



FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

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

TESE DE DOUTORADO

POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DO COMPLEXO *cis*-
[Ru(phen)₂(xant)](PF₆)

NANASHARA COELHO DE CARVALHO

Salvador – Brasil
2018

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DO COMPLEXO *CIS*-
[RU(PHEN)₂(XANT)](PF₆)**

NANASHARA COELHO DE CARVALHO

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra

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

**Salvador – Brasil
2018**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C331a Carvalho, Nanashara Coelho de
Potencial antineoplásico do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆), Brasil. /
Nanashara Coelho de Carvalho. - 2018.
110 f.: il. ; 30 cm.

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

Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –
Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

1. Câncer. 2. Carcinoma hepatocelular. 3. Complexo de rutênio. 4. Apoptose.
I.Título.

CDU 616-006.6

"POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DO COMPLEXO CIS-[RU(PHEN)₂(XANT)](PF₆)."

NANASHARA COELHO DE CARVALHO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Flávia Oliveira de Lima
Professora Adjunta
UEFS



Dra. Dalila Luciola Zanette
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dra. Fabiola Cardillo
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

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

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB.

AGRADECIMENTOS

Ao encerrar mais um ciclo nessa caminhada, sinto-me com a sensação de dever cumprido. Dizem que “a vida é um jogo” e que jogo! Dispensar falar sobre as dificuldades enfrentadas ao longo desses quatro anos, porque, sem as dificuldades não haveria aprendizado, amadurecimento pessoal e profissional, assim, só desejo agradecer:

- ✓ A Deus e aos meus amigos de luz que sempre me acompanham, me fazem enxergar a importância da resiliência, da fé e da humildade.
- ✓ À minha mãe e a minha irmã, meus amores incondicionais. Que estejamos juntas em muitas outras vidas!
- ✓ À minha grande e maravilhosa família, especialmente aos primos-irmãos Jamile, João Pedro, Isabeli, Láine e Lucas.
- ✓ Aos amigos maravilhosos que encontrei nessa trajetória chamada pós-graduação: Gisele Leite, Rosane Borges, Cinara Costa, Valdenízia Rodrigues, Maiara Oliveira e Wagno Alcântara.
- ✓ Aos companheiros do grupo de pesquisa do câncer: Sara, Larissa, Ana Carolina, Rafaela e Luciano. Vocês são os melhores!
- ✓ Aos colegas do LETI, que tornaram os dias de trabalho no laboratório mais amenos e divertidos.
- ✓ Ao Dr. Daniel Pereira Bezerra pela orientação, pelas reflexões, pela paciência e por ter favorecido o meu desenvolvimento profissional.
- ✓ Ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa – CPqGM, aos membros do corpo docente, funcionários e à biblioteca do Instituto Gonçalo Moniz/Fiocruz-BA, em especial, à Ana Maria Fiscina.

CARVALHO, Nanashara Coelho de. Potencial antineoplásico do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆), Brasil. 110 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Os compostos à base de rutênio ganharam grande interesse devido à sua potente citotoxicidade nas células cancerígenas, no entanto, muitas das suas potenciais aplicações permanecem inexploradas. **OBJETIVO:** Avaliar o potencial antineoplásico do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆) (CRX) recém sintetizado em células de carcinoma hepatocelular humano HepG2. **MATERIAL E MÉTODOS:** O complexo CRX foi sintetizado e caracterizado estruturalmente para posterior validação da atividade biológica. A avaliação da atividade citotóxica do complexo CRX foi realizada sobre um painel de células tumorais e não tumorais *in vitro* e seu efeito antitumoral foi verificado em modelo xenográfico de carcinoma hepatocelular humano HepG2 *in vivo*. **RESULTADOS:** Neste trabalho, relatamos a síntese de um novo complexo CRX e a investigação de sua ação celular e molecular em células HepG2. Descobrimos que CRX exibiu um potente efeito citotóxico em um painel de linhagens celulares de câncer em culturas monocamadas e em um modelo 3D de esferóides de câncer multicelular formado a partir de células HepG2. Este composto foi detectado em alta concentração nos núcleos celulares, induziu intercalação com o DNA e inibiu a síntese de DNA, interrompendo o ciclo celular na fase S, seguido pela ativação da via de apoptose mediada por caspase em células HepG2. A análise de expressão gênica revelou alterações na expressão de genes relacionados ao controle do ciclo celular, apoptose e via MAPK. Além disso, CRX induziu a fosforilação de ERK1/2, e o pré-tratamento com U-0126, um inibidor de MEK que inibe a ativação de ERK1/2, impediu a apoptose induzida por CRX. Em contraste, o pré-tratamento com um inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica) não impediu a apoptose induzida por CRX, indicando a ativação de uma via de apoptose independente de p53. CRX também apresentou um potente efeito antitumoral *in vivo* em camundongos SCID C.B-17 enxertados com células HepG2. **CONCLUSÕES:** Esses resultados indicam que o CRX é um novo candidato à fármaco anticancerígena.

Palavras-chave: Câncer, Carcinoma hepatocelular, Complexo de rutênio, Apoptose.

CARVALHO, Nanashara Coelho de. Antineoplastic potential of the complex *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆), Brazil.110 f. il. Thesis (Doctorate in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Ruthenium-based compounds have gained great interest due to their potent cytotoxicity in cancer cells; however, much of their potential applications remain unexplored. **OBJECTIVE:** to evaluate the antineoplastic potential of the newly synthesized *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆) complex (RCX) in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. **MATERIAL AND METHODS:** The RCX complex was synthesized and structurally characterized for subsequent validation of biological activity. The evaluation of the cytotoxic activity of the CRX complex was performed on a panel of tumor and non-tumor cells in vitro and its antitumor effect was verified in xenographic model of HepG2 human hepatocellular carcinoma in vivo. **RESULTS:** In this paper, we report the synthesis of a novel ruthenium complex with xanthoxylin (RCX) and the investigation of its cellular and molecular action in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. We found that RCX exhibited a potent cytotoxic effect in a panel of cancer cell lines in monolayer cultures and in a 3D model of multicellular cancer spheroids formed from HepG2 cells. This compound is detected at a high concentration in the cell nuclei, induces DNA intercalation and inhibits DNA synthesis, arresting the cell cycle in the S-phase, which is followed by the activation of the caspase-mediated apoptosis pathway in HepG2 cells. Gene expression analysis revealed changes in the expression of genes related to cell cycle control, apoptosis and the MAPK pathway. In addition, RCX induced the phosphorylation of ERK1/2, and pretreatment with U-0126, an MEK inhibitor known to inhibit the activation of ERK1/2, prevented RCX-induced apoptosis. In contrast, pretreatment with a p53 inhibitor (cyclic pifithrin- α) did not prevent RCX-induced apoptosis, indicating the activation of a p53-independent apoptosis pathway. RCX also presented a potent in vivo antitumor effect in C.B-17 SCID mice engrafted with HepG2 cells. **CONCLUSIONS:** Altogether, these results indicate that RCX is a novel anticancer drug candidate.

Keywords: Cancer, Hepatocellular carcinoma, Ruthenium complex, Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Processo de transformação maligna. Alterações genéticas e epigenéticas, número e arranjo cromossômico, e interações heterotípicas que, ao longo do caminho para malignidade, se submetem a ciclos de seleção clonal evolutiva levando à aquisição de características cancerígenas.	16
Figura 2	Estrutura química de compostos à base de platina e rutênio utilizadas no tratamento de cânceres humanos.	22
Figura 3	Etapa de preparação do complexo <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (xant)](PF ₆) a partir do precursor RuCl ₃ .3H ₂ O	26
Figura 4	Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em modelo 3D in vitro de esferoides multicelulares formados por células HepG2.	42
Figura 5	Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre a viabilidade de células HepG2 determinadas por exclusão com o corante azul de tripam.	43
Figura 6	Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre a distribuição subcelular do rutênio, indução da intercalação com o DNA e inibição da síntese de DNA.	45
Figura 7	Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre a morfologia de células HepG2 após 12, 24, 48 e 72 h de incubação.	49
Figura 8	Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) na análise morfológica de células HepG2 após 12, 24, 48 e 72 h de incubação.	50
Figura 9	Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) na análise morfológica de células HepG2 examinadas por microscópio eletrônico de transmissão após 24 h de incubação.	51
Figura 10	Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) na indução de apoptose em células HepG2 após 12, 24, 48 ou 72 h de incubação, conforme determinado por citometria de fluxo usando marcação de anexina V-FITC/IP.	52
Figura 11	Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células HepG2.	54
Figura 12	Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre a atividade de caspase 3, 8 e 9.	55
Figura 13	Efeito do inibidor não seletivo de caspases (Z-VAD(Ome)-FMK), inibidor seletivo de caspase 8 (Z-IETD-FMK) e inibidor seletivo da	56

caspase 9 (Z-LEHD-FMK) na apoptose induzida pelo complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em células HepG2, determinado por citometria de fluxo usando marcação por anexina V-FITC/IP.

- Figura 14** Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) de células HepG2 e proteção antioxidante por NAC determinado por citometria de fluxo usando marcação por DCF-DA. 57
- Figura 15** Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em ERK1/2 (pT202/pY204), conforme determinado por citometria de fluxo de células em HepG2 tratadas por um período agudo (15 minutos ou 30 minutos) com CRX (12 μ M) ou após tratamento prolongado (24 h de incubação). 61
- Figura 16** Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em JNK/SAPK (pT183/pY185), conforme determinado por citometria de fluxo de células em HepG2 tratadas por um período agudo (15 minutos ou 30 minutos) com CRX (12 μ M) ou após tratamento prolongado (24 h de incubação). 62
- Figura 17** Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em p38 MAPK (pT180/pY182), conforme determinado por citometria de fluxo de células em HepG2 tratadas por um período agudo (15 minutos ou 30 minutos) com CRX (12 μ M) ou após tratamento prolongado (24 h de incubação). 63
- Figura 18** Efeito do inibidor de MEK (U-0126), inibidor de JNK/ SAPK (SP 600125) e inibidor de p38 MAPK (PD 169316) na apoptose induzida pelo complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em células HepG2, conforme determinado por citometria de fluxo usando marcação de anexina V-FITC/IP. 64
- Figura 19** Efeito do inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica) sobre a apoptose induzida pelo complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em células HepG2 determinado por citometria de fluxo usando marcação com anexina V-FITC/IP. 65
- Figura 20** Atividade antitumoral in vivo do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em camundongos SCID C.B-17 inoculados com células HepG2. 67
- Figura 21** Análise toxicológica do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em camundongos SCID C.B-17 inoculados com células HepG2. 71
- Figura 22** Resumo do mecanismo de ação citotóxico proposto para o complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em células HepG2. 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais classes de agentes naturais anticancerígenos.	19
Tabela 2	Lista de células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade para determinação de CI_{50}	28
Tabela 3	Atividade citotóxica do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX)	40
Tabela 4	Índice de seletividade do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX)	41
Tabela 5	Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre a distribuição do ciclo celular de células HepG2	47
Tabela 6	Efeito do tratamento com o complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre a regulação gênica de células HepG2	59
Tabela 7	Efeito do tratamento com o complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre o peso corporal e o peso relativo dos órgãos de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2.	69
Tabela 8	Efeito do tratamento com o complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre parâmetros hematológicos do sangue periférico de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CI ₅₀	Concentração inibitória média
CRX	Complexo de rutênio com xantoxilina
ctDNA	<i>Circulating tumor DNA</i> (DNA circulante de tumor)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetra Acetic Acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
E.P.M	Erro padrão da média
ERK 1/2	<i>Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2</i> (proteínas cinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC	Intervalo de confiança
IS	Índice de seletividade
JNK	<i>c-Jun amino-terminal kinases</i> (cinases c-Jun amino-terminal)
μCi	Microcurie
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mL	Mililitro
M	Molar
mM	Milimolar
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (proteína cinase ativada por mitógeno)
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
NAC	N-acetyl-L-cysteine (N-acetil-L-cisteína)
nm	Nanômetro
OXA	Oxaliplatina
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (células mononucleares do sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (salina tamponada com fosfato)
PI	<i>Propidium iodide</i> (Iodeto de propídio)
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase quantitativa)
QR	Quantificação relativa
SAPK	<i>Stress-activated protein kinases</i> (proteína cinase ativada por estresse)
SBF	Soro fetal bovino
TEM	<i>Transmission electron microscope</i> (microscópio eletrônico de transmissão)
Z-VAD(OMe)	<i>Z-Val-Ala-Asp-(OMe)-Fluoromethyl Ketone</i> (Z-Val-Ala-ASp-(OMe)-
FMK	Fluormetil Cetona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	CÂNCER	14
2.2	CARCINOMA HEPATOCELULAR	17
2.3	QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER	17
2.4	COMPLEXOS METÁLICOS	20
3	OBJETIVOS	24
3.1	OBJETIVO GERAL	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	SÍNTESE DO COMPLEXO <i>cis</i> -[Ru(phen) ₂ (xant)](PF ₆)	25
4.2	ENSAIOS <i>in vitro</i>	26
4.2.1	Células	26
4.2.2	Avaliação da atividade citotóxica	29
4.2.3	Cultura de esferoides 3D multicelulares	29
4.2.4	Avaliação da viabilidade celular – exclusão por azul de tripam	29
4.2.5	Distribuição subcelular de rutênio	30
4.2.6	Ensaio de intercalação do DNA	30
4.2.7	Quantificação da síntese de DNA	30
4.2.8	Avaliação da fragmentação internucleossômica de DNA e distribuição do ciclo celular	31
4.2.9	Análise morfológica	31
4.2.10	Ensaio de marcação com Anexina-V/IP	32
4.2.11	Ensaio de reversão utilizando inibidores farmacológicos	32
4.2.12	Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial	32
4.2.13	Ensaio da atividade de caspases 3, 8 e 9	33
4.2.14	Avaliação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO)	33
4.2.15	Análise da expressão gênica	34
4.2.16	Quantificação de proteínas MAPK fosforiladas	35
4.3	ENSAIOS <i>in vivo</i>	35
4.3.1	Animais	35
4.3.2	Modelo xenográfico de carcinoma hepatocelular humano	36
4.3.3	Avaliação toxicológica	36
4.3.4	Análise estatística	37
5	RESULTADOS	38
5.1	O COMPLEXO DE RUTÊNIO COM XANTOXILINA EXIBE UMA CITOTOXICIDADE POTENTE EM UM PAINEL DE DIFERENTES CÉLULAS TUMORAIS	38
5.2	O COMPLEXO DE RUTÊNIO COM XANTOXILINA SE ACUMULA NO NÚCLEO DA CÉLULA, INDUZ INTERCALAÇÃO DO DNA E INIBE A SÍNTESE DE DNA	44

5.3	O COMPLEXO DE RUTÊNIO COM XANTOXILINA CAUSA PARADA EM FASE S EM CÉLULAS HepG2	46
5.4	O COMPLEXO DE RUTÊNIO COM XANTOXILINA DESENCADEIA APOPTOSE MEDIADA POR CASPASE DE CÉLULAS HepG2	48
5.5	O COMPLEXO DE RUTÊNIO COM XANTOXILINA ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS HepG2	58
5.6	O COMPLEXO DE RUTÊNIO COM XANTOXILINA CAUSA APOPTOSE MEDIADA POR ERK1/2 EM CÉLULAS HepG2 ATRAVÉS DE UMA VIA INDEPENDENTE DE p53	60
5.7	O COMPLEXO DE RUTÊNIO COM XANTOXILINA REDUZ O CRESCIMENTO DE CÉLULAS HepG2 EM MODELO XENOGRÁFICO	66
6	DISCUSSÃO	72
7	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICE	84
	ANEXO	86

1 INTRODUÇÃO

O câncer constitui um grupo diversificado de doenças caracterizadas pela presença de células anormais, que devido às mudanças genóticas, adquirem a capacidade de proliferar de modo independente aos sinais proliferativos, evadem mecanismos pró-apoptóticos e invadem tecidos adjacentes formando metástases. As estimativas para o ano de 2030 apontam para 27 milhões de novos casos de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de indivíduos portadores por ano (OMS, 2012). Dentre eles, o câncer de fígado é a segunda maior causa de óbitos por câncer no planeta, com 746 mil casos (9,1% do número total) de morte estimados em 2012 (GLOBOCAN, 2012).

A quimioterapia ainda é a estratégia de primeira linha para o tratamento de diversos cânceres, principalmente para tumores metastáticos, entretanto, células cancerosas frequentemente adquirem resistência aos agentes quimioterápicos, que por sua vez, induzem efeitos colaterais indesejáveis. Nesse contexto, o desenvolvimento de novas substâncias com potencial anticancerígeno desperta interesse.

O estudo de complexos metálicos para uso na quimioterapia teve grande impulso depois da descoberta das propriedades antitumorais da *cis*-diaminodichloroplatina (II), *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], comumente chamada cisplatina, que é um dos compostos de grande relevância no tratamento do câncer. Dentre os complexos metálicos, apenas os de platina têm sido utilizados na clínica médica para o tratamento do câncer até o momento, entretanto, compostos contendo vários outros íons metálicos apresentam atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, entre eles, os complexos de rutênio II e III. Átomos de rutênio combinados com ligantes orgânicos biologicamente ativos podem se apresentar como alternativa no desenvolvimento de novos compostos com atividade anticâncer, já que essa interação sugere uma otimização da atividade do metal relacionada, por exemplo, ao sinergismo das moléculas (SILVA, 2010).

A xantoxilina, uma acetofenona encontrada na planta *Sebastiania schottiana* (Euphorbiaceae), que, por sua vez, apresenta diversas atividades farmacológicas, incluindo antibacteriana, antifúngica, antinociceptiva, antiedematogênica e

antiespasmódica (CALIXTO et al., 1990; BOECK et al., 2005; CAMPOS-BUZZI et al., 2006). Neste trabalho, a xantoxilina foi complexada com o rutênio (II) com o intuito de obtermos um novo complexo rutenado. O complexo *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆) foi sintetizado e seu potencial antineoplásico foi estudado aqui pela primeira vez.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

O câncer representa uma das principais causas de mortalidade no mundo, principalmente para os países em desenvolvimento (GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, 2015). No Brasil, as estimativas para o biênio 2016/ 2017 indicaram cerca de 596 mil novos casos de câncer (INCA, 2016), e até 2030 haverá cerca de 23,6 milhões de novos casos em todo o planeta (IARC, 2012).

Este grupo heterogêneo de doenças possui como característica típica a manifestação de células anormais que proliferam descontroladamente, independente de estímulos externos (GUTSCHNER e DIEDERICHS, 2012). Para que as células cancerosas escapem dos mecanismos de controle proliferativo, elas adquirem habilidades fisiológicas fundamentais, como: autossuficiência na produção de fatores de crescimento, insensibilidade a sinais antiproliferativo, resistência à morte celular programada, potencial replicativo ilimitado, indução de angiogênese, invasão tecidual e metástase (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

As alterações de genes que controlam o crescimento e a proliferação estão diretamente relacionadas a processos carcinogênicos. Estes genes são conhecidos como oncogenes (promotores do crescimento) e genes supressores tumorais ou anti-oncogenes (inibidores do crescimento) (YARBRO, 1992). A ativação de proto-oncogenes em oncogenes e a inativação de genes supressores tumorais levam à proliferação celular anormal (FELSHER, 2008; SPANDIDOS, 2008).

Entre os oncogenes associados a tumores humanos, a família RAS é a mais comum, onde suas proteínas GTPases regulam a transdução de sinais celulares, como a proliferação, crescimento, sobrevivência, migração, diferenciação ou

dinâmica citoesquelética. Cerca de 30% dos tumores humanos possuem mutações em umas das isoformas (KRAS, NRAS e HRAS) do gene RAS (SINGH, et al., 2015; TAKASHIMA e FALLER, 2013).

A ativação constitutiva de oncogenes através de translocações e inversões é um evento genético importante em processos carcinogênicos (SEKI et al., 2015). Outro exemplo é a translocação (t8;14) do oncogene MYC, descrita inicialmente pelo envolvimento no linfoma de Burkitt, o qual induz super expressão gênica levando a um estado proliferativo acentuado e comportamento clínico agressivo (PETRICH et al., 2014; CAI et al., 2015).

O primeiro gene supressor de tumor identificado foi o gene de susceptibilidade ao retinoblastoma, RB, que condiciona o surgimento de tumores oculares infantis hereditários ou não hereditários (GUO et al., 2014). O gene RB controla checkpoints na fase G₁ do ciclo celular, além de orientar a diferenciação das células durante a embriogênese e em tecidos adultos, e regular mecanismos de morte celular por apoptose (BURKHART e SAGE, 2008). Infecções virais por HPV induzem alterações em proteínas RB e a degradação de proteínas p53 aumentando o risco de desenvolvimento de câncer uterino em mulheres adultas (DOORBAR, 2006).

É sabido que, na maioria dos tumores humanos o gene supressor p53 encontra-se mutado, conferindo às células tumorais ganho de funções (resistência à apoptose, instabilidade genômica, ciclo celular aberrante, invasão e metástase), desse modo, este gene tornou-se alvo de intervenções terapêuticas, e a análise do seu estado é útil no diagnóstico e prognóstico da doença (LANE e LAIN, 2002; TULLO et al., 2003; SOLOMON et al., 2011).

A ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores também alteram o metabolismo de células cancerosas que passam a realizar glicólise aeróbica (efeito Warburg) obtendo substratos para o crescimento e proliferação celular (DANG, 2012; LEVINE e PUZIO-KUTER, 2010). Essa alteração do metabolismo decorre de interações entre células, complexos gênicos, proteínas e metabólitos que atuam gerando um determinado fenótipo cancerígeno (RAHMAN e HASAN, 2015).

Além dos mecanismos genéticos, as alterações epigenéticas também controlam o início e a progressão da transformação maligna (MARTÍNEZ-CLIMENT et al., 2006). Os mecanismos epigenéticos alteram a expressão gênica, induzem transformações neoplásicas que precedem mudanças genéticas, mas não modificam de modo permanente a sequência de DNA (incluem modificações em histonas, metilações e silenciamento gênico mediado por RNA não codificante), desse modo, são reversíveis e hereditários (TOIYAMA et al., 2014; KANWAL et al., 2015). Tais alterações participam em vias oncogênicas, permitindo a proliferação e disseminação das células malignas (VALDESPINO-GÓMEZ e VALDESPINO-CASTILLO, 2010).

Associados aos fatores genéticos e epigenéticos, existem componentes externos que contribuem para a carcinogênese (**Figura 1**), tais como: o uso do tabaco, o consumo de álcool, o hábito alimentar e sedentarismo (OMS, 2013). Além destes fatores, agentes físicos, como a radiação, e agentes biológicos, tais como os vírus, influenciam o processo carcinogênico induzindo mutações em genes que codificam oncoproteínas e proteínas supressoras de tumor (RALPH et al., 2010; LUO et al., 2013). Em resumo, o processo carcinogênico está relacionado à ação de distintos insultos, que atuam continuamente sobre células fenotipicamente normais transformando-as em células malignas (FOUAD e AANEI, 2017)

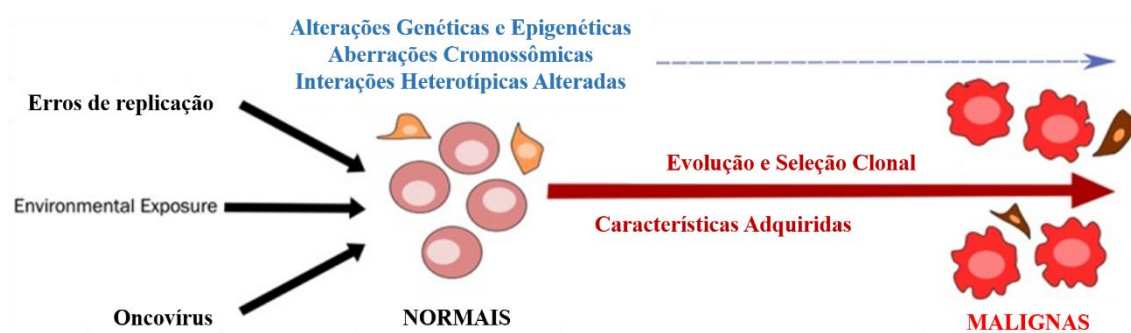


Figura 1. Processo de transformação maligna. Alterações genéticas e epigenéticas, número e arranjo cromossômico, e interações heterotípicas que, ao longo do caminho para malignidade, se submetem a ciclos de seleção clonal evolutiva levando à aquisição de características cancerígenas. Fonte: FOUAD e AANEI, 2017.

2.2 CARCINOMA HEPATOCELULAR

O câncer de fígado é a segunda maior causa de óbitos por câncer no planeta, com 746 mil casos (9,1% do número total) de morte estimados em 2012 (GLOBOCAN, 2012). Este pode ser primário do fígado ou secundário (tumor metastático, originado em outro órgão e que atinge também o fígado). Os tumores primários de fígado incluem o carcinoma hepatocelular (HCC), o colangiocarcinoma (que acomete os ductos biliares dentro do fígado), angiossarcoma (tumor do vaso sanguíneo) e, na criança, o hepatoblastoma. Dentre esses, o HCC é o mais comum e o seu desenvolvimento está relacionado a fatores de risco como o histórico prévio de doença hepática crônica, a cirrose por hepatite viral, consumo excessivo de álcool e doença hepática gordurosa (ANG et al., 2017).

A maioria dos casos de HCC está associada a infecções virais crônicas por hepatite B e hepatite C, que dão origem ao processo longo (30 anos) de hepatocarcinogênese que abrange inflamação prolongada, hepatite, regeneração, fibrose, cirrose, displasia e finalmente HCC (TORNESELLO et al., 2013). Além disso, as alterações moleculares mais especificamente relacionadas ao HCC foram descritas: via VEGF (angiogênese mediada pelo fator de crescimento endotelial); a via WNT, que pode ser ativada se houver uma mutação no gene β -catenina (CTNNB1), que é a terceira mutação mais frequente observada em HCC após a mutação p53; a via do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/AKT/ alvo de mamífero da rapamicina (mTOR); e as vias da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e c-MET (BUPATHI et al., 2015).

O HCC é um câncer altamente maligno com alta taxa de recorrência e um mau prognóstico, e embora a ressecção cirúrgica ou o transplante ajudem a melhorar as taxas de sobrevivência dos pacientes, ainda não há tratamento efetivo para os pacientes avançados não elegíveis para a cirurgia (LIU et al., 2017).

2.3 QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER

Antes de 1960, o principal tratamento para o câncer baseava-se na ressecção cirúrgica e na radioterapia, quando a abordagem quimioterápica começou a se desenvolver, tratando sistemicamente a doença e alterações

correlacionadas a metástase (GUDDATI, 2012; CRAWFORD, 2013). A terapia endócrina e imunoterapia constituem opções terapêuticas mais recentes, embora a quimioterapia convencional ainda seja a estratégia de primeira linha para o tratamento de diversos cânceres (RAHMAN e HASAN, 2015).

Estratégias para controlar a proliferação celular através da utilização de substâncias naturais ou sintéticas, individualmente ou como terapias combinadas, emergiram como uma abordagem promissora para o tratamento do câncer disponíveis atualmente na clínica (CHATURVEDI et al., 2008).

Os agentes quimioterápicos são classificados em: alquilantes (ciclofosfamida, dacarbazina, carmustina, etc.); antimetabólitos (5-fluoracil, gencitabina, metotrexato, 6-mercaptopurina, etc.); epipodofilotoxinas (etoposídeo e etoposídeo); taxanos (paclitaxel e docetaxel); antimitóticos; antibióticos citotóxicos (doxorubicina, mitomicina, bleomicina, dactinomicina, etc.); alcaloides da vinca (vimblastina, vincristina e vinorelbina); compostos de platina (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina); camptotecinas (irinotecano e topotecano); hormônios (tamoxifeno, ciproterona, flutamida, etc.); e novas drogas anticâncer, como os inibidores de proteína cinase (bevacizumab, panitumumab, trastuzumab, etc.); e anticorpos monoclonais (erlotinib, imatinib, sorafenib, etc.) (DIAS et al., 2015).

Cerca de 70% dos compostos antineoplásicos conhecidos são produtos naturais ou derivados destes (KARIKAS, 2010). O potencial uso destes agentes como anticancerígenos foi reconhecido na década de 1950 pelo Instituto Nacional do Câncer dos EUA (NCI), que já identificou cerca de 3000 espécies de plantas que demonstraram atividade anticancerígena. Desde então, vários estudos têm contribuído para a descoberta de novos produtos naturais com tal potencial (DESAI et al., 2008; FERREIRA et al., 2011). A **Tabela 1** resume as principais classes de agentes anticâncer utilizados na clínica derivados de produtos naturais.

Tabela 1. Principais classes de agentes naturais anticancerígenos

Classes de Anticancerígenos	Agentes	Mecanismo de Ação
Taxanos	Paclitaxel Docetaxel	Estabiliza a polimerização da tubulina
Alcaloides da Vinca	Vimblastina Vincristina Vinorelbina	Inibe a polimerização da tubulina
Camptotecinas	Irinotecano Topotecano	Inibe a topoisomerase I
Epipodofilotoxinas	Etoposídeo Tenoposídeo	Inibe a topoisomerase II
Antibióticos citotóxicos	Doxorrubicina Mitomicina Idarrubicina Bleomicina Dactinomicina	Radicais livres de oxigênio se ligam às fitas simples ou duplas do DNA causando a quebra da molécula; Alguns agentes inibem a topoisomerase II e/ ou intercalam no DNA

Fonte: DIAS et al., 2015

Dentre os produtos naturais com ação antineoplásica, destacam-se os taxanos (paclitaxel e docetaxel), os alcaloides da vinca (vincristina e vincristina), os derivados da podofilotoxina (etoposídeo e tenoposídeo) e os derivados da camptotecina (topotecano e irinotecano). Os taxanos e alcaloides da vinca atuam sobre a dinâmica dos microtúbulos e induzem a morte celular por apoptose através de dois mecanismos distintos: ao passo que os taxanos promovem a polimerização microtubular e aumentam a sua estabilidade, os alcaloides da vinca e seus derivados, por sua vez, inibem a polimerização dos microtúbulos (KAVALLARIS et al., 2001; JORDAN e WILSON, 2004; CERESOLI e ZUCALI, 2015). A camptotecina, um alcaloide de origem vegetal obtido a partir planta chinesa conhecida como “árvore da felicidade” (*Camptotheca acuminata* Decne.), atua como um inibidor da topoisomerase, contudo, por ser insolúvel, modificações moleculares derivaram compostos semi-sintéticos (irinotecano e topotecano) aprovados para uso contra câncer colorretal, carcinoma de ovário, carcinoma de pulmão e carcinoma de cérvix uterino (O’CONNOR, 2015). Já a podofilotoxina, uma

lignana isolada a partir das espécies vegetais *Phodophyllum peltatum* e *Phodophyllum hexandrum*, atua como um agente antimetabólico inibindo os microtúbulos, e seus derivados (etoposídeo e tenoposídeo), que atuam como inibidores da topoisomerase II, são usados na clínica como fármacos anticâncer frente à diversos tipos de tumores (CHENG et al., 2015; YOU, 2005; GORDALIZA et al., 2001).

Além das plantas, os microrganismos também são considerados importantes produtores de metabólitos secundários, assim, constituem fontes para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Um importante exemplo é a doxorrubicina, um antibiótico da classe das antraciclinas, obtida a partir de bactérias do gênero *Streptomyces*, que tem atividade sobre linfomas agudos, sarcomas, osteossarcomas e vários tipos de carcinomas, e atua por intercalação ao DNA, formação de radicais livres com consequente inibição da síntese desta molécula (WASOWSKA et al., 2005; GERWITZ, 1999). Neste contexto, o desenvolvimento de novas substâncias com potencial antitumoral desperta interesse e, a descoberta de moléculas ativas derivadas de produtos naturais pode ser relevante.

2.4 COMPLEXOS METÁLICOS

Os metais são elementos naturais essenciais a diversos processos bioquímicos, pois, apresentam características específicas, como a atividade redox, mecanismos de coordenação variáveis e reatividade para substratos orgânicos, assim, complexos metálicos coordenados, utilizados como fármacos ou pró-fármacos são considerados como potenciais agentes anticâncer (FREZZA et al., 2010). Tais elementos, incluem o gálio, zinco, cobalto, prata, vanádio, estrôncio, manganês e cobre, requeridos pelo organismo em quantidades traço para induzir processos catalíticos (NDAGI et al., 2017).

Os registros sobre o uso de metais e compostos metálicos para o tratamento do câncer remetem há centenas de anos, mas apenas em 1960, a atividade citostática do complexo metálico *cis*-diamina-dicloroplatina (II) ou cisplatina foi demonstrada, induzindo o desenvolvimento de novos compostos inorgânicos metálicos com atividade anticancerígena (KÖPF-MAIER, 1994). A citotoxicidade induzida pela cisplatina está relacionada à sua capacidade de interação ao DNA,

interferindo nos processos de replicação e transcrição, e levando à morte celular por apoptose (SCHMITT et al., 2012).

Por outro lado, embora os compostos de platina e seus derivados ainda representem uma importante fonte de agentes com efeitos comprovados frente a diversos tipos de tumores (testículo, ovário, mama, cérvix, melanoma, linfomas, cólon, pulmão, cabeça e pescoço), a resistência e efeitos citotóxicos correlacionados aos tradicionais fármacos anticancerígenos à base de platina estimulou a busca por novos compostos metálicos com propriedades antiproliferativas, como complexos de rutênio, complexos à base de ouro, prata e cobre (OTT e GUST, 2007; TAN et al. 2010; MUNTEANU e SUNTHARALINGAM, 2015).

O desenvolvimento de complexos de rutênio surgiu como uma alternativa para o tratamento de tumores resistentes ou não responsivos à cisplatina, com o primeiro composto de rutênio, o NAMI-A, liberado para testes clínicos de fase I, como fármaco antimetastático, em 1999, com marcante efeito sobre metástase pulmonar e tumores sólidos, mas, sem efeito sobre tumores primários (GALANSKI et al., 2003; RAVERA et al., 2004; VARGIU et al., 2008). O segundo complexo de rutênio liberado para ensaios clínicos, o KP1019, ficou conhecido por seu potencial citotóxico capaz de inibir a proliferação celular e induzir apoptose em células cancerígenas (HARTINGER et al., 2006).

O efeito anticancerígeno dos complexos de rutênio, inicialmente, foi associado à interação ao DNA, mesmo mecanismo dos agentes da platina (SAVA et al., 1984). Em teoria, a estrutura química similar à cisplatina e seus derivados (**Figura 2**), estaria relacionada à uma atividade biológica semelhante (SCHMITT et al., 2012), além disso, a estrutura octaédrica do rutênio e sua propensão a sofrer reações redox seria favorecida pelo ambiente hipóxico dos tumores (ABID et al., 2016; GRANSBURY et al., 2016).

