em células HCT116 determinadas por citometria de fluxo usando coloração anexina V-FITC/PI. **(A)** *Dot plots* representativos de citometria de fluxo mostrando a porcentagem de células em estágios de necrose, apoptose tardia, apoptose inicial e viáveis. **(B)** Quantificação de células apoptóticas (células em apoptose inicial + tardia). As células foram pré-tratadas durante 2 h com 5 μ M de SP 600125 e incubadas com os complexos de rutênio com piplartina nas concentrações estabelecidas (2,5 μ M para CPR1 e 5 μ M para CPR2) por 48 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) usado para solubilizar e diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (DOX, 1 μ M) e piplartina (PL, 10 μ M) foram usadas como controles positivo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Para a análise em citometria de fluxo, 10.000 eventos foram avaliados por experimento e os detritos celulares foram omitidos da análise. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls. # $P < 0,05$ em comparação com o respectivo tratamento sem inibidor por ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls.



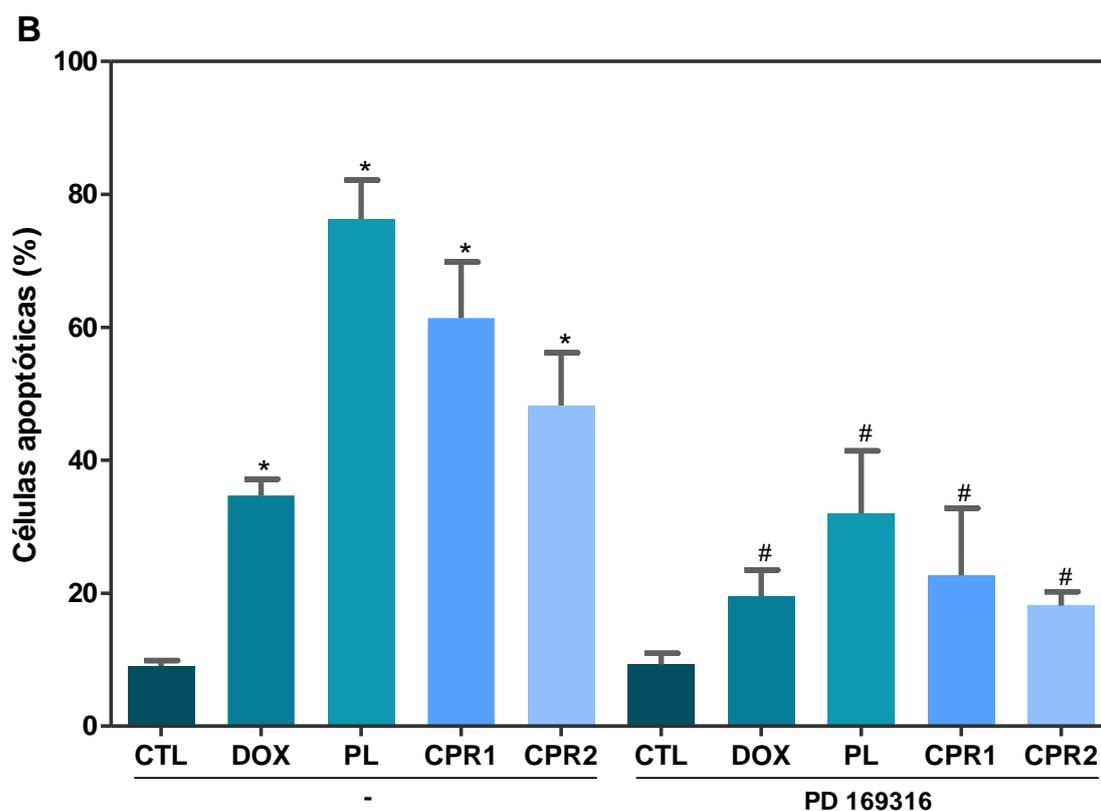
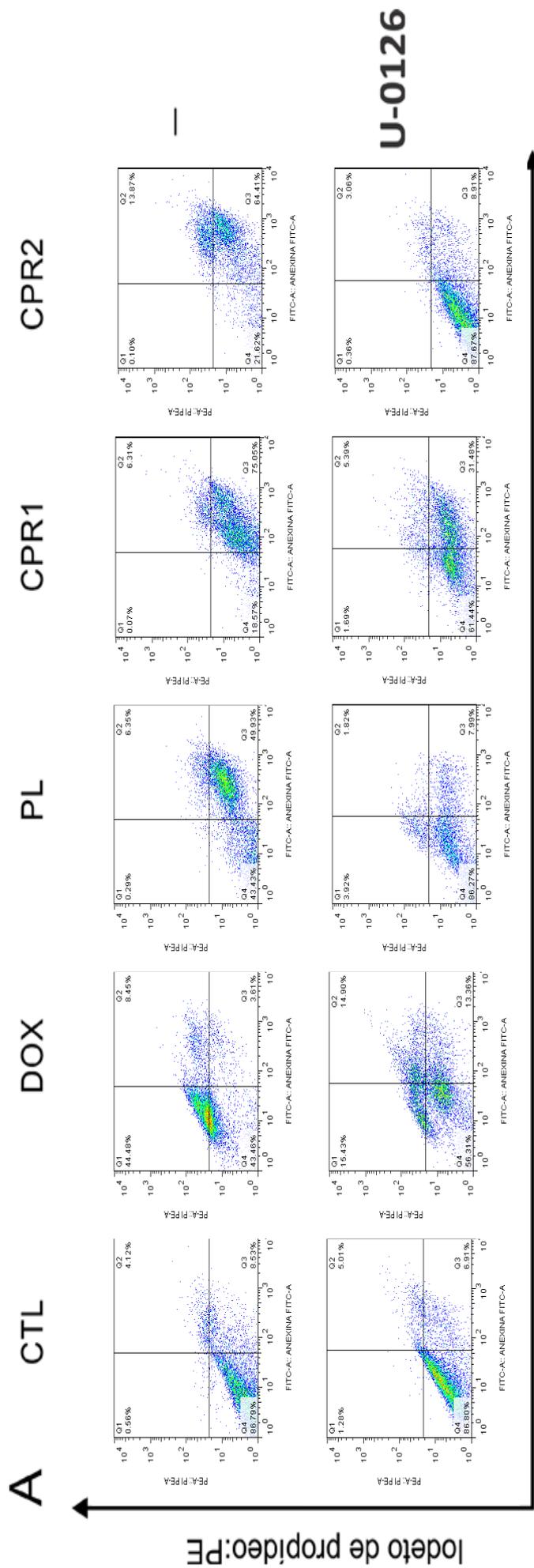


Figura 8. Efeito do inibidor de p38 MAPK (PD 169316) na apoptose induzida pelos complexos de rutênio com piplartina em células HCT116 determinadas por citometria de fluxo usando coloração anexina V-FITC/PI. **(A)** *Dot plots* representativos de citometria de fluxo mostrando a porcentagem de células em estágios de necrose, apoptose tardia, apoptose inicial e viáveis. **(B)** Quantificação de células apoptóticas (células em apoptose inicial + tardia). As células foram pré-tratadas durante 2 h com 5 μ M de PD 169316 e incubadas com os complexos de rutênio com piplartina nas concentrações estabelecidas (2,5 μ M para CPR1 e 5 μ M para CPR2) por 48 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) usado para solubilizar e diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (DOX, 1 μ M) e piplartina (PL, 10 μ M) foram usadas como controles positivo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Para a análise em citometria de fluxo, 10.000 eventos foram avaliados por experimento e os detritos celulares foram omitidos da análise. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls. # $P < 0,05$ em comparação com o respectivo tratamento sem inibidor por ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls.



Anexina V:FITC

Íodeto de propideo:PE

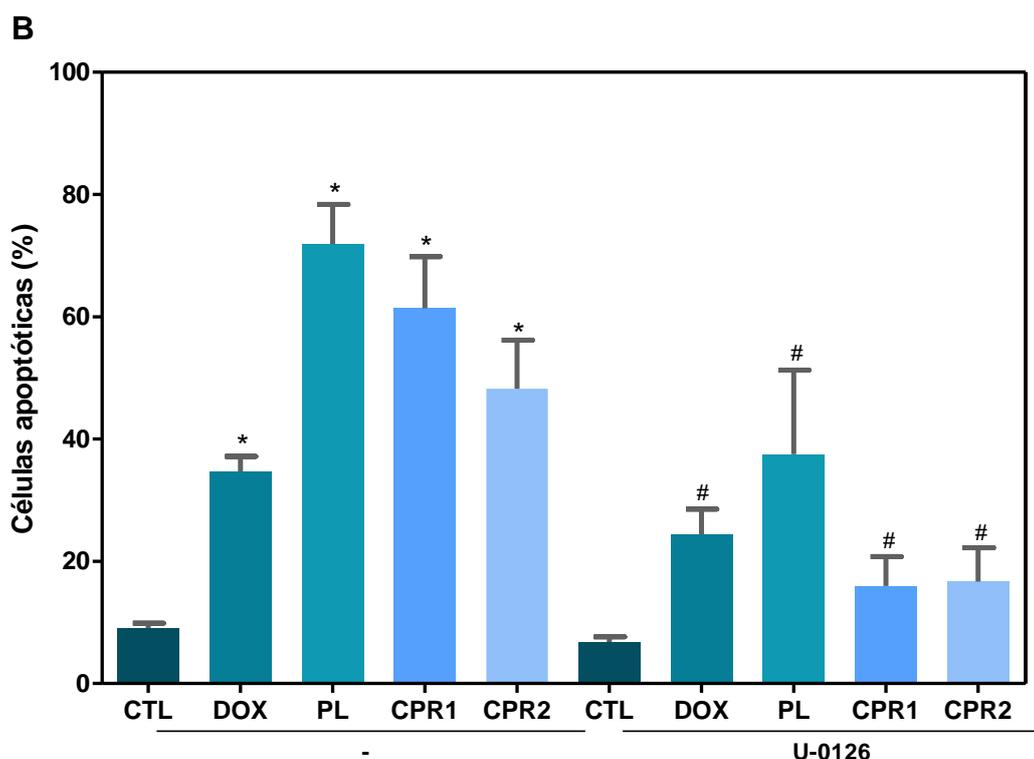
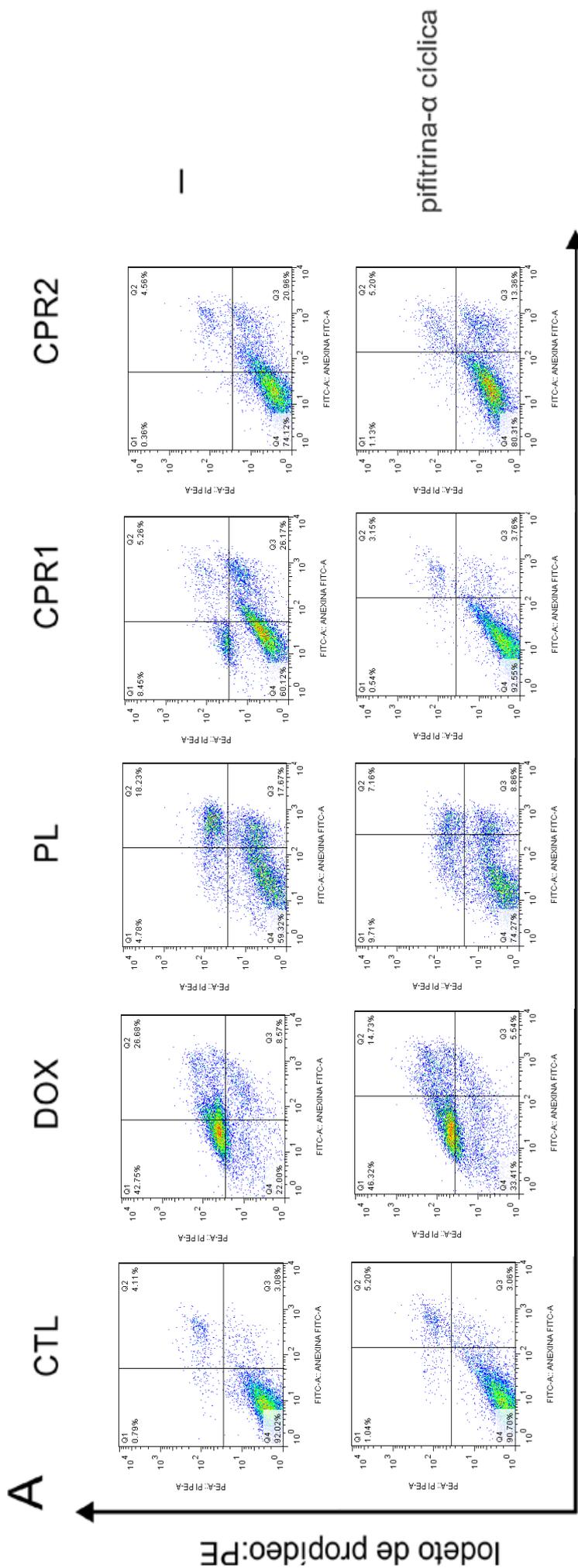


Figura 9. Efeito do inibidor MEK (U-0126) na apoptose induzida pelos complexos de rutênio com piplartina em células HCT116 determinadas por citometria de fluxo usando coloração anexina V-FITC/PI. **(A)** *Dot plots* representativos de citometria de fluxo mostrando a porcentagem de células em estágios de necrose, apoptose tardia, apoptose inicial e viáveis. **(B)** Quantificação de células apoptóticas (células em apoptose inicial + tardia). As células foram pré-tratadas durante 2 h com 5 μ M de U-0126 e incubadas com os complexos de rutênio com piplartina nas concentrações estabelecidas (2,5 μ M para CPR1 e 5 μ M para CPR2) por 48 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) usado para solubilizar e diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina (DOX, 1 μ M) e piplartina (PL, 10 μ M) foram usadas como controles positivo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Para a análise em citometria de fluxo, 10.000 eventos foram avaliados por experimento e os detritos celulares foram omitidos da análise. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls. # $P < 0,05$ em comparação com o respectivo tratamento sem inibidor por ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls.

5.2 EFEITO DO INIBIDOR DE P53

A ativação de ERK1/2 está associada com a ativação da via p53, a qual também é ativada durante o dano do DNA celular. A fim de confirmar essa associação, foi realizado o pré-tratamento com o inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica), que impediu a apoptose induzida pelos complexos, indicando a indução de morte celular por apoptose em uma via dependente de p53 (**figura 10 A/B**).



Anexina V:FITC

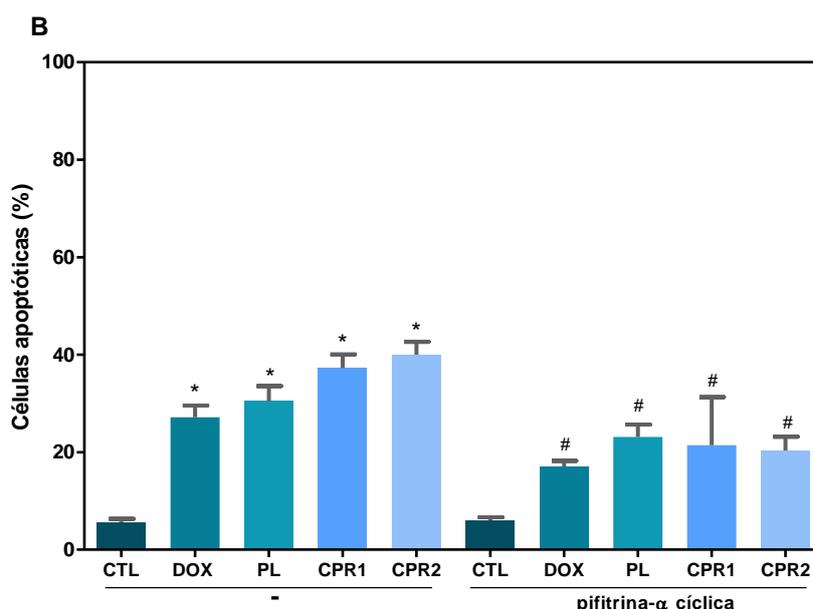


Figura 10. Efeito do inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica) na apoptose induzida pelos complexos em células HCT116 determinadas por citometria de fluxo usando coloração anexina V-FITC/PI. **(A)** *Dot plots* representativos de citometria de fluxo mostrando a porcentagem de células em estágios de necrose, apoptose tardia, apoptose inicial e viáveis. **(B)** Quantificação de células apoptóticas (células em apoptose inicial + tardia). As células foram pré-tratadas durante 2 h com 10 μ M de pifitrina- α cíclica e incubadas com os complexos de rutênio com piplartina nas concentrações estabelecidas (2,5 μ M para CPR1 e 5 μ M para CPR2) por 48 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) usado para solubilizar e diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (DOX, 1 μ M) e piplartina (PL, 10 μ M) foram usadas como controles positivo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Para a análise em citometria de fluxo, 10.000 eventos foram avaliados por experimento e os detritos celulares foram omitidos da análise. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls. # $P < 0,05$ em comparação com o respectivo tratamento sem inibidor por ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ALVO

Conforme observado acima, o pré-tratamento com os inibidores MEK (U-0126), JNK1-3 (SP 600125), p38 MAPK (PD 169316) e p53 (pifitrina- α cíclica) foram capazes de prevenir a morte por apoptose induzida pelos complexos CPR1 e CPR2 indicando que os mesmos ativam a apoptose mediada por MAPK (JNK, p38 e ERK) e p53. Portanto, decidimos confirmar a participação dessas vias na apoptose induzida pelos complexos em células HCT116 através das avaliações das alterações no estado de fosforilação das proteínas fosfo-JNK2 (T183/Y185), fosfo-p38 α (T180/Y182), fosfo-ERK1 (T202/Y204), fosfo-p53 (S15), MDM2 e fosfo-histona H2AX (S139) pela técnica de ELISA, após incubação aguda (15 e 30 min) e prolongada (24 h). O tratamento com CPR1 e CPR2 induziu fosforilação de JNK2 (**figura 11**), p38 α

(figura 12) e ERK1 (figura 13) após 15 e 30 minutos de incubação, mas não induziu após o período de 24h. Já em relação a p53 (figura 14A) e H2AX (figura 15) o tratamento com CPR1 e CPR2 induziu fosforilação após 24 horas de incubação. Não foi observado alteração na quantificação do regulador negativo do p53, MDM2 (figura 14B).