Os complexos de rutênio têm distintos comportamentos biológicos: se ligam à albumina plasmática, sendo transportados ativamente para à célula; se ligam às proteínas de matriz extracelular e proteínas de superfície celular favorecendo um efeito antimetastático específico; se ligam a enzimas reguladoras dentro da membrana celular e/ ou no citoplasma; e interagem com o DNA nuclear. Esta

diversidade de mecanismos de ação dos complexos rutenados está relacionada às suas propriedades anticancerígenas (LEVINA et al., 2009).

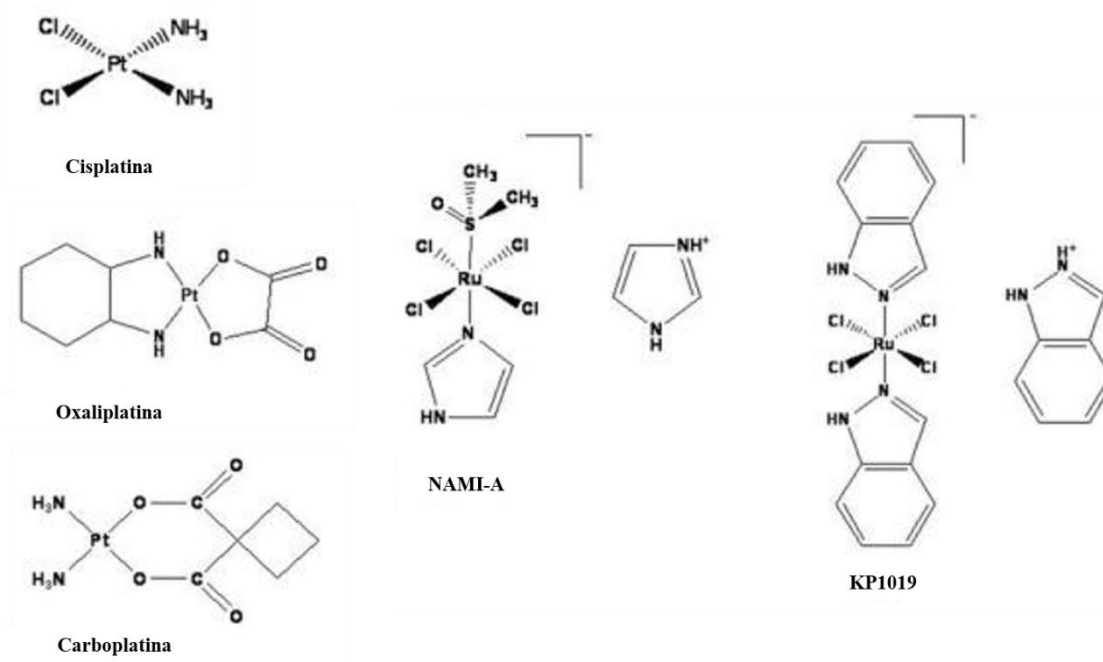


Figura 2. Estrutura química de compostos à base de platina e rutênio utilizadas no tratamento de cânceres humanos. Adaptado de: SCHMITT et al., 2012.

Os complexos de rutênio receberam atenção como agentes antitumorais, pois apresentam propriedades anticancerígenas seletivas e baixa toxicidade sistêmica, penetrando e ligando-se preferencialmente ao DNA das células tumorais para então serem ativadas (KOSTOVA, 2006; ANTONARAKIS e EMADI, 2010). A ação desses compostos sobre alvos não nucleares como a mitocôndria, receptores de morte em superfície celular e retículo endoplasmático também está associada ao efeito apoptótico em células tumorais (BRABEC e NAVÁKOVÁ, 2006; ZHENG et al., 2017). Adicionalmente, os complexos de rutênio possuem características que lhes permitem realizar uma variedade de ligações químicas, o transporte de potenciais moléculas acessórias e, não menos importante, a propriedade de existir nos fluidos biológicos em vários estados oxidativos (BERGAMO et al., 2012).

A combinação de íons metálicos e moléculas orgânicas representa uma alternativa para o desenvolvimento de novos candidatos antineoplásicos, que possuam efeitos sinérgicos e maior atividade, como complexos orgânicos de rutênio (SILVA, 2010). Para obter informações adicionais sobre o potencial

citotóxico de compostos à base de rutênio, um novo ligando, xantoxilina, foi usado para sintetizar um novo complexo de rutênio. A xantexilina (2-hidroxi-4,6-dimetoxiacetofenona) é uma molécula derivada de plantas com atividades antibacteriana, antifúngica, antinociceptiva, antiedematogênica e antiespasmódica (CALIXTO et al., 1990; BOECK et al., 2005; CAMPOS-BUZZI et al., 2006). Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antineoplásico do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆) (onde, phen = 1,10'-fenantrolina; xant = xantoxilina) recém sintetizado em células de carcinoma hepatocelular humano HepG2.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o potencial antineoplásico do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆) (CRX) em células de carcinoma hepatocelular humano HepG2.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a citotoxicidade do complexo CRX frente a diferentes células tumorais e células não tumorais em modelos 2D e em esferoides 3D multicelulares formadas a partir de células HepG2;
- ✓ Quantificar a distribuição de rutênio intracelular após o tratamento com o complexo CRX em células HepG2;
- ✓ Analisar a capacidade do complexo CRX de intercalar com o DNA;
- ✓ Analisar a capacidade do complexo CRX de inibir a síntese de DNA de células HepG2;
- ✓ Investigar o efeito do complexo CRX sobre o ciclo celular em células HepG2;
- ✓ Qualificar a morfologia celular após o tratamento com o complexo CRX em células HepG2;
- ✓ Avaliar o efeito do complexo CRX sobre a externalização de fosfatidilserina em células HepG2;
- ✓ Investigar o efeito do complexo CRX sobre o potencial transmembrânico mitocondrial em células HepG2;
- ✓ Avaliar o efeito do complexo CRX sobre a atividade de caspase 3, 8 e 9 em células HepG2;
- ✓ Avaliar a capacidade do complexo CRX em induzir estresse oxidativo em células HepG2;
- ✓ Verificar o efeito do complexo CRX sobre a expressão gênica de células HepG2;
- ✓ Investigar o papel da via de sinalização MAPK (JNK, p38 e ERK1/2) e p53 sobre a morte celular apoptótica induzida pelo complexo CRX em células HepG2;
- ✓ Determinar a eficácia antitumoral *in vivo* em modelo xenográfico com células HepG2.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DO COMPLEXO *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆)

O complexo CRX foi sintetizado e caracterizado estruturalmente no departamento de química da Universidade Federal de São Carlos (USFCAR) pelos Dr(a)s Edjane R. dos Santos, Regina M. M. Oliveira, Rose M. Carlos e Paulo C. L. Nogueira. Resumidamente, para a síntese do complexo CRX, com fórmula química *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆), foram utilizadas as substâncias RuCl₃.3H₂O, o cloreto de lítio (LiCl), 1,10'-fenatrolina (phen) e a xantoxilina (xant), todas compradas da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) (**Figura 3**). O precursor *cis*-RuCl₂(phen)₂.2H₂O foi obtido na forma de cristais violeta de acordo com procedimento descrito na literatura (DWYER et al., 1963). A xantoxilina (0,0549 g; 0,28 mmol) e a trietilamina (39 mL; 0,28 mmol) foram dissolvidas na proporção 1:1 em solução aquosa de álcool etílico (EtOH/H₂O: 30 mL) e, adicionalmente, 0,15 g (0,26 mmol) de *cis*-[RuCl₂(phen)₂]. A solução foi agitada sob uma atmosfera de N₂ por 8 h sob refluxo. Uma quantidade estequiométrica de NH₄PF₆ foi utilizada para precipitar o complexo e a mistura resultante foi arrefecida a 0 °C *overnight*. O *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆) foi filtrado, lavado em água arrefecida, etanol, éter dietílico e seco a vácuo (rendimento de 80%). A reação do precursor com o ligante xantoxilina levou ao deslocamento do ligante lábil cloreto e a entrada do ligante xantoxilina, previamente desprotonada, na esfera de coordenação formando o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆). A determinação da geometria do complexo formado foi avaliada por técnicas espectroscópicas (IV e RMN ¹H), através de espectrômetro Bruker DRX-400 e Bruker DRX-500. Todas as mudanças químicas (δ) são dadas em ppm com referência ao sinal de hidrogênio do grupo metil do tetrametilsilano (TMS) como padrão interno, e as constantes de acoplamento (J) estão em Hz. As medidas eletroquímicas foram registradas usando um potenciador μAutolab tipo III. As soluções de dimetilformamida tipicamente continham 1 mM do complexo. Um disco de platina servido como o eletrodo de trabalho (d = 0,2 mm) e contador (d = 0,5 mm) e o fio Ag⁺/Ag foi usado como eletrodo de referência. As soluções continham hexafluorofosfato de tetra-nbutilamônio 0,1 M (TBAPF₆) como eletrólito de suporte. Os espectros ópticos foram registrados em um espectrofotômetro UV-vis Agilent 8453. Os espectros infravermelhos foram registrados em um espectrômetro FT-IR Bomem Michelson FT na região 4000 - 400/cm.

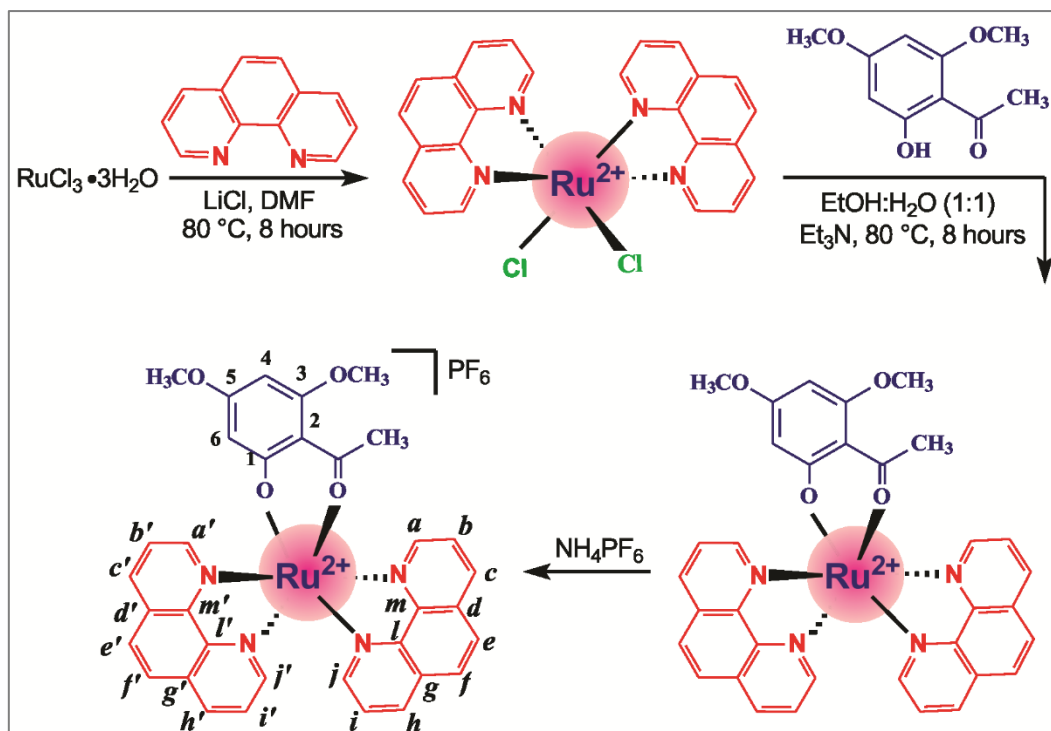


Figura 3: Etapa de preparação do complexo $cis\text{-[Ru(phen)}_2\text{(xant)](PF}_6\text{)}$ a partir do precursor $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

4.2 ENSAIOS *in vitro*

4.2.1 Células

Um painel de quinze linhagens de células tumorais, três tipos celulares não tumorais, uma linhagem mutante e sua linhagem parental foram utilizadas nesse estudo (**Tabela 2**). Os tipos celulares utilizados neste trabalho foram mantidos em garrafas de polipropileno contendo meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF, Cultilab, Campinas, SP, BRA) e 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, BRA), em estufa umidificada a $37\text{ }^\circ\text{C}$ e 5% de CO_2 . O crescimento celular foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido e a troca do meio de cultivo ocorreu sempre que o limite de confluência das células fosse alcançado, ou houvesse necessidade de repor nutrientes. Para a manutenção das linhagens aderentes, foi utilizada uma solução de tripsina EDTA a 0,25% (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) para destacar as células das garrafas de

cultura. Todos os experimentos foram conduzidos com células em fase exponencial de crescimento. Todas as linhagens celulares foram testadas para micoplasma usando um kit de detecção de micoplasma por coloração com Hoechst (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), a fim de evitar o uso de células contaminadas. As PBMC foram isoladas por protocolo padrão utilizando um gradiente de densidade com uso de Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia). Após a separação, as PBMCs foram lavadas duas vezes com solução salina, ressuspensas ($0,3 \times 10^6$ células/ mL) em meio RPMI suplementado com 20% de SBF, 2 mM de glutamina e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina. Para induzir a divisão celular de linfócitos T, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de concanavalina-A (ConA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como agente mitógeno.

Tabela 2. Lista de células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade para determinação de CI_{50}

Células	Tipo Histológico	Origem	Fonte
<i>Células tumorais</i>			
HCT116	Carcinoma de cólon	Humana	ATCC
HT-29	Adenocarcinoma de cólon	Humana	ATCC
MCF-7	Carcinoma de mama	Humana	ATCC
HepG2	Carcinoma hepatocelular	Humana	ATCC
HSC-3	Carcinoma oral de células escamosa	Humana	ATCC
SCC-4	Carcinoma oral de células escamosa	Humana	ATCC
SCC-9	Carcinoma oral de células escamosa	Humana	ATCC
SCC-15	Carcinoma oral de células escamosa	Humana	ATCC
SCC-25	Carcinoma oral de células escamosa	Humana	ATCC
AGP-01	Adenocarcinoma gástrico ascítico	Humana	UFPA
ACP-02	Adenocarcinoma gástrico	Humana	UFPA
ACP-03	Adenocarcinoma gástrico	Humana	UFPA
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana	ATCC
K-562	Leucemia mielogênica crônica	Humana	ATCC
B16-F10	Melanoma	Camundongo	ATCC
<i>Células não tumorais</i>			
MRC-5	Fibroblasto de pulmão	Humana	ATCC
HaCAT	Queratinócito	Humana	ATCC
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico	Humana	Cultura primária
<i>Célula mutante e sua linhagem parental</i>			
BAD KO SV40 MEF	Fibroblasto embrionário imortalizado nocaute para o gene BAD	Camundongo	ATCC
WT SV40 MEF	Fibroblasto embrionário imortalizado do tipo selvagem	Camundongo	ATCC

ATCC indica *American Type Culture Collection*, UFPA indica Universidade Federal do Pará, PA, Brasil (gentilmente doadas pela Dra. Raquel Carvalho Montenegro e pelo Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano); Unicamp indica Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil (gentilmente doadas pelo Dr. Ricardo Della Coletta). As culturas primárias de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas por protocolo padrão de gradiente por densidade de Ficoll. O Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (Salvador, BA, Brasil) aprovou o protocolo experimental (nº 031019/2013).

4.2.2 Avaliação da atividade citotóxica

A avaliação da atividade citotóxica do complexo CRX foi realizado com uso do corante Alamar blue (resazurina, Sigma-Aldrich Co), após 72 h de tratamento. A doxorrubicina (Laboratório IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) e a oxaliplatina (Sigma Chemical, Co) foram usadas como controles positivo, e os poços não-tratados com as substâncias avaliadas receberam apenas o veículo utilizado para solubilizá-las (0,5% de DMSO, Sigma Chemical, Co). Inicialmente, células de linhagens aderentes foram adicionadas a placas de 96 poços ($0,7 \times 10^5$ células/mL em 100 μ L/ poço) e incubadas por 24 h para aderência. O plaqueamento de células não aderentes (HL-60 e K562) também foram realizadas após este período ($0,3 \times 10^6$ células/mL em 100 μ L/ poço). Todas as culturas foram tratadas por um período de 72 h com o composto (0,19 – 25 μ g/mL) dissolvidos em DMSO. Antes do final do período de incubação (4 h para linhagens celulares e 24 h para o PBMC), 20 μ L da solução estoque (0,312 mg/mL) de Alamar blue foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando leitora de placas Spectra Max 190.

4.2.3 Cultura de esferoides 3d multicelulares

As células HepG2 foram cultivadas em esferoides 3D multicelulares. Resumidamente, 100 μ L de uma solução de células ($0,5 \times 10^6$ células/mL) foram inseridos em placas de 96 poços com uma superfície repelente (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) e cultivadas em meio completo mais 3% de matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Os esferoides com estruturas estáveis se formaram após três dias. Em seguida, os esferoides foram expostos por 72 h a diferentes concentrações das substâncias e a viabilidade celular foi quantificada como descrito na metodologia acima.

4.2.4 Avaliação da viabilidade celular – Exclusão por azul de tripam

Para avaliar a viabilidade celular, a cada término do período de tratamento (12, 24, 48 e 72 h) as células foram coletadas e uma alíquota de 90 μ L foi acrescida a 10 μ L do corante azul de tripam. Esse método permite detectar células inviáveis, cuja membrana, por apresentar danos, permite a incorporação do corante e coram-se em azul; enquanto que as células viáveis, por apresentarem membrana íntegra,

expulsão o corante. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer e as imagens analisadas por meio de microscópio óptico (Olympus CX41).

4.2.5 Distribuição subcelular de rutênio

A distribuição subcelular de rutênio em células HepG2 foi realizada por espectroscopia dispersiva de raio-x (EDS) (KIRK et al., 1996), após 3 h de tratamento com o complexo CRX. As células foram fixadas em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M a pH 7,4, contendo 2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído, durante, ao menos 2 h. Após a lavagem, as células foram desidratadas em séries de acetona e infiltradas em resina epóxi polipolar (Polysciences, Warrington, PA). As secções ultrafinas foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão JEM-1230 (TEM) integrado ao sistema de microanálise EDS (JEOL USA, Inc.; Peabody, MA, EUA).

4.2.6 Ensaio de intercalação do DNA

A intercalação do DNA foi avaliada examinando a capacidade do complexo em deslocar o brometo de etídio do DNA do timo de bezerro (ctDNA, Sigma-Aldrich) (GLASS et al., 2010). O ensaio foi conduzido em placas de 96 poços e continha 15 µg/mL de ctDNA, 1,5 µM de brometo de etídio e 10 ou 20 µM de CRX em 100 µL de solução salina. A fluorescência foi mensurada utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 320 e 600 nm, respectivamente.

4.2.7 Quantificação da síntese de DNA

A síntese de DNA celular foi quantificada pela incorporação de metil-[³H]-timidina. O composto foi adicionado juntamente com 1 µCi de metil-[³H]-timidina (PerkinElmer; Shelton, CT, EUA) e incubou-se durante 3 h. Após este período, as culturas foram transferidas para placas-filtro com o auxílio de um coletor de células (Brandel, Inc., Gaithersburg, MD, EUA) onde permaneceram por um período de 24 h para a secagem dos filtros. Para determinar a incorporação de ³H-timidina, 50 µL de um líquido de cintilação Hidex Maxilight (PerkinElmer Life Sciences, Groningen, GE, Holanda) foram adicionados aos poços da placa-filtro, a radiação emitida foi obtida por um contador de partículas β CHAMELEON V (Mustionkatu 2; Turku, Finlândia) e mensurada pelo software MikronWin Hidex 2000 v.4.38 (Microtek Laborsysteme GmbH, Overath, Alemanha). A Mitoxantrona (Sigma-Aldrich) foi

utilizada como o controle positivo. O percentual de DNA sintetizado foi determinado pela relação da radioatividade expressada entre células tratadas e não tratadas.

4.2.8 Avaliação da fragmentação internucleossômica de DNA e distribuição do ciclo celular

A determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o PI (iodeto de propídio) como agente fluorógeno. Decorridos os períodos de tratamento com os compostos, o sobrenadante foi coletado, os poços foram lavados com solução salina, as células foram tripsinizadas e centrifugadas (295 xG/5 minutos) juntamente com o sobrenadante. As células foram diluídas com a solução de permeabilização (200 µL) contendo 0,1 % de triton X-100, 0,1% de citrato de sódio e 2 µg/mL iodeto de propídio e 100 µg/mL RNase em água destilada, na ausência de luz e a 37°C. Após 15 minutos, as células foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). As proporções de DNA fragmentado e as fases do ciclo celular foram obtidas utilizando o software Flowjo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.2.9 Análise morfológica

Para avaliar alterações na morfologia das células, estas foram cultivadas sob lamínula e coradas com May-Grunwald-Giemsa. As alterações morfológicas foram examinadas por microscopia óptica. As características de dispersão da luz foram determinadas por citometria de fluxo, conforme descrito acima. Além disso, as células foram fixadas em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M a pH 7,4, contendo 2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído, por ao menos 2 h. Após a lavagem, as células foram tratadas com 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferricianeto de potássio e 5 mM de cloreto de cálcio durante 1 h. Após a lavagem, as células foram desidratadas em séries de acetona e infiltradas em resina epóxi polipolar. As secções ultrafinas foram coradas com acetato de uranil aquoso a 2% e citrato de chumbo aquoso a 2%, e a análise ultraestrutural foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) usando um microscópio JEM-1230 (JEOL USA, Inc.).

4.2.10 Ensaio de marcação com Anexina-V/IP

Após o tratamento com o complexo CRX, as células HepG2 foram marcadas com anexina V-FITC e PI para determinar a viabilidade celular (viável, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose), de acordo com o protocolo do fabricante (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA). As células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes com solução salina e em seguida, ressuspensas numa solução de 100 μ L do tampão de ligação, 5 μ L de PI e 5 μ L de anexina V-FITC. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, na ausência de luminosidade, 400 μ L de tampão de ligação foram adicionados a cada amostra. As células foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). A proporção de células em apoptose foi determinada pela porcentagem de anexina quantificada utilizando o programa FlowJo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.2.11 Ensaio de reversão utilizando inibidores farmacológicos

Para avaliar o mecanismo apoptótico do complexo CRX sobre células HepG2, foram utilizados os seguintes inibidores: inibidor não seletivo de caspases (Z-VAD(OMe)-FMK, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA); inibidor seletivo de caspase 8 (Z-IETD-FMK; BD Biosciences); inibidor seletivo de caspase 9 (Z-LEHD-FMK; BD Biosciences); inibidor de MAP quinase quinase (MKK, MEK) (U-0126; Cayman Chemical); inibidor de Jun quinase (JNK/ SAPK) (SP 600125; Cayman Chemical), inibidor de p38 MAPK (PD 169316; Cayman Chemical); e inibidor de p53 (pifithrin- α cíclico, Cayman Chemical). Em resumo, as células foram pré-tratadas durante 2 h com 50 μ M de Z-VAD(Ome)-FMK, 20 μ M de Z-IETD-FMK, 20 μ M de Z-LEHD-FMK, 5 μ M de U-0126, 5 μ M de SP 600125, 5 μ M de PD 169316 e 10 μ M de pifitrina- α cíclica, seguido de incubação com 12 μ M de CRX por 48 h. As células foram então tripsinizadas e o ensaio de detecção de apoptose por anexina V-FITC foi conduzido como descrito acima.

4.2.12 Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial

O potencial transmembrana mitocondrial foi determinado pela retenção da rodamina 123 (SUREDA et al., 1997). A rodamina 123 é um corante catiônico verde

florescente capturado pelas mitocôndrias íntegras. Alterações no potencial das membranas mitocondriais reduzem o influxo de rodamina 123 para estas organelas. Assim, as células foram incubadas com rodamina 123 (5 µg/mL, Sigma-Aldrich Co.), a 37°C durante 15 minutos, no escuro e lavadas com solução salina. As células foram então reincubadas em solução salina a 37°C, por mais 30 minutos, no escuro e a fluorescência celular foi determinada por citometria de fluxo, como descrito acima.

4.2.13 Ensaio da atividade de caspases 3, 8 e 9

A atividade da caspase 3 (Sigma-Aldrich), da caspase 8 (BioVision Inc., Milpitas, CA, EUA) e da caspase 9 (Invitrogen; Frederick, MD, EUA) foram avaliadas através de kits colorimétricos, de acordo com as recomendações dos fabricantes. O método é baseado na detecção espectrofotométrica do cromóforo *p*-nitroanilida (*p*NA) após clivagem dos substratos X-*p*NA, onde X representa a sequência de aminoácidos reconhecidos por caspases específicas: Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-*p*NA para a caspase-3; Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-*p*NA para a caspase 8; e Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-*p*NA para caspase 9. Inicialmente, células HepG2 tratadas com o complexo CRX por 48 h foram centrifugadas e lisadas em gelo. A quantidade de proteína no lisado foi determinada utilizando-se o ensaio para dosagem de proteína pelo método já descrito por Bradford (BRADFORD, 1976). Em seguida, 100 µg de proteínas foram incubadas com o substrato em placa de 96 poços. A densidade óptica das amostras foi mensurada a 405 nm em espectrofotômetro.

4.2.14 Avaliação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Os níveis de espécies reativas de oxigênio foram mensurados de acordo com o procedimento previamente descrito por LeBel et al., (1992). Devido a uma maior sensibilidade, os métodos fluorescentes têm sido extremamente utilizados para monitorar a produção de ERO. Neste experimento, foi utilizado o reagente diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H₂-DCF-DA) (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA), que é um indicador de ERO intracelular (reativo ao H₂O₂), pois, penetra na membrana plasmática e é mantido depois que esterases intracelulares clivam os grupos acetato que são convertidos num produto verde fluorescente na presença de ERO. As células HepG2 foram tratadas com o complexo CRX por 1 h

e 3 h. Em seguida, as células foram tripsinizadas, lavadas e incubadas em 1 mL de solução salina e 5 μM de $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$. Após 30 minutos de incubação a 37°C , na ausência de luminosidade, as células foram centrifugadas (295 xG/5 minutos), ressuspensas em salina e adquiridas imediatamente em citômetro de fluxo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

O ensaio de proteção usando o anti-oxidante *N*-acetil-*L*-cisteína (NAC, Sigma-Aldrich) também foi realizado. Em resumo, as células foram pré-tratadas durante 1 h com 5 mM de NAC, depois incubadas com 12 μM de CRX durante 24 h. As células foram então tripsinizadas e o ensaio de exclusão do corante de azul de tripam foi realizado.

4.2.15 Análise da expressão gênica

As células HepG2 foram plaqueadas em garrafas para cultura celular (7×10^4 células/mL). Após 12 h de incubação com 12 μM de CRX, o RNA total foi isolado das células usando microcolunas de sílica-Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi avaliado por fluorimetria usando QuBit™ (Life Technologies; Camarillo, CA, EUA). A transcrição reversa de RNA foi realizada usando Superscript VILO™ (Invitrogen Corporation, Waltham, MA, EUA). Para as reações de PCR quantitativo em tempo real foram utilizados TaqMan Gene Expression Assays™ (Life Technologies) inventoriados para TaqMan Array Human Molecular Mechanisms of Cancer 96 plate, Fast (ID 4418806, Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA) para o estudo de expressão gênica por *q*PCR. As reações foram conduzidas no aparelho ABI ViiA7 (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA), utilizando placa Fast de 96 poços e com um volume total de 20 μL . As condições do ciclo compreenderam 2 minutos a 50°C , 20 segundos a 95°C , 40 ciclos de 3 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C . A quantificação relativa (QR) da expressão de mRNA foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) usando o software Gene Expression Suite™ (Applied Biosystems™) e as células tratadas com o controle negativo (0,2% DMSO) foram utilizadas como calibrador. As reações foram normalizadas através da média geométrica de QR dos genes de referência GAPDH, 18S e HPRT1. Todos os experimentos foram realizados em condições livres de Dnase/Rnase. Os genes foram considerados regulados positivamente quando $\text{QR} \geq 2$, o que significa que a

expressão do gene em células tratadas com CRX foi pelo menos duas vezes maior que nas células tratadas com controle negativo. Da mesma forma, os genes foram considerados como regulados negativamente se $QR \leq 0,5$, o que significa que a expressão do gene em células tratadas com CRX foi metade ou menos da metade em células tratadas com controle negativo.

4.2.16 Quantificação de proteínas MAPK fosforiladas

A análise das proteínas fosforiladas ERK 1/2 (quinase regulada por sinal extracelular), JNK/ SAPK e p38 MAPK foi realizada por citometria de fluxo (CHOW et al., 2001). Células HepG2 foram tratadas por 15 minutos, 30 minutos e 24 h com 12 μ M de CRX. Posteriormente, as células foram recolhidas em tubos de citômetro, ressuspensas em 0,5 – 1 mL de formaldeído a 4% e fixadas durante 10 minutos a 37°C. Em seguida, os tubos foram resfriados em gelo durante 1 minuto. As células foram permeabilizadas por adição de 100% de metanol gelado, enquanto se agitava suavemente, até que uma concentração final de 90% de metanol fosse atingida. As amostras foram incubadas por 30 minutos em gelo e a lavadas com tampão de incubação (0,5% de albumina de soro bovino em PBS). As células foram novamente ressuspensas em solução tampão de incubação contendo anticorpos específicos marcados com o fluorocromo PE: anti-ERK1/2 (pT202/pY204), anti-JNK/SAPK (pT183/pY185), anti-p38 MAPK (pT180/pY182) ou IgG1 (anticorpo κ de controle isotipo), todos da BD Biosciences. As amostras foram incubadas por mais 1 h à temperatura ambiente. Finalmente, as células foram lavadas com PBS e a fluorescência foi determinada por citometria de fluxo, como descrito acima.

4.3 ENSAIOS *in vivo*

4.3.1 Animais

Um total de 78 camundongos mutantes portadores de imunodeficiência combinada severa (SCID) da linhagem CB-17 (fêmeas, 25-30 g) foram obtidos e mantidos nas instalações de animais do Instituto Gonçalo Moniz-FIOCRUZ (Salvador, Bahia, Brasil). Os animais foram alojados em gaiolas com acesso livre a alimentos e água. Todos os animais foram mantidos sob um ciclo de claro/ escuro

de 12:12 h (luzes acesas às 6:00 da manhã). O Comitê local de ética animal aprovou o protocolo experimental de número 06/2015.

4.3.2 Modelo xenográfico de carcinoma hepatocelular humano

Células HepG2 (10^7 células/500 μ L) foram implantadas subcutaneamente na região axilar da pata dianteira esquerda dos camundongos. No início do experimento, os camundongos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos: grupo 1: animais que receberam injeção de veículo (solução de DMSO a 5%, $n = 15$); grupo 2: animais que tratados com doxorrubicina (DOX, 0,3 mg/ kg, $n = 14$, Laboratório IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina); grupo 3: animais que tratados com 5-fluorouracil (5-FU, 10 mg/ kg, $n = 15$, Sigma-Aldrich); grupo 4: animais tratados com CRX (2,5 mg/ kg, $n = 14$); grupo 5: animais tratados com CRX (5 mg/ kg, $n = 14$). Os tratamentos foram iniciados um dia após a injeção do tumor. Os animais foram tratados pela via intraperitoneal (200 μ L por animal) uma vez por dia durante 21 dias consecutivos. No 22^o dia, os animais foram anestesiados e amostras de sangue periférico foram coletadas da artéria braquial. Os animais foram eutanasiados por superdosagem anestésica e os tumores foram excisados e pesados.

4.3.3 Avaliação toxicológica

Para avaliar os efeitos toxicológicos, os camundongos foram pesados no início e no final do experimento. Ao longo do período experimental, foram realizadas avaliações diárias comportamentais a fim de qualificar possíveis efeitos tóxicos relacionados ao tratamento. Os parâmetros (motricidade, tremores, tônus musculares, deambulação, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia, irritabilidade e morte) foram observados durante os 21 dias de tratamento. A análise hematológica foi realizada por microscopia óptica. O fígado, rins, pulmões e coração foram removidos, pesados e examinados quanto a sinais de lesões graves, alterações de cor e/ou hemorragia. Após análise macroscópica, tumores e órgãos foram fixados em tampão de formalina a 4% e incluídos em parafina. As secções de tecido foram coradas com hematoxilina e eosina, e um patologista realizou análises por microscopia óptica.

4.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. ou CI_{50} e seus intervalos de confiança de 95% (IC 95%) obtidos por regressão não linear. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas por análise de variância (ANOVA) seguida do teste Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 5.01 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 O COMPLEXO DE RUTÊNIO COM XANTOXILINA EXIBE UMA CITOTOXICIDADE POTENTE EM UM PAINEL DE DIFERENTES CÉLULAS TUMORAIS

O efeito citotóxico do complexo CRX foi avaliado em um painel de 15 linhagens de células tumorais e 3 tipos celulares não tumorais através do ensaio do Alamar Blue, após 72 h de tratamento, em cultura de monocamada (modelo 2D). A **Tabela 3** mostra os valores obtidos. Os valores de CI_{50} do complexo CRX variaram entre 1,6 – 26,0 μM para as linhagens tumorais HCT116 e ACP-03, respectivamente. Os valores de CI_{50} encontrados para as células não tumorais foram de 21,3, 6,1 e 4,6 μM para MRC-5, HaCAT e PBMC, respectivamente. A xantoxilina livre de metal não foi citotóxica para qualquer célula testada ($CI_{50} > 127,42 \mu\text{M}$). A doxorubicina apresentou valores de CI_{50} entre 0,2 e 6,8 μM para as linhagens tumorais HCT116 e ACP-02, enquanto que para as células não tumorais, os valores de CI_{50} foram de 1,3, 0,1 e 5,2 μM para as MRC-5, HaCAT e PBMC, respectivamente. A oxaliplatina apresentou valores de CI_{50} de 0,6 e 7,7 μM para células tumorais HL-60 e SCC-4, enquanto que, os valores encontrados para as células não tumorais MRC-5 e PBMC foram de 9,5 e 9,4 μM , respectivamente. A **Tabela 4** mostra o índice de seletividade calculado (IS). O CRX exibiu IS semelhante ou superior à dos controles positivo doxorubicina e oxaliplatina na maioria das linhagens celulares testadas.

O efeito citotóxico do complexo CRX também foi avaliado *in vitro* num modelo tridimensional (3D) de esferoides multicelulares formados por células HepG2. As mudanças morfológicas dos esferoides tratados com o complexo CRX indicaram permeabilidade do complexo na cultura 3D (**Figura 4A**). O valor encontrado de CI_{50} para CRX foi de 8,0 μM , após 72 h de tratamento (**Figura 4B**). A doxorubicina e a oxaliplatina exibiram valores de CI_{50} de 18,1 e 6,6 μM , respectivamente.

A viabilidade celular após o tratamento com CRX foi confirmada pelo ensaio de exclusão com o corante azul de tripam em células HepG2 após 12, 24, 48 e 72 h de incubação (**Figura 5**). Nas concentrações de 12 e 24 μM , CRX reduziu o número de células viáveis em 57,2% e 62,2% após 24 h, 74,6% e 73,9% após 48

h, e 73,8% e 82,1% após 72 h, respectivamente. Não houve redução significativo no número de células viáveis após 12 h de incubação. Além disso, CRX induziu um aumento significativo no número de células não viáveis apenas após 48 e 72 h de incubação. Doxorubicina e oxaliplatina também reduziram o número de células viáveis a partir de 24 h de incubação. A doxorubicina também induziu um aumento significativo no número de células não viáveis após 72 h de incubação. A partir desses resultados, a linhagem HepG2 de carcinoma hepatocelular foi utilizada como modelo para as avaliações posteriores realizadas neste estudo.

Tabela 3. Atividade citotóxica do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX)

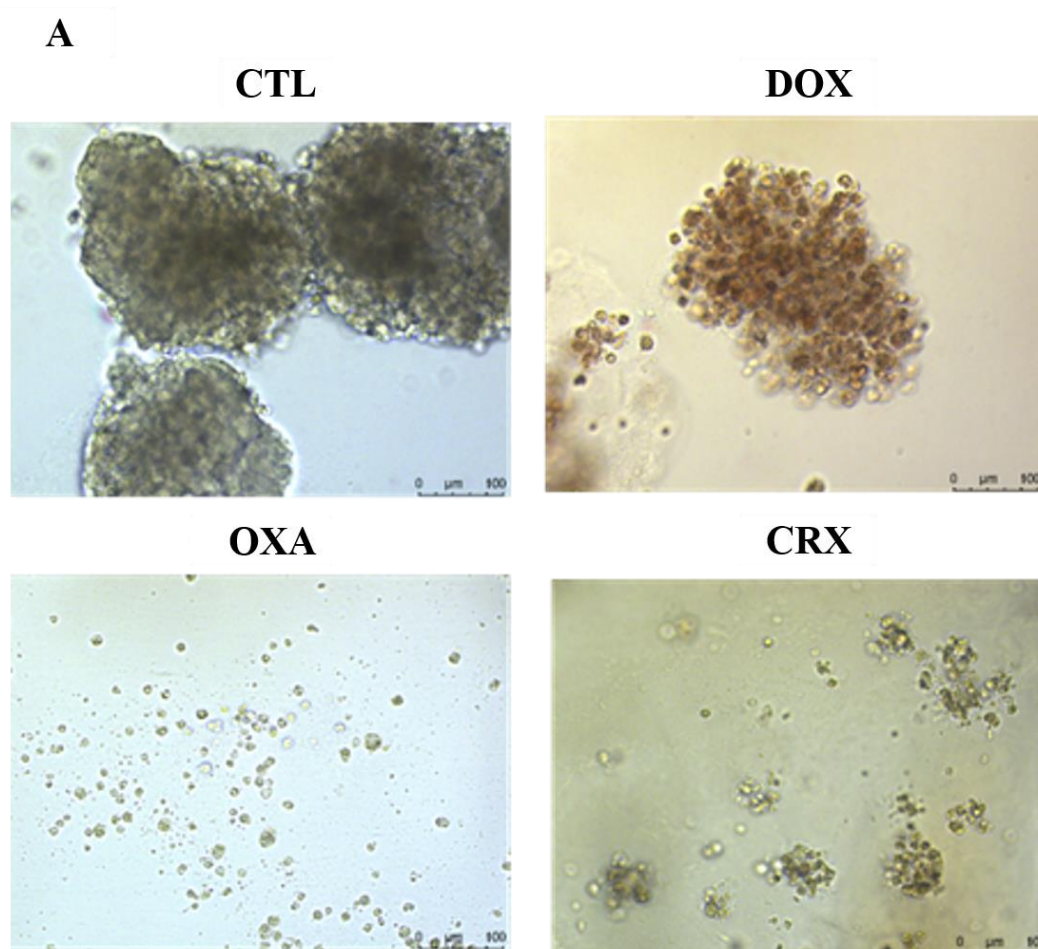
Células	Tipo histológico	CI ₅₀ em μM		
		DOX	OXA	CRX
HCT116	Células cancerosas			
	Carcinoma de cólon humano	0,2 0,1 – 0,3	4,1 2,3 – 5,5	1,6 1,2 – 2,2
HT-29	Carcinoma de cólon humano	0,3 0,2 – 0,4	n.d.	3,4 2,4 – 4,8
	Carcinoma de mama humano	1,1 0,3 – 3,5	5,9 3,5 – 9,9	22,4 18,6 – 27,1
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano	1,3 1,0 – 1,8	2,2 1,3 – 3,8	13,5 11,6 – 15,8
HSC-3	Carcinoma oral de células escamosas humano	0,4 0,1 – 1,2	3,3 1,4 – 7,8	7,7 3,2 – 18,5
SCC-4	Carcinoma oral de células escamosas humano	2,1 1,7 – 2,6	7,7 4,6 – 13,0	5,3 4,0 – 7,1
SCC-9	Carcinoma oral de células escamosas humano	2,6 2,0 – 3,3	n.d.	3,4 1,8 – 6,5
SCC-15	Carcinoma oral de células escamosas humano	1,5 0,8 – 2,9	n.d.	6,8 3,7 – 11,9
SCC-25	Carcinoma oral de células escamosas humano	1,0 0,5 – 2,3	n.d.	6,5 5,2 – 8,0
AGP-01	Adenocarcinoma gástrico ascítico humano	1,9 0,9 – 4,3	n.d.	5,3 4,0 – 7,1
ACP-02	Adenocarcinoma gástrico humano	6,8 1,1 – 24,3	n.d.	18,3 14,2 – 23,5
ACP-03	Adenocarcinoma gástrico humano	2,4 0,9 – 6,0	n.d.	26,0 18,9 – 36,0
HL-60	Leucemia promielocítica humana	0,2 0,2 – 0,3	0,6 0,1 – 0,8	6,6 3,7 – 11,7
K-562	Leucemia mielogênica crônica humana	1,0 0,6 – 1,8	1,0 0,1 – 1,3	6,1 3,7 – 10,0
B16-F10	Melanoma murino	0,6 0,4 – 0,7	2,2 1,2 – 4,1	12,44 9,2 – 16,8
Células não tumorais				
MRC-5	Fibroblasto humano de pulmão	1,3 1,0 – 1,5	9,5 5,7 – 15,9	21,3 17,0 – 26,7
HaCAT	Queratinócito humano	0,1 0,02 – 0,6	n.d.	6,1 3,1 – 12,0
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico humano	5,2 2,4 – 11,4	9,4 6,5 – 11,4	4,6 2,3 – 9,1

Dados são apresentados como valores de CI₅₀ em μM e seus respectivos intervalos de confiança de 95% obtidos por regressão não linear de três experimentos independentes realizados em duplicatas pelo método de Alamar blue, após 72 h de tratamento. A doxorubicina (DOX) e a oxaliplatina (OXA) foram usadas como controles positivo. N.d. (não determinado).

Tabela 4. Índice de seletividade do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX)

Células tumorais	Células não tumorais								
	MRC5			HaCAT			PBMC		
	DOX	OXA	CRX	DOX	OXA	CRX	DOX	OXA	CRX
HCT116	6,5	2,3	13,3	0,5	N.d.	3,8	26	2,3	2,9
HT-29	4,3	N.d.	6,3	0,3	N.d.	1,8	17,3	N.d.	1,4
MCF-7	1,2	1,6	1	0,1	N.d.	0,3	4,7	1,6	0,2
HepG2	1	4,3	1,6	0,1	N.d.	0,5	4	4,3	0,3
HSC-3	3,3	2,9	2,8	0,3	N.d.	0,8	13	2,8	0,6
SCC-4	0,6	1,2	4	0,1	N.d.	1,2	2,5	1,2	0,9
SCC-9	0,5	N.d.	6,3	0,04	N.d.	1,8	2	N.d.	1,4
SCC-15	0,9	N.d.	3,1	0,1	N.d.	0,9	3,5	N.d.	0,7
SCC-25	1,3	N.d.	3,3	0,1	N.d.	0,9	5,2	N.d.	0,7
AGP-01	0,7	N.d.	4	0,1	N.d.	1,2	2,7	N.d.	0,9
ACP-02	0,2	N.d.	1,2	0,02	N.d.	0,3	0,8	N.d.	0,3
ACP-03	0,5	N.d.	0,8	0,04	N.d.	0,2	2,2	N.d.	0,2
HL-60	6,5	15,8	3,2	0,5	N.d.	0,9	26	15,7	0,7
K-562	1,3	9,5	3,5	0,1	N.d.	1	5,2	9,4	0,8
B16-F10	2,2	4,3	1,7	0,2	N.d.	0,5	8,7	4,3	0,4

Os dados são apresentados o índice de seletividade (IS) calculado com a seguinte fórmula: $IS = CI_{50} \text{ [células não tumorais]} / CI_{50} \text{ [células tumorais]}$. Células tumorais: HCT116 (carcinoma do cólon humano); HT-29 (adenocarcinoma do cólon humano); MCF7 (adenocarcinoma de mama humano); HepG2 (carcinoma hepatocelular humano); HSC-3 (carcinoma epidermóide oral humano); SCC-4 (carcinoma epidermóide oral humano); SCC-9 (carcinoma epidermóide oral humano); SCC-15 (carcinoma epidermóide oral humano); SCC-25 (carcinoma epidermóide oral humano); AGP-01 (adenocarcinoma gástrico ascítico humano), ACP-02 (adenocarcinoma gástrico humano), ACP-03 (adenocarcinoma gástrico humano), HL-60 (leucemia promielocítica humana); K-562 (leucemia mielóide crônica humana); e B16-F10 (melanoma murino). Células não tumorais: MRC-5 (fibroblasto pulmonar humano), HaCAT (queratinócito humano) e PBMC (células mononucleares de sangue periférico humano). Doxorubicina (DOX) e oxaliplatina (OXA) foram utilizados como controles positivos. N.d. Não determinado.

**B**

Esferoides	CI ₅₀ em μM		
	DOX	OXA	CRX
HepG2	18,1	6,6	8,0
	11,0 – 24,3	5,0 – 7,8	5,5 – 11,5

Figura 4. Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em modelo 3D *in vitro* de esferoides multicelulares formados por células HepG2. **(A)** Células avaliadas por microscopia de luz (barra = 100 μm). **(B)** Valores de CI₅₀ em μM e seus respectivos intervalos de confiança 95% obtidos por regressão não linear de três experimentos independentes realizados em duplicatas, mensurados pelo ensaio de Alamar blue após 72 h de incubação. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0.2% DMSO) usado para solubilizar o composto testado. Doxorubicina (DOX) e oxaliplatina (OXA) foram usados como controles positivos.

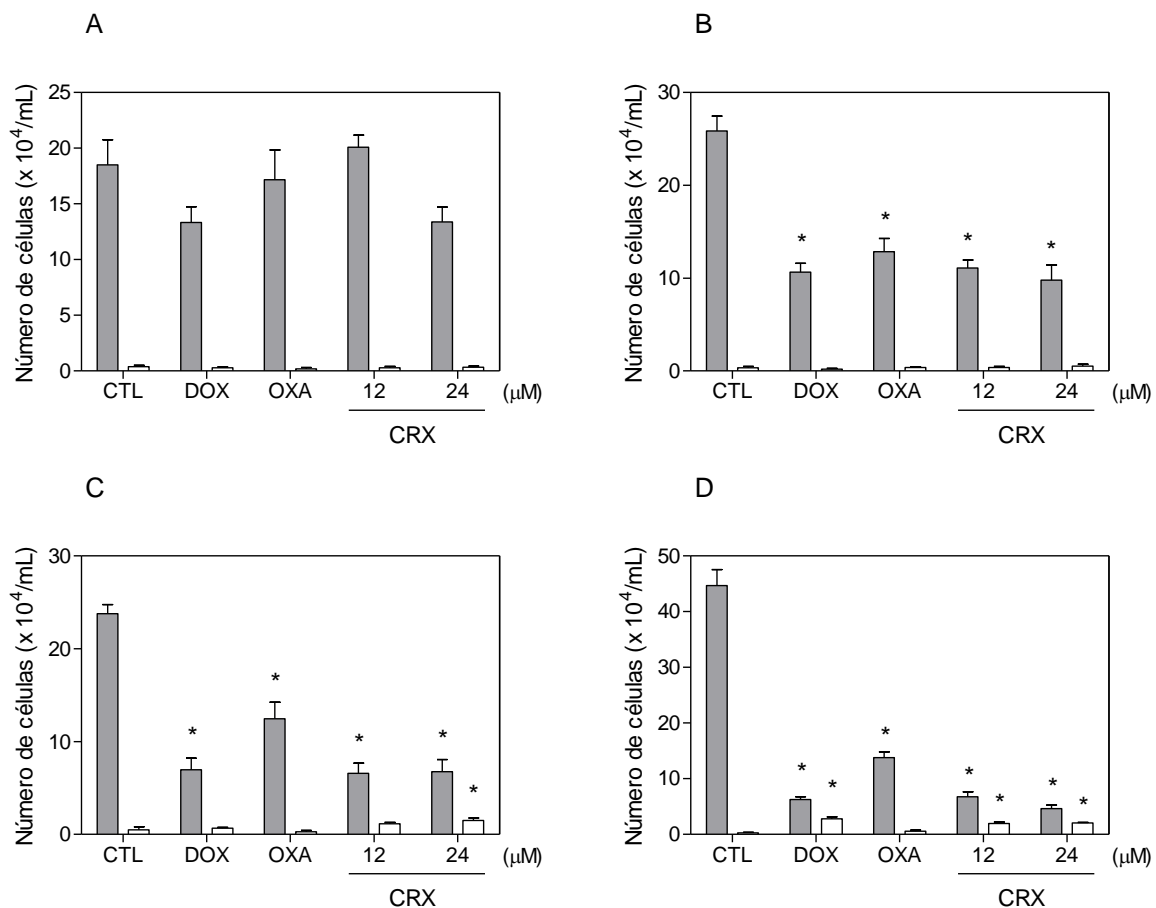


Figura 5. Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre a viabilidade de células HepG2 determinadas por exclusão com o corante azul de tripam, após 12 h (A), 24 h (B), 48 h (C) e 72 h (D) de incubação. As barras cinzas representam as células viáveis e as barras brancas representam as células não viáveis. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (DMSO a 0,2 %) utilizado para solubilizar a substância testada. A doxorubicina (DOX, 2 μM) e a oxaliplatina (OXA, 10 μM) foram usadas como controles positivo. Os dados são apresentados como a média ± E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * P < 0,05 quando comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

5.2 O COMPLEXO DE RUTÊNIO COM XANTOXILINA ACUMULA-SE NO NÚCLEO DA CÉLULA, INDUZ INTERCALAÇÃO DO DNA E INIBE A SÍNTESE DE DNA

A distribuição subcelular do rutênio foi avaliada por EDS em células HepG2 tratadas com complexo CRX após 3 h de incubação. A oxaliplatina, controle positivo, foi utilizada para determinar a distribuição subcelular da platina. Semelhante à oxaliplatina, CRX foi detectado tanto no citoplasma como no núcleo das células HepG2, porém, em maior concentração no núcleo celular (**Figura 6A**). Assim, decidimos investigar se CRX poderia induzir intercalação de DNA. A intercalação de DNA foi avaliada em um sistema livre de células usando ctDNA como modelo. Para isso, CRX foi adicionado à uma mistura de brometo de etídio e DNA para examinar sua capacidade de deslocar o brometo de etídio do DNA, diminuindo assim a intensidade de fluorescência do brometo de etídio. O tratamento com CRX (20 μM) diminuiu a fluorescência do brometo de etídio ($P < 0,05$), indicando que CRX é um intercalador de DNA (**Figura 6B**). A doxorrubicina (20 μM), um intercalador de DNA conhecido, foi usada como controle positivo e também reduziu significativamente a fluorescência do brometo de etídio. Como CRX foi capaz de induzir a intercalação do DNA, foi investigada a sua interferência sobre a síntese de DNA em células HepG2. A síntese de DNA foi mensurada pela incorporação de metil-[^3H]-timidina após 3 h de incubação com o complexo. Nas concentrações de 12 e 24 μM , CRX reduziu a síntese de DNA das células HepG2 em 46,4 e 65,2% ($P < 0,05$) (**Figura 6C**). A mitoxantrona (12 μM), um inibidor de síntese de DNA conhecido, foi usada como controle positivo e reduziu a síntese de DNA em 55,2%.

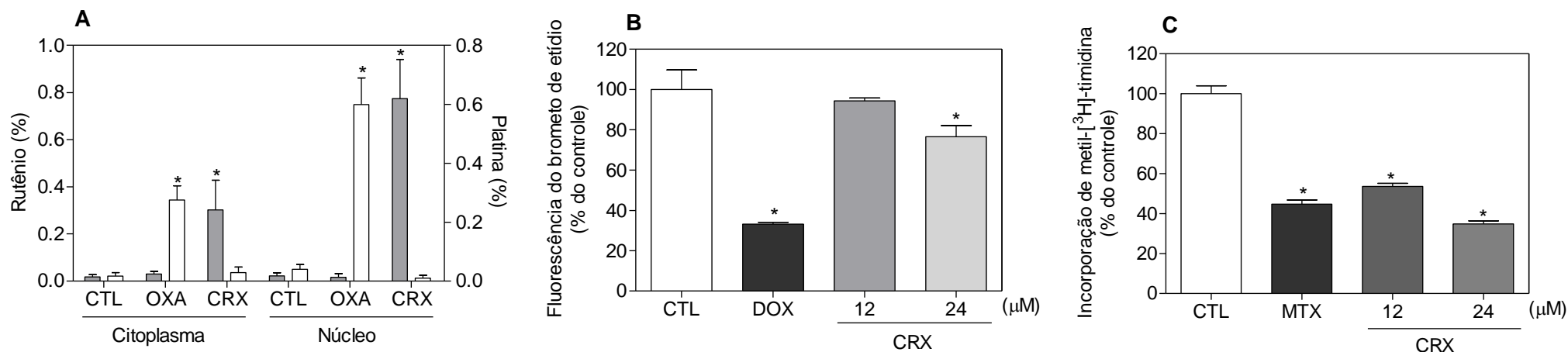


Figura 6. Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre a distribuição subcelular do rutênio, indução da intercalação com o DNA e inibição da síntese de DNA. **(A)** A distribuição subcelular do rutênio foi determinada por espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) em células HepG2, após 3 h de tratamento com 250 μ M de CRX. As células não tratadas foram utilizadas como controle negativo (CTL). A oxaliplatina (OXA, 500 μ M) foi utilizada como controle positivo e a distribuição subcelular da platina foi determinada. As barras cinzas representam a porcentagem de rutênio e as barras brancas representam a porcentagem de platina. Dez células foram analisadas em cada grupo tratado. **(B)** A intercalação do CRX com o DNA foi avaliada através da capacidade do CRX em deslocar o brometo de etídio do DNA de timo de bezerro. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (DMSO a 0,2 %) usado para solubilizar a substância testada. A doxorrubicina (DOX, 20 μ M) foi usada como controle positivo. **(C)** A quantificação da síntese de DNA foi determinada pela incorporação de metil-[³H]-timidina em células HepG2, após 3 h de incubação. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (DMSO a 0,2 %) utilizado para solubilizar a substância testada. A Mitoxantrona (MTX, 12 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados foram apresentados como médias \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

5.3 O COMPLEXO DE RUTÊNIO COM XANTOXILINA CAUSA PARADA EM FASE S EM CÉLULAS HepG2

A progressão do ciclo celular de células HepG2 tratadas com CRX foi avaliada por citometria de fluxo após 12, 24, 48 e 72 h de incubação. A **Tabela 6** evidencia a distribuição do ciclo celular obtida. Todo o DNA que era sub-diploide (sub-G₀/G₁) foi considerado fragmentado. Na concentração de 12 µM, o tratamento com CRX resultou em um aumento significativo no número de células na fase S em comparação com o controle negativo (P <0,05) após 24 h de incubação. Além do aumento de células na fase S, observou-se também um aumento na fragmentação do DNA internucleossômico a partir de 12 h de incubação para ambas as concentrações testadas (P <0,05). A doxorrubicina e o oxaliplatina causaram bloqueio do ciclo celular na fase G₂/M, seguido pela fragmentação do DNA.

Tabela 5. Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre a distribuição do ciclo celular de células HepG2

Tratamento	Concentração (μM)	Conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G ₀ /G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
12 h incubação					
CTL	-	4,4 \pm 0,7	55,2 \pm 2,0	13,3 \pm 1,2	17,6 \pm 1,3
DOX	2	13,4 \pm 1,2*	51,9 \pm 4,8	6,9 \pm 0,1	22,6 \pm 2,6
OXA	10	6,2 \pm 0,7	44,4 \pm 4,7	12,9 \pm 4,4	43,5 \pm 3,4*
CRX	12	9,6 \pm 1,1*	66,4 \pm 4,0	18,0 \pm 7,4	13,3 \pm 1,1
	24	13,0 \pm 2,5*	68,9 \pm 2,2	8,6 \pm 4,5	13,9 \pm 1,6
24 h incubação					
CTL	-	1,2 \pm 0,2	58,9 \pm 0,9	15,7 \pm 0,3	20,5 \pm 1,2
DOX	2	16,8 \pm 4,3*	20,9 \pm 3,3*	8,9 \pm 2,3*	66,9 \pm 5,5*
OXA	10	4,8 \pm 0,5	26,0 \pm 1,1*	18,5 \pm 1,4	47,1 \pm 0,7*
CRX	12	15,3 \pm 0,6*	38,2 \pm 1,2*	22,4 \pm 0,7*	17,6 \pm 0,9
	24	34,7 \pm 1,4*	29,9 \pm 2,7*	13,0 \pm 1,6	13,0 \pm 1,3
48 h incubação					
CTL	-	1,2 \pm 0,5	61,9 \pm 1,2	14,8 \pm 1,2	14,9 \pm 0,5
DOX	2	20,9 \pm 1,0*	34,6 \pm 2,7*	9,1 \pm 1,9	31,1 \pm 3,3*
OXA	10	6,8 \pm 1,3	34,7 \pm 3,7*	21,2 \pm 1,7*	33,7 \pm 1,5*
CRX	12	44,1 \pm 6,3*	23,3 \pm 2,0*	11,5 \pm 2,7	9,0 \pm 0,8*
	24	62,6 \pm 3,4*	18,9 \pm 3,0*	10,3 \pm 1,3	6,5 \pm 0,7*
72 h incubação					
CTL	-	3,6 \pm 0,7	64,4 \pm 2,1	12,4 \pm 1,1	13,1 \pm 1,4
DOX	2	46,6 \pm 2,8*	31,6 \pm 5,1*	12,5 \pm 1,1	16,3 \pm 1,1
OXA	10	17,6 \pm 3,9*	30,1 \pm 5,1*	16,2 \pm 1,1	38,0 \pm 5,4*
CRX	12	42,6 \pm 6,8*	23,6 \pm 1,9*	13,2 \pm 0,8	11,1 \pm 1,8
	24	68,2 \pm 3,7*	19,7 \pm 3,3*	4,9 \pm 1,1*	6,7 \pm 0,7

Dados apresentados como a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para solubilizar a substância testada. A doxorubicina (DOX, 2 μM) e a oxaliplatina (OXA, 10 μM) foram usadas como controles positivo. Dez mil eventos foram analisados e os detritos celulares foram omitidos da análise. * P < 0,05 quando comparado ao controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

5.4 O COMPLEXO DE RUTÊNIO COM XANTOXILINA DESENCADEIA APOPTOSE MEDIADA POR CASPASE DE CÉLULAS HepG2

Usando microscópio de luz para analisar a morfologia celular, observa-se uma redução da população e do volume celular, além de características morfológicas de apoptose (fragmentação nuclear e condensação da cromatina) nas células tratadas com CRX a partir de 24 h de tratamento com ambas as concentrações do complexo, entretanto, as alterações mais evidentes foram observadas a partir de 48 h de tratamento (**Figura 7**). Além disso, CRX causou encolhimento celular observado pelo decréscimo da dispersão luminosa para a frente (FSC) e condensação nuclear, como observado por um aumento na dispersão lateral (SSC) (**Figura 8**). A doxorrubicina e a oxaliplatina utilizadas como controles positivo também causaram alterações condizentes com mecanismos apoptóticos de morte quando comparada ao controle negativo.

Adicionalmente, a análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão corroborou com os resultados descritos acima, indicando o efeito de CRX sobre a morfologia das células HepG2, que após tratamento com o complexo, apresentaram alterações características de apoptose como o encolhimento celular, a presença de *blebs* na membrana, corpos apoptóticos e fragmentação nuclear (**Figura 9**). A doxorrubicina e a oxaliplatina utilizadas como controles positivo também induziram alterações condizentes à apoptose.

A avaliação do perfil de morte celular foi verificada a partir da externalização da fosfatidilserina (**Figura 10**), através da ligação de anexina V a fosfolipídios de membrana celular das células HepG2 tratadas com CRX por 12, 24, 48 e 72 h. Os resultados obtidos demonstram uma exposição significativa de fosfatidilserina em células HepG2 tratadas com CRX, em ambas as concentrações testadas (12 e 24 μM) e em todos os tempos avaliados. A doxorrubicina (DOX, 2 μM) e a oxaliplatina (OXA, 10 μM) utilizadas como controles positivo também induziram aumento na externalização da fosfatidilserina, de modo significativo nos tempos de tratamento avaliados quando comparados ao grupo controle negativo (DMSO 0,2%).

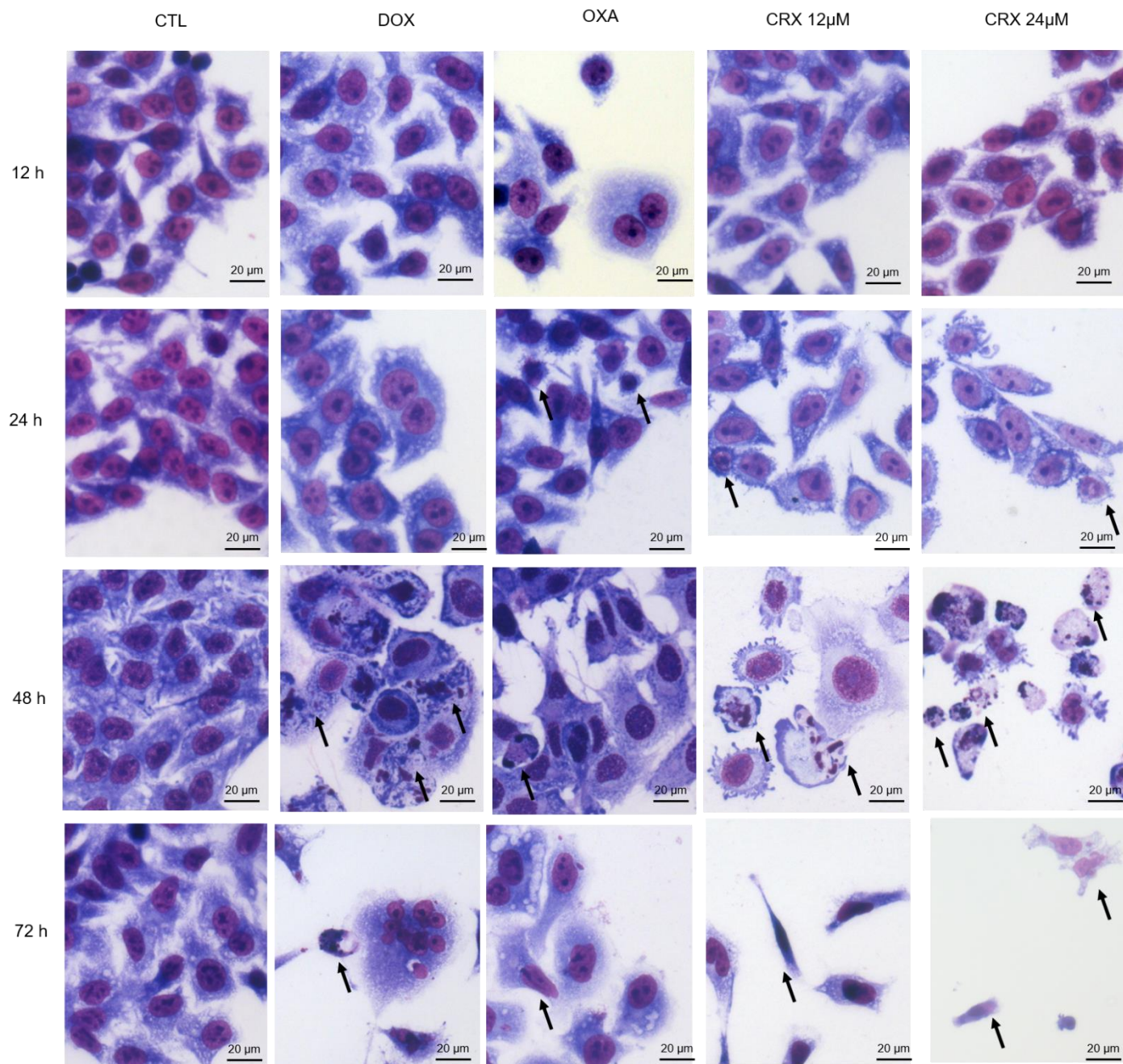


Figura 7. Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre a morfologia de células HepG2 após 12, 24, 48 e 72 h de incubação. As células foram coradas com May-Grunwald-Giemsa e examinadas por microscopia óptica (barra = 20 µm). As setas indicam encolhimento celular ou células com DNA fragmentado. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para diluir o composto testado. Doxorrubicina (DOX, 2 µM) e oxaliplatina (OXA, 10 µM) foram utilizados como controles positivo.

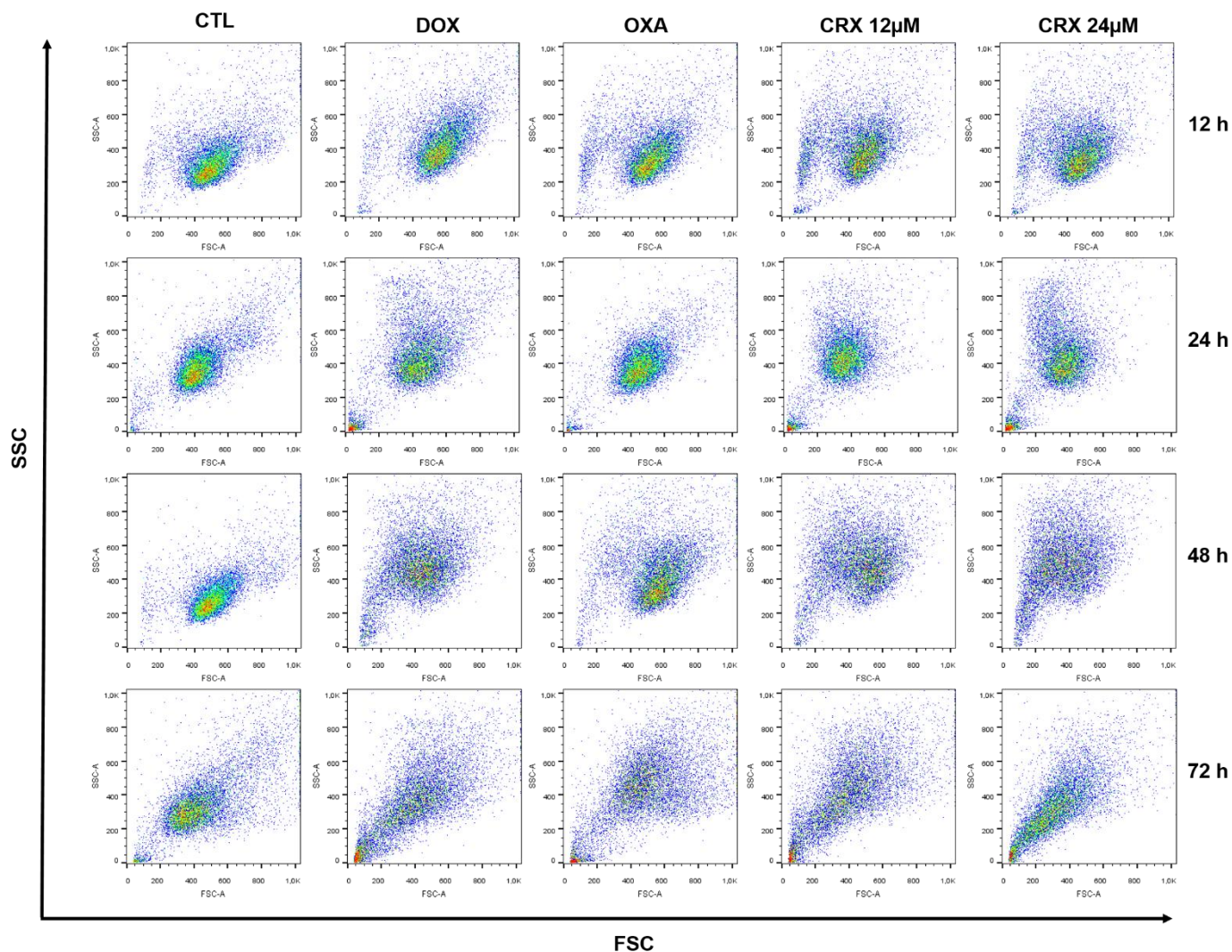


Figura 8. Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) na análise morfológica de células HepG2 após 12, 24, 48 e 72 h de incubação. As características de dispersão de luz foram determinadas por citometria de fluxo. Dez mil eventos foram avaliados por experimento e detritos celulares foram omitidos da análise. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para solubilizar o composto testado. A doxorubicina (DOX, 2 µM) e oxaliplatina (OXA, 10 µM) foram utilizados como controles positivo. FSC (*Forward scatter* – desvio de luz para frente) e SSC (*Side scatter* – desvio de luz para o lado) foram usados como parâmetros de tamanho relativo e granulosidade ou complexidade interna da célula.