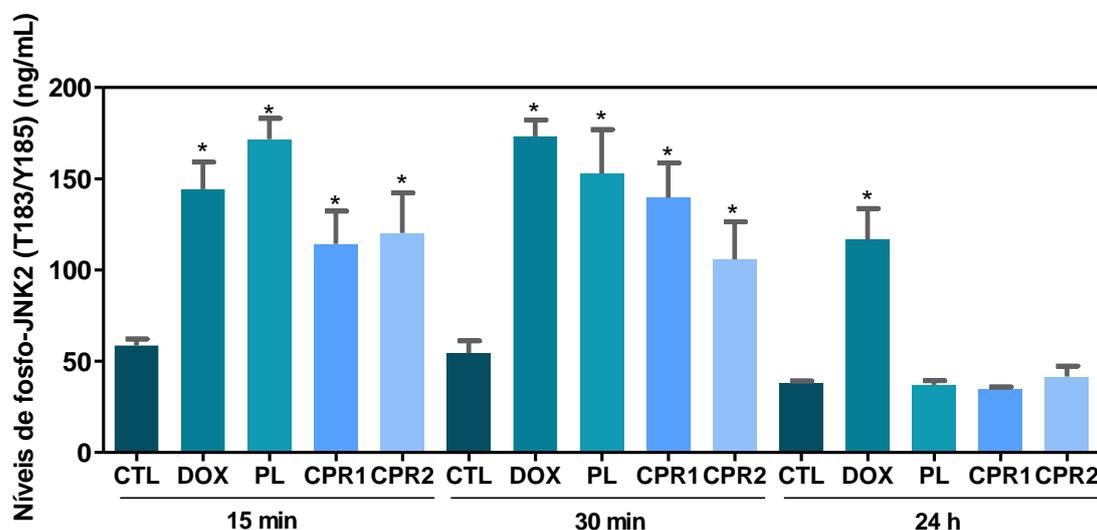


Figura 11. Quantificação dos níveis de fosfo-JNK2 (T183/Y185). As células foram tratadas durante 15 min, 30 min e 24 h com os complexos de rutênio com piplartina nas concentrações estabelecidas (2,5 μM para CPR1 e 5 μM para CPR2). O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) usado para solubilizar e diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (DOX, 1 μM) e piplartina (PL, 10 μM) foram usadas como controles positivo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

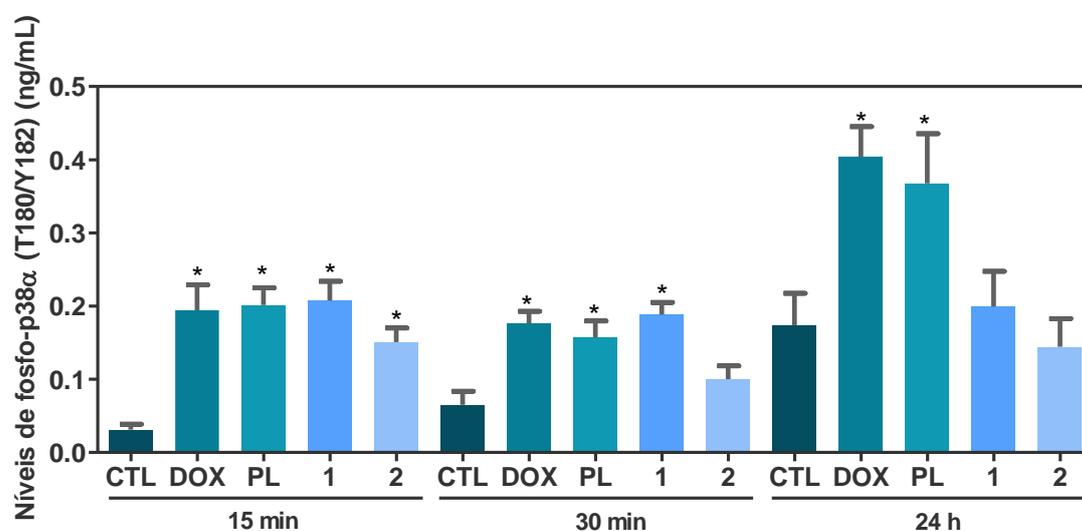


Figura 12. Quantificação dos níveis de fosfo-p38 α (T180/Y182). As células foram tratadas durante 15 min, 30 min e 24 h com os complexos de rutênio com piplartina nas concentrações estabelecidas (2,5 μM para CPR1 e 5 μM para CPR2). O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) usado para solubilizar e diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (DOX, 1 μM) e piplartina (PL, 10 μM) foram usadas como

controles positivo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

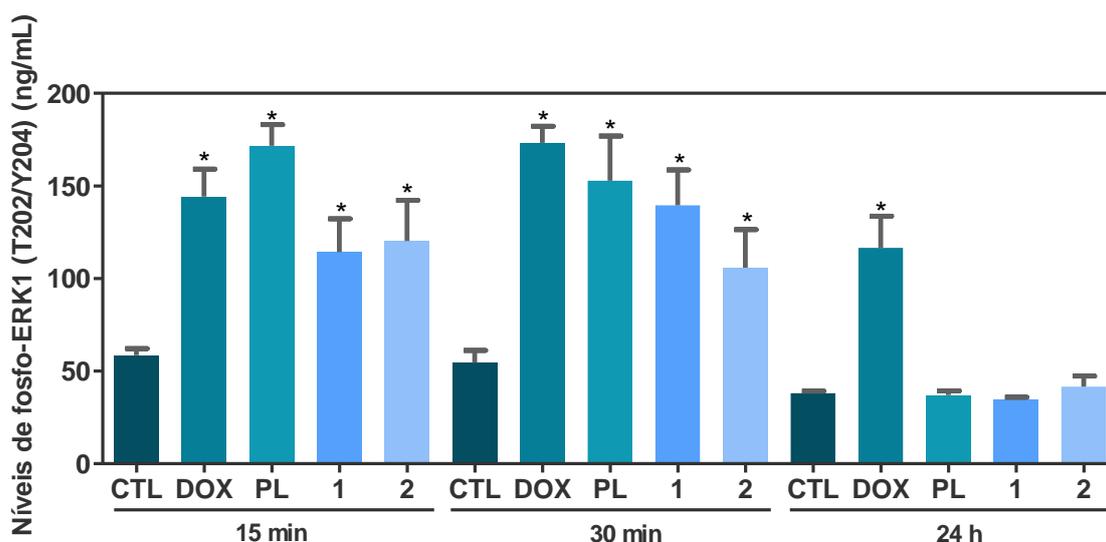


Figura 13. Quantificação dos níveis de fosfo-ERK1 (T202/Y204). As células foram tratadas durante 15 min, 30 min e 24 h com os complexos de rutênio com piplartina nas concentrações estabelecidas (2,5 μ M para CPR1 e 5 μ M para CPR2). O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) usado para solubilizar e diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (DOX, 1 μ M) e piplartina (PL, 10 μ M) foram usadas como controles positivo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

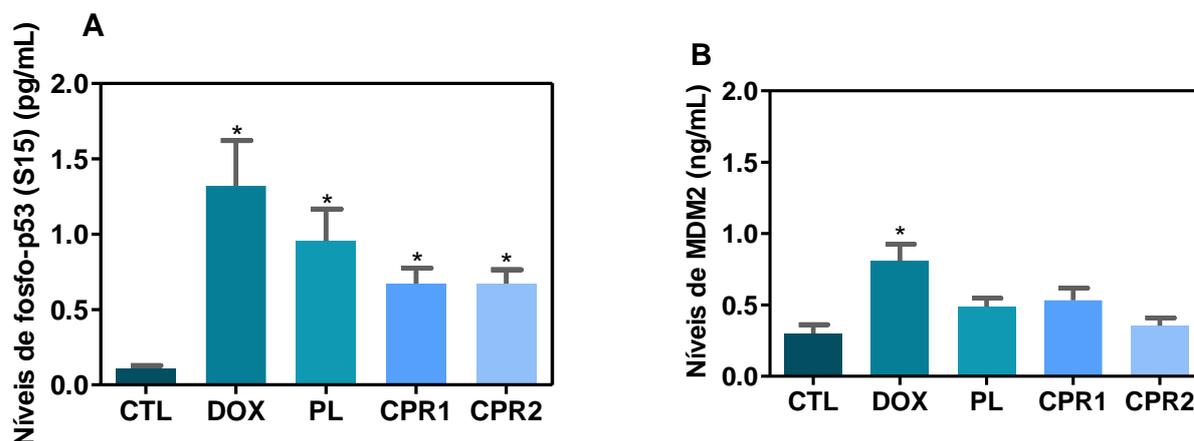


Figura 14. Quantificação dos níveis de fosfo-p53 (S15) e MDM2. **(A)** Quantificação dos níveis de fosfo-p53 (S15). **(B)** Quantificação dos níveis MDM2. As células foram tratadas durante 24 h com os complexos de rutênio com piplartina nas concentrações estabelecidas (2,5 μ M para CPR1 e 5 μ M para CPR2). O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) usado para solubilizar e diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (DOX, 1 μ M) e piplartina (PL, 10 μ M) foram usadas como controles positivo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

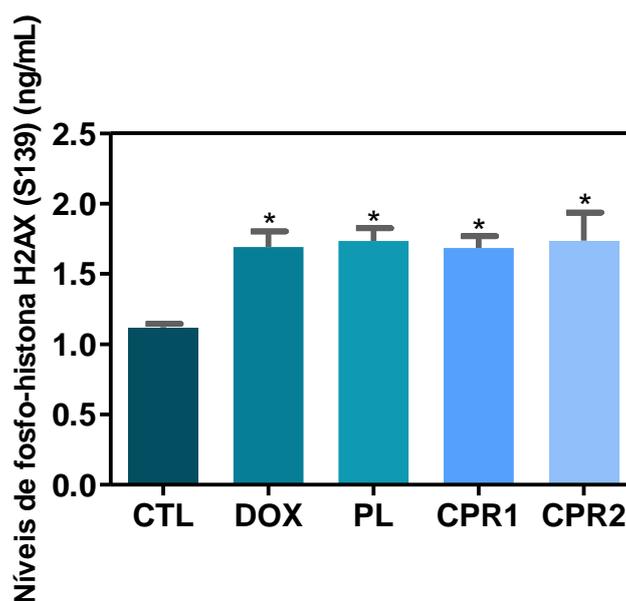


Figura 15. Quantificação dos níveis de fosfo-histona H2AX (S139). As células foram tratadas durante 24 h com os complexos de rutênio com piplartina nas concentrações estabelecidas (2,5 μM para CPR1 e 5 μM para CPR2). O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) usado para solubilizar e diluir as substâncias testadas. Doxorubicina (DOX, 1 μM) e piplartina (PL, 10 μM) foram usadas como controles positivo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

5.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA DO COMPLEXO NO MODELO 3D

O efeito citotóxico dos complexos de rutênio com piplartina em um modelo 3D foi avaliado em esferoides multicelulares formados a partir de células HCT116. Os esferoides tratados com os complexos apresentaram alterações morfológicas que indicam permeabilidade do fármaco e citotoxicidade na cultura 3D (**figura 16**). Após 72h de incubação, o valor Cl_{50} de CPR1 e CPR2 foi de 7,3 e 8,3 μM , respectivamente (**tabela 1**), enquanto a piplartina apresentou o valor Cl_{50} de 22,1 μM .