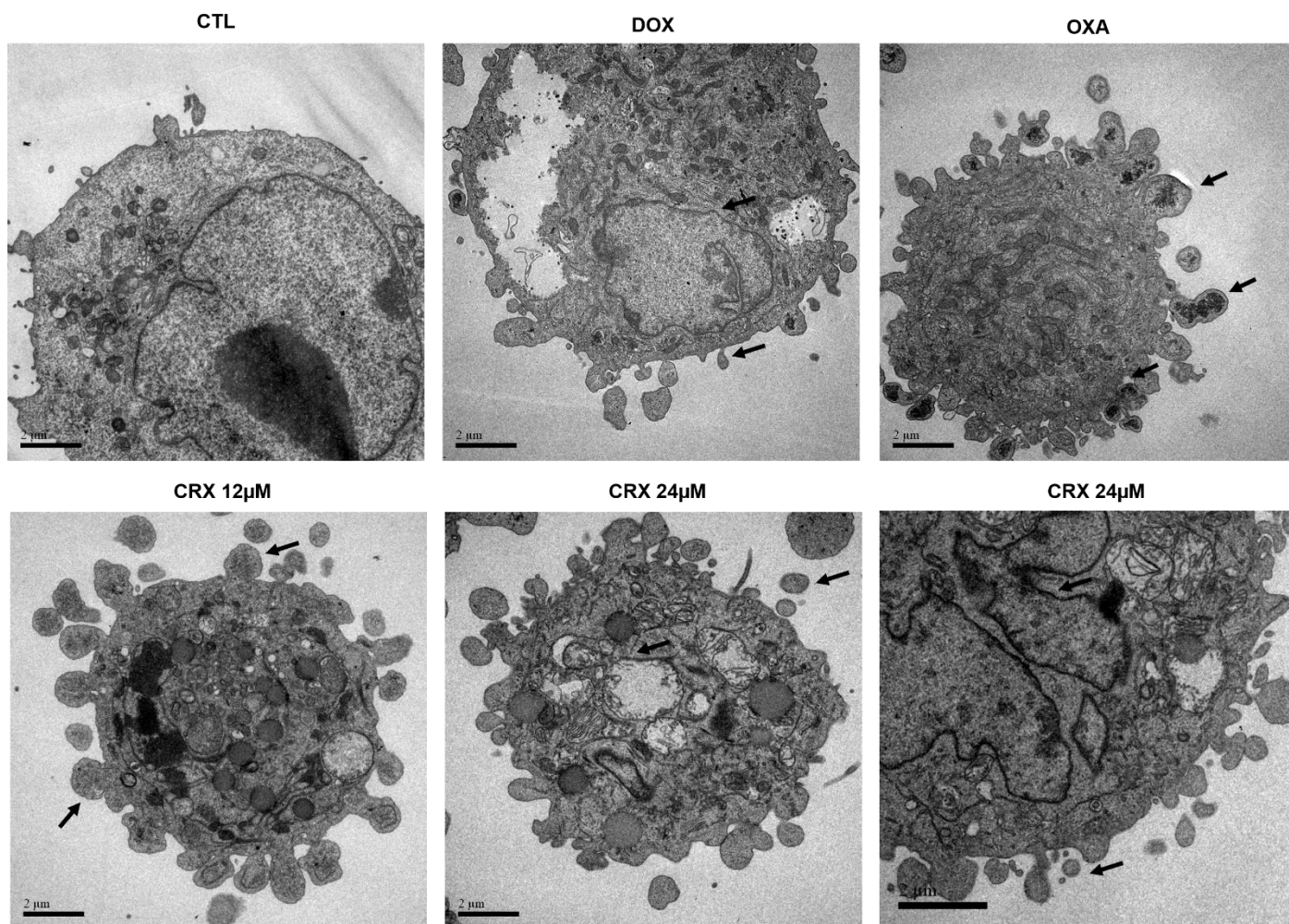


Figura 9. Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) na análise morfológica de células HepG2 examinadas por microscópio eletrônico de transmissão após 24 h de incubação. As setas indicam células com fragmentação nuclear, presença de *blebs* na membrana e/ ou corpos apoptóticos (barra = 2 µm). O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para solubilizar o composto testado. Doxorubicina (DOX, 2 µM) e oxaliplatina (OXA, 10 µM) foram utilizados como controles positivo.

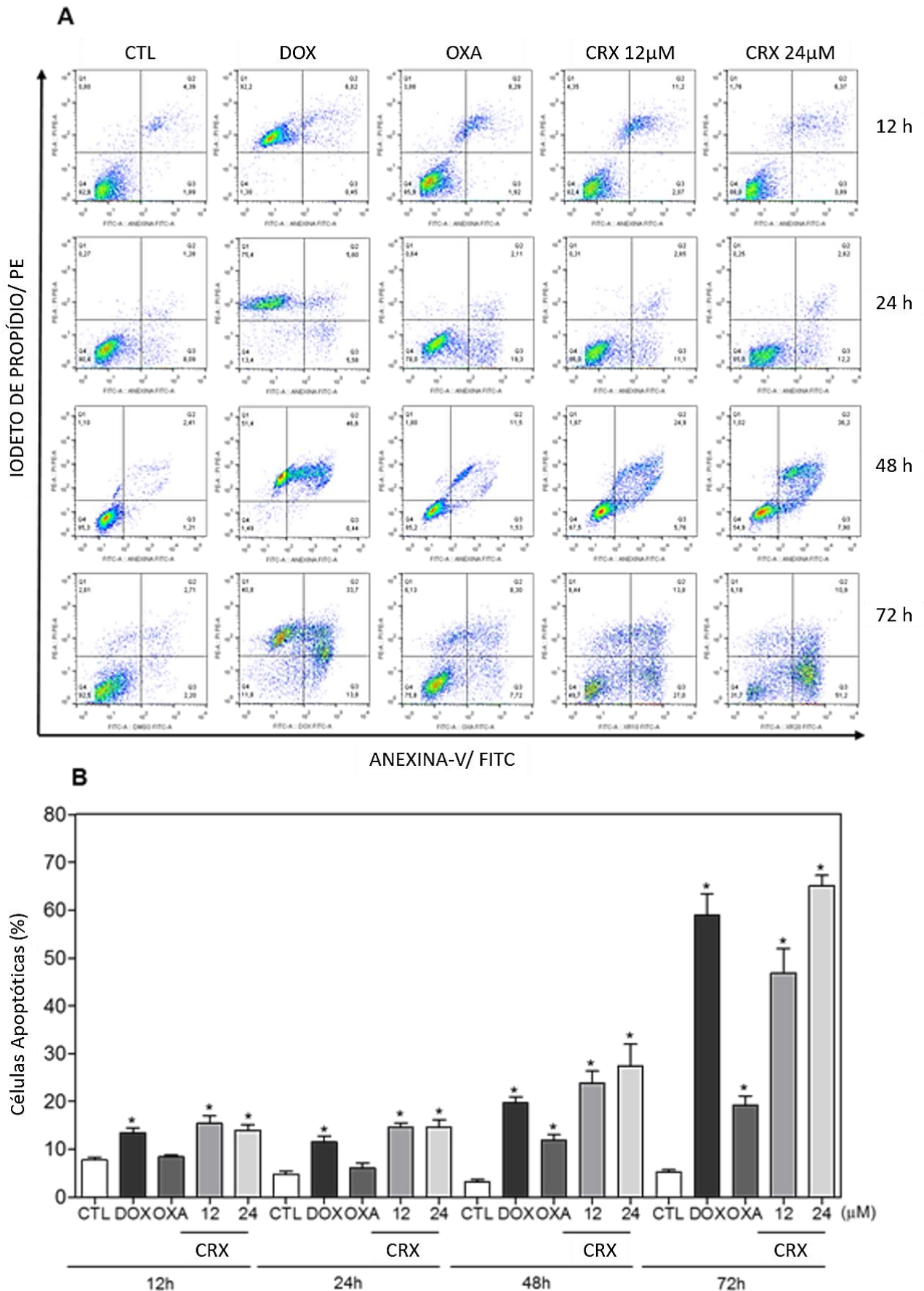


Figura 10. Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) na indução de apoptose em células HepG2 após 12, 24, 48 ou 72 h de incubação, conforme determinado por citometria de fluxo usando marcação de anexina V-FITC/IP. **(A)** *Dotplots* representativos obtidos por citometria de fluxo mostram o percentual de células viáveis, apoptóticas iniciais, apoptóticas tardia e necróticas. **(B)** Quantificação de células apoptóticas. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para diluir o composto testado. Doxorrubicina (DOX, 2 μ M) e oxaliplatina (OXA, 10 μ M) foram utilizados como os controles positivo. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. Dez mil eventos foram avaliados por experimento e os detritos celulares foram omitidos na análise. * $P < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

O potencial transmembrânico mitocondrial foi determinado por retenção do corante rodamina 123 e analisado em citômetro de fluxo. A **Figura 11** representa a despolarização mitocondrial em células HepG2 tratadas com as concentrações de 12 e 24 μM de CRX após 24 h de incubação. O tratamento com ambas as concentrações testadas do complexo CRX aumentou a taxa de despolarização de modo significativo em relação ao controle negativo (DMSO a 0,2%).

A atividade das caspases 3, 8 e 9 foi obtida através de lisados de células HepG2 tratadas com CRX nas concentrações de 12 e 24 μM , por meio de ensaio colorimétrico. Essa família de proteases desempenha um papel fundamental nas fases de iniciação e execução da apoptose. Após a ativação, essas enzimas clivam substratos específicos e, portanto, medeiam muitas das alterações bioquímicas e morfológicas típicas em células apoptóticas, como encolhimento de células, condensação de cromatina, fragmentação de DNA e bolhas de membrana plasmática. Assim, a detecção de caspases ativadas pode ser utilizada como marcador bioquímico para a apoptose (KÖHLER et al., 2002). Como pode ser observado na **Figura 12**, houve ativação significativa das caspases avaliadas após 48 h de tratamento com CRX, em ambas as concentrações testadas. Além disso, o pré-tratamento com o inibidor não seletivo de caspases (Z-VAD-(Ome)-FMK), o inibidor seletivo de caspase 8 (Z-IETD-FMK) e inibidor seletivo de caspase 9 (Z-LEHD-FMK) preveniu o aumento da apoptose induzida por CRX (**Figura 13**).

Também avaliamos a atividade citotóxica de CRX em uma linhagem de fibroblasto embrionário de camundongo imortalizado de tipo selvagem (WT SV40 MEF) e fibroblasto embrionário de camundongo imortalizado nocaute para BAD (BAD KO SV40 MEF) pelo ensaio do alamar blue, após 72 h de incubação. Os valores CI_{50} para CRX foram de 3,9 μM para a linhagem celular WT SV40 MEF e de 4,1 μM para a linhagem celular BAD KO SV40, sugerindo que BAD não é essencial para a citotoxicidade induzida por CRX. A doxorubicina apresentou valores de CI_{50} de 0,04 e 0,41 μM , enquanto o 5-fluorouracil apresentou valores de CI_{50} de 1,7 e 7,3 μM nas linhagens celulares WT SV40 MEF e BAD KO SV40 MEF, respectivamente.

O efeito de CRX nos níveis intracelulares de ERO foi investigado em células HepG2 por citometria de fluxo usando a sonda fluorescente (DCF-DA) sensível ao ambiente redox. No entanto, CRX não induziu um aumento significativo nos níveis de ERO após 1 ou 3 h de incubação (**Figura 14A**). Além disso, o pré-tratamento com o antioxidante NAC não impediu a redução do número de células viáveis, conforme avaliado pelo ensaio de exclusão com o colorante azul de tripam após 24 h de incubação (**Figura 14B**).

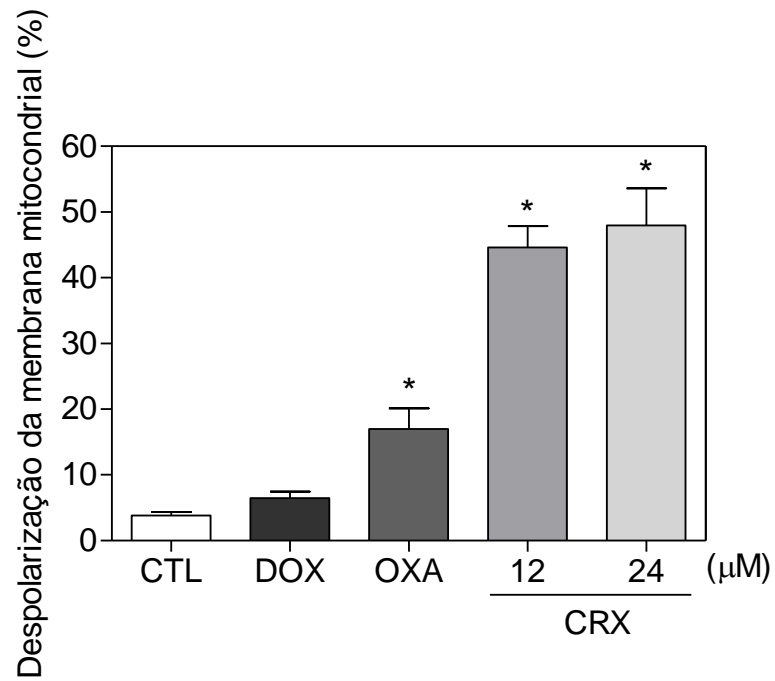


Figura 11. Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células HepG2. As células foram tratadas com 12 e 24 μM de CRX por 24 h e o potencial transmembrânico foi determinado por citometria de fluxo através da incorporação da rodamina 123. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para diluir a substância (DMSO 0,2%). A doxorrubicina (DOX, 2 μM) e a oxaliplatina (OXA, 4 μM) foram usadas como controles positivo. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em triplicata. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os detritos celulares foram omitidos na análise. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise da variância) seguido por pós-teste de Newman-Keuls.

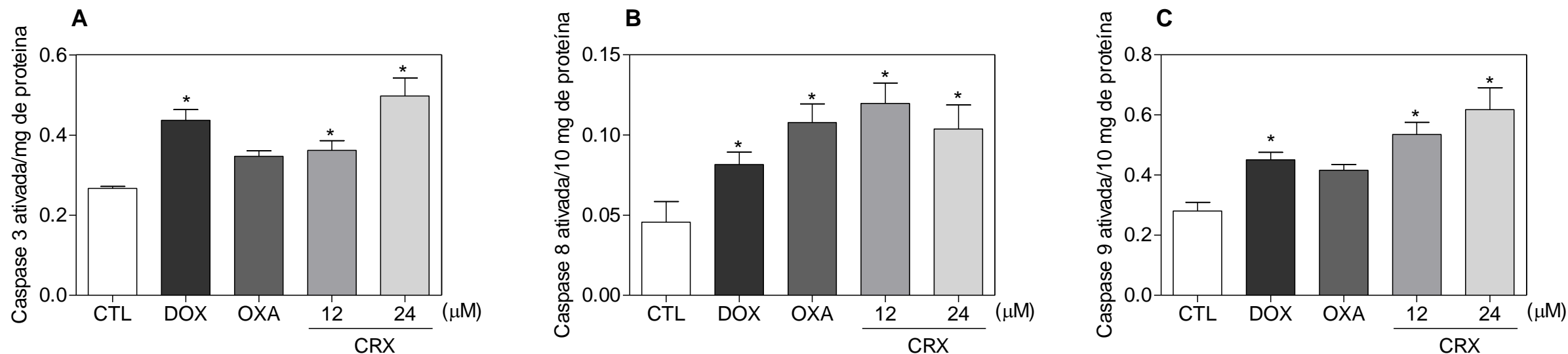


Figura 12. Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre a atividade de caspase 3, 8 e 9. **(A)** A atividade da caspase 3 foi determinada por ensaio colorimétrico após 48 h de incubação com CRX. **(B)** A atividade da caspase 8 foi determinada por ensaio colorimétrico após 48 h de incubação com CRX. **(C)** A atividade da caspase 9 foi determinada por ensaio colorimétrico após 48 h de incubação com CRX. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para diluir o composto testado. Doxorubicina (DOX, 2 μM) e oxaliplatina (OXA, 10 μM) foram utilizadas como controles positivo. Os dados são apresentados como médias \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. Dez mil eventos foram avaliados por experimento e os detritos celulares foram omitidos na análise. * $P < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls.

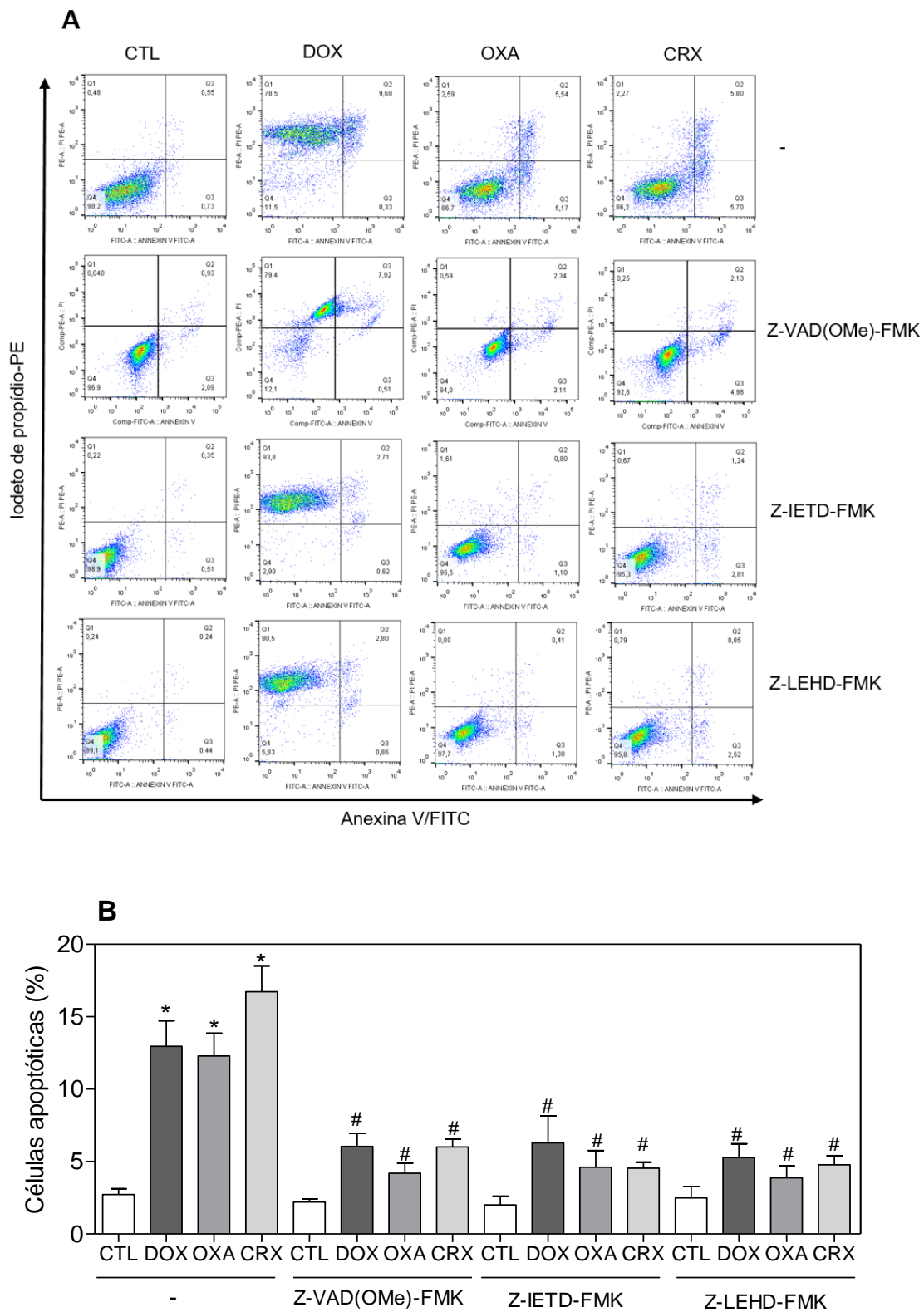


Figura 13. Efeito do inibidor não seletivo de caspases (Z-VAD(Ome)-FMK), inibidor seletivo de caspase 8 (Z-IETD-FMK) e inibidor seletivo da caspase 9 (Z-LEHD-FMK) na apoptose induzida pelo complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em células HepG2, determinado por citometria de fluxo usando marcação por anexina V-FITC/IP. **(A)** *Dotplots* representativos obtidos por citometria de fluxo mostrando a porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. **(B)** Quantificação de células apoptóticas. Para os ensaios de proteção, as células foram pré-tratadas durante 2 h com 50 μ M de Z-VAD (Ome)-FMK, 20 μ M de Z-IETD-FMK ou 20 μ M de Z-LEHD-FMK e depois incubadas com 12 μ M de CRX por 48 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para diluir o composto testado. Doxorrubicina (DOX, 2 μ M) e oxaliplatina (OXA, 10 μ M) foram utilizados como controles positivo. Os dados são apresentados como as médias \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. Dez mil eventos foram avaliados por experimento e os detritos celulares foram omitidos na análise. * $P < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls. # $P < 0,05$ em comparação com o respectivo tratamento sem inibidor por ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls.

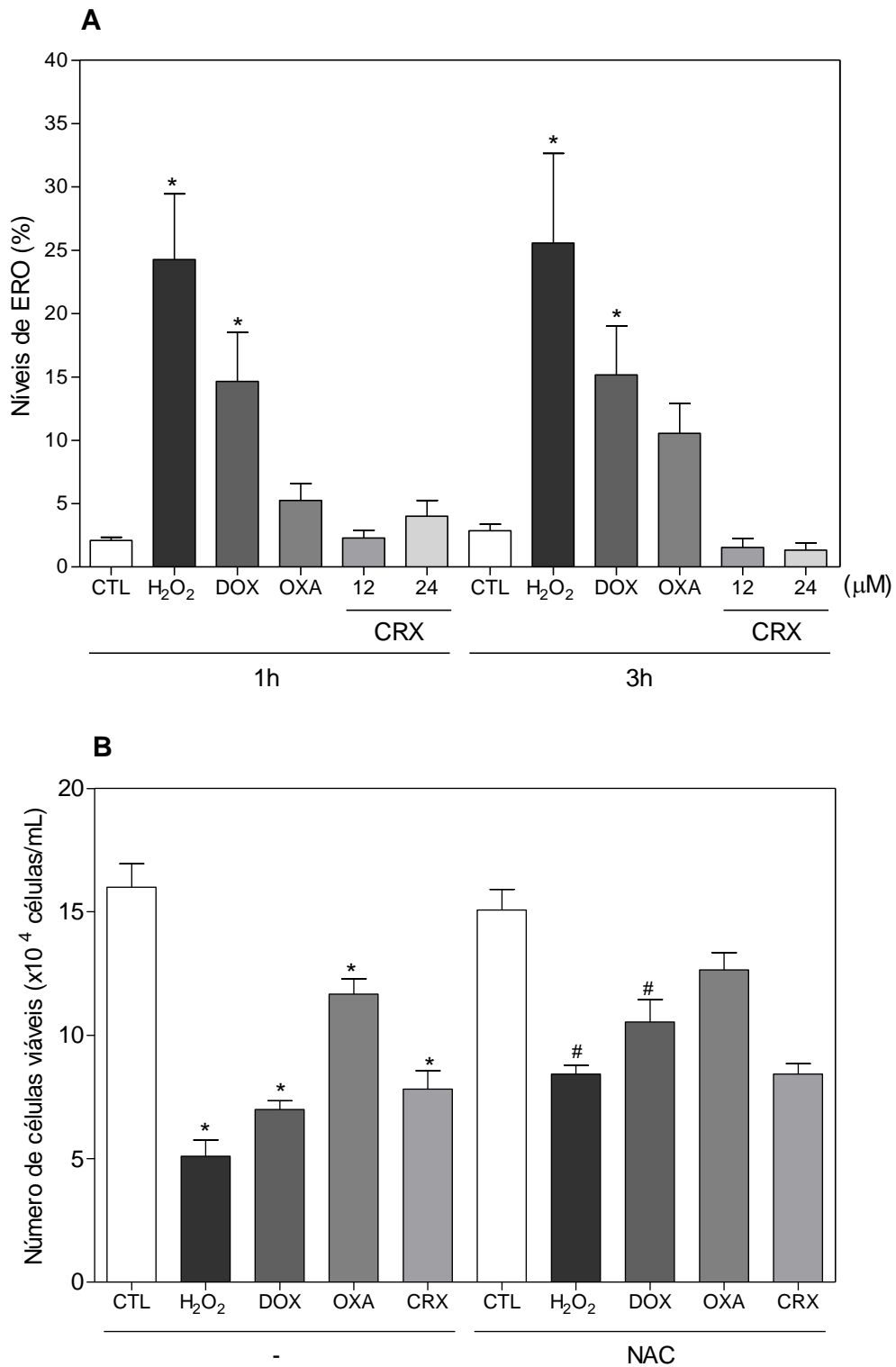


Figura 14. Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) de células HepG2 e proteção antioxidante por NAC determinado por citometria de fluxo usando marcação por DCF-DA. **(A)** Níveis de ERO em células HepG2 após 1 e 3 h de tratamento com CRX. **(B)** Viabilidade celular de células HepG2 pré-tratadas com o antioxidante NAC e, em seguida, tratadas com CRX, determinada por coloração com azul de tripam. Para o ensaio de proteção, as células foram pré-tratadas durante 1 h com 5 mM de NAC e depois incubadas com CRX (12 μ M) durante 24 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para diluir o composto testado. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 200 μ M), a doxorubicina (DOX, 2 μ M) e a oxaliplatina (OXA, 10 μ M) foram utilizados como controles positivo. Os dados são apresentados como a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata. Para análise de citometria de fluxo, foram avaliados 10.000 eventos por experimento e os detritos celulares foram omitidos da análise. * P <0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls. # P <0,05 em comparação com o respectivo tratamento sem inibidor por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls.

5.5 O COMPLEXO DE RUTÊNIO COM XANTOXILINA ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS HepG2

A análise da expressão gênica em células HepG2 foi realizada por qPCR Array, após 12 h de incubação com o CRX (12 μ M). De um total de 92 genes investigados, 40 genes estavam regulados positivamente e 2 genes estavam regulados negativamente (**Tabela 6**). Entre eles, os genes pró-apoptóticos BCL2L11 (QR = 9,8 para CRX e QR = 14,0 para doxorrubicina), FAS (QR = 2,9 para CRX e QR = 2,5 para doxorrubicina) e E2F1 (QR = 7,1 para CRX e QR = 4,8 para doxorrubicina) foram regulados positivamente. Um gene relacionado ao controle do ciclo celular (transição entre as fases G₁/S), CDKN2A (QR = 3,8 para CRX e QR = 2,0 para doxorrubicina) também foi regulado positivamente. Além disso, pelo menos sete genes relacionados à via de proteína quinase mitogênica (MAPK), incluindo BRAF (QR = 2,3 para CRX e QR = 1,0 para doxorrubicina), ELK1 (QR = 5,2 para CRX e QR = 2,1 para doxorrubicina), JUN (QR = 4,5 para CRX e QR = 7,3 para doxorrubicina), MAP2K1 (QR = 2,6 para CRX e QR = 2,4 para doxorrubicina), MAPK1 (QR = 2,1 para CRX e QR = 0,9 para doxorrubicina), MAPK14 (QR = 3,0 para CRX e QR = 2,2 para doxorrubicina) e RAF1 (QR = 4,7 para CRX e QR = 3,5 para doxorrubicina), foram regulados positivamente, indicando uma ação significativa de CRX na sinalização MAPK em células HepG2. Em contraste, o principal gene envolvido na ativação da via p53, TP53 (QR = 0,5 para CRX e QR = 1,0 para doxorrubicina), foi regulado negativamente, enquanto o gene relacionado à inativação da via p53 MDM2 (QR = 3,2 para CRX e QR = 0,9 para doxorrubicina) foi regulado positivamente.

Tabela 6. Efeito do tratamento com o complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre a regulação gênica de células HepG2

Símbolo	Nome Completo	QR	
		DOX	CRX
<i>Genes regulados positivamente</i>			
AKT2	AKT serine/threonine kinase 2	3,3	2,7
BCAR1	BCAR1, Cas family scaffolding protein	2,2	2,9
BCL2	BCL2, apoptosis regulator	1,1	2,4
BCL2L11	BCL2 like 11	14,0	9,8
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase	1,0	2,3
CCND1	cyclin D1	0,8	4,8
CCND3	cyclin D3	1,2	2,4
CDC42	cell division cycle 42	1,1	4,2
CDK4	cyclin dependent kinase 4	1,4	2,7
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A	2,0	3,8
CRK	CRK proto-oncogene, adaptor protein	2,5	6,2
DVL1	dishevelled segment polarity protein 1	0,5	2,7
E2F1	E2F transcription factor 1	4,8	7,1
EGFR	epidermal growth factor receptor	0,5	2,0
ELK1	ELK1, ETS transcription factor	2,1	5,2
ERBB2	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2	1,8	2,2
FAS	Fas cell surface death receptor	2,5	2,9
FGF2	fibroblast growth factor 2	1,9	5,5
FYN	FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	1,0	2,2
FZD1	frizzled class receptor 1	5,8	4,8
HRAS	HRas proto-oncogene, GTPase	1,4	2,1
IGF1	insulin like growth factor 1	N.d.	N.d.
ITGA2B	integrin subunit alpha 2b	2,4	5,4
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	7,3	4,5
KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase	2,6	4,8
MAP2K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	2,4	2,6
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	0,9	2,1
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	2,2	3,0
MDM2	MDM2 proto-oncogene	0,9	3,2
MYC	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor	0,4	4,3
NFKB1	nuclear factor kappa B subunit 1	2,0	2,2
NFKB2	nuclear factor kappa B subunit 2	3,6	3,6
PTK2	protein tyrosine kinase 2	1,0	2,0
RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	3,5	4,7
RELA	RELA proto-oncogene, NF-kB subunit	1,1	2,4
SHC1	SHC adaptor protein 1	1,9	3,7
SMAD4	SMAD family member 4	2,6	3,6
SOS1	SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1	2,2	5,0
TCF3	transcription factor 3	1,9	3,2
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	1,8	3,8
<i>Genes regulados negativamente</i>			
CDKN1B	cyclin dependent kinase inhibitor 1B	1,0	0,5
TP53	tumor protein p53	1,0	0,5

As células HepG2 foram tratadas com 12 μ M de CRX por 12 h. O controle negativo foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para diluir o composto testado. A doxorrubicina (DOX, 2 μ M) foi utilizada como controle positivo. Após o tratamento, o RNA total foi isolado e transcrito de forma reversa. A expressão dos genes foi detectada usando uma placa de 96 poços TaqMan®. Os genes GAPDH, 18S e HPRT1 foram utilizados como genes endógenos para a normalização. Os valores representam a quantificação relativa (QR) em comparação com o calibrador (células tratadas com o controle negativo, QR = 1,0). Os genes foram considerados como regulados positivamente quando QR \geq 2 e foram considerados como regulados negativamente se QR \leq 0,5. N.d. Não determinado.

5.6 O COMPLEXO DE RUTÊNIO COM XANTOXILINA CAUSA APOPTOSE MEDIADA POR ERK1/2 EM CÉLULAS HepG2 ATRAVÉS DE UMA VIA INDEPENDENTE DE p53

Conforme observado acima, a análise de expressão gênica indicou a ativação da via MAP quinase em células HepG2 tratadas com CRX. Portanto, decidimos investigar o papel das três principais famílias MAPK – ERK1/2, JNK/SAPK e p38 MAPK – na apoptose induzida por CRX em células HepG2. Para isso, avaliamos as alterações no estado de fosforilação das proteínas ERK1/2, JNK/SAPK e p38 MAPK por citometria de fluxo, após incubação aguda (15 e 30 min) e prolongada (24 h). O tratamento com CRX induziu fosforilação de ERK1/2 (**Figura 15**), JNK/ SAPK (**Figura 16**), mas não de p38 MAPK (**Figura 17**) após 15 minutos de incubação. Além disso, o pré-tratamento com um inibidor de MKK (U-0126), que inibe a ativação de ERK1/2, impediu a apoptose induzida por CRX (**Figura 18**). O pré-tratamento com o inibidor de JNK/SAPK (SP 600125) (**Figura 18**) e o inibidor de p38 MAPK (PD 169316) (**Figura 18**) não impediram a apoptose induzida por CRX. Uma vez que a ativação ERK1/2 pode ocorrer associada à ativação da via p53, nós investigamos a ativação da via p53 em células HepG2 tratadas com CRX. No entanto, o pré-tratamento com um inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica) não impediu a apoptose induzida por CRX (**Figuras 19**), indicando uma ativação da via de apoptose via ERK 1/2 independente de p53. De fato, o principal gene da ativação da via p53 (TP53) foi encontrado regulado negativamente, e o gene relacionado à inativação de p53 (MDM2) foi encontrado regulado positivamente em células HepG2 tratadas com CRX.

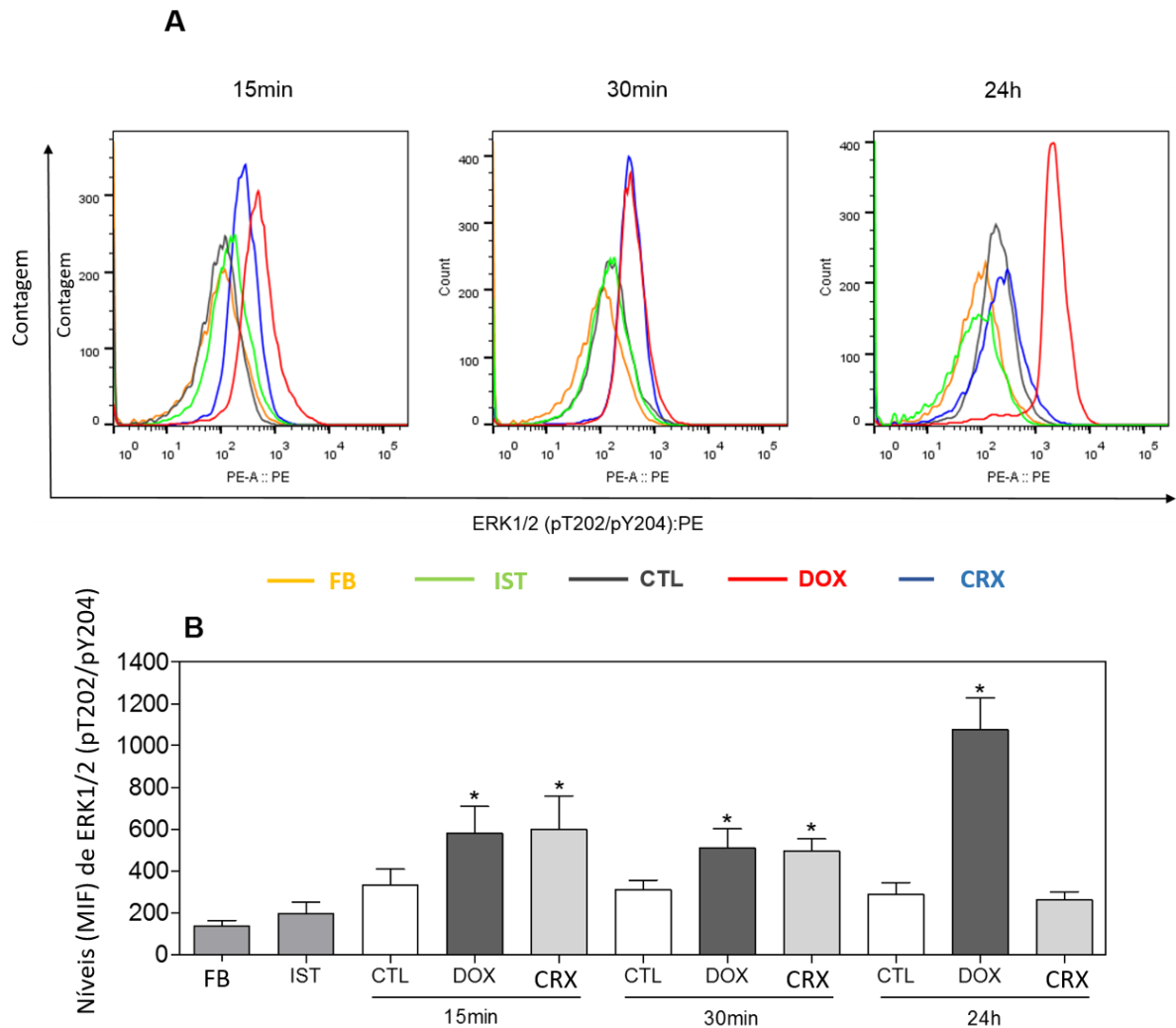


Figura 15. Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em ERK1/2 (pT202/pY204), conforme determinado por citometria de fluxo de células em HepG2 tratadas por um período agudo (15 minutos ou 30 minutos) com CRX (12 μ M) ou após tratamento prolongado (24 h de incubação). **(A)** Histogramas representativos de citometria de fluxo. **(B)** Quantificação dos níveis de ERK1/2 (pT202/pY204). O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para diluir o composto testado. Doxorrubicina (DOX, 2 μ M) foi usada como o controle positivo. Os dados são apresentados como médias \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. Dez mil os eventos foram avaliados por experimento, e os detritos celulares foram omitidos da análise. * $P < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls. FB, células não coradas (fluorescência basal); IST, controle isotipo. MIF, média da intensidade de fluorescência.

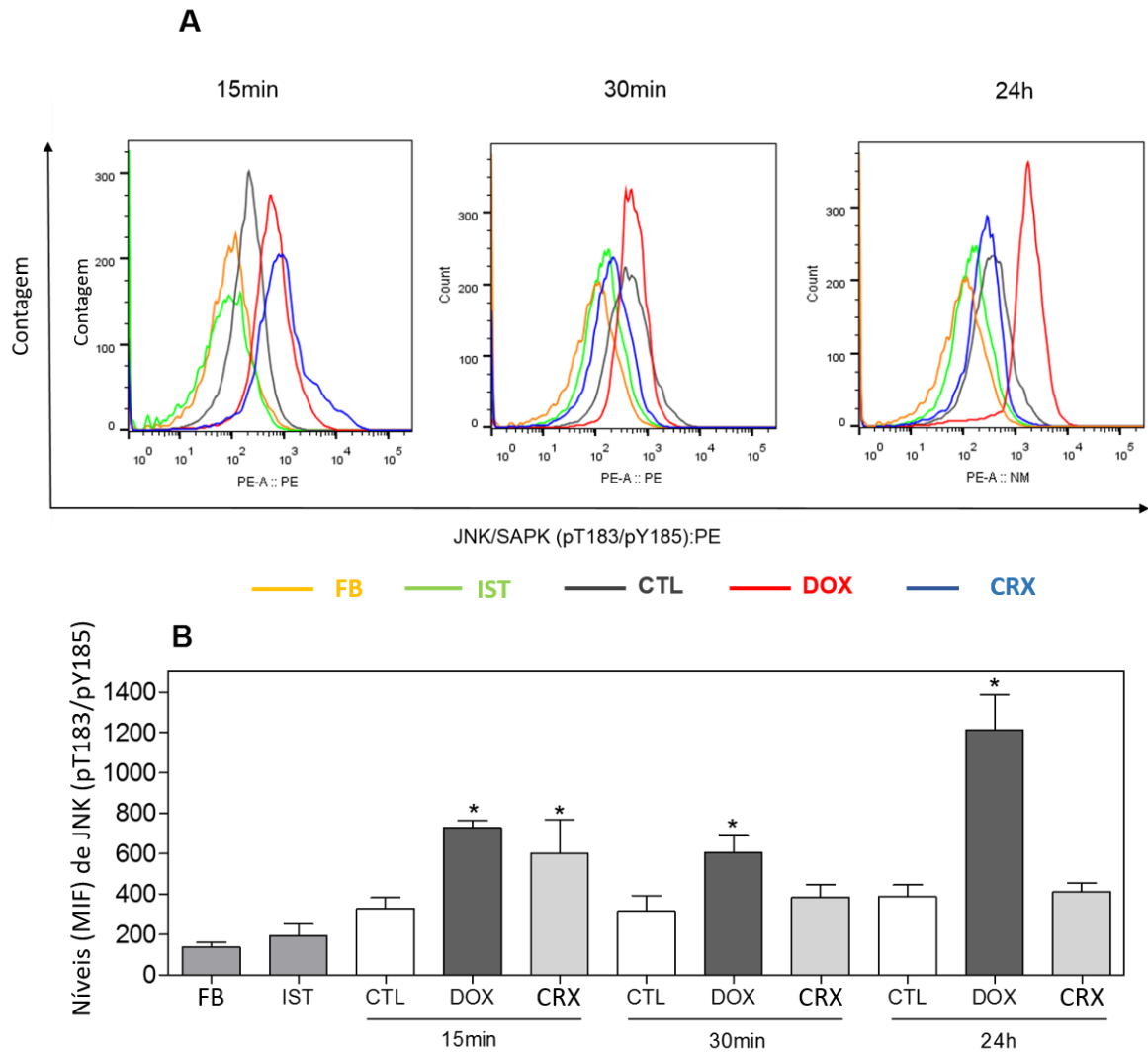


Figura 16. Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em JNK/SAPK (pT183/pY185), conforme determinado por citometria de fluxo de células em HepG2 tratadas por um período agudo (15 minutos ou 30 minutos) com CRX (12 μ M) ou após tratamento prolongado (24 h de incubação). **(A)** Histogramas representativos de citometria de fluxo. **(B)** Quantificação dos níveis de JNK/SAPK (pT183/pY185). O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para diluir o composto testado. Doxorrubicina (DOX, 2 μ M) foi usada como o controle positivo. Os dados são apresentados como médias \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. Dez mil os eventos foram avaliados por experimento, e os detritos celulares foram omitidos da análise. * $P < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls. FB, células não coradas (fluorescência basal); IST, controle isotipo; MIF, média da intensidade de fluorescência.

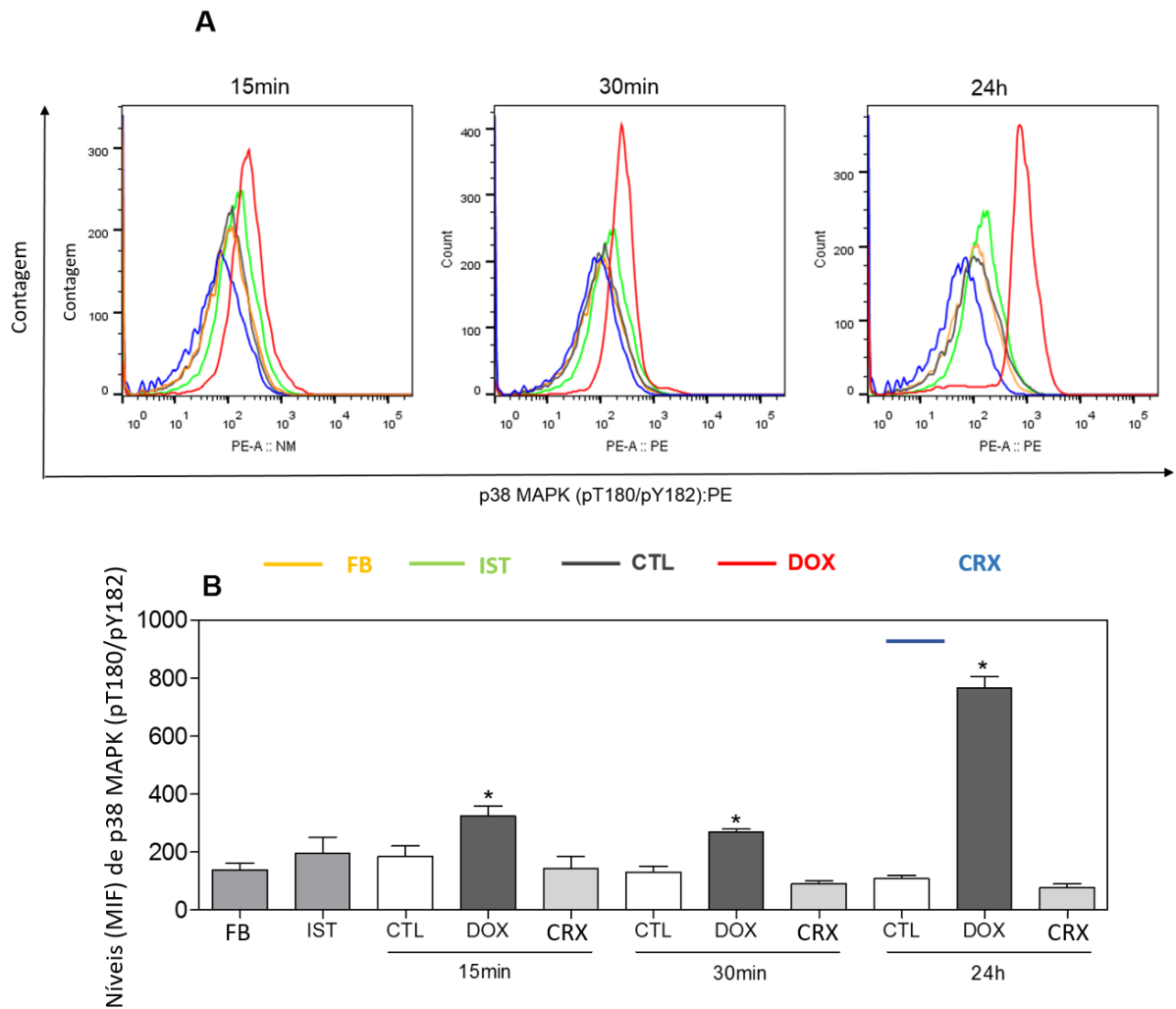


Figura 17. Efeito do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em p38 MAPK (pT180/pY182), conforme determinado por citometria de fluxo de células em HepG2 tratadas por um período agudo (15 minutos ou 30 minutos) com CRX (12 μ M) ou após tratamento prolongado (24 h de incubação). **(A)** Histogramas representativos de citometria de fluxo. **(B)** Quantificação dos níveis de p38 MAPK (pT180/pY182). O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para diluir o composto testado. Doxorrubicina (DOX, 2 μ M) foi usada como o controle positivo. Os dados são apresentados como médias \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. Dez mil os eventos foram avaliados por experimento, e os detritos celulares foram omitidos da análise. * P < 0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls. FB, células não coradas (fluorescência basal); IST, controle isotipo; MIF, média da intensidade de fluorescência.

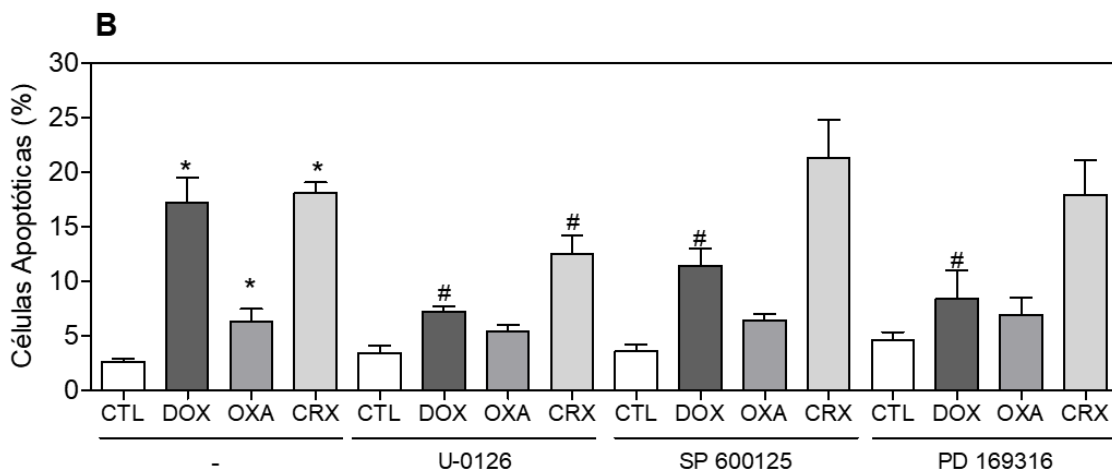
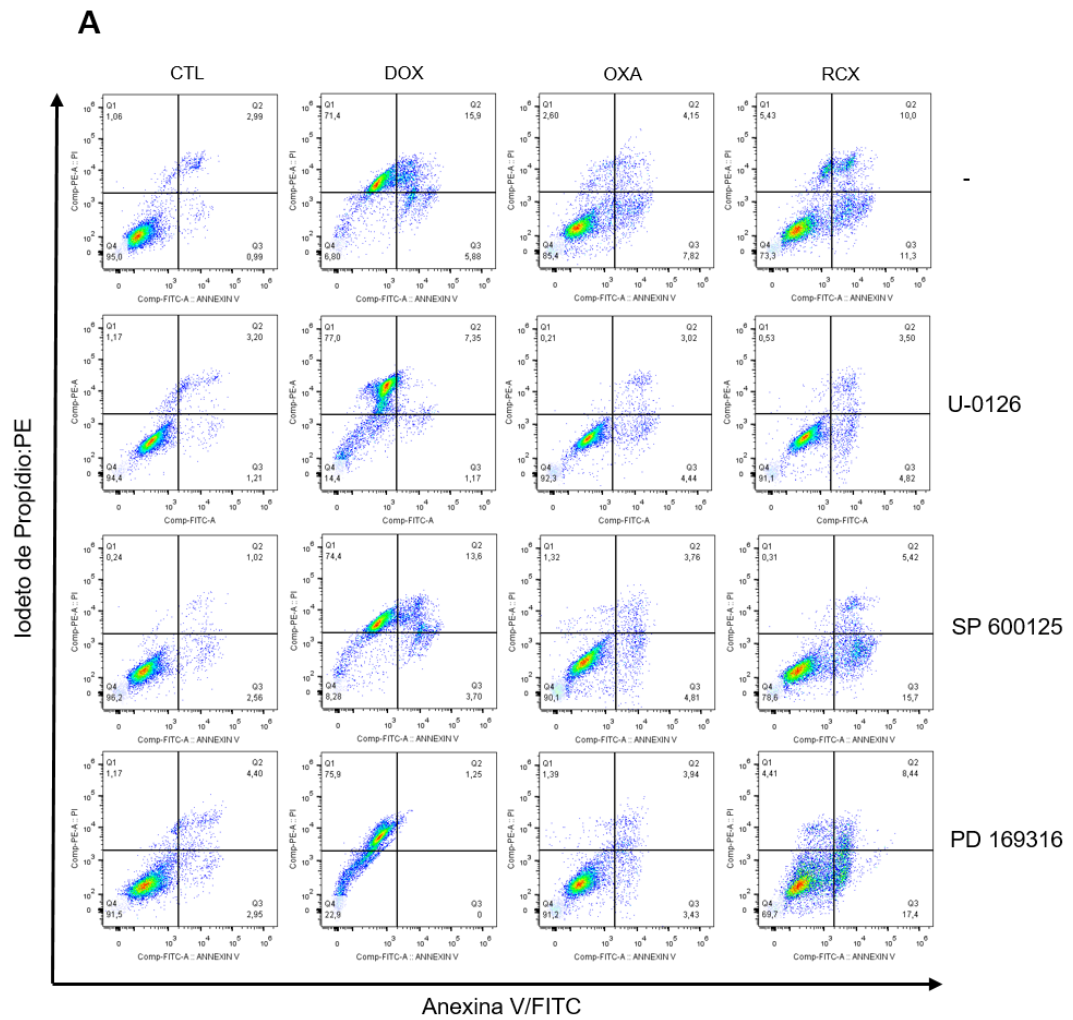


Figura 18. Efeito do inibidor de MEK (U-0126), inibidor de JNK/ SAPK (SP 600125) e inibidor de p38 MAPK (PD 169316) na apoptose induzida pelo complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em células HepG2, conforme determinado por citometria de fluxo usando marcação de anexina V-FITC/IP. (A) Dotplots representativos mostram a porcentagem de células nos estágios apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. (B) Quantificação de células apoptóticas HepG2. Para ensaios de proteção, as células foram pré-tratadas durante 2 h com 5 μ M de U-0126, 5 μ M de SP 600125 ou 5 μ M de PD 169316 e depois incubadas com 12 μ M de CRX por 48 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para diluir o composto testado. Doxorrubicina (DOX, 2 μ M) e oxaliplatina (OXA, 10 μ M) foram utilizadas como controles positivos. Os dados são apresentados como as médias \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. Dez mil eventos foram avaliados por experimento e os detritos celulares foram omitidos da análise. * $P < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste Student Newman-Keuls. # $P < 0,05$ em comparação com o respectivo tratamento sem inibidor por ANOVA, seguido do teste Student-Newman-Keuls

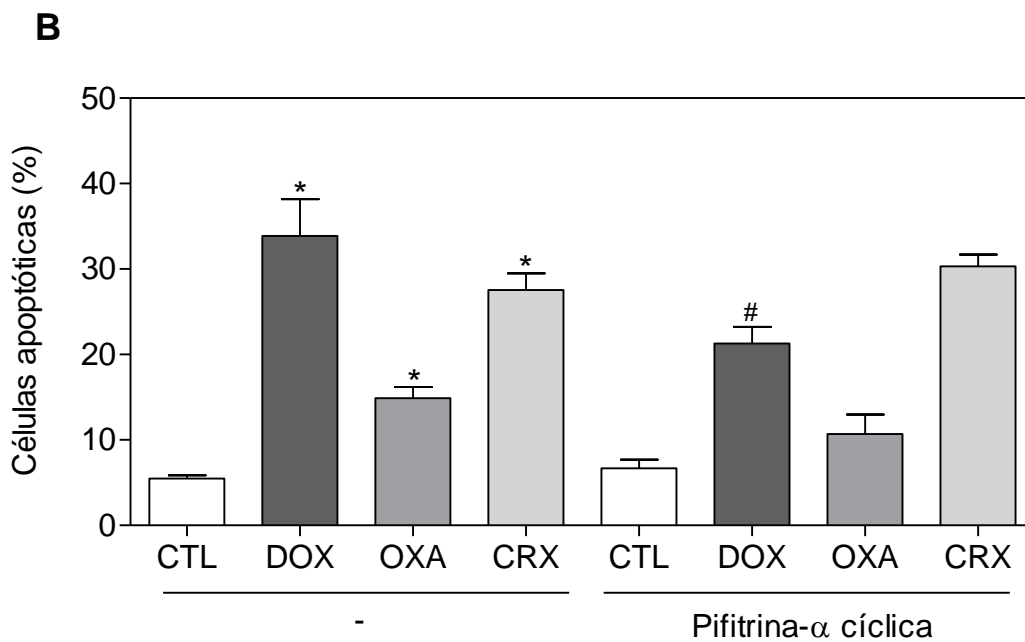
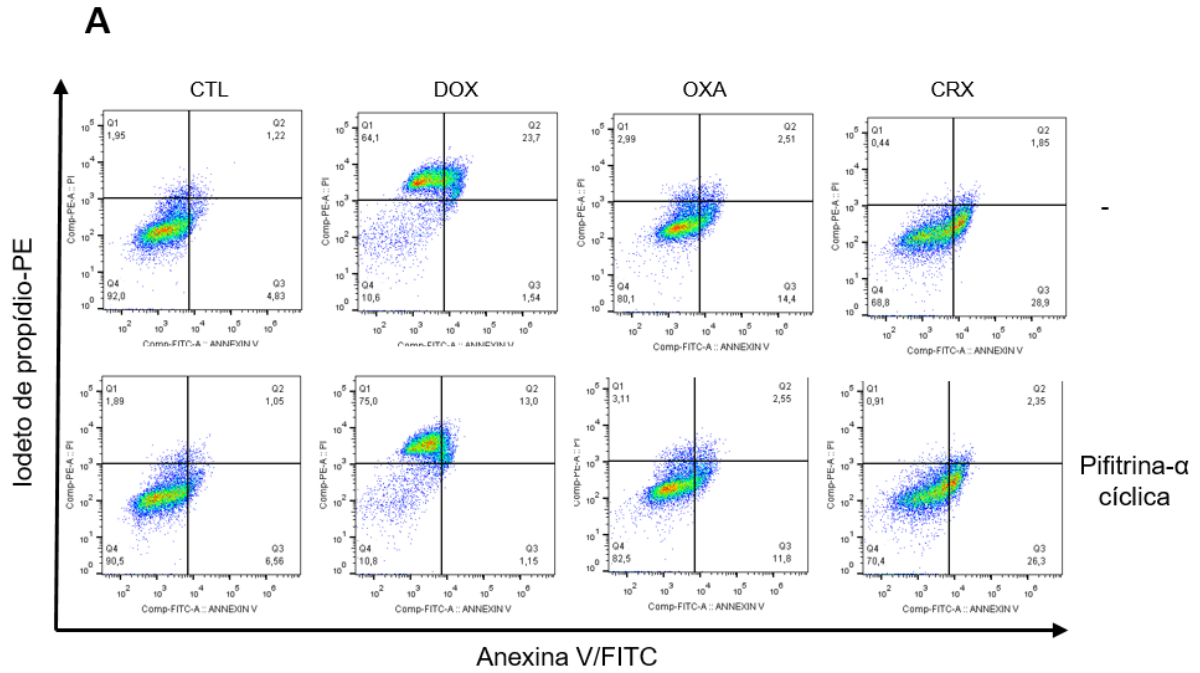


Figura 19. Efeito do inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica) sobre a apoptose induzida pelo complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em células HepG2 determinado por citometria de fluxo usando marcação com anexina V-FITC/IP. **(A)** *Dotplots* representativos obtidos por citometria de fluxo mostrando a porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. **(B)** Quantificação de células apoptóticas. As células foram pré-tratadas durante 2 h com pifitrina- α cíclica (10 μ M), depois incubadas com CRX (12 μ M) durante 48 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para diluir o composto testado. Doxorrubicina (DOX, 2 μ M) e oxaliplatina (OXA, 10 μ M) foram utilizadas como controles positivos. Os dados são apresentados como a média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. Dez mil eventos foram analisados por experimento e os detritos celulares foram omitidos da análise. * P < 0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls. # P < 0,05 em comparação com o respectivo tratamento sem inibidor por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls.

5.7 O COMPLEXO DE RUTÊNIO COM XANTOXILINA REDUZ O CRESCIMENTO DE CÉLULAS HepG2 EM MODELO XENOGRÁFICO

A atividade antitumoral *in vivo* do complexo CRX foi investigada em camundongos SCID C.B-17 enxertados com células HepG2. Os animais foram tratados com CRX em doses de 2,5 e 5 mg/kg, por via intraperitoneal, uma vez por dia durante 21 dias consecutivos. Ambas as doses foram capazes de inibir o crescimento de células HepG2 nos camundongos tratados. A **Figura 20A** mostra a inibição do crescimento do tumor obtido. No 22º dia, o peso médio do tumor dos animais do grupo controle foi de $0,6 \pm 0,04$ g. Nos animais tratados com CRX, os pesos médios dos tumores foram $0,4 \pm 0,06$ e $0,2 \pm 0,04$ g nas doses de 2,5 e 5 mg/kg, respectivamente, e a inibição da massa tumoral foi de 24,0 e 67,7%, respectivamente. Os controles positivos (doxorubicina, 0,3 mg/kg e 5-fluorouracil ou 5-FU, 10 mg/kg) reduziram o peso do tumor em 27,2 e 40,3%, respectivamente.

Na análise histológica, todos os grupos exibiram tumores sólidos e hipervascularizados com células apresentando pleomorfismo intenso e nucléolos proeminentes. As áreas necróticas foram observadas em todos os grupos, mas as figuras mitóticas aberrantes foram menos evidentes nos grupos tratados com CRX (**Figura 20B**).

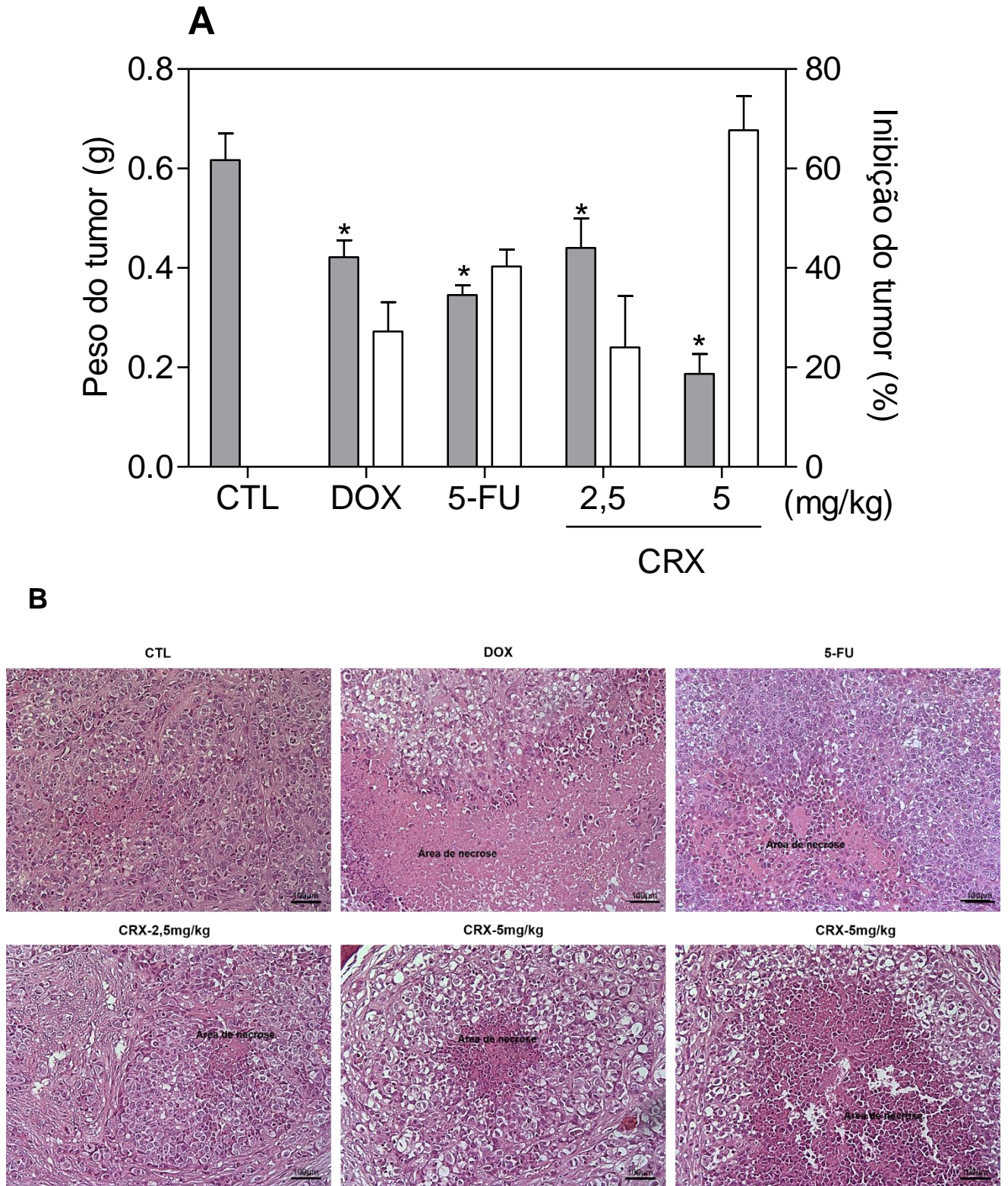


Figura 20. Atividade antitumoral *in vivo* do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em camundongos SCID C.B-17 inoculados com células HepG2. **(A)** Quantificação do peso do tumor e inibição do tumor. As barras cinzas representam o peso do tumor (g) e as barras brancas representam a inibição do tumor (%). **(B)** Análise histológica representativa dos tumores corados com hematoxilina e eosina e analisados por microscopia óptica. Os dados são apresentados como os médias \pm E.P.M. de 7 a 15 animais. * $P < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA, seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Os parâmetros toxicológicos também foram examinados nos animais tratados com CRX. Verificou-se uma ligeira diminuição no peso corporal de camundongos SCID C.B-17 inoculados de células HepG2 após 21 dias de tratamento com 5 mg/kg CRX ($P < 0,05$), quando comparado com o controle negativo. No entanto, não houve alteração no peso corporal do animal tratado com 2,5 mg/kg de CRX ($P > 0,05$). Nenhuma alteração significativa foi observada no fígado, nos rins, nos pulmões ou no coração de qualquer grupo ($P > 0,05$) (**Tabela 7**). A contagem de leucócitos e eritrócitos dos animais tratados com CRX também foi analisada (**Tabela 8**). O número de leucócitos permaneceu inalterado após o tratamento com ambas as doses de CRX ($P > 0,05$), contudo, encontramos uma diminuição no número total de leucócitos em grupos DOX e 5-FU em comparação com o grupo controle negativo ($P < 0,05$). O número de eritrócitos não foi alterado significativamente em qualquer um dos grupos experimentais.

A análise histológica foi realizada no fígado, rim, pulmão e coração de todos os grupos (**Figura 21**). As análises histopatológicas dos fígados revelaram degeneração hidrópica, dilatação do sistema portal venoso, dilatação dos canais biliares com áreas de atrofia, áreas dispersas de necrose de coagulação e inflamação em todos os grupos experimentais. É importante notar que essas características histopatológicas foram mais pronunciadas nos grupos tratados com CRX, em comparação com os demais grupos (controle negativo, 5-FU e doxorubicina). Nos rins, observou-se congestão vascular leve e hialinização glomerular moderada em todos os grupos. Nos pulmões, atelectasias, hemorragia focal, inflamação aguda, congestão vascular, espessamento de septos alveolares e aumento do espaço aéreo foram observados em todos os animais. Deve notar-se que essas características histopatológicas foram mais pronunciadas nos grupos tratados com doxorubicina, CRX 2,5 mg/kg e CRX 5 mg/kg, quando comparados aos outros grupos (controle negativo e 5-FU). Além disso, foram observados nódulos e embolias tumorais no parênquima pulmonar de dois animais do grupo DMSO. A análise histopatológica dos corações não evidenciou alterações em nenhum grupo. Algumas características histopatológicas deste estudo (degeneração hidrópica, congestão vascular e áreas focais de inflamação) são respostas celulares agudas ao estímulo relacionado ao tratamento e as células lesadas podem retornar à homeostase quando a agressão terminar.

Tabela 7. Efeito do tratamento com o complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre o peso corporal e o peso relativo dos órgãos de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2.

Parâmetros	CTL	DOX	5-FU	CRX	CRX
Dose (mg/kg)	-	0,3	10	2,5	5
Sobrevivência	15/15	14/14	9/15	14/14	7/14
Peso corpóreo inicial (g)	21,2 ± 0,4	22,3 ± 0,4	25,2 ± 0,4	22,2 ± 0,5	21,1 ± 0,4
Peso corpóreo final (g)	20,4 ± 0,3	19,5 ± 0,6	24,1 ± 1,7	20,6 ± 0,4	17,0 ± 0,4*
Fígado (g/100 g peso corpóreo)	5,0 ± 0,1	4,8 ± 0,1	3,4 ± 0,7	4,9 ± 0,2	4,2 ± 0,4
Rim (g/100 g peso corpóreo)	1,5 ± 0,04	1,5 ± 0,04	1,2 ± 0,4	1,6 ± 0,04	1,5 ± 0,06
Coração (g/100 g peso corpóreo)	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,02	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,02	0,6 ± 0,03
Pulmão (g/100 g peso corpóreo)	0,9 ± 0,07	0,9 ± 0,06	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,04	0,8 ± 0,04

O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (5% de DMSO) usado para diluir o composto testado. A doxorubicina (DOX, 0,3 mg/kg) e 5-fluorouracil (5-FU, 10 mg / kg) foram utilizados como controles positivo. A partir de 1 dia após a implantação do tumor, os animais foram tratados através da via intraperitoneal por 21 dias consecutivos. Os dados são apresentados como a média ± E.P.M. de 7-15 animais. * P <0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

Tabela 8. Efeito do tratamento com o complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre parâmetros hematológicos do sangue periférico de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2.

Parâmetros	NT	CTL	DOX	5-FU	CRX	CRX
Dose (mg/kg)	-	-	0,3	10	2,5	5
Eritrócitos (10^6 cel/ μ L)	11,4 \pm 0,3	8,1 \pm 0,7	8,9 \pm 0,7	8,4 \pm 0,5	9,0 \pm 0,6	8,3 \pm 0,3
Leucócitos totais (10^3 cel/ μ L)	3,1 \pm 0,5	3,6 \pm 0,8	1,5 \pm 0,2*	1,8 \pm 0,3*	3,1 \pm 0,5	2,6 \pm 0,2
Contagem diferencial de leucócitos (%)						
Neutrófilos	41,0	59,7	48,8	65,0	48,3	49,0
Linfócitos	53,8	22,0	49,3	32,8	49,3	49,0
Monócitos	3,2	0,8	1,0	1,3	1,0	1,0
Eosinófilos	1,2	0,8	1,0	1,0	1,0	1,0

O grupo não tumoral (NT) representa camundongos C.B-17 SCID sem inoculação de tumor ou qualquer tratamento. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (5% de DMSO) usado para diluir o composto testado. Doxorrubicina (DOX, 0,3 mg/kg) e 5-fluorouracil (5-FU, 10 mg/kg) foram utilizados como controles positivo. A partir de 1 dia após a implantação do tumor, os animais foram tratados pela via intraperitoneal por 21 dias consecutivos. Os dados são apresentados como a média \pm E.P.M. de 5 a 6 animais. * P <0,05 em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman-Keuls.