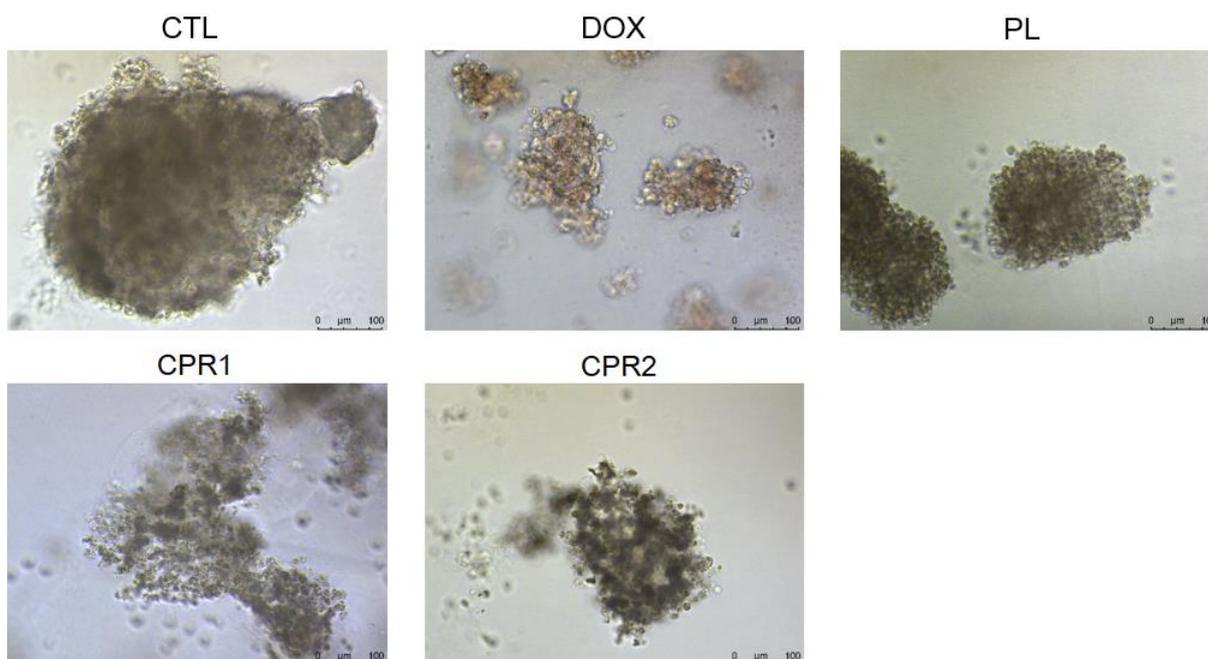


Figura 16. Efeito dos complexos no modelo 3D de esferoides multicelulares de câncer formados a partir de células HCT116. Células examinadas por microscopia óptica (bar = 100 µm). As células foram incubadas com os complexos de rutênio com piplartina numa gama de oito concentrações diferentes variando de 0,19 a 25 µg/mL. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) usado para solubilizar e diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina (DOX) e piplartina (PL) foram usadas como controles positivo.

Tabela 1. Efeito dos complexos no modelo 3D de esferoides multicelulares de câncer formados a partir de células HCT116.

Esferoides	CI ₅₀ em µM			
	DOX	PL	CPR1	CPR2
HCT116	6,3	22,1	7,3	8,3
	1,2 – 11,1	14,1 – 28,5	4,1 – 13,1	6,0 – 11,6

Valores de CI₅₀ e o respectivo intervalo de confiança de 95% de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do alamar blue após 72 h de exposição obtidos por regressão não-linear. As células foram incubadas com os complexos de rutênio com piplartina numa gama de oito concentrações diferentes variando de 0,19 a 25 µg/mL. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) usado para solubilizar e diluir as substâncias testadas. Doxorrubicina (DOX) e piplartina (PL) foram usadas como controles positivo.

5.5 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

A atividade antitumoral *in vivo* dos complexos foi investigada em camundongos CB17 SCID inoculados com células HCT116. Foram observadas alterações estatisticamente significantes no peso do tumor (em gramas) dos animais tratados com os complexos que foram de $1,32 \pm 0,14$, $0,94 \pm 0,05$, $0,93 \pm 0,06$ e $0,97 \pm 0,05$ para o controle negativo, piplartina, CPR1 e CPR2, respectivamente (**figura 17 A**). As porcentagens de inibição tumoral em resposta a piplartina e aos complexos 1 e 2 foram de 32,03%, 35,06% e 29,71%, respectivamente, e o que faz com que os complexos sejam mais potentes é o fato de que a dose em $\mu\text{mol}/\text{kg}$ dos mesmos foi 4 vezes menor em relação a piplartina (**figura 17 B**). Não foram observadas alterações significantes no peso corpóreo nem nos órgãos (fígado, rim, pulmão e coração) dos grupos tratados com os complexos, o que é um resultado positivo ($P > 0,05$, **tabela 2**). Além disso, a contagem total de eritrócitos e leucócitos, assim como uma contagem diferencial de leucócitos, tais como neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, foram realizadas como parâmetro hematológico. Não ocorreram alterações estatisticamente significantes nos parâmetros hematológicos do sangue periféricos nos grupos tratados com os complexos ($P > 0,05$, **tabela 3**).

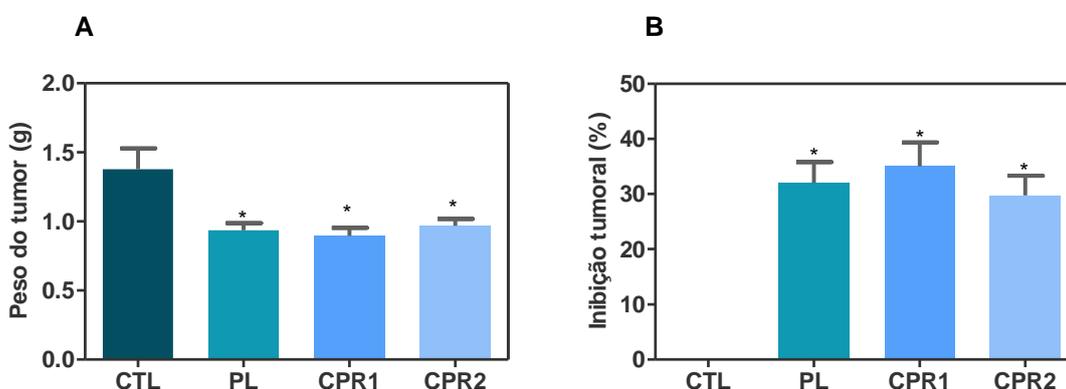


Figura 17. Efeito dos complexos de rutênio contendo a piplartina como ligante sobre a massa tumoral em camundongos CB17 SCID inoculados com células HCT116. Quantificação do peso do tumor e inibição do tumor. **(A)** peso do tumor (g) e **(B)** inibição do tumor (%). Os animais foram tratados com os complexos nas concentrações estabelecidas ($15 \mu\text{mol}/\text{kg}$ para os complexos CPR1 e CPR2) por 15 dias consecutivos. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) usado para solubilizar e diluir as substâncias testadas. Piplartina (PL, $60 \mu\text{mol}/\text{kg}$) foi usado como controle positivo. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de 10-11 animais. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

Tabela 2. Efeito dos complexos de rutênio contendo a piplartina como ligante sobre a massa corpórea e a massa úmida dos órgãos de camundongos inoculados com células HCT116.

	CTL	Piplartina	CPR1	CPR2
Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	-	60	15	15
Fígado (g/100g de massa corpórea)	4,95 \pm 0,23	5,02 \pm 0,25	5,46 \pm 0,28	5,45 \pm 0,17
Rins (g/100g de massa corpórea)	1,53 \pm 0,05	1,60 \pm 0,06	1,62 \pm 0,07	1,64 \pm 0,05
Pulmão (g/100g de massa corpórea)	0,79 \pm 0,04	0,81 \pm 0,04	0,82 \pm 0,05	0,87 \pm 0,10
Coração (g/100g de massa corpórea)	0,65 \pm 0,07	0,59 \pm 0,02	0,63 \pm 0,03	0,63 \pm 0,03

Os valores correspondem a média \pm E.P.M. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar e diluir a substância teste. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

Tabela 3. Efeito dos complexos de rutênio contendo a piplartina como ligante sobre os parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos inoculados com células HCT116.