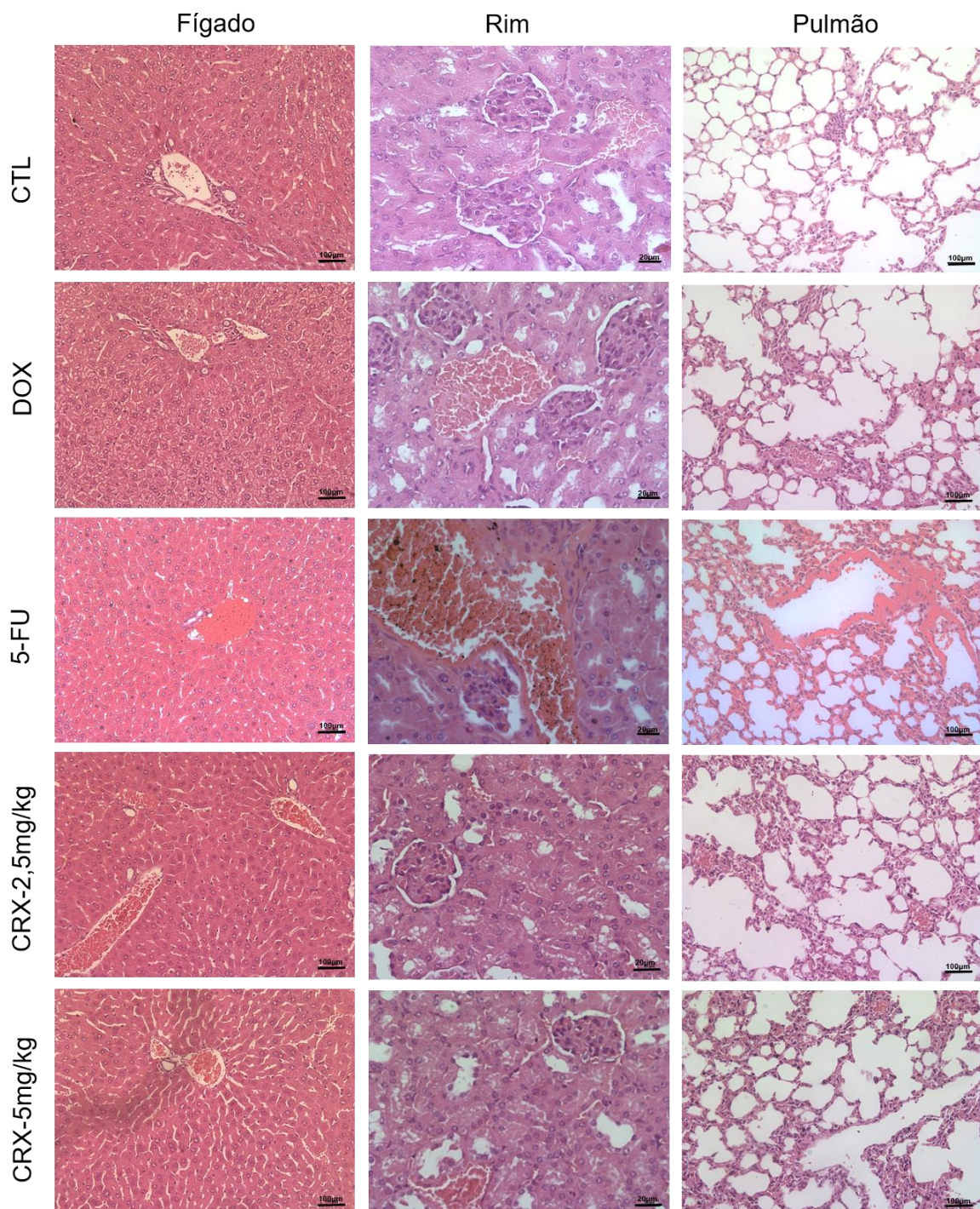


Figura 21. Análise toxicológica do complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em camundongos SCID C.B-17 inoculados com células HepG2. São mostradas a análises histológicas representativas de fígados, rins e pulmões corados com hematoxilina e eosina e analisados por microscopia óptica. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (5% de DMSO) usado para diluir o composto testado. A doxorrubicina (DOX, 0,3 mg/kg) e 5-fluorouracil (5-FU, 10 mg/kg) foram utilizados como controles positivos. A partir de 1 dia após a implantação do tumor, os animais foram tratados através da via intraperitoneal por 21 dias consecutivos.

6 DISCUSSÃO

Como mencionado anteriormente, os complexos de rutênio são amplamente referenciados por seu potencial citotóxico em diferentes linhagens de células cancerosas, sendo que a estrutura do ligante confere propriedades específicas a cada complexo metálico formado (ZENG et al., 2016; MILUTINOVIĆ et al., 2017; WAN et al., 2017; COSTA et al., 2017). A xantoxilina, que é um composto não citotóxico ($CI_{50} > 127,42 \mu M$), foi complexada ao rutênio e apresentou potente atividade citotóxica. Neste estudo, o complexo metálico de rutênio com xantoxilina de fórmula química *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆) teve sua resposta celular e molecular em células de carcinoma de hepatocelular humano HepG2 avaliada pela primeira vez.

Para a avaliação da citotoxicidade, exploramos, além da cultura em 2D, o modelo de cultura 3D, por esferoides multicelulares formados a partir de células HepG2. Nesse modelo, as células podem explorar as 3-dimensões do espaço, aumentando assim as interações entre células e com o ambiente onde a cultura possui heterogeneidade celular, formação de microambiente e exposição diferencial a diversos fatores como nutrientes e oxigênio (FENNEMA et al., 2003). As mudanças morfológicas dos esferoides tratados com o CRX indicam que o complexo conseguiu penetrar nos pequenos agregados de células, pois as análises apresentam menor valor de CI_{50} em cultura 3D, do que o valor encontrado na cultura de células 2D, (valores de CI_{50} de 8,0 μM e 13,5 μM , respectivamente). Tanto a doxorubicina, quanto a oxaliplatina apresentaram valores de CI_{50} maior na cultura esferoide 3D, quando comparada a 2D. A doxorubicina apresentou valor de CI_{50} treze vezes maior na cultura 3D ($CI_{50} = 18,1 \mu M$ em cultura 3D e 1,3 μM na cultura 2D ($CI_{50} = 0,5 \mu M$). Estes dados são condizentes com estudos que mostram uma maior resistência da cultura em células 3D ao quimioterápico doxorubicina, quando comparado à cultura em monocamada (LIN E CHANG, 2008).

A citotoxicidade do CRX, observada no ensaio do alamar blue, foi confirmada pelo ensaio de exclusão com o corante azul de tripam, no qual observamos a diminuição do número de células viáveis. A análise da distribuição subcelular do rutênio por EDS revelou uma maior concentração do complexo no núcleo da célula. Subsequentemente, observamos que o complexo atua como intercalante do DNA e inibe sua síntese de DNA em células HepG2. Outros complexos de rutênio já demonstraram atuar por meio de interações ao DNA, dentre eles, podemos citar o KP1019 (*trans*-[tetrachlorobis(1*H*-indazole)ruthenate), o qual possui potente capacidade de intercalar ao DNA e tem se destacado por sua eficácia em tumores com resistência intrínseca à cisplatina (JACUPEC et al., 2008; BERGAMO et al., 2012).

A análise de transcritos de RNA revelou mudanças em genes relacionados ao controle do ciclo celular, à apoptose e mais de 7 genes relacionados a via MAPK, indicando um papel significativo da sinalização MAPK para a atuação do CRX em

células HepG2. Dentre os genes relacionados ao controle do ciclo celular, o CDKN2A foi regulado positivamente, gene responsável por codificar as proteínas p16 e p14, as quais atuam como supressores tumorais envolvidos na inibição do ciclo celular através de diferentes vias, sendo necessário para a transição do ciclo celular entre as fases G₁/S (PUNTERVOLL et al., 2013). De fato, a parada do ciclo celular em fase S foi observada em células HepG2 tratadas com CRX, seguida pela indução da via de apoptose mediada pelas caspases. Conforme descrito na literatura, complexos de rutênio com diferentes ligantes foram relatados por terem a capacidade de ligação ao DNA nuclear, induzindo à inibição da síntese de DNA e levando à morte celular por apoptose por vias associadas a receptor de morte celular e/ou por via mitocondrial e/ou estresse oxidativo (JAIN et al., 2013; ALAGESAN et al., 2014; ZENG et al., 2016; DENG et al., 2017; MILUTINOVIĆ et al., 2017; WAN et al., 2017; COSTA et al., 2017). Jovanović e colaboradores (2016) relataram parada do ciclo celular em fase S e morte celular por ativação da via apoptótica (mitocondrial) intrínseca, utilizando um complexo de rutênio-areno com um ligante isoquinolina-3-carboxílico. Também condizente com os resultados encontrados nesse estudo, o complexo de rutênio [Ru(dmp)₂(NMIP)](ClO₄)₂ também inibiu o crescimento celular na fase S e levou células de osteosarcoma à morte celular por apoptose por via mitocondrial (ZHU et al., 2016). Em ambos os estudos, foi observado um aumento nos níveis de ERO. Entretanto, não observamos aumento de ERO em nosso estudo com células HepG2 tratadas com CRX.

As análises referentes à análise morfológica demonstram características típicas de morte celular apoptótica, como redução do tamanho celular, fragmentação nuclear, núcleo picnótico, assim como, um aumento da externalização de fosfatidilserina e ativação de caspases também foram observados em análise de citometria de fluxo, ratificando os resultados encontrados na análise morfológica. Foi observada ainda a perda do potencial transmembrânico mitocondrial, que pode levar à liberação de agentes pró-apoptóticos e conseqüentemente à apoptose desencadeada pela mitocôndria (CHEN, et al., 2013). A apoptose induzida por CRX foi evitada pelo pré-tratamento com um inibidor de não seletivo de caspases, um inibidor seletivo de caspase 8 e um inibidor seletivo de caspase 9. Já é bastante descrito na literatura a atuação da caspase 8 relacionada à via do receptor de morte extrínseca, mostrando que essa protease desempenha importante função na iniciação da apoptose (OLSSON; ZHIVOTOVSKY, 2011).

A via intrínseca da apoptose é regulada por membros da família Bcl-2 e também por caspases. As proteínas Bad, podem atuar inativando os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 levando a célula à apoptose (SINICROPE et al., 2008). Utilizando uma linhagem BAD KO SV40 MEF (fibroblasto embrionário de camundongo imortalizado knockout para BAD) e na sua linhagem celular parental WT SV40 MEF (fibroblasto embrionário de camundongo imortalizado de tipo BAD selvagem) verificamos se o gene BAD é essencial para a apoptose causada pelo composto. Os valores CI₅₀ para CRX

foram de 3,9 μM para a linhagem celular WT SV40 MEF e de 4,1 μM para a linhagem celular BAD KO SV40, sugerindo que BAD não é essencial para a citotoxicidade induzida por CRX.

A análise de transcritos de RNA também mostrou participação de membros da família Bcl-2 na morte celular apoptótica. Em resposta ao estímulo citotóxico causada por CRX, o gene BCL2L11 (também conhecida como BIM), foi regulado positivamente. O aumento da expressão do BCL2L11 e de sua proteína corresponde, pode levar à uma maior interação desta às proteínas anti-apoptóticas, permitindo que proteínas pro-apoptóticas, como Bax e Bak, formem canais na membrana mitocondrial levando a liberação do citocromo C e levando à morte celular por apoptose (CZABOTAR et al., 2009).

No que se refere ao papel das vias de sinalização MAPK na morte celular causada por CRX em células HepG2, foi observado um aumento da fosforilação de ERK1/2 em células HepG2 tratadas com CRX. Além disso, o pré-tratamento com um inibidor de MKK (U-0126), que inibe a ativação de ERK1/2, impediu a apoptose induzida por CRX, indicando que o complexo é capaz de ativar uma via apoptótica em células HepG2 mediada por ERK1/2. De fato, embora ERK1/2 tenha uma função pró-sobrevivência na via de sinalização MAPK, sendo em geral reconhecida por seus efeitos tumorigênicos, a ativação ERK1/2 também pode levar a apoptose. O quimioterápico etoposídeo, assim como alguns compostos de platina e outros agentes que causam danos ao DNA, atuam ativando ERK1/2 em diferentes linhagens celulares, levando a morte celular apoptótica. Esses efeitos são revertidos na presença de um inibidor ERK1/2, reduzindo fortemente a apoptose induzida por essas moléculas (WANG et al., 2000; WU et al., 2006; YAN et al., 2007; WEI et al., 2010). Adicionalmente, a apoptose mediada por ERK1/2 causada por agentes que causam danos ao DNA pode ocorrer por agentes que causam danos diretos ao DNA ou via produção de ERO. Nesse estudo, os achados demonstram que a citotoxicidade causada por CRX não está relacionada com o estresse oxidativo, como citado anteriormente; Entretanto, observamos que o complexo CRX é capaz de intercalar com o DNA.

A via p53 também pode ser ativada quando ocorre danos ao 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). Nossos resultados são condizentes com o estudo de Tang e colaboradores (2002), uma vez que o pré-tratamento com um inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica) não impediu a apoptose induzida por CRX, indicando que a ativação da apoptose mediada por ERK1/2 em células HepG2 ocorreu por via independente de p53. Observamos ainda que, o principal gene da ativação da via p53 (TP53), no ensaio de análise do RNA transcrito, foi encontrado regulado negativamente, e o gene relacionado à inativação de p53 (MDM2) foi encontrado regulado positivamente em células HepG2 tratadas com CRX. Assim, os

resultados indicam que o CRX se acumula no núcleo da célula, causando intercalação com o DNA, inibindo a síntese de DNA, provocando parada do ciclo celular em fase S e desencadeia morte celular por apoptose mediada por ERK1/2 em células HepG2 através de uma via independente de p53. A **Figura 22** resume o mecanismo de ação citotóxico proposto para o complexo CRX em células HepG2.

A atividade antitumoral *in vivo* de CRX também foi investigada em camundongos SCID C.B-17 enxertados com células HepG2. O complexo CRX reduziu o crescimento de células HepG2 de forma mais eficiente do que a doxorrubicina e 5-fluorouracil, e reduziu o número de figuras mitóticas em células HepG2. Deng e colaboradores (2017) demonstraram que o complexo de rutênio com um derivado de fenilterpiridina inibiu o desenvolvimento de células do melanoma humano A375 em modelo xenográfico. 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). Adicionalmente, Zhu e colaboradores observaram uma diminuição no peso tumoral em camundongos inoculados com células de osteosarcoma HOS por um complexo de rutênio (II) (ZHU et al., 2016).

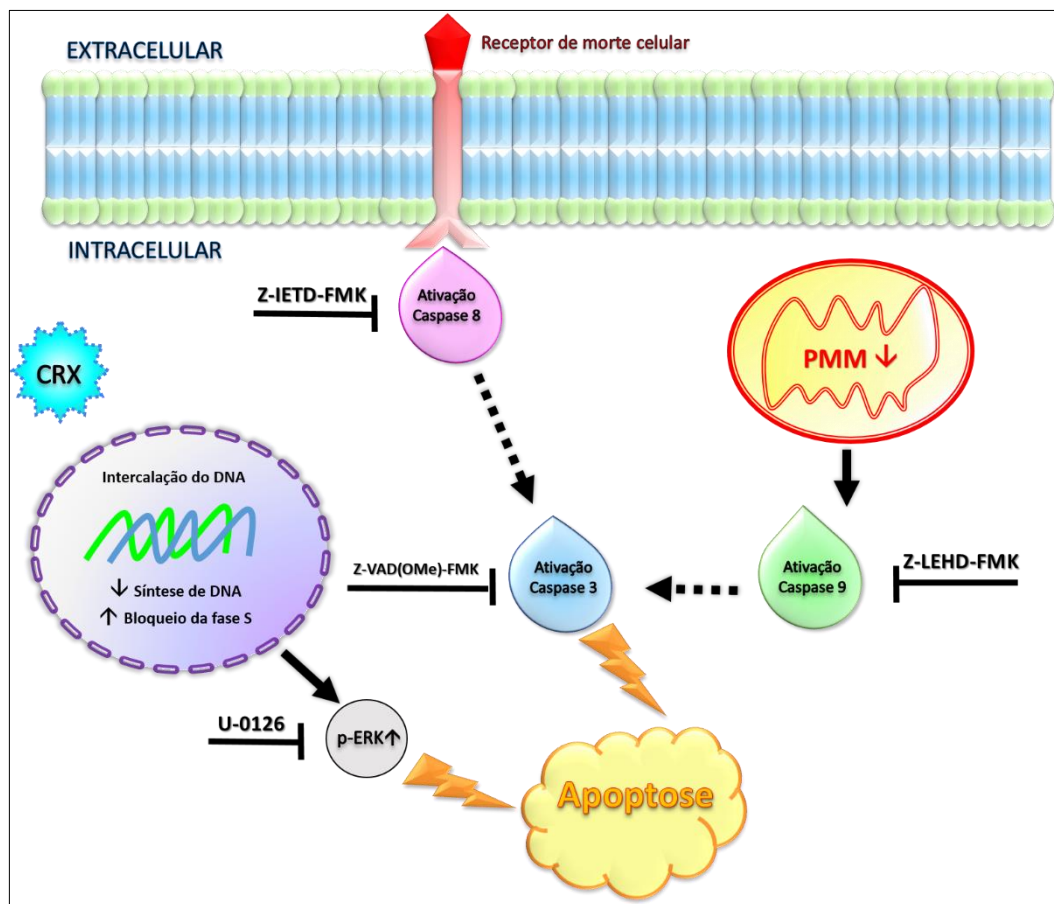


Figura 22. Resumo do mecanismo de ação citotóxico proposto para o complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) em células HepG2.

7 CONCLUSÃO

O nosso estudo revelou que o complexo de rutênio com xantoxilina com fórmula química *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆) exibe uma citotoxicidade potente em um painel de diferentes células tumorais, que foi associada à intercalação do DNA e à inibição da síntese de DNA. Observamos também parada do ciclo celular na fase S, seguido de indução da apoptose mediada por caspase e ERK1/2 em células HepG2 por uma via independente de p53. Além disso, o complexo reduziu o crescimento de células HepG2 no modelo de xenográfico, indicando que este é um novo candidato à fármaco anticancerígeno.

REFERÊNCIAS

ABID, M.; SHAMSI, F.; AZAM, A. Ruthenium complexes: An emerging ground to the development of metallopharmaceuticals for cancer therapy. **Mini Reviews In Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 772-786, 2016.

ALAGESAN, M., BHUVANESH, N.S.; DHARMARAJ, N. An investigation on new ruthenium(II) hydrazone complexes as anticancer agents and their interaction with biomolecules. **Dalton Transactions**, v. 43, p. 6087-6099, 2014.

ANTONARAKIS, E.S.; EMADI, A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 66, p. 1-9, 2010.

BERGAMO, A. *et al.* Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.106, p.90-99, 2012.

BOECK, P. *et al.* Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxylone-derived chalcones. **Archiv der Pharmazie**, v. 338, p. 87-95, 2005.

BRABEC, V.; NAVÁKOVÁ, O. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. **Drug Resistance Updates**, v. 9, p. 111-122, 2006.

BUPATHI, M.; KASEB, A.; MERIC-BERNSTAM, F.; NAING, A. Hepatocellular carcinoma: Where there is unmet need. **Molecular Oncology**, v. 9, p. 1501-1509, 2015.

BURKHART, D.L.; SAGE J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nature Reviews. Cancer**, v. 8, p. 671-682, 2008.

CAI, Q. *et al.* MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: biology, entity, differential diagnosis and clinical management. **Oncotarget**, v. 6, p.38591-38616, 2015.

CALIXTO, J.B. *et al.* Action of 2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone isolated from *Sebastiania schottiana*. **Planta Medica**, v. 56, p. 31-35, 1990.

CAMPO-BUZZI, F. *et al.* Antinociceptive effects of synthetic chalcones obtained from xanthoxylone. **Archiv der Pharmazie**, v. 339, p. 361-365, 2006.

CERESOLI, G.L.; ZUCALI, P.A. Vinca alkaloids in the therapeutic management of malignant pleural mesothelioma. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, p. 853-858, 2015.

CHATURVEDI, P.K.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. Lupeol: connotations for chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 263, p. 1-13, 2008.

CHEN, L. M. *et al.* The studies on the cytotoxicity in vitro, cellular uptake, cell cycle arrest and apoptosis-inducing properties of ruthenium methylimidazole complex [Ru(MeIm)₄(p-cpip)](2). **Journal Inorganic Biochemistry**, v.156, p. 64-74, 2016.

- 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.
- CHOW, S.; PATEL, H.; HEDLEY, D.W. Measurement of MAP kinase activation by flow cytometry using phospho-specific antibodies to MEK and ERK: potential for pharmacodynamic monitoring of signal transduction inhibitors. **Cytometry**, v. 46, p. 72-78, 2001.
- COSTA, C.O.D. *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.
- CRAWFORD, S. Is it time for a new paradigm for systemic cancer treatment? Lessons from a century of cancer chemotherapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 1-18, 2013.
- CZABOTAR, P.E.; COLMAN, P. M.; HUANG, D. C. Bax activation by Bim? **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 1187-1191, 2009.
- DANG, C.V. links between metabolism and cancer. **Genes & Development**, v. 26, p. 877-890, 2012.
- DENG, Z. *et al.* Ruthenium complexes with phenylterpyridine derivatives target cell membrane and trigger death receptors-mediated apoptosis in cancer cells. **Biomaterials**, v. 129, 111–126, 2017.
- DESAI, A.G. *et al.* Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention. **Current Drug Metabolism**. v. 9, p. 581-591, 2008.
- DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v. 110, p. 525-541, 2006.
- DWYER, F.P.; GOODWIN, H.A.; GYARFAS, E.C. Mono- and bis-(2,2'-bipyridine) and -(1,10-phenanthroline) chelates of ruthenium and osmium. II. bischelates of bivalent and trivalent ruthenium. **Australian Journal of Chemistry**, v. 16, p. 544-548, 1963.
- FELSHER, D.W. Oncogene addiction versus oncogene amnesia: perhaps more than just a bad habit? **Cancer Research**, v. 68, p. 3081-3086, 2008.
- FENNEMA, E. *et al.* Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. **Trends in Biotechnology**, v.31, p.108-115, 2013.
- FERREIRA, P.M.P. *et al.* Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, São Paulo. v. 83, p. 1045-1058, 2011.
- FOUAD, Y.A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, p. 1016-1036, 2017.
- FREZZA, M. *et al.* Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, p. 1813-1825, 2010.

GALANSKI, M. *et al.* Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 2078-2089, 2003.

GEWITZ, D.A. A Critical Evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, p. 727-741, 1999.

GLASS, L.S. *et al.* Semi-automated high-throughput fluorescent intercalator displacement-based discovery of cytotoxic DNA binding agents from a large compound library. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p.1685-1688, 2010.

GLOBAL BURDEN OF DEASEASE CANCER COLLABORATION *et al.* The Global Burden of Cancer 2013. **JAMA Oncology**, v.1 (4), p. 505-527, 2015.

GLOBOCAN. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC: Liver Cancer – estimated incidence, mortality and prevalence Worldwide in 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/liver-new.asp>. Acesso em: 16 jan. 2018.

GORDALIZA, M. *et al.* Cytotoxic cyclolignans related to podophyllotoxin. **II Farmaco**, v. 56, p. 297-304, 2001.

GRANSBURY, G.K. *et al.* Comparison of KP1019 and NAMI-A in tumour-mimetic environments. **Metallomics: integrated biometal Science**, v. 8, n. 8, p. 762-773, 2016.

GUDDATI, A.K. A novel strategy of cancer therapy by enucleation. **Journal of Experimental Therapeutics & Oncology**, v. 10, p. 113 -117, 2012.

GUO, X.E. *et al.* Targeting tumor suppressor networks for cancer therapeutics. **Current Drug Targets**, v. 15, p. 1-16, 2014.

GUTSCHNER, T.; DIEDERICHS, S. The hallmarks of cancer – A long non-coding RNA point of view. **RNA Biology**, v. 9, p. 703-719, 2012.

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

HARTINGER, C.G. *et al.* From bench to bedside--preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 891-904, 2006.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>. Acesso em: 16 jan. 2018.

JAIN, S. S. *et al.* RNA binding and inhibition of primer extension by a Ru(III)/Pt(II) metal complex. **Chemical Communications**, v. 49, 5031-5033, 2013.

JAKUPEC, M. A. *et al.* Antitumour metal compounds: more than theme and variations. **Dalton transactions**, v.2, p.183-194, 2008.

- JORDAN, M.N.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer Drugs. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 253-265, 2004.
- JOVANOVIĆ, K.K. *et al.* cycle, apoptosis, cellular uptake and wholetranscriptome microarray gene expression analysis of HeLa cells treated with a ruthenium(II)-arene complex with an isoquinoline-3-carboxylic acid ligand. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 163, 362-373, 2016.
- KANWAL, R; GUPTA, K; GUPTA, S. Cancer epigenetics: an introduction. **Methods in Molecular Biology**, v. 1238, p. 3 – 25, 2015.
- KARIKAS, G.A. Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. **Journal of B.U.ON**, v. 15, p. 627-638, 2010.
- KAVALLARIS, M.; VERRILLS, N.M.; HILL, B.T. Anticancer therapy with novel tubulin-interacting drugs. **Drug Resistance Updates**, v. 4, p. 392-401, 2001.
- KIRK, R.G. *et al.* Quantitative X-ray imaging of labelled molecules in tissues and cells. **Journal of Microscopy**, v. 183, p.181-186, 1996.
- KÖHLER C.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, p. 97-110, 2002.
- KÖPF-MAIER, P. Complexes of metals other than platinum as antitumour agents. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, p. 1-16, 1994.
- KOSTOVA, I. Ruthenium complexes as anticancer agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1085-1107, 2006.
- LANE, D.P.; LAIN, S. Therapeutic exploitation of the p53 pathway. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, p. S38-42, 2002.
- LEBEL, C.P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v.5, p.227-231, 1992.
- LEVINA, A.; MITRA, A.; LAY, P.A. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. **Metalomics: integrated biometal Science**, v. 1 (6), p. 458-470, 2009.
- LEVINE, A.J.; PUZIO-KUTER, A.M. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. **Science**, v. 330, p. 1340-1344, 2010.
- LIN, R. Z.; CHANG, H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnology Journal**, v.3, p. 1172-1184, 2008.
- LIU, L. *et al.* The role of autophagy in hepatocellular carcinoma: friend or foe. **Oncotarget**, v. 8, p. 57707-57722, 2017.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LUO, G *et al.* HBV infection increases the risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. **Cancer Causes & Control**. v. 24, p. 529-537, 2013.

MARTÍNEZ-CLIMENT, J.A; ANDREU, E.J; PROSPER, F. Somatic stem cells and the origin of cancer. **Clinical & Translational Oncology**, v. 8, p. 647-663, 2006.

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

MUNTEANU, C.R.; SUNTHARALINGAM, K. Advances in cobalt complexes as anticancer agents. **Dalton Transactions**, v. 44, p. 13796-13808, 2015.

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

O'CONNOR, S.E. Plant Biochemistry. Fighting Cancer While Saving The Mayapple. **Science**, v. 349, p. 1167-1168, 2015.

OLIVEIRA, R.M.M.; DANIEL, J.F.S.; CARLOS, R.M. Synthesis, spectroscopic characterization and biological activity of cis-[Ru(hesperidin)(1,10'-phenanthroline)2](PF6) complex. **Journal of Molecular Structure**, v. 1031, p. 269–274, 2013.

OLIVEIRA, R.M.M. *et al.* CARLOS, R.M. Structural effects on the hesperidin properties obtained by chelation to magnesium complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 129, p. 35–42, 2013.

OLSSON M.; ZHIVOTOVSKY, B. Caspases and cancer. **Cell Death Differ**, v.18, p. 1441-1449, 2011.

OTT, I.; GUST, R. Non Platinum Metal Complexes as Anti-cancer Drugs. **Archiv der Pharmazie**, v. 340, p. 117-126, 2007.

PETRICH, A.M.; NABHAN, C.; SMITH, S.M. MYC-associated and double-hit lymphomas: A review of pathobiology, prognosis, and therapeutic approaches. **Cancer**, v. 120, p. 3884- 3895, 2014.

PUNTERVOLL, H. E. *et al.* Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. **Journal of Medical Genetics**, v. 50, p. 264-270, 2013.

RAHMAN, M.; HASAN, M.R. Cancer Metabolism and Drug Resistance. **Metabolites**, v. 5, p. 571-600, 2015.

RALPH, S.J. *et al.* The causes of cancer revisited: “Mitochondrial malignancy” and ROS-induced oncogenic transformation – Why mitochondria are targets for cancer therapy. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 145 – 170, 2010.

RAVERA, M. *et al.* Appraisal of the redox behaviour of the antimetastatic ruthenium(III) complex [ImH][RuCl(4)(DMSO)(Im)], NAMI-A. **Dalton Transactions**, v. 15, p. 2347-2351, 2004.

SAVA, Z. *et al.* Antineoplastic activity and toxicity of an organometallic complex of ruthenium(II) in comparison with cis-PDD in mice bearing solid malignant neoplasms. **European Journal of Cancer & Clinical Oncology**, v. 20, p. 841-847, 1984.

SCHMITT, S.M.; FREZZA, M.; DOU, Q.P. New applications of old metal-binding drugs in the treatment of human cancer. **Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)**, v. 4, p. 375-391, 2012.

SEKI, Y.; MIZUKAMI, T.; KOHNO, T. Molecular Process Producing Oncogene Fusion in Lung Cancer Cells by Illegitimate Repair of DNA Double-Strand Breaks. **Biomolecules**, v. 5, p. 2464-2476, 2015.

SILVA, D.O. Perspectives for novel mixed diruthenium-organic drugs as metallopharmaceuticals in cancer therapy. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 312 – 323, 2010.

SINGH, H.; LONGO, D.L.; CHABNER, B.A. Improving Prospects for Targeting RAS. **Journal of Clinical Oncology**, v. 62, p. 1052-1064, 2015.

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.

SINICROPE, F. A. *et al.* Proapoptotic Bad and Bid protein expression predict survival in stages II and III colon cancers. **Clinical Cancer Research**, v.14, p.4128-4133, 2008.

SOLOMON, H.; MADAR, S.; ROTTER, V. Mutant p53 gain of function is interwoven into the hallmarks of cancer. **The Journal of Pathology**, v. 225, p. 475-478, 2011.

SPANDIDOS, D.A. Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis. **Journal of B.U.ON**, v. 1, p. 9-12, 2007.

SUREDA, F.X. *et al.* A. Mitochondrial membrane potential measurement in rat cerebellar neurons by flow cytometry. **Cytometry**, v. 28, p.74-80, 1997.

TAKASHIMA, A.; FALLER, D.V. Targeting the RAS oncogene. **Expert Opinion on Therapeutics Targets**, v. 17, p. 507-531, 2013.

TAN, S.J. *et al.* Cooper, gold and silver compounds as potential new anti-tumor metallodrugs. **Future Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 1591-1608, 2010.

TANG, D. *et al.* ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 12710–12717, 2002.

TOIYAMA, Y; OKUGAWA, Y; GOEL, A. DNA methylation and microRNA biomarkers for noninvasive detection of gastric and colorectal cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 455, p. 43 – 57, 2014.

TORNESELLO, M.L. *et al.* Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA genes in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B and hepatitis C virus infections. **Genomics**, v. 102, p. 74-83, 2013.

TULLO A.; D'ERCHIA, A.M.; SBISÀ E. Methods for screening tumors for p53 status and therapeutic exploitation. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 3, p. 289-301, 2003.

VALDESPINO-GÓMEZ, V.M; VALDESPINO-CASTILLO, V.E. Non-classical cellular and molecular deficits in cancer development. **Gaceta Medica de Mexico**, v, 146, p. 185 – 198, 2010.

VARGIU, A.V. *et al.* The hydrolysis mechanism of the anticancer ruthenium drugs NAMI-A and ICR investigated by DFT-PCM calculations. **The Journal of Physical Chemistry**, v.112, p. 4401-4409, 2008.

WAN, D. *et al.* Ruthenium (II) polypyridyl complexes: synthesis, characterization and anticancer activity studies on BEL-7402 cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 173, p. 1-11, 2017.

WANG, X.; MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 39435–39443, 2000.

WASOWSKA, M. *et al.* Influence of the structure of new anthracycline antibiotics on their biological properties. **Anticancer Research**, v. 25, p. 2043-2048, 2005.

WEI, F.; XIE, Y.; TAO, L.; TANG, D. Both ERK1 and ERK2 kinases promote G2/M arrest in etoposide-treated MCF7 cells by facilitating ATM activation. **Cell Signal**, v. 22, p. 1783-1789, 2010.

WU, D. *et al.* ERK activity facilitates activation of the S-phase DNA damage checkpoint by modulating ATR function. **Oncogene**, v. 25, p.1153–1164 2006.

YAN, Y.; BLACK, C. P.; COWAN, K. H. Irradiation-induced G2/M checkpoint response requires ERK1/2 activation. **Oncogene**, v. 26, p. 4689-4698, 2007.

YARBRO, J.W. Oncogenes and cancer suppressor genes. **Seminars in Oncology Nursing**, v.8, p. 30-39, 1992.

YOU, Y. Podophyllotoxin derivatives: current synthetic approaches for new anticancer agents. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 1695-1717, 2005.

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

ZHENG, K. *et al.* Ruthenium(II) Complexes as Potential Apoptosis Inducers in Chemotherapy. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 29-39, 2017.

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

APÊNDICE

Tabela 1. Efeito do tratamento com o complexo de rutênio com xantoxilina (CRX) sobre a expressão gênica de células HepG2

Símbolo	Nome Completo	QR	
		DOX	CRX
ABL1	ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	2,628	1,908
AKT1	AKT serine/threonine kinase 1	1,813	1,685
AKT2	AKT serine/threonine kinase 2	3,275	2,697
APC	APC, WNT signaling pathway regulator	1,780	1,106
BAX	BCL2 associated X, apoptosis regulator	0,964	0,887
BCAR1	BCAR1, Cas family scaffolding protein	2,176	2,846
BCL2	BCL2, apoptosis regulator	1,140	2,377
BCL2L1	BCL2 like 1	0,663	0,898
BCL2L11	BCL2 like 11	13,988	9,786
BID	BH3 interacting domain death agonist	1,433	1,477
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase	1,012	2,296
CASP8	caspase 8	1,414	1,493
CASP9	caspase 9	0,957	N.d.
CCND1	cyclin D1	0,820	4,752
CCND2	cyclin D2	N.d.	N.d.
CCND3	cyclin D3	1,151	2,397
CCNE1	cyclin E1	1,535	0,674
CDC42	cell division cycle 42	1,077	4,147
CDH1	cadherin 1	N.d.	1,051
CDK2	cyclin dependent kinase 2	4,331	1,251
CDK4	cyclin dependent kinase 4	1,427	2,737
CDKN1A	cyclin dependent kinase inhibitor 1A	2,849	0,628
CDKN1B	cyclin dependent kinase inhibitor 1B	1,029	0,543
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A	2,027	3,836
CDKN2B	cyclin dependent kinase inhibitor 2B	N.d.	N.d.
COL1A1	collagen type I alpha 1 chain	N.d.	N.d.
CRK	CRK proto-oncogene, adaptor protein	2,519	6,172
CTNNB1	catenin beta 1	2,392	1,930
CYCS	cytochrome c, somatic	0,582	1,927
DVL1	dishevelled segment polarity protein 1	0,539	2,712
E2F1	E2F transcription factor 1	4,768	7,081
EGFR	epidermal growth factor receptor	0,502	1,985
ELK1	ELK1, ETS transcription factor	2,142	5,179
ERBB2	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2	1,746	2,186
FADD	Fas associated via death domain	3,100	1,854
FAS	Fas cell surface death receptor	2,459	2,845
FASLG	Fas ligand	N.d.	N.d.
FGF2	fibroblast growth factor 2	1,914	5,503
FN1	fibronectin 1	N.d.	N.d.
FOS	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	1,514	1,472
FYN	FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	1,034	2,240
FZD1	frizzled class receptor 1	5,811	4,807
GRB2	growth factor receptor bound protein 2	1,030	0,855
GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta	0,590	0,999
HGF	hepatocyte growth factor	N.d.	N.d.
HRAS	HRas proto-oncogene, GTPase	1,370	2,071
IGF1	insulin like growth factor 1	N.d.	N.d.
IGF1R	insulin like growth factor 1 receptor	1,160	1,052
ITGA2B	integrin subunit alpha 2b	2,384	5,437
ITGAV	integrin subunit alpha V	2,101	1,126

ITGB1	integrin subunit beta 1	1,941	1,547
ITGB3	integrin subunit beta 3	1,707	1,478
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	7,340	4,475
KDR	kinase insert domain receptor	N.d.	N.d.
KIT	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase	N.d.	N.d.
KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase	2,552	4,786
LEF1	lymphoid enhancer binding factor 1	N.d.	N.d.
MAP2K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	2,441	2,591
MAP3K5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1,887	1,752
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	0,857	2,124
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	2,163	3,025
MAPK3	mitogen-activated protein kinase 3	1,561	1,762
MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8	1,273	1,293
MAX	MYC associated factor X	N.d.	N.d.
MDM2	MDM2 proto-oncogene	0,928	3,153
MYC	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor	0,392	4,304
NFKB1	nuclear factor kappa B subunit 1	2,017	2,156
NFKB2	nuclear factor kappa B subunit 2	3,594	3,621
NFKBIA	NFKB inhibitor alpha	1,224	1,342
NRAS	NRAS proto-oncogene, GTPase	1,874	1,862
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha	2,854	1,265
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1	6,207	1,408
PTEN	phosphatase and tensin homolog	0,476	0,644
PTK2	protein tyrosine kinase 2	0,948	2,034
PTK2B	protein tyrosine kinase 2 beta	0,530	0,803
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	2,048	1,199
RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	3,447	4,645
RB1	RB transcriptional corepressor 1	1,230	0,795
RELA	RELA proto-oncogene, NF-kB subunit	1,074	2,403
RHOA	ras homolog family member A	1,270	1,541
SHC1	SHC adaptor protein 1	1,865	3,702
SMAD4	SMAD family member 4	2,601	3,549
SOS1	SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1	2,199	4,992
SPP1	secreted phosphoprotein 1	N.d.	N.d.
SRC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase	1,036	1,833
TCF3	transcription factor 3	1,915	3,166
TGFB1	transforming growth factor beta 1	1,413	1,267
TGFBR1	transforming growth factor beta receptor 1	1,403	1,352
TGFBR2	transforming growth factor beta receptor 2	1,094	1,069
TP53	tumor protein p53	0,945	0,471
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	1,772	3,759
WNT1	Wnt family member 1	N.d.	N.d.

As células HepG2 foram tratadas com 12 μ M de CRX por 12 h. O controle negativo foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para diluir o composto testado. A doxorubicina (DOX, 2 μ M) foi utilizada como controle positivo. Após o tratamento, o RNA total foi isolado e transcrito de forma reversa. A expressão dos genes foi detectada usando uma placa de 96 poços TaqMan®. Os genes GAPDH, 18S e HPRT1 foram utilizados como genes endógenos para a normalização. Os valores representam a quantificação relativa (QR) em comparação com o calibrador (células tratadas com o controle negativo, QR = 1,0). Os genes foram considerados como regulados positivamente quando QR \geq 2 e foram considerados como regulados negativamente se QR \leq 0,5. N.d. Não determinado.

ANEXO

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

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

ARTICLE

Open Access

A novel ruthenium complex with xanthoxylin induces S-phase arrest and causes ERK1/2-mediated apoptosis in HepG2 cells through a p53-independent pathway

Nanashara C. de Carvalho¹, Sara P. Neves¹, Rosane B. Dias¹, Ludmila de F. Valverde¹, Caroline B. S. Sales², Clarissa A. G. Rocha¹, Milena B. P. Soares^{1,3}, Edjane R. dos Santos⁴, Regina M. M. Oliveira⁴, Rose M. Carlos⁴, Paulo C. L. Nogueira⁵ and Daniel P. Bezerra¹

Abstract

Ruthenium-based compounds have gained great interest due to their potent cytotoxicity in cancer cells; however, much of their potential applications remain unexplored. In this paper, we report the synthesis of a novel ruthenium complex with xanthoxylin (RCX) and the investigation of its cellular and molecular action in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. We found that RCX exhibited a potent cytotoxic effect in a panel of cancer cell lines in monolayer cultures and in a 3D model of multicellular cancer spheroids formed from HepG2 cells. This compound is detected at a high concentration in the cell nuclei, induces DNA intercalation and inhibits DNA synthesis, arresting the cell cycle in the S-phase, which is followed by the activation of the caspase-mediated apoptosis pathway in HepG2 cells. Gene expression analysis revealed changes in the expression of genes related to cell cycle control, apoptosis and the MAPK pathway. In addition, RCX induced the phosphorylation of ERK1/2, and pretreatment with U-0126, an MEK inhibitor known to inhibit the activation of ERK1/2, prevented RCX-induced apoptosis. In contrast, pretreatment with a p53 inhibitor (cyclic pifithrin- α) did not prevent RCX-induced apoptosis, indicating the activation of a p53-independent apoptosis pathway. RCX also presented a potent *in vivo* antitumor effect in C.B-17 SCID mice engrafted with HepG2 cells. Altogether, these results indicate that RCX is a novel anticancer drug candidate.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a primary malignancy of the liver that accounts for most liver cancers, which is also one of the most common cancers in the world. In 2012, HCC was estimated to be responsible for approximately 746,000 deaths worldwide¹. The

antineoplastic chemotherapy for HCC includes doxorubicin, cisplatin and 5-fluorouracil alone or in combination with each other but has low efficacy². More recently, sorafenib, a tyrosine kinase inhibitor, was introduced as the only validated systemic therapy for advanced HCC treatment; however, this treatment prolongs survival by only a mere 3 months. Other tyrosine kinase inhibitors have also been evaluated for HCC but with failed results^{3,4}.

Metal complexes have been investigated for cancer treatment since the discovery of the cytotoxic properties of cisplatin, a platinum-based compound⁵. Among them,

Correspondence: Daniel P. Bezerra (danielpbezerra@gmail.com)

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

²Department of Biomorphology, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia 40110-902, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Edited by M. Campanella

© The Author(s). 2018



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

ruthenium-based compounds have received great interest due to their potent cytotoxic activity in cancer cells^{6–9}, and significant progress in the preclinical and clinical development of ruthenium complexes as antineoplastic agents has been observed. These include the development of NAMI-A ([ImH][trans-RuCl₄(DMSO)(Im)], where Im = imidazole and DMSO = dimethylsulfoxide) and KP1019 ([IndH][trans-RuCl₄(Ind)₂], where Ind = indazole), which are in phase I/II clinical trials^{10,11}. On the other hand, since the structure of the ligand of the metal-based compounds is related to the cytotoxicity of these complexes, various potentialities of ruthenium complexes remain unexplored.

To obtain additional information about the cytotoxic potential of ruthenium-based compounds, a new ligand, xanthoxylin, was used to synthesize a novel ruthenium complex. Xanthoxylin (2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone) is a plant-derived molecule with antibacterial, antifungal, antinociceptive, antiedematogenic and antispasmodic activities^{12–15}. In this paper, we report the synthesis of a novel ruthenium complex with xanthoxylin (RCX), *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆) (phen = 1,10'-phenanthroline; xant = xanthoxylin) and the investigation of its cellular and molecular action on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells.

Results

Synthesis of novel ruthenium complex with xanthoxylin

The RCX was synthesized by reacting a previously deprotonated xanthoxylin with the precursor complex [Ru(phen)₂Cl₂] in an ethanol/water mixture using a procedure similar to one already established^{16,17} (Fig. 1). Xanthoxylin is expected to coordinate with the metal center bidentate after deprotonation of the hydroxyl group. The geometry of the formed complex was determined by spectroscopic techniques. The ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum of RCX was obtained in DMSO-*d*₆ at 25 °C. The spectrum is shown in Fig. 2a, and the complete assignments are summarized in Table S1. By integrating the area of the hydrogen signals into the ¹H NMR spectrum of RCX, the signals corresponding to the xanthoxylin and 1,10'-phenanthroline portions were found to be present at a ratio of 1:2, indicating that the Ru(II) ion is hexacoordinated and that chelation occurred through the oxygen atoms of the C1-O⁻ and C1'=O groups of xanthoxylin and the nitrogen atoms of the two phenanthrolines. In the ¹H NMR spectrum of RCX, the signal at 13.77 ppm that was attributed to the proton of the 1-OH group of metal-free xanthoxylin is not present. In addition, the signals of the protons 2-COCH₃, 3-OCH₃, 5-OCH₃, 4 and 6 were displaced -0.23, -0.25, -0.15, -0.48 and -0.45 ppm, respectively. Thus, all hydrogen signals of the coordinated xanthoxylin were shifted to a high field. These data are consistent with the redistribution of the xanthoxylin electrons involved in the Ru(II) coordination.

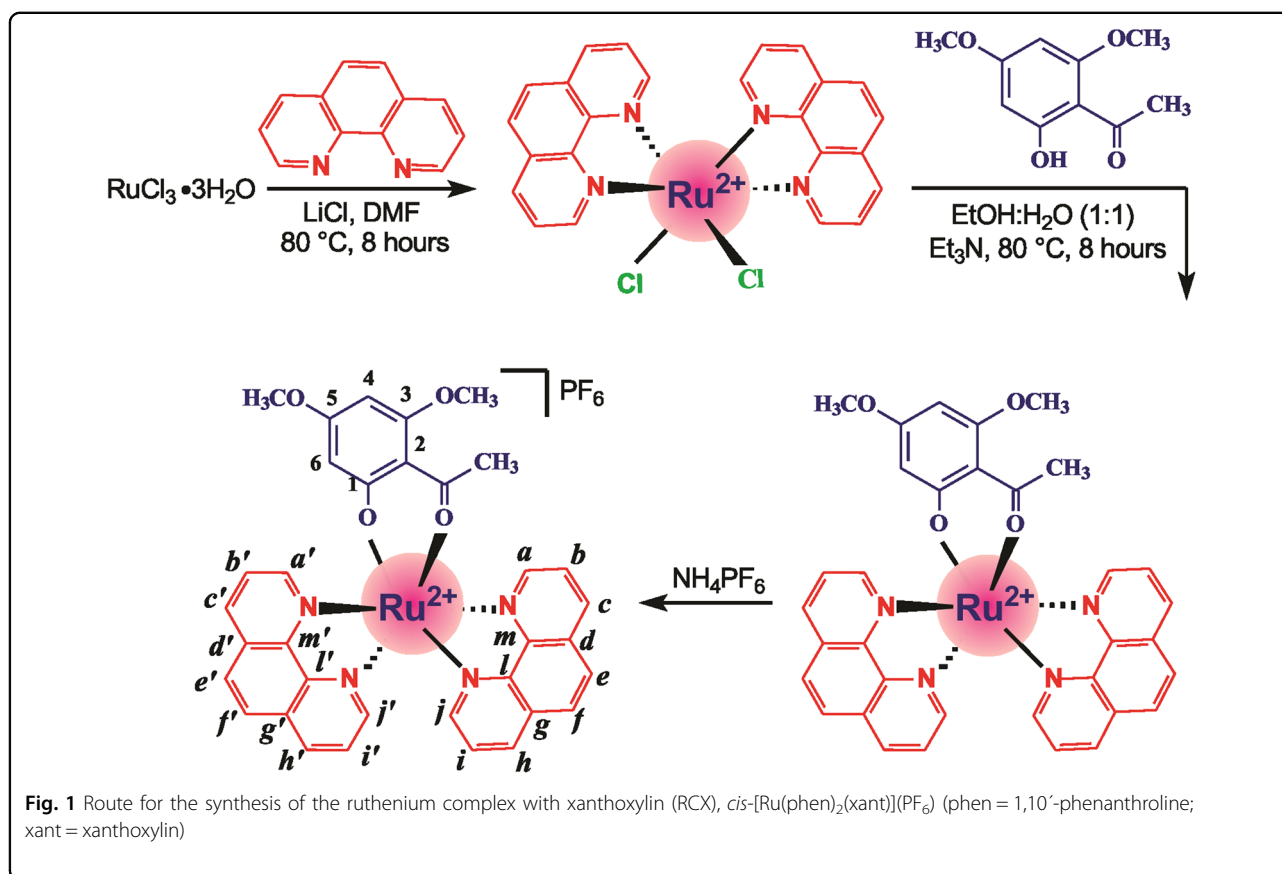
These displacements are also consistent with the displacement of the redox potential of RCX, which presents a reversible electron-centered process with $E_{1/2} = 751$ mV, which is a more positive potential than that observed for the precursor complex *cis*-[RuCl₂(phen)₂], $E_{1/2} = 562$ mV (Fig. 2b). Therefore, the observation that the electron oxidation of RCX is more difficult than that of the precursor is consistent with the increased stabilization of the $d\pi$ orbitals of the metal ion, resulting from coordination with xanthoxylin.

The obtained infrared (IR) spectra of free xanthoxylin, precursor and RCX in CsI pellets are shown in Fig. 2c. In the IR spectrum of RCX, the carbonate peak of free xanthoxylin at 1622 cm⁻¹ decreased in intensity and was shifted to a lower energy, appearing at 1608 cm⁻¹. Additionally, the absence of the peak at 328 cm⁻¹ corresponding to the Ru-Cl stretch and the appearance of a new peak at 555 cm⁻¹ attributable to the Ru-O stretch is consistent with Ru(II) coordination^{18,19}. Additional peaks observed in the 1444–1110 cm⁻¹ range are attributed to the CH stretches of the ring deformation of the phenanthrolines and xanthoxylin linkers and at 844 cm⁻¹ is attributed to the ν (P-F) mode of the PF₆⁻ ion, which is consistent with previous studies²⁰.

The electronic absorption spectra of free xanthoxylin, the precursor and RCX complex obtained in DMF are shown in Fig. 2d. The intense and broad absorption band observed in the visible region of the precursor complex ($\lambda_{\text{max}} = 552$ nm, $\epsilon = 8137$ mol⁻¹ L cm⁻¹) and that of RCX ($\lambda_{\text{max}} = 510$ nm, $\epsilon = 19,555$ mol⁻¹ L cm⁻¹) are qualitatively attributed to the metal-to-ligand charge transfer (MLCT) transition (Ru, $d\pi \rightarrow$ phen, π^*). In accordance with the cyclic voltammetric measurements, the energy of RCX MLCT transition was lower than that found for its precursor complex.

Ruthenium complex with xanthoxylin exhibits potent cytotoxicity in a panel of different cancer cells

The cytotoxicity of RCX in a panel of 15 cancer cell lines and 3 non-cancer cells was evaluated using the Alamar blue assay after a 72 h of incubation. Table 1 shows the IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) obtained. RCX presented IC₅₀ values of 1.6 and 26.0 μ M for the HCT116 and ACP-03 cancer cell lines, respectively, representing the range of IC₅₀ values observed. The IC₅₀ values for non-cancer cells were 21.3, 6.1 and 4.6 μ M for the MRC-5, HaCAT and PBMC cells, respectively. Metal-free xanthoxylin was not cytotoxic to any cells at the concentrations tested (IC₅₀ > 127.4 μ M). Doxorubicin presented IC₅₀ values ranging from 0.2 to 6.8 μ M for the HCT116 and ACP-02 cancer cell lines, respectively, and 1.3, 0.1 and 5.2 μ M for the non-cancer cells MRC-5, HaCAT and PBMC, respectively. Oxaliplatin presented IC₅₀ values ranging from 0.6 to 7.7 μ M for the HL-60 and



SCC-4 cancer cell lines, respectively, and 9.5 and 9.4 μM for the non-cancer cells MRC-5 and PBMC. Table 2 shows the calculated selectivity index (SI). The SI was calculated using the following formula: $\text{SI} = \text{IC}_{50} [\text{non-cancer cells}] / \text{IC}_{50} [\text{cancer cells}]$. Based on the SI, RCX exhibited a selectivity index similar to or higher than that of the positive controls doxorubicin and oxaliplatin, which are clinically useful drugs in the treatment of cancer, in most of the cancer cell lines.

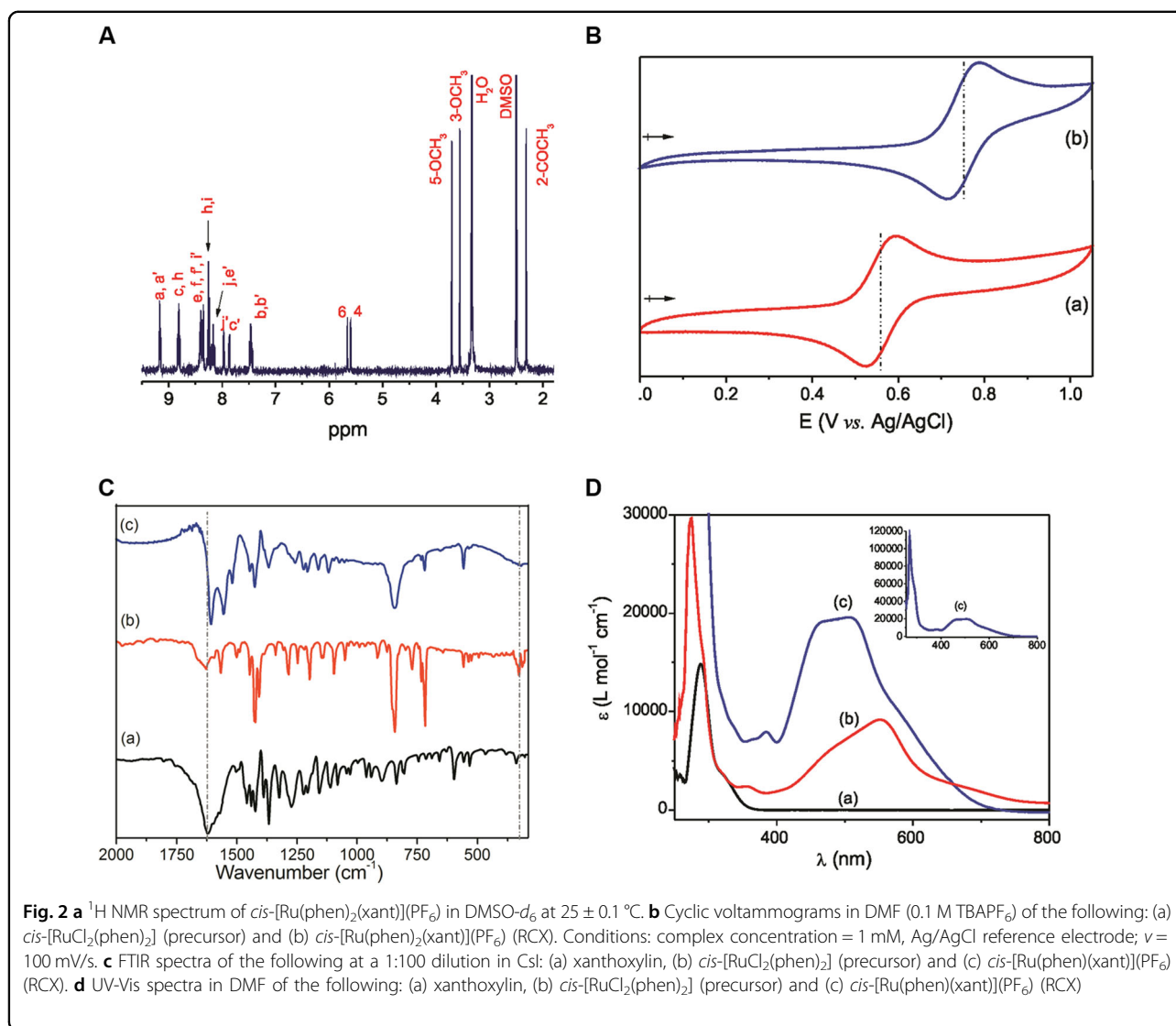
The cytotoxic effect of RCX was also evaluated with an *in vitro* three-dimensional (3D) model of cancer using multicellular spheroids formed from HepG2 cells. The morphological changes of the spheroids treated with RCX indicated drug permeability into the 3D culture (Fig. 3a). The IC_{50} value of RCX was 8.0 μM after a 72 h of incubation (Fig. 3b). Doxorubicin and oxaliplatin had IC_{50} values of 18.1 and 6.6 μM , respectively. Therefore, the human hepatocellular carcinoma HepG2 cell line was used as a cellular model for further experiments.

After incubating with RCX for 12, 24, 48 or 72 h, HepG2 cell viability was determined by the trypan blue exclusion (TBE) assay (Fig. S1). At the concentrations of 12 and 24 μM , RCX reduced the number of viable cells by 57.2% and 62.2%, respectively, after 24 h, 74.6% and 73.9% after 48 h, and 73.8% and 82.1% after 72 h. No significant

decrease in the number of viable cells was observed after the 12 h of incubation. In addition, RCX induced a significant increase in the number of non-viable cells only after the 48 and 72 h of incubations. Doxorubicin and oxaliplatin also reduced the number of viable cells after incubation for 24 h. Doxorubicin also induced a significant increase in the number of non-viable cells after a 72 h of incubation.

Ruthenium complex with xanthoxilin induces DNA intercalation and inhibits DNA synthesis

The subcellular distribution of ruthenium was assessed with an energy dispersive X-ray spectrometer (EDS) in RCX-treated HepG2 cells after a 3 h of incubation. Oxaliplatin, a positive control, was used to determine the subcellular platinum distribution. Similar to oxaliplatin, RCX was detected in both the cytoplasm and nucleus of HepG2 cells but was at the highest concentration in the cell nucleus (Fig. 3c). Thus, we decided to investigate if RCX is able to induce DNA intercalation. DNA intercalation was evaluated in a cell-free system using calf thymus DNA (ctDNA) as a model. For this, RCX was added to a DNA-ethidium bromide mixture to examine its ability to displace ethidium bromide from the DNA, thereby decreasing the fluorescence intensity of ethidium



bromide. At 20 μM , RCX treatment decreased the ethidium bromide fluorescence ($P < 0.05$), indicating that RCX intercalates with DNA (Fig. 3d). Doxorubicin, a known DNA intercalator, was used at 20 μM as the positive control and also significantly reduced the fluorescence intensity.

Since RCX was able to induce DNA intercalation, we investigated if it interferes with DNA synthesis in HepG2 cells. DNA synthesis was measured by the incorporation of methyl- ^3H -thymidine after a 3 h of incubation. At the concentrations of 12 and 24 μM , RCX reduced DNA synthesis in HepG2 cells by 46.4% and 65.2% ($P < 0.05$) (Fig. 3e), respectively. Mitoxantrone, a known DNA synthesis inhibitor, was used as the positive control and reduced DNA synthesis by 55.2% at 12 μM .

Ruthenium complex with xanthoxylin causes S-phase arrest in HepG2 cells

The effect of RCX on cell cycle progression and inter-nucleosomal DNA fragmentation of HepG2 cells after 12, 24, 48 or 72 h of incubation were evaluated using flow cytometry. Table 3 shows the cell cycle distribution. All DNA that was subdiploid (sub- G_0/G_1) was considered fragmented. At a concentration of 12 μM and after a 24 h of incubation, RCX treatment resulted in a significant increase in the number of cells in S-phase compared to the number of cells in S-phase in the negative control ($P < 0.05$). In addition to the increase in the number of cells in S-phase, an increase in the amount of inter-nucleosomal DNA fragmentation was also observed for both tested concentrations after a 12 h of incubation

Table 1 Cytotoxic activity of the ruthenium complex with xanthoxylin (RCX)

Cells	Histological type	IC ₅₀ in μM		
		DOX	OXA	RCX
Cancer cells				
HCT116	Human colon carcinoma	0.2 0.1–0.3	4.1 2.3–5.5	1.6 1.2–2.2
HT-29	Human colon adenocarcinoma	0.3 0.2–0.4	N.d.	3.4 2.4–4.8
MCF-7	Human breast adenocarcinoma	1.1 0.3–3.5	5.9 3.5–9.9	22.4 18.6–27.1
HepG2	Human hepatocellular carcinoma	1.3 1.0–1.8	2.2 1.3–3.8	13.5 11.6–15.8
HSC-3	Human oral squamous cell carcinoma	0.4 0.1–1.2	3.3 1.4–7.8	7.7 3.2–18.5
SCC-4	Human oral squamous cell carcinoma	2.1 1.7–2.6	7.7 4.6–13.0	5.3 4.0–7.1
SCC-9	Human oral squamous cell carcinoma	2.6 2.0–3.3	N.d.	3.4 1.8–6.5
SCC-15	Human oral squamous cell carcinoma	1.5 0.8–2.9	N.d.	6.8 3.7–11.9
SCC-25	Human oral squamous cell carcinoma	1.0 0.5–2.3	N.d.	6.5 5.2–8.0
AGP-01	Human ascitic gastric adenocarcinoma	1.9 0.9–4.3	N.d.	5.3 4.0–7.1
ACP-02	Human gastric adenocarcinoma	6.8 1.1–24.3	N.d.	18.3 14.2–23.5
ACP-03	Human gastric adenocarcinoma	2.4 0.9–6.0	N.d.	26.0 18.9–36.0
HL-60	Human promyelocytic leukemia	0.2 0.2–0.3	0.6 0.1–0.8	6.6 3.7–11.7
K-562	Human chronic myelogenous leukemia	1.0 0.6–1.8	1.0 0.1–1.3	6.1 3.7–10.0
B16-F10	Murine melanoma	0.6 0.4–0.7	2.2 1.2–4.1	12.4 9.2–16.8
Non-cancer cells				
MRC-5	Human lung fibroblast	1.3 1.0–1.5	9.5 5.7–15.9	21.3 17.0–26.7
HaCAT	Human keratinocyte	0.1 0.02–0.6	N.d.	6.1 3.1–12.0
PBMC	Human peripheral blood mononuclear cells	5.2 2.4–11.4	9.4 6.5–11.4	4.6 2.3–9.1

Table 2 Selectivity index of the ruthenium complex with xanthoxylin (RCX)

Cancer cells	Non-cancer cells								
	MRC5			HaCAT			PBMC		
	DOX	OXA	RCX	DOX	OXA	RCX	DOX	OXA	RCX
HCT116	6.5	2.3	13.3	0.5	N.d.	3.8	26	2.3	2.9
HT-29	4.3	N.d.	6.3	0.3	N.d.	1.8	17.3	N.d.	1.4
MCF-7	1.2	1.6	1	0.1	N.d.	0.3	4.7	1.6	0.2
HepG2	1	4.3	1.6	0.1	N.d.	0.5	4	4.3	0.3
HSC-3	3.3	2.9	2.8	0.3	N.d.	0.8	13	2.8	0.6
SCC-4	0.6	1.2	4	0.1	N.d.	1.2	2.5	1.2	0.9
SCC-9	0.5	N.d.	6.3	0.04	N.d.	1.8	2	N.d.	1.4
SCC-15	0.9	N.d.	3.1	0.1	N.d.	0.9	3.5	N.d.	0.7
SCC-25	1.3	N.d.	3.3	0.1	N.d.	0.9	5.2	N.d.	0.7
AGP-01	0.7	N.d.	4	0.1	N.d.	1.2	2.7	N.d.	0.9
ACP-02	0.2	N.d.	1.2	0.02	N.d.	0.3	0.8	N.d.	0.3
ACP-03	0.5	N.d.	0.8	0.04	N.d.	0.2	2.2	N.d.	0.2
HL-60	6.5	15.8	3.2	0.5	N.d.	0.9	26	15.7	0.7
K-562	1.3	9.5	3.5	0.1	N.d.	1	5.2	9.4	0.8
B16-F10	2.2	4.3	1.7	0.2	N.d.	0.5	8.7	4.3	0.4

Data are presented as the selectivity index (SI) calculated using the following formula: $SI = IC_{50}[\text{non-cancer cells}] / IC_{50}[\text{cancer cells}]$. Cancer cells: HCT116 (human colon carcinoma); HT-29 (human colon adenocarcinoma); MCF7 (human breast adenocarcinoma); HepG2 (human hepatocellular carcinoma); HSC-3 (human oral squamous cell carcinoma); SCC-4 (human oral squamous cell carcinoma); SCC-9 (human oral squamous cell carcinoma); SCC-15 (human oral squamous cell carcinoma); SCC-25 (human oral squamous cell carcinoma); AGP-01 (human ascitic gastric adenocarcinoma), ACP-02 (human gastric adenocarcinoma), ACP-03 (human gastric adenocarcinoma), HL-60 (human promyelocytic leukemia); K-562 (human chronic myelogenous leukemia); and B16-F10 (murine melanoma). Non-cancer cells: MRC-5 (human lung fibroblast), HaCAT (human keratinocyte) and PBMC (human peripheral blood mononuclear cells). Doxorubicin (DOX) and oxaliplatin (OXA) were used as positive controls. *N.d.* not determined

($P < 0.05$). Doxorubicin and oxaliplatin caused cell cycle arrest at the G_2/M phase, which was followed by inter-nucleosomal DNA fragmentation.

Ruthenium complex with xanthoxylin triggers caspase-mediated apoptosis of HepG2 cells

Using light microscopy to analyze cell morphology, we observed cell shrinkage, chromatin condensation and nuclear fragmentation in cells treated with RCX (Fig. S2). Additionally, flow cytometric analysis also showed cell shrinkage caused by RCX, as observed by a decrease in forward light scatter (FSC), and nuclear condensation, as observed by a transient increase in side scatter (SCC), indicating morphological changes consistent with apoptosis (Fig. S3). Furthermore, transmission electron microscope (TEM) analysis indicated cell shrinkage, nuclear fragmentation, the presence of membrane bubbles and apoptotic bodies (Fig. 4). Doxorubicin and oxaliplatin treatment also led to an apoptotic morphology.

In addition to the morphological analysis, we performed Annexin V/propidium iodide (PI) double staining in HepG2 cells after 12, 24, 48 or 72 h of

incubation, and the numbers of viable, early apoptotic, late apoptotic and necrotic cells were quantified (Fig. 5). RCX caused apoptosis in a time- and concentration-dependent manner. No significant increase in the number of necrotic cells was observed. Using flow cytometry after a 24 h of incubation, RCX also induced mitochondrial depolarization in HepG2 cells, as measured by the incorporation of rhodamine 123 (Fig. 6a). Next, we studied the activation of the effector (caspase-3) and initiator (caspases-8 and -9) caspases on RCX-treated HepG2 cells after 48 h of incubation. Incubation with RCX caused the activation of all caspases analyzed (Figs. 6b, c, d), indicating the activation of the caspase-mediated apoptosis pathway. Moreover, pretreatment with a pan-caspase inhibitor (Z-VAD(OMe)-FMK), caspase-8 inhibitor (Z-IETD-FMK) or caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK) prevented the RCX-induced apoptosis (Figs. 7a, b).

The cytotoxic activity of RCX in wild-type immortalized mouse embryonic fibroblasts (WT SV40 MEF) and immortalized mouse embryonic fibroblast with the BAD gene knocked out (BAD KO SV40 MEF) was also

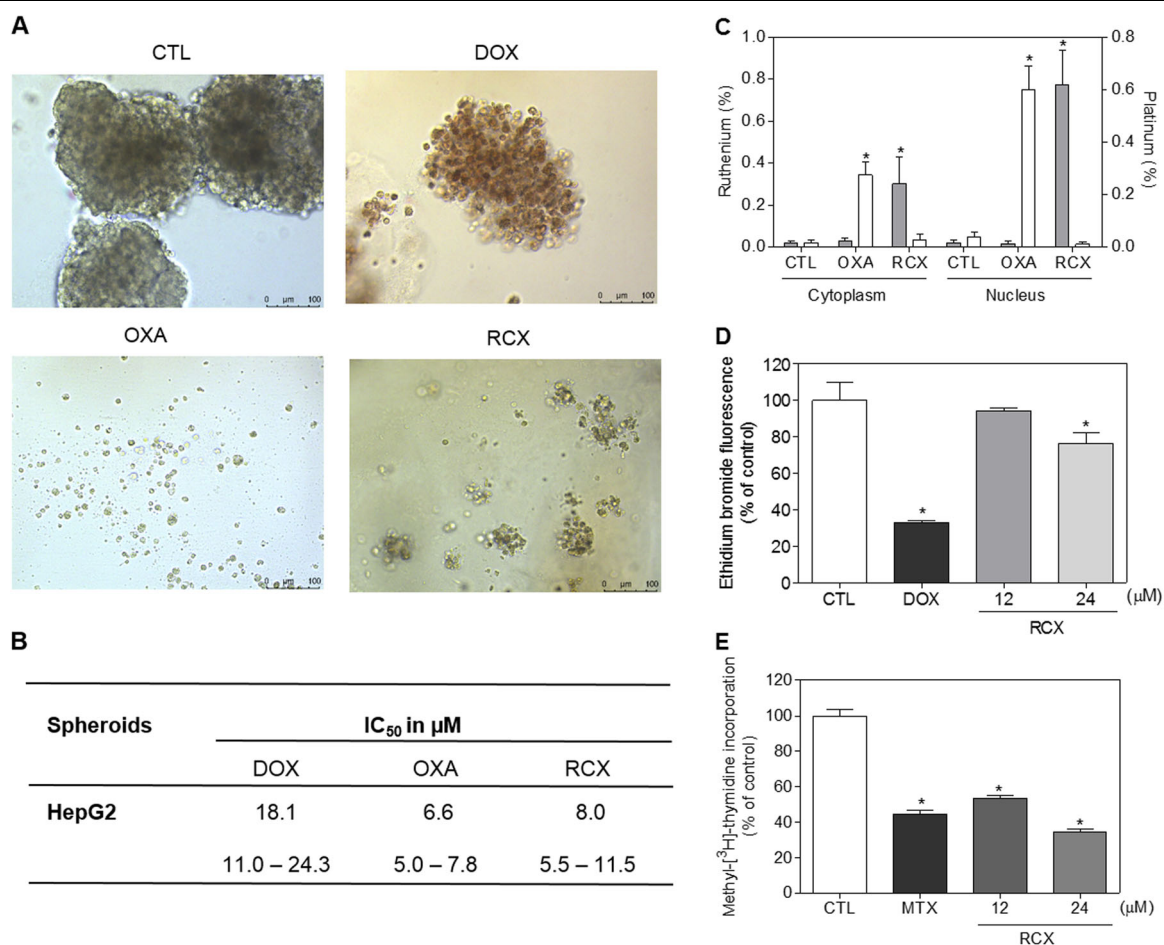


Fig. 3 Effect of the ruthenium complex with xanthoxylin (RCX) on a 3D in vitro model of cancer multicellular spheroids formed from HepG2 cells, ruthenium subcellular distribution, and the RCX-induced DNA intercalation and inhibition of DNA synthesis. **a** Cells in the 3D in vitro model were examined by light microscopy (bar = 100 µm). **b** IC₅₀ values in µM 72 h after incubation with the 3D in vitro model and their respective 95% confidence interval obtained by nonlinear regression from three independent experiments performed in duplicate, as measured by alamar blue assay. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.2% DMSO) used for diluting the tested compound. Doxorubicin (DOX) and oxaliplatin (OXA) were used as positive controls. **c** Ruthenium subcellular distribution was determined with an energy dispersive X-ray spectrometer in HepG2 cells after 3 h of treatment with 250 µM RCX. Cells without treatment were used as the negative control (CTL). Oxaliplatin (OXA, 500 µM) was used as the positive control, and platinum subcellular distribution was determined. The gray bars represent the percent of ruthenium, and the white bars represent the percent of platinum. Ten cells were analyzed in each treatment. **d** DNA intercalation with RCX was examined by the ability of RCX to displace ethidium bromide from calf thymus DNA. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.2% DMSO) used for diluting the tested compound. Doxorubicin (DOX, 20 µM) was used as the positive control. **e** DNA synthesis quantification was determined by methyl-³H-thymidine in HepG2 cells after a 3 h of incubation. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.2% DMSO) used for diluting the tested compound. Mitoxantrone (MTX, 12 µM) was used as the positive control. Data are presented as the means ± S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. * $P < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test

evaluated by the alamar blue assay after a 72 h of incubation. The IC₅₀ values for RCX were 3.9 µM for the WT SV40 MEF cell line and 4.1 µM for the BAD KO SV40 MEF cell line, suggesting that BAD is not essential for RCX-induced cytotoxicity. Doxorubicin presented with IC₅₀ values of 0.04 and 0.41 µM, while 5-fluorouracil presented with IC₅₀ values of 1.7 and 7.3 µM in WT SV40 MEF and BAD KO SV40 MEF cell lines, respectively.