Parâmetros	CTL	Piplartina	CPR1	CPR2
Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	-	60	15	15
Eritrócitos (10^6 cél./ μL)	8,88 \pm 1,35	6,48 \pm 0,53	8,10 \pm 0,42	9,26 \pm 0,79
Leucócitos totais (10^3 cél./ μL)	2,05 \pm 0,38	2,36 \pm 0,27	3,08 \pm 0,90	3,36 \pm 0,30
Contagem diferencial de leucócitos				
Neutrófilos (%)	75,60	66,80	72,60	60,75
Basófilos (%)	1,00	1,00	1,00	1,00
Monócitos (%)	0,0	0,0	0,0	0,0
Eosinófilos (%)	1,00	1,00	1,00	1,50
Linfócitos (%)	22,40	31,20	25,00	36,75

Os valores correspondem a média \pm E.P.M de seis animais por grupo ($n=6$). O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para solubilizar e diluir a substância teste.

As análises histopatológicas dos pulmões revelaram, de forma geral, uma arquitetura parcialmente preservada, observando um espessamento dos septos interalveolares com diminuição do espaço aéreo, que variou de discreto a moderado, em todos os grupos experimentais. Também foi observado inflamação predominantemente mononuclear, edema, congestão e hemorragia, variando de leve a grave. É importante notar que essas alterações histopatológicas foram mais pronunciadas nos grupos do controle negativo, piplartina e CPR2 do que no grupo CPR1. Além disso, nódulos tumorais e êmbolos nos pulmões foram observados apenas em um animal do grupo controle negativo e CPR2, respectivamente. Nos fígados, a arquitetura acinar e a veia centrolobular também foram preservadas em todos os grupos. Áreas focais de inflamação e necrose de coagulação foram observadas no controle negativo, CPR1 e CPR2. Outros achados, como congestão e degeneração hidrópica foram encontrados em todos os grupos, variando de leve a

moderado. Nos rins, a arquitetura dos tecidos foi 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 moderada. A análise histopatológica dos corações dos animais não mostrou alterações em nenhum grupo. Em relação aos tumores, todos os grupos exibiram um adenocarcinoma predominantemente pouco diferenciado com padrão de crescimento sólido, com extensas áreas de necrose tumoral para os grupos tratados com piplartina e com CPR1 e CPR2 (figura 18).

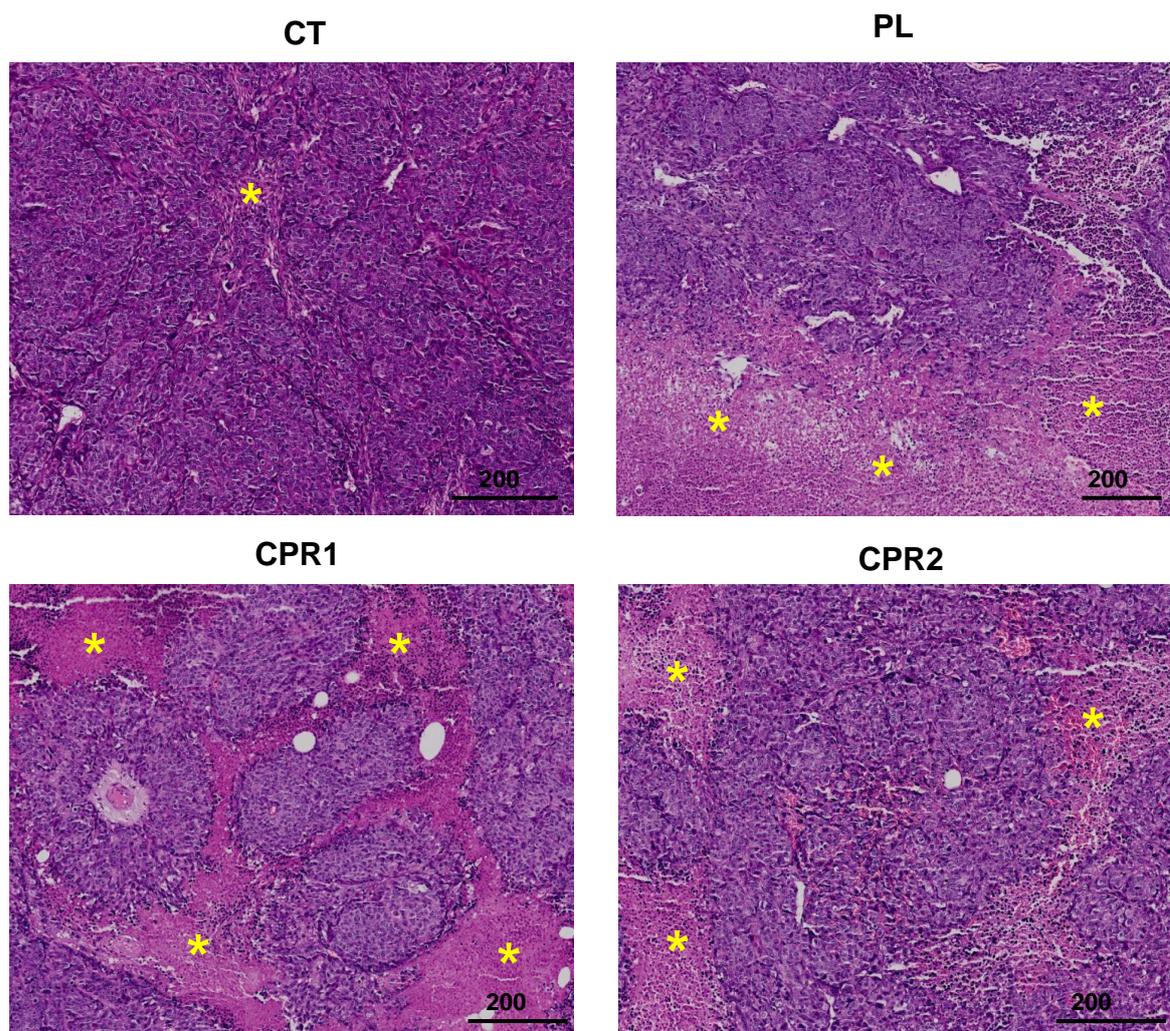


Figura 18. Análise histológica representativa dos tumores de camundongos CB17 SCID inoculados com células HCT116 corados com hematoxilina e eosina e analisados por microscopia óptica. Os asteriscos representam áreas com necrose tumoral. Os tratamentos foram iniciados um dia após a injeção das células cancerígenas. Os animais foram tratados intraperitonealmente uma vez ao dia por 15 dias consecutivos com os complexos nas concentrações estabelecidas (15 $\mu\text{mol/kg}$ para os complexos CPR1 e CPR2). O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% da mistura contendo 70% de sorbitol, 25% de tween 80 e 5% de água) usado para solubilizar e diluir as substâncias testadas. Piplartina (PL, 60 $\mu\text{mol/kg}$) foi usado como controle positivo.

6 DISCUSSÃO

Como mencionado anteriormente, os complexos de rutênio são amplamente referenciados por seu potencial citotóxico em diferentes linhagens de células cancerosas, além de serem conhecidos por causarem efeitos colaterais menos graves. O rutênio pode formar complexos octaédricos que dão oportunidade para explorar mais ligantes, podendo atuar na terapia dirigida e abordagem multinuclear (complexos de cluster de rutênio, intercaladores de DNA de rutênio e compostos de metais misturados com rutênio e platina) (PAGE, 2012).

A piplartina tem sido mais extensamente estudada como um potencial agente anticancerígeno, exibindo citotoxicidade contra um amplo espectro de linhagens celulares de câncer humano, bem como atividade antitumoral demonstrada em roedores. Verificou-se também que a piplartina é um agente antiangiogênico, pró-apoptótico, anti-invasivo e atua em sinergia com agentes quimioterapêuticos modernos. Devido ao seu potencial clínico, vários estudos foram realizados para obter análogos de piplartina, os quais exibiram atividade mais potente ou parâmetros mais apropriados (revisado por PISKA *et al.*, 2018).

O uso de complexos metálicos no tratamento do câncer é uma concepção antiga que recentemente está sob investigação intensiva. Muitas moléculas foram consideradas como íons quelantes de diferentes íons metálicos, e alguns complexos são atualmente estudados em ensaios clínicos (PISKA *et al.*, 2018). Nosso grupo de pesquisa sintetizou dois novos complexos de rutênio contendo a piplartina como ligante, CPR1 e CPR2, os quais aumentaram a expressão de genes das vias MAPK e p53 (COSTA *et al.*, 2017). Nesse estudo, esses complexos foram avaliados quanto a sua via de sinalização na apoptose em células de carcinoma de colón humano HCT116, bem como sua eficácia *in vivo*. Os complexos de rutênio com piplartina foram capazes de induzir morte celular por apoptose em células HCT116 por vias mediadas pela sinalização MAPK e p53, e ainda foi capaz de reduzir o crescimento tumoral em modelo de xenotransplante de células HCT116, sendo mais potentes que a piplartina livre.

As cascatas das proteínas quinases ativada por mitógeno (MAPK) desempenham um papel fundamental na transdução de sinais extracelulares para respostas celulares. Em células de mamífero, três famílias MAPK foram claramente

caracterizadas: MAPK clássica (também conhecida como ERK), quinase c-Jun N-terminal /proteína quinase ativada por estresse (JNK/SAPK) e quinase p38 (WIDMANN *et al.*, 1999). Navarro e colaboradores (2006) concluíram que a DOX desencadeia a ativação das quinases ERK, JNK e p38 em culturas primárias de hepatócitos de ratos, independentemente do dano oxidativo.

A família JNK é predominantemente ativada por citocinas, radiação UV, privação de fatores de crescimento, agentes danificadores de DNA e certos receptores acoplados à proteína G (WESTON e DAVIS, 2002). Nesse trabalho, o pré-tratamento com um inibidor de JNK1-3 (SP 600125) foi capaz de reverter a morte celular por apoptose induzida pelos complexos CPR1 e CPR2 em células HCT116, o que foi confirmado pela quantificação dos níveis de fosforilação de JNK2. Um estudo mostrou que JNK foi fosforilada na presença de piplartina na linhagem celular de melanoma A375, sugerindo que o efeito da produção de ERO induzida por piplartina estava associado à via JNK (SONG *et al.*, 2018). Além disso, a piplartina aumentou a fosforilação de JNK em células mononucleares da medula óssea, BMMNCs, provenientes de pacientes com leucemias mielóides, enquanto o pré-tratamento com o inibidor específico de JNK SP600125 inverteu parcialmente a produção de ERO induzida por piplartina (XIONG *et al.*, 2015). Liu e colaboradores (2013) relataram que a piplartina matou seletivamente células de glioblastoma multiforme (GBM) através da acumulação de espécies reativas de oxigênio (ERO) para ativar JNK e p38. Outro estudo demonstrou que um composto de rutênio (II) denominado "RAPTA-C", em camundongos com carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC), foi capaz de aumentar JNK significativamente durante a apoptose (CHATTERJEE *et al.*, 2008).

Foram identificadas quatro isoformas de p38 MAPK: p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ , sendo as isoformas p38 α e p38 β as mais estudadas. As famílias de p38 MAPK de mamífero são ativadas por tensão celular incluindo irradiação UV, choque térmico, estresse osmótico elevado, lipopolissacarídeo, inibidores de síntese proteica, citocinas pró-inflamatórias (tais como IL-1 e TNF- α) e certos mitógenos. Sua ativação modula uma ampla variedade de funções celulares, tais como proteínas quinases, fosfatases, reguladores de ciclos celulares e fatores de transcrição, incluindo p53 (ICHIJO, 1999; STRAMUCCI *et al.*, 2018). Com o intuito de avaliar se a via p38 está envolvida na apoptose causada por CPR1 e CPR2, fizemos o pré-

tratamento com um inibidor de p38 MAPK (PD 169316) o qual foi capaz de prevenir a morte por apoptose induzida pelos complexos em células HCT116, o que foi confirmado pela quantificação dos níveis de fosforilação de p38 α (T180/Y182), indicando a ativação da apoptose mediada por p38. Além de JNK, Xiong e colaboradores demonstraram que a piplartina também aumentou a fosforilação de p38 em células mononucleares da medula óssea, BMMNCs, provenientes de pacientes com leucemias mielóides, enquanto o pré-tratamento com o inibidor específico de p38 SB203580 inverteu parcialmente a produção de ERO induzida por PL (XIONG *et al.*, 2015). Wang e colaboradores também relataram que a piplartina induz a apoptose e a autofagia em células leucêmicas por meio do direcionamento das vias de sinalização PI3K/Akt/mTOR e p38 (WANG *et al.*, 2018). Estudos utilizando a técnica de western blotting sugeriram que as vias de sinalização de MAPK estavam envolvidas na apoptose induzida pelo complexo de metilimidazol de rutênio (II) [Ru(MeIm)₄(4mopip)]²⁺ em células de carcinoma de pulmão humano A549, onde ocorreu a fosforilação de JNK (p-JNK) e p38 (p-p38) (CHEN *et al.*, 2017).

ERK tem sido a melhor MAPK caracterizada e a via Raf-MEK-ERK representa uma das melhores vias de sinalização MAPK (ZHANG e LIU, 2002). A via ERK desempenha um papel importante na regulação do crescimento e diferenciação celular, sendo altamente induzida em resposta a fatores de crescimento, citocinas e ésteres de forbol (JOHNSON e VAILLANCOURT, 1994; ROBINSON e COBB, 1997; HE *et al.*, 1999). No que se refere ao papel das vias de sinalização MAPK na morte celular causada por CPR1 e CPR2 em células HCT116, o pré-tratamento com um inibidor de MKK (U-0126), que inibe a ativação de ERK1/2, impediu a apoptose induzida pelos complexos, e foi observada uma fosforilação aumentada de ERK1 (T202/Y204), indicando que os complexos são capazes de ativar uma via apoptótica em células HCT116 mediada por ERK1/2. O complexo de rutênio com xantoxilina, CRX, induziu a fosforilação de ERK1/2, e o pré-tratamento com U-0126, um inibidor de MEK, preveniu a apoptose induzida por CRX em células HepG2 (DE CARVALHO *et al.*, 2018). O tratamento com cisplatina resultou em ativação dose e tempo-dependentes de ERK em células de carcinoma cervical humano Hela. A utilização de inibidores químicos da via de sinalização MEK/ERK, PD98059 e U0126, preveniram a apoptose (WANG *et al.*, 2000). Randhawa e colaboradores

investigaram os mecanismos de sinalização intracelular através dos quais a piplartina leva à morte celular de câncer de cólon. Descobriram que a exposição aguda (0-60 min) e prolongada (24h) das células HT-29 a piplartina resultou na fosforilação de ERK. Os resultados sugerem que a piplartina funciona, pelo menos em parte, através da via MEK/ERK para resultar na morte de células de câncer de cólon (RANDHAWA *et al.*, 2013). Oliveira e colaboradores também demonstraram que o pré-tratamento com um inibidor de p38 MAPK (PD 169316) e um inibidor de MEK (U-0126) preveniu a apoptose induzida pelo complexo de platina contendo piplartina em células de leucemia promielocítica aguda humana HL-60 (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Além disso, outro estudo mostrou que a piplartina provocou a morte das linhas celulares de colangiocarcinoma CCA através da ativação do JNK-ERK observado por análise de western blotting (p-ERK) (THONGSOM *et al.*, 2017).

A ativação de ERK1/2 está associada com a ativação da via p53, a qual também é ativada durante o dano do DNA celular. Embora existam ligações 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). O gene TP53 codifica a proteína supressora de tumor p53. A morte celular induzida pela piplartina tem sido observada tanto por via dependente como independente de p53 (BEZERRA *et al.*, 2013). Um trabalho anterior realizado por nosso grupo demonstrou que os complexos de rutênio contendo piplartina como ligante, CPR1 e CPR2, foram capazes de aumentar a expressão do gene TP53, sugerindo também a ativação dessa via de sinalização (COSTA *et al.*, 2017). Os complexos de hidrazinil-tiazolo areno-rutênio também podem induzir a morte celular pela via p53 em células de câncer do ovário resistentes e/ou sensíveis à cisplatina (GROZAV *et al.*, 2015). Com o objetivo de confirmar a associação de ERK1/2 com p53, realizamos o pré-tratamento com o inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica), o qual impediu a apoptose induzida por CPR1 e CPR2, indicando a indução de morte celular por apoptose em uma via dependente de p53. Esse resultado corrobora com o que observamos na quantificação dos níveis de fosfo-p53 (S15).

Um dos primeiros acontecimentos na resposta a danos ao DNA é a fosforilação da histona H2A variante H2AX, numa serina de quatro resíduos no terminal C (resíduo 139) para formar γ -H2AX (ROGAKOU *et al.*, 1998). O tratamento

com os complexos CPR1 e CPR2 induziu a fosforilação de H2AX (S139) após 24 horas, indicando que os compostos causam danos ao DNA celular.

Os métodos de cultura de células 3D conferem um alto grau de relevância clínica e biológica aos modelos *in vitro* além de simular melhor o microambiente tumoral *in vivo* e as interações célula-célula e célula-matriz (FENNEMA *et al.*, 2013; GAO *et al.*, 2017). Os esferoides formados a partir de células HCT116 tratados com CPR1 e CPR2 apresentaram alterações morfológicas que indicam que os complexos têm a capacidade de penetrar nos pequenos agregados de células além de serem mais potentes na indução da citotoxicidade do que a piplartina livre de metal. Estudos similares relataram que novos complexos de rutênio também apresentaram citotoxicidade no modelo 3D, levando a alterações morfológicas em células de carcinoma hepatocelular humano HepG2 e carcinoma de cólon HCT116 em modelo de cultura 3D (DE CARVALHO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018).

A atividade antitumoral *in vivo* dos compostos CPR1 e CPR2 foi investigada em camundongos CB17 SCID enxertados com células HCT116. Os complexos foram capazes de inibir o crescimento do tumor nas doses testadas assim como a piplartina livre de metal. Também não foram observadas alterações significantes no peso corporal e dos órgãos dos animais tratados, e nem nos parâmetros hematológicos analisados, indicando baixa toxicidade dos compostos. Em estudos anteriores realizados por nosso grupo, foi demonstrado que um complexo de rutênio com xantoxilina, CRX, inibiu o desenvolvimento de células HepG2 em modelo de xenotransplante (DE CARVALHO *et al.*, 2018). O complexo de rutênio com um ligante imidazol também inibiu significativamente o crescimento tumoral em camundongos inoculados com células de carcinoma pulmonar humano A549 (CHEN *et al.*, 2016). Outro grupo demonstrou que o complexo de rutênio (II) inibiu de maneira dose-dependente o crescimento de células de hepatocarcinoma humano BEL-7402 em camundongos xenotransplantados (WANG *et al.*, 2018). Estes resultados são análogos a outros estudos previamente reportados (WANG *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2016; DENG *et al.*, 2017). Quando camundongos *Swiss* transplantados com tumor de sarcoma 180 foram tratados com a combinação de piplartina e 5-FU, a taxa de inibição do tumor aumentou aditivamente (BEZERRA *et al.*, 2006; 2008a). O mesmo foi observado quando foi utilizada a combinação de piplartina com cisplatina, o qual suprimiu sinergicamente o crescimento tumoral em

camundongos BALB/c inoculados com células AMC-HN3 e AMC-HN9 (ROH *et al.*, 2014).

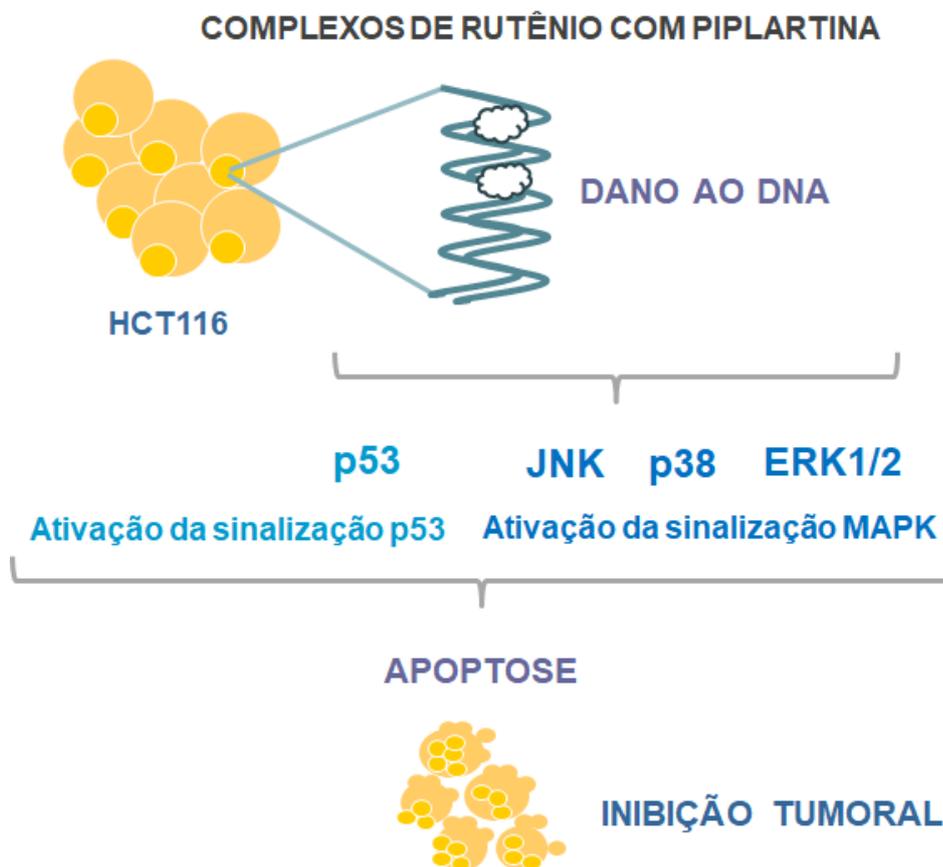


Figura 19. Resumo do mecanismo de ação dos complexos de rutênio com piplartina nas células HCT116.

7 CONCLUSÃO

O nosso estudo revelou que os complexos de rutênio com piplartina, CPR1 e CPR2, são capazes de induzir apoptose pela ativação das vias MAPK (JNK, MEK e p38) e p53 em células HCT116. Exibiram uma citotoxicidade maior que a piplartina no modelo 3D. Além disso, os complexos foram capazes de reduzir o crescimento de células HCT116 em modelo de xenotransplante, sendo mais potentes que a piplartina livre, indicando que estes são novos candidatos à fármacos anticancerígenos.

REFERÊNCIAS

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

AGNEW, J. **Medicine in the Old West: A History, 1850–1900**. 1 ed. Jefferson, NC: McFarland, 2010.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALESSIO, E. *et al.* **Cytotoxic, mutagenic and carcinogenic potencial of heavy metals related to human environment**. Dordrecht/Norwell, Kluwer Academic, 1997. p. 652.

ALLARDYCE, C.S.; DYSON, P.J. Metal-based drugs that break the rules. **Dalton Trans.**, v. 45, n. 8, p. 3201–3209, 2016.

ANG, W.H.; CASINI, A.; SAVA, G.; DYSON, P.J. Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action. **J. Organomet. Chem.**, v. 696, n. 5, p. 989–98, 2011.

BAGLEY, M. *et al.* Use of p38 MAPK inhibitors for the treatment of Werner Syndrome. **Pharmaceuticals**, v. 3, p. 1842-72, 2010.

BAS, A. K. *et al.* **Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças**. 8 ed., Elsevier, 2010. p. 682–692.

BECKERMAN, R.; PRIVES, C. Transcriptional regulation by p53. **Cold Spring Harb Perspect. Biol.**, v. 2, p. a000935, 2010.

BELYI, V. A. *et al.* The origins and evolution of the p53 family of genes. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 2, p. a001198, 2010.

BERGAMO, A. *et al.* In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors, and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 289, p. 559–564, 1999.

BERGAMO, A. *et al.* Ruthenium-based NAMI-A type complexes with in vivo selective metastasis reduction and in vitro invasion inhibition unrelated to cell cytotoxicity. **Int. J. Oncol.**, v. 21, n. 6, p. 1331-1338, 2002.

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

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

BEZERRA, D.P. *et al.* In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **J. Appl. Toxicol.**, v. 28, n. 2, p. 156–163, 2008a.

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

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

BRUIJNINCX, P.; SADLER, P. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 12, n. 12, p. 197–206, 2008.

CHATTERJEE, S. V. *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. 13, n. 7, p. 1149–1155, 2008.

CHEN, H. *et al.* Organometallic ruthenium(II) diamine anticancer complexes: arenenucleobase stacking and stereospecific hydrogen-bonding in guanine adducts. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 124, p. 3064–3082, 2002.

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, L. *et al.* The induction of autophagy against mitochondria-mediated apoptosis in lung cancer cells by a ruthenium (II) imidazole complex. **Oncotarget**, v. 7, p. 80716–80734, 2016.

CLARKE, M.J. Oncological implication of the chemistry of ruthenium. **Met. Ions Biol. Syst.**, v. 11, p. 231–283, 1980.

COSO, O.A. *et al.* Transforming G protein-coupled receptors potently activate JNK (SAPK). Evidence for a divergence from the tyrosine kinase signaling pathway. **J Biol Chem.**, v.2 70, p. 5620–5624, 1995.

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

COTREAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

DAVIS, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell**, v. 103, p. 239-52, 2000.

DE CARVALHO, N.C. *et al.* A novel ruthenium complex with xanthoxylin induces S-phase arrest and causes ERK1/2-mediated apoptosis in HepG2 cells through a p53-independent pathway. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 2, p. 79, 2018.

DECATRIS, M. P.; SUNDAR, S.; O'BYRNE, K. J. Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. **Cancer Treat. Rev.**, v. 30, p. 53–8, 2004.

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.

DOUGAN, S.J. *et al.* Catalytic organometallic anticancer complexes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.105, p.11628–11633, 2008.

FENNEMA, E. *et al.* Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. **Trends in Biotechnology**, v. 31, p. 108-115, 2013.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **Am. J. Cancer Res.**, v. 7, n.5 , p. 1016-1036, 2017.

FRAUSIN, F. *et al.* Free exchange across cells, and Echistatin-sensitive membrane target for the metastasis inhibitor NAMI-A (imidazolium trans-imidazole dimethylsulfoxide tetrachlororuthenate) on KB tumor cells. **J. Pharm. Exp. Therap.**, v, 313, p. 227-233, 2005.

FRESHNEY, N.W. *et al.* Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. **Cell**, v. 78, p. 1039-1049, 1994.

FREZZA, M. *et al.* Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. **Curr. Pharm. Des.**, v. 16, n. 16, p. 1813–1825, 2010.

FRICKER, S.P. Medical uses of gold compounds. **Gold Bull.**, v. 29, n. 2, p. 53–60, 1996.

GAESTEL, M. MAPKAP kinases—MKs—two's company, three's a crowd. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 7, n. 2, p. 120–30, 2006.

GAO, S.; SHEN, J.; HORNICEK, F.; DUAN, Z. Three-dimensional (3D) culture in sarcoma research and the clinical significance. **Biofabrication**, v. 9, n. 3, p. 032003, 2017.

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

HANAHAN, D., WEINGERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

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

HANKS, S.K.; QUINN, A.M.; HUNTER, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. **Science**, v. 241, n. 4861, p. 42-52, 1988.

HE, H. *et al.* Phorbol ester-induced mononuclear cell differentiation is blocked by the mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) inhibitor PD98059. **Cell Growth Differ.**, v. 10, p. 307–315, 1999.

HORN, H.F.; VOUSDEN, K.H. Coping with stress: multiple ways to activate p53. **Oncogene**, v. 26, p.1306–1316, 2007

HOTZE, A.C.G. *et al.* Structuredependent in vitro cytotoxicity of the isomeric complexes Ru(L)2Cl2 (L = otolylazopyridine and 4-methyl-2-phenylazopyridine) in comparison to [Ru(azpy)2Cl2]. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 9, p. 354–364, 2004.

ICHIJO, H. From receptors to stress-activated MAP Kinase. **Oncogene**, v. 18, p. 6087-93, 1999.

INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

JOHNSON, G.L.; VAILLANCOURT, R.R. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 6, n. 2, p. 230-8, 1994.

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

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

KANG, Q.; YAN, S. Piperlongumine reverses doxorubicin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in K562/A02 human leukemia cells. **Exp. Ther. Med.**, v. 9, n. 4, p. 1345-1350, 2015.

KELMAN, A.D. *et al.* Biological activity of ruthenium purine complexes. **J. Clin. Hematol. Oncol.**, v. 7, p. 274–288, 1977.

KEPPLER, B.K.; HARTMANN, M. New tumor-inhibiting metal complexes. Chemistry and antitumor properties. **Metal-Based Drugs**, v. 1, p. 145-149, 1994.

KIM, E.K.; CHOI, E.J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. **Archives of toxicology**, v. 89, n. 6, p. 867-82, 2015.

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

KÖPF-MAIER, P. Complexes of metals other than platinum as antitumour agents. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 47, p. 1-16, 1994.

KOSTOVA, I. Ruthenium complexes as anticancer agents. **Curr. Med. Chem.**, v.13, n.9, p.1085-1107, 2006.

KRENS, S.F.; SPAINK, H.P.; SNAAR-JAGALSKA, B.E. Functions of the MAPK family in vertebrate-development. **FEBS Lett**, v. 580, p. 4984–4990, 2006.

KUMARI, R. *et al.* Constitutively activated ERK sensitizes cancer cells to doxorubicin: Involvement of p53-EGFR-ERK pathway. **J. Biosci**, v. 42, n. 1, p. 31–41, 2017.

KWONG, L.N.; CHIN, L. The brothers RAF. **Cell**, v. 140, n. 2, p. 180–2. 2010.

KYRIAKIS, J.M.; AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol. Rev.**, v. 81, p. 807-69, 2001.

LEE, J.C. *et al.* A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. **Nature**, v. 372, p. 739-746, 1994.

LEE, S.W.; MANDINOVA, A. Patent application title: Methods for the treatment of cancer using piperlongumine and piperlongumine. **Analogs**. WO 20090312373, 2009.

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

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

LIU, Q. *et al.* Coloaded nanoparticles of paclitaxel and piperlongumine for enhancing synergistic antitumor activities and reducing toxicity. **J. Pharm. Sci.**, v. 106, n. 10, p. 3066-3075, 2017.

MALINA, J. *et al.* Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by anticancerheterocyclic complexes of ruthenium(III) in cell free media. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 6, p. 435-445, 2001.

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

MEEK, D.W.; ANDERSON, C.W. Posttranslational modification of p53: Cooperative integrators of function. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 1, p.a000950, 2009.

MESTRONI, G. *et al.* Chemical, biological and antitumor properties of ruthenium(II) complexes with dimethyl sulfoxide. **Prog. Clin. Biochem. Med.**, v. 10, p. 71-87, 1989.

MORBIDELLI, L. *et al.* Antiangiogenic properties of selected ruthenium(III) complexes that are nitric oxide scavengers. **Br. J. Cancer.**, v. 88, n. 9, p.1484-91, 2003.

MOURINO, V.; CATTALINI, J.P.; BOCCACCINI, A.R. Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments. **J. R. Soc. Interface.**, v. 9, n. 68, p. 401–419, 2012.

NAVARRO, R. *et al.* Doxorubicin-Induced MAPK Activation in Hepatocyte Cultures Is Independent of Oxidant Damage. **Ann. New York Acad. Sci.**, v. 1090, p. 408–418, 2006.

NDAGI, U.; MHLONGO, N.; SOLIMAN, M. E. Metal complexes in cancer therapy - an update from drug design perspective. **Drug Des. Devel Ther.**, v.11, p. 599–616, 2017.

NORN, S. *et al.* Mercury a major agent in the history of medicine and alchemy. **Dan Medicinhist Årboq.**, v. 36, p. 21–40, 2008.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OMS. Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em: 06 set. 2017.

PAGE, S. Ruthenium compounds as anticancer agents. **Educ. Chem.**, v. 10, p. 26–29, 2012.

PARMAR, V.S. *et al.* Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry**, v. 46, p. 597 – 673, 1997.

PELUSO, I. *et al.* MAPK Signalling pathway in cancers: olive products as cancer preventive and therapeutic agents. **Semin. Cancer Biol.**, pii: S1044-579X(17)30165-7, 2017.

PEREIRA, L. *et al.* Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK. **EMBO Mol. Med.** v. 5, p. 1759-74, 2013.

PISKA, K. *et al.* Piperlongumine (piplartine) as a lead compound for anticancer agents – Synthesis and properties of analogues: A mini-review. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 156, p. 13-20, 2018.

PIZARRO, A.M.; SADLER, P.J. Unusual DNA modes for metal anticancer complexes. **Biochimie.**,v. 91, n. 10, p. 1198-211, 2009.

RANDHAWA, H. *et al.* Activation of ERK signaling and induction of colon cancer cell death by piperlongumine. **Toxicol. In Vitro**, v. 27, n. 6, p. 1626-33, 2013.

RILEY, T. *et al.* Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 9, p. 402–412, 2008.

ROBINSON, M.J.; COBB, M.H. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 9, p. 180–186, 1997.

ROGAKOU, E.P. *et al.* DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 5858–68, 1998.

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

ROH, J .L. *et al.* Piperlongumine selectively kills cancer cells and increases cisplatin antitumor activity in head and neck cancer. **Oncotarget.**, v. 9, n. 4, p. 1345-1350, 2015.

SAVA, G.; PACOR, S. MESTRONI, G. Na[trans-RuCl₄(DMSO)Im], a metal complex of ruthenium with antimetastatic properties. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 10, p. 273-80, 1992.

SAVA, G. **Ruthenium compounds in cancer therapy**. In: FRICKER, S.P. (Ed.) **Metal compounds in cancer therapy**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 65-91.

SAVA, G. *et al.* Response of MCa mammary-carcinoma to cisplatin and to Na[trans-RuCl₄(dmsO)Im] - selective-inhibition of spontaneous lung metastasis by the ruthenium complex. **Drug Invest.**, v. 8, p. 150-161, 1994.

SAVA, G. *et al.* Effects of ruthenium complexes on experimental-tumors – irrelevance of cytotoxicity for metastasis inhibition. **Chem. Biol. Interact.**, v. 95, p. 109-126, 1995.

SAVA, G. *et al.* Comparison of the effects of the antimetastatic compound ImH[trans-RuCl₄(dmsO)Im] (NAMI-A) on the arthritic rat and on MCa mammary carcinoma in mice. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 4, p. 30-36, 1998.

SAVA, G. *et al.* Sulfoxide ruthenium complexes: non-toxic tools for the selective treatment of solid tumor metastases. **Top. Biol. Inorg. Chem.**, v. 1, p. 143-169, 1999.

SCHIEVEN, G.L. The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 5, p. 921-928, 2005.

SILVA, V.R. *et al.* A ruthenium-based 5-fluorouracil complex with enhanced cytotoxicity and apoptosis induction action in HCT116 cells. **Scient. Rep.**, v. 8, n. 1, p. 288, 2018.

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

SONG, X. *et al.* Piperlongumine induces apoptosis in human melanoma cells via reactive oxygen species mediated mitochondria disruption. **Nutr. Cancer.**, v. 70, n. 3, p. 502-511, 2018.

STRAMUCCI, L.; PRANTEDA, A.; BOSSI, G. Insights of crosstalk between p53 protein and the MKK3/MKK6/p38 MAPK signaling pathway in cancer. **Cancers**, v. 10, n. 5, 2018.

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.

THONGSOM, S. *et al.* Piperlongumine induces G2/M phase arrest and apoptosis in cholangiocarcinoma cells through the ROS-JNK-ERK signaling pathway. **Apoptosis**, v. 22, p. 1473-1484, 2017.

TOLEDO, F.; WAHL, G. M. Regulating the p53 pathway: In vitro hypotheses, in vivo veritas. **Nat. Rev.**, v. 6, p. 909–923, 2006.

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

VACCA, A. *et al.* Inhibition of endothelial cell functions and of angiogenesis by the metastasis inhibitor NAMI-A. **Br. J. Cancer.**, v. 86, n. 6, p. 993-8, 2002.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 307–310, 2000.

WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat. Rev. Drug Discovery**, v. 4, p. 307-320, 2005.

WANG, H. *et al.* Piperlongumine induces apoptosis and autophagy in leukemic cells through targeting the PI3K/Akt/mTOR and p38 signaling pathways. **Oncol Lett.**, v. 15, n. 2, p. 1423-1428, 2017.

WANG, J.; XIA, Y. Assessing developmental roles of MKK4 and MKK7 in vitro. **Commun. Integr. Biol.**, v. 5, n. 4, p. 319-24, 2012.

WANG, J. *et al.* The antitumor effect and toxicity of a ruthenium (II) complex in vivo. **Inorg. Chem. Commun.**, v. 87, p. 49-52, 2018.

WANG, J.Q. *et al.* A ruthenium (II) complex inhibits tumor growth in vivo with fewer side-effects compared with cisplatin. **J. Inorg. Biochem.**, v. 146, p. 89-96, 2015.

WANG, X.; MARTINDALE, J.L.; HOLBROOK, N.J. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 50, p. 39435-43, 2000.

WASYLISHEN, A.R.; LOZANO, G. Attenuating the p53 pathway in human cancers: Many means to the same end. **Cold Spring Harb Perspect. Med.**, v. 6, n. 8, p. a026211, 2016.

WAXMAN, S.; ANDERSON, K.C. History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy. **Oncologist.**, v. 6, suppl 2, p. 3–10, 2001.

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

WESTON, C.R.; DAVIS, R.J. The JNK signal transduction pathway. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 12, p. 14–21, 2002.

WIDMANN, C. *et al.* L.Mitogen-activated Protein Kinase: Conservation of a three-Kinase module from yeast to human. **Phys Rev.**, v. 79, p. 143–80, 1999.

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

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell Res.**, v. 15, p. 11–18, 2005.

ZHANG, W.; LIU, H.T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Res.**, v. 12, n. 1, p. 9, 2002.

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

ZHU, J.W. *et al.* Anticancer activity studies of ruthenium(II) complex toward human osteosarcoma HOS cells. **J. Membr. Biol.**, v. 249, p. 483-492, 2016.