The effect of RCX on intracellular reactive oxygen species (ROS) levels was also investigated in HepG2 cells through flow cytometry using the redox-sensitive fluorescent probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). However, RCX did not induce a significant increase in ROS levels after 1 or 3 h of incubation (Fig. S4A). In addition, pretreatment with the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC) did not prevent the reduction in the

Table 3 Effect of the ruthenium complex with xanthoxylin (RCX) in the cell cycle distribution of HepG2 cells

Treatment	Concentration (μM)	DNA content (%)		S	G_0/G_1	G_2/M
		Sub- G_0/G_1				
12 h of incubation						
CTL	-	4.4 \pm 0.7		13.3 \pm 1.2	55.2 \pm 2.0	17.6 \pm 1.3
DOX	2	13.4 \pm 1.2*		6.9 \pm 0.1	51.9 \pm 4.8	22.6 \pm 2.6
OXA	10	6.2 \pm 0.7		12.9 \pm 4.4	44.4 \pm 4.7	43.5 \pm 3.4*
RCX	12	9.6 \pm 1.1*		18.0 \pm 7.4	66.4 \pm 4.0	13.3 \pm 1.1
	24	13.0 \pm 2.5*		8.6 \pm 4.5	68.9 \pm 2.2	13.9 \pm 1.6
24 h of incubation						
CTL	-	1.2 \pm 0.2		15.7 \pm 0.3	58.9 \pm 0.9	20.5 \pm 1.2
DOX	2	16.8 \pm 4.3*		8.9 \pm 2.3*	20.9 \pm 3.3*	66.9 \pm 5.5*
OXA	10	4.8 \pm 0.5		18.5 \pm 1.4	26.0 \pm 1.1*	47.1 \pm 0.7*
RCX	12	15.3 \pm 0.6*		22.4 \pm 0.7*	38.2 \pm 1.2*	17.6 \pm 0.9
	24	34.7 \pm 1.4*		13.0 \pm 1.6	29.9 \pm 2.7*	13.0 \pm 1.3
48 h of incubation						
CTL	-	1.2 \pm 0.5		14.8 \pm 1.2	61.9 \pm 1.2	14.9 \pm 0.5
DOX	2	20.9 \pm 1.0*		9.1 \pm 1.9	34.6 \pm 2.7*	31.1 \pm 3.3*
OXA	10	6.8 \pm 1.3		21.2 \pm 1.7*	34.7 \pm 3.7*	33.7 \pm 1.5*
RCX	12	44.1 \pm 6.3*		11.5 \pm 2.7	23.3 \pm 2.0*	9.0 \pm 0.8*
	24	62.6 \pm 3.4*		10.3 \pm 1.3	18.9 \pm 3.0*	6.5 \pm 0.7*
72 h of incubation						
CTL	-	3.6 \pm 0.7		12.4 \pm 1.1	64.4 \pm 2.1	13.1 \pm 1.4
DOX	2	46.6 \pm 2.8*		12.5 \pm 1.1	31.6 \pm 5.1*	16.3 \pm 1.1
OXA	10	17.6 \pm 3.9*		16.2 \pm 1.1	30.1 \pm 5.1*	38.0 \pm 5.4*
RCX	12	42.6 \pm 6.8*		13.2 \pm 0.8	23.6 \pm 1.9*	11.1 \pm 1.8
	24	68.2 \pm 3.7*		4.9 \pm 1.1*	19.7 \pm 3.3*	6.7 \pm 0.7

Data are presented as the means \pm S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.2% DMSO) used for diluting the tested compound. Doxorubicin (DOX) and oxaliplatin (OXA) were used as positive controls. Ten thousand events were evaluated per experiment and cellular debris was omitted from the analysis. * $P < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls Test

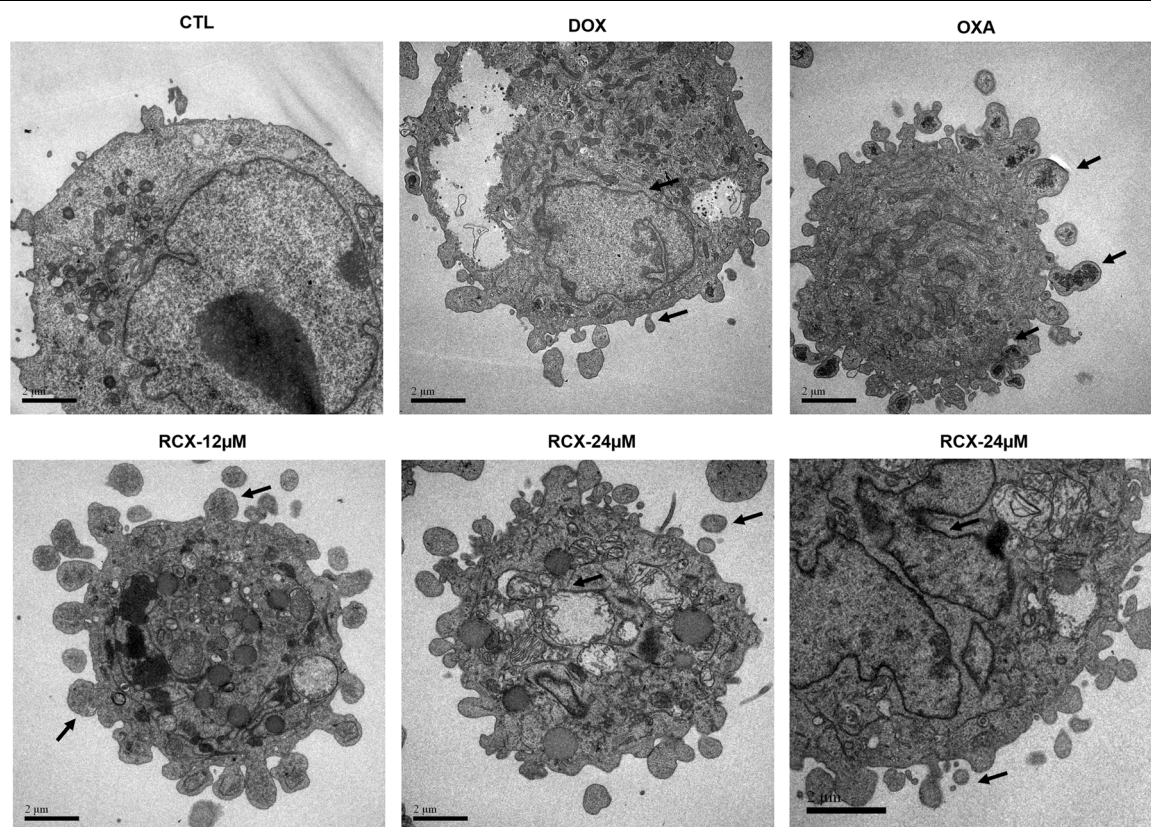


Fig. 4 Effect of the ruthenium complex with xanthoxylin (RCX) on the morphological analysis of HepG2 cells after 24 h of incubation, as examined by a transmission electron microscope. Arrows indicate cells with nuclear fragmentation, the presence of membrane bubbles and/or apoptotic bodies (bar = 2 µm). The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.2% DMSO) used for diluting the tested compound. Doxorubicin (DOX, 2 µM) and oxaliplatin (OXA, 10 µM) were used as positive controls

number of viable cells, as assessed by TBE assay after 24 h of incubation (Fig. S4B).

Ruthenium complex with xanthoxylin alters gene expression in HepG2 cells

Out of a total of 94 genes investigated, 40 up-regulated and 2 down-regulated genes were identified in HepG2 cells treated with 12 µM RCX for a 12 h of incubation (Table 4 and S2). Among them, the pro-apoptotic genes BCL2L11 (RQ = 9.8 for RCX and RQ = 14.0 for doxorubicin), FAS (RQ = 2.9 for RCX and RQ = 2.5 for doxorubicin) and E2F1 (RQ = 7.1 for RCX and RQ = 4.8 for doxorubicin) were up-regulated. A gene related to cell cycle control (G₁/S transition), CDKN2A (RQ = 3.8 for RCX and RQ = 2.0 for doxorubicin), was up-regulated. Moreover, at least seven genes related to the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, including BRAF (RQ = 2.3 for RCX and RQ = 1.0 for doxorubicin), ELK1 (RQ = 5.2 for RCX and RQ = 2.1 for doxorubicin), JUN (RQ = 4.5 for RCX and RQ = 7.3 for doxorubicin), MAP2K1 (RQ = 2.6 for RCX and RQ = 2.4 for

doxorubicin), MAPK1 (RQ = 2.1 for RCX and RQ = 0.9 for doxorubicin), MAPK14 (RQ = 3.0 for RCX and RQ = 2.2 for doxorubicin) and RAF1 (RQ = 4.7 for RCX and RQ = 3.5 for doxorubicin), were up-regulated, indicating a substantial role for MAPK signaling in the action of RCX in HepG2 cells. In contrast, the main gene involved in p53 pathway activation, TP53 (RQ = 0.5 for RCX and RQ = 1.0 for doxorubicin), was down-regulated, whereas the gene related to the inactivation of the p53 pathway MDM2 (RQ = 3.2 for RCX and RQ = 0.9 for doxorubicin) was up-regulated.

Ruthenium complex with xanthoxylin causes ERK1/2-mediated apoptosis in HepG2 cells through a p53-independent pathway

As observed above, the gene expression analysis indicated the activation of the MAPK pathway in RCX-treated HepG2 cells. Therefore, we decided to investigate the role of the three main MAPK families, extracellular signal-regulated kinase (ERK), Jun kinase (JNK/SAPK) and p38 MAPK, in RCX-induced apoptosis in HepG2 cells. For

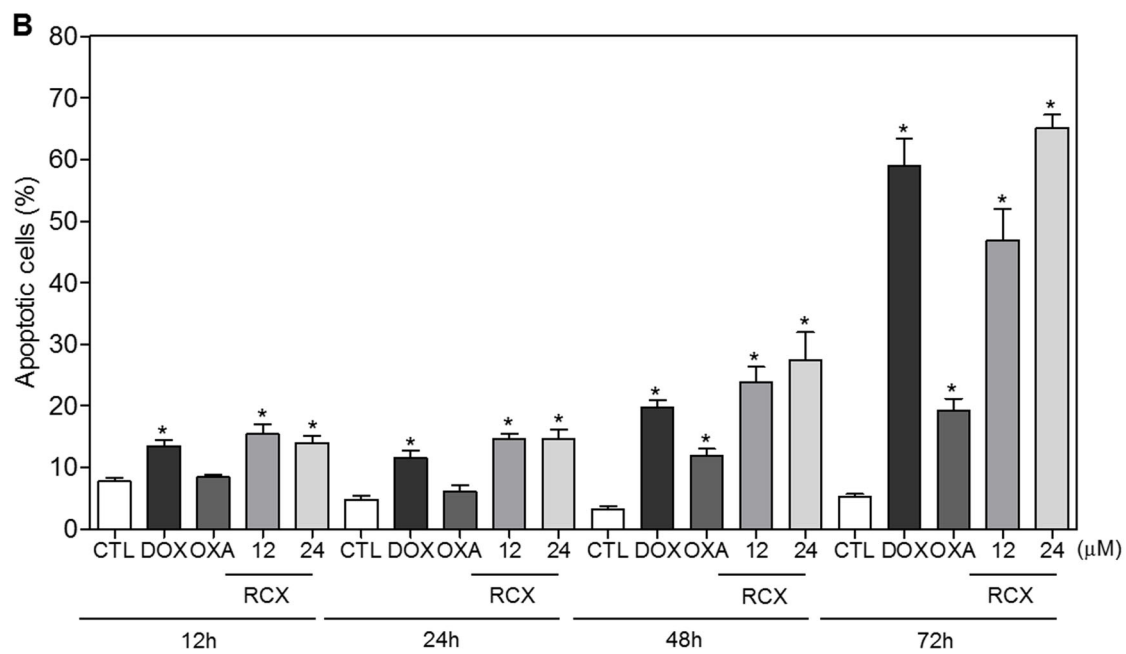
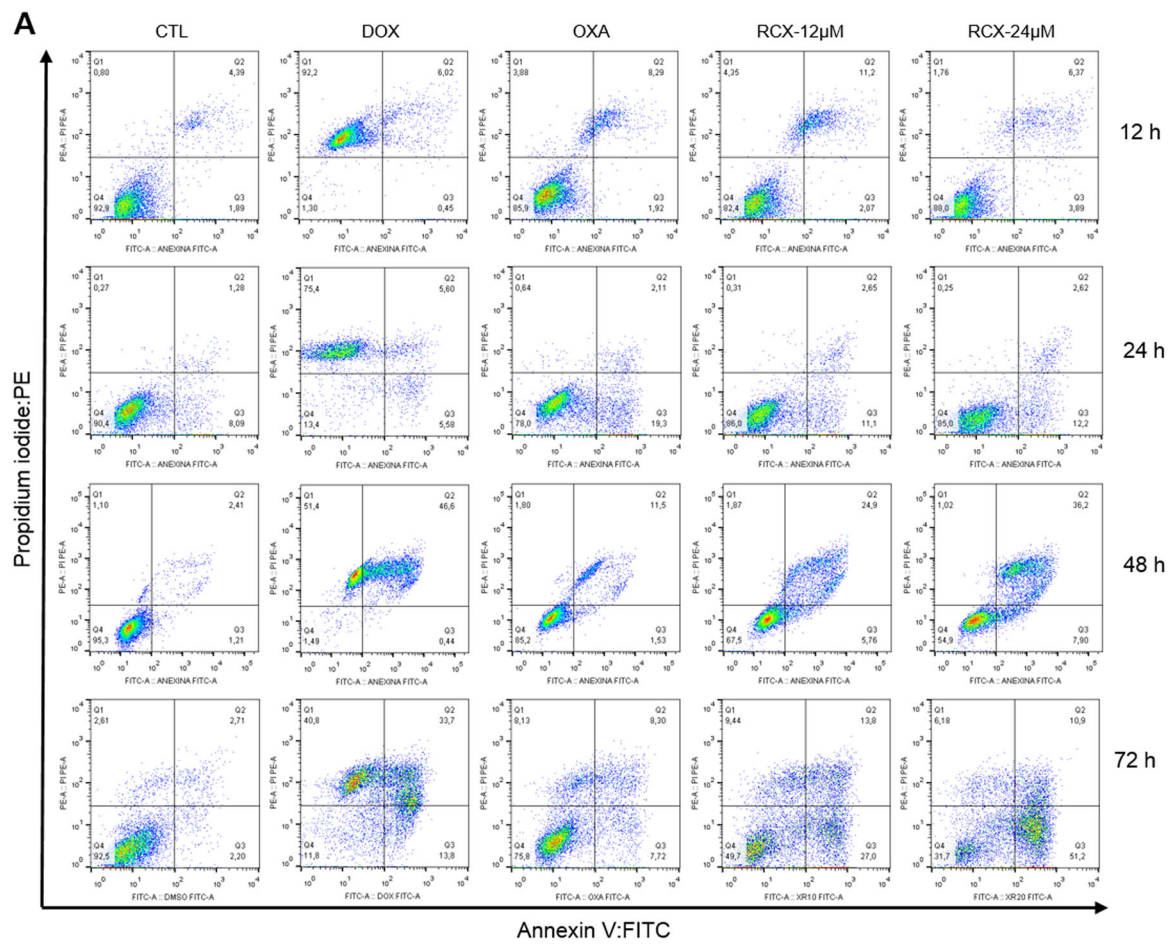


Fig. 5 (See legend on next page.)

(see figure on previous page)

Fig. 5 Effect of the ruthenium complex with xanthoxylin (RCX) on the induction of apoptosis in HepG2 cells after 12, 24, 48 or 72 h of incubation, as determined by flow cytometry using annexin V-FITC/PI staining. **a** Representative flow cytometry dot plots show the percent cells in the viable, early apoptotic, late apoptotic and necrotic stages. **b** Quantification of apoptotic HepG2 cells. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.2% DMSO) used for diluting the tested compound. Doxorubicin (DOX, 2 μ M) and oxaliplatin (OXA, 10 μ M) were used as positive controls. Data are presented as the means \pm S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. Ten thousand events were evaluated per experiment, and cellular debris was omitted from the analysis. * $P < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test

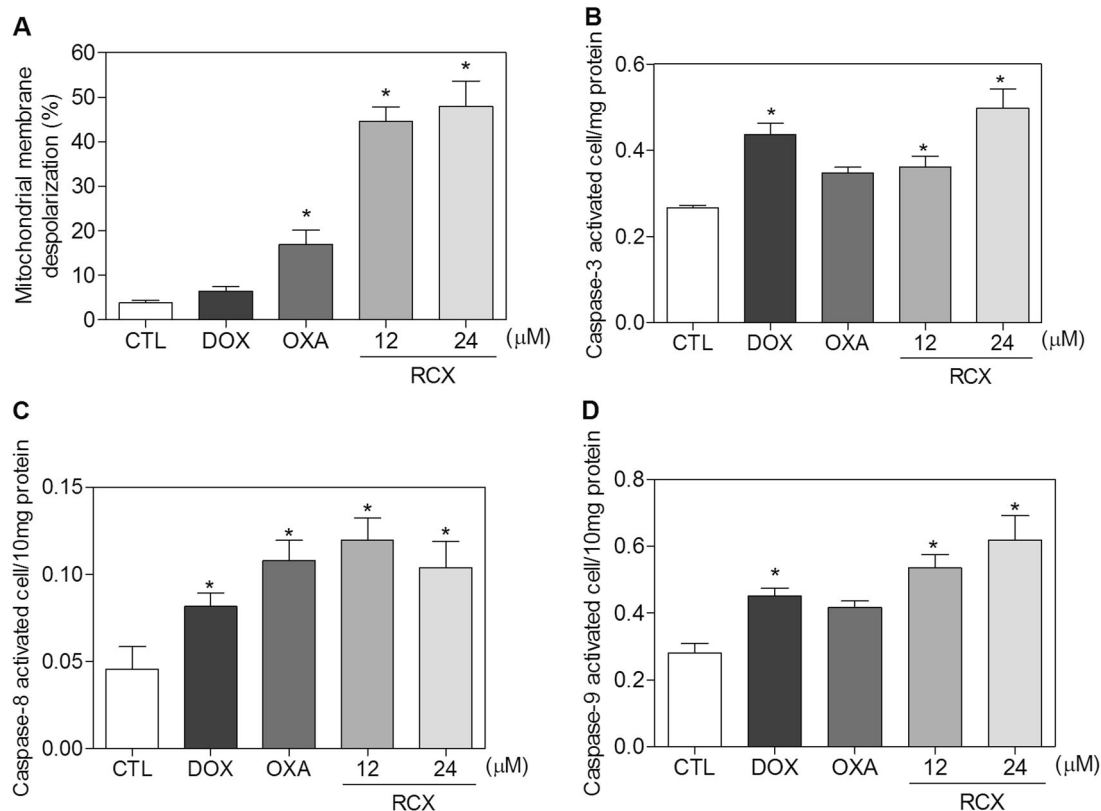
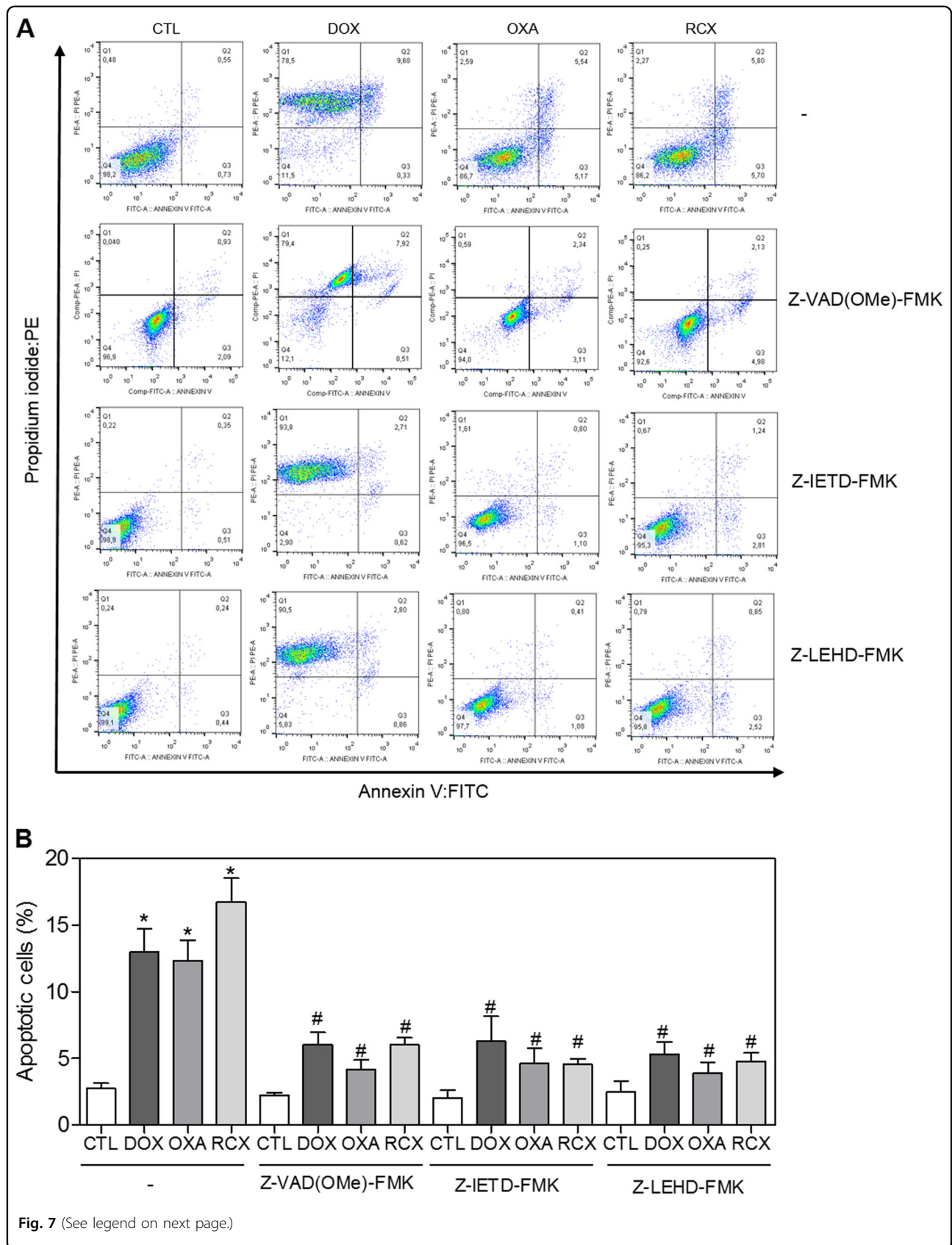


Fig. 6 Effect of the ruthenium complex with xanthoxylin (RCX) on the mitochondrial membrane potential and caspase-3, -8 and -9 activity in HepG2 cells. **a** Mitochondrial membrane potential was determined by flow cytometry using rhodamine 123 staining after 24 h of incubation with RCX. **b** Caspase-3 activity was determined by colorimetric assay after 48 h of incubation with RCX. **c** Caspase-8 activity was determined by colorimetric assay after 48 h of incubation with RCX. **d** Caspase-9 activity was determined by colorimetric assay after 48 h of incubation with RCX. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.2% DMSO) used for diluting the tested compound. Doxorubicin (DOX, 2 μ M) and oxaliplatin (OXA, 10 μ M) were used as positive controls. Data are presented as the means \pm S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. For flow cytometry analysis, 10,000 events were evaluated per experiment, and cellular debris was omitted from the analysis. * $P < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test

this, we monitored alterations in the phosphorylation status of ERK1/2, JNK/SAPK and p38 MAPK proteins by Phosflow analysis after acute (15 and 30 min) and prolonged (24 h) incubations with RCX (Fig. 8). RCX induced the phosphorylation of ERK1/2 after 15- and 30-min incubations and the phosphorylation of JNK/SAPK after a 15-min incubation, but an increase in the phosphorylation

of p38 MAPK was not observed at any time point investigated. Moreover, pretreatment with an MEK (mitogen-activated protein kinase kinase) inhibitor (U-0126), which inhibits the activation of ERK1/2, prevented RCX-induced apoptosis (Figs. 9a, b). Pre-treatment with a JNK/SAPK inhibitor (SP 600125) or p38 MAPK inhibitor (PD 169316) did not prevent RCX-induced apoptosis (Figs. 9a,



(see figure on previous page)

Fig. 7 Effects of the pan-caspase (Z-VAD(Ome)-FMK), caspase-8 (Z-IETD-FMK) and caspase-9 (Z-LEHD-FMK) inhibitors in the apoptosis induced by the ruthenium complex with xanthoxylin (RCX) in HepG2 cells, determined by flow cytometry using annexin V-FITC/PI staining. **a** Representative flow cytometry dot plots showing the percent of cells in the viable, early apoptotic, late apoptotic and necrotic stages. **b** Quantification of apoptotic HepG2 cells. For protection assays, the cells were pretreated for 2 h with 50 μ M Z-VAD(Ome)-FMK, 20 μ M Z-IETD-FMK or 20 μ M Z-LEHD-FMK and then incubated with 12 μ M RCX for 48 h. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.2% DMSO) used for diluting the tested compound. Doxorubicin (DOX, 2 μ M) and oxaliplatin (OXA, 10 μ M) were used as positive controls. Data are presented as the means \pm S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. Ten thousand events were evaluated per experiment, and cellular debris was omitted from the analysis. * $P < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test. # $P < 0.05$ compared with the respective treatment without inhibitor by ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test

b). Since ERK1/2 activation is associated with the activation of the p53 pathway, we investigated the activation of the p53 pathway in RCX-treated HepG2 cells. However, pretreatment with a p53 inhibitor (cyclic pifithrin- α) did not prevent the RCX-induced apoptosis (Fig. S5A and S5B), indicating the activation of a p53-independent apoptosis pathway. In fact, the main gene of p53 pathway activation (TP53) was down-regulated, and the gene related to the inactivation of p53 (MDM2) was up-regulated in RCX-treated HepG2 cells.

Ruthenium complex with xanthoxylin reduces HepG2 cell growth in a xenograft model

The *in vivo* antitumor activity of RCX was investigated in C.B-17 severe combined immunodeficient (SCID) mice engrafted with HepG2 cells. The animals were treated with RCX at doses of 2.5 and 5 mg/kg by intraperitoneal injections once a day for 21 consecutive days. Both doses of RCX were able to inhibit HepG2 cell growth in mice. Figure 10a shows the inhibition of tumor growth. On the 22nd day, the average tumor weight of the negative control mice was 0.6 ± 0.04 g. In the presence of RCX, the average tumor weights were 0.4 ± 0.06 and 0.2 ± 0.04 g at the highest and lowest doses, respectively, and the tumor mass inhibition was 24.0 and 67.7%, respectively. The positive controls (0.3 mg/kg doxorubicin and 10 mg/kg 5-fluorouracil) reduced the tumor weight by 27.2 and 40.3%, respectively. In the histological analysis, all groups exhibited solid, hypervascularized tumors with cells exhibiting intense pleomorphism and prominent nucleoli. Necrotic areas were observed in all groups, but aberrant mitotic figures were less evident in the RCX-treated groups (Fig. 10b).

Toxicological parameters were examined in the RCX-treated mice. Compared with the weight of the negative control mice, a slight decrease in the body weight of C.B-17 SCID mice bearing HepG2 cells was identified after 21 days of treatment with RCX at the highest dose ($P < 0.05$); however, there was no change in the body weight of animals treated with RCX at the lowest dose ($P > 0.05$). No significant alterations were observed in the liver, kidney, lung or heart wet weight of any group

($P > 0.05$) (Table S3). The number of white and erythrocyte blood cells in the RCX-treated animals was also analyzed (Table S4). The number of leukocytes remained unchanged after treatment with both doses of RCX ($P > 0.05$); however, we found a decrease in the total number of leukocytes in the doxorubicin and 5-fluorouracil groups compared to that of the negative control group ($P < 0.05$). No significant alteration in the number of erythrocytes was observed in any group.

Morphological analyses of the liver, kidneys, lungs and hearts in all groups were performed (Fig. 10c). Histopathological analysis of the livers revealed hydropic degeneration, portal venous system dilatation, bile duct dilatation with areas of atrophy, disperse areas of coagulation necrosis and inflammation in all experimental groups. It is important to note that these histopathological characteristics were more pronounced in the RCX groups than in the other groups (negative control, 5-fluorouracil and doxorubicin). In the kidneys, mild vascular congestion and moderate glomerular hyalinization were observed in all groups. In the lungs of all animals, atelectasis, focal hemorrhage, acute inflammation, vascular congestion, thickening of the alveolar septa and increased airspace were observed. It should be noted that these histopathological characteristics were more pronounced in the doxorubicin and RCX (both doses) groups than in the other groups (negative control and 5-fluorouracil). In addition, nodules and tumor emboli were observed in the pulmonary parenchyma of two animals from the negative control group. Histopathological analysis of animal hearts did not show alterations in any group. Some histopathological features of this study (hydropic degeneration, vascular congestion and focal areas of inflammation) are acute cellular responses to stimuli unrelated to the treatment, and the injured cells are able to return to a homeostatic state when the stimulation ends.

Discussion

In this study, a novel ruthenium complex with xanthoxylin was synthesized and assessed for its cellular and molecular response in human hepatocellular carcinoma

Table 4 Effect of the ruthenium complex with xanthoxylin (RCX) in gene expression of HepG2 cells

Symbol	Full name	RQ	
		DOX	RCX
Genes up-regulated			
AKT2	AKT serine/threonine kinase 2	3.3	2.7
BCAR1	BCAR1, Cas family scaffolding protein	2.2	2.9
BCL2	BCL2, apoptosis regulator	1.1	2.4
BCL2L11	BCL2 like 11	14.0	9.8
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase	1.0	2.3
CCND1	Cyclin D1	0.8	4.8
CCND3	Cyclin D3	1.2	2.4
CDC42	Cell division cycle 42	1.1	4.2
CDK4	Cyclin dependent kinase 4	1.4	2.7
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A	2.0	3.8
CRK	CRK proto-oncogene, adaptor protein	2.5	6.2
DVL1	Dishevelled segment polarity protein 1	0.5	2.7
E2F1	E2F transcription factor 1	4.8	7.1
EGFR	Epidermal growth factor receptor	0.5	2.0
ELK1	ELK1, ETS transcription factor	2.1	5.2
ERBB2	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2	1.8	2.2
FAS	Fas cell surface death receptor	2.5	2.9
FGF2	Fibroblast growth factor 2	1.9	5.5
FYN	FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	1.0	2.2
FZD1	Frizzled class receptor 1	5.8	4.8
HRAS	HRas proto-oncogene, GTPase	1.4	2.1
IGF1	Insulin like growth factor 1	N.d.	N.d.
ITGA2B	Integrin subunit alpha 2b	2.4	5.4
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	7.3	4.5
KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase	2.6	4.8
MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	2.4	2.6
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	0.9	2.1
MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	2.2	3.0
MDM2	MDM2 proto-oncogene	0.9	3.2
MYC	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor	0.4	4.3
NFKB1	Nuclear factor kappa B subunit 1	2.0	2.2
NFKB2	Nuclear factor kappa B subunit 2	3.6	3.6
PTK2	Protein tyrosine kinase 2	1.0	2.0
RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	3.5	4.7
RELA	RELA proto-oncogene, NF-kB subunit	1.1	2.4
SHC1	SHC adaptor protein 1	1.9	3.7
SMAD4	SMAD family member 4	2.6	3.6

Table 4 continued

Symbol	Full name	RQ	
		DOX	RCX
SOS1	SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1	2.2	5.0
TCF3	Transcription factor 3	1.9	3.2
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	1.8	3.8
Genes down-regulated			
CDKN1B	Cyclin dependent kinase inhibitor 1B	1.0	0.5
TP53	Tumor protein p53	1.0	0.5

HepG2 cells were treated with 13 μ M of RCX for 12 h. The negative control was treated with the vehicle (0.2% DMSO) used for diluting the tested compound. Doxorubicin (DOX, 2 μ M) was used as positive control. After treatment, total RNA was isolated and reverse transcribed. Gene expression was detected using the 96-well plate TaqMan[®] Array Human Molecular Mechanisms of Cancer. GAPDH, 18S and HPRT1 genes were used as endogenous genes for normalization. Values represent the relative quantitation (RQ) compared with the calibrator (cells treated with the negative control, RQ = 1.0). The genes were considered to be up-regulated if RQ \geq 2 and were considered to be down-regulated if RQ \leq 0.5. *N.d.* not determined.

HepG2 cells for the first time. As mentioned, ruthenium complexes have been extensively reported as potent cytotoxic compounds in different cancer cells;^{6–9} however, the structure of the ligand confers the characteristic properties of the metal complex formed. Xanthoxylin is a non-cytotoxic compound that forms a ruthenium complex with potent cytotoxicity in cancer cells.

EDS analysis of RCX-treated HepG2 cells indicated the accumulation of ruthenium in the cell nucleus. Moreover, RCX induced DNA intercalation, inhibited DNA synthesis and triggered the caspase-mediated apoptosis pathway in HepG2 cells, as observed by cell shrinkage, internucleosomal DNA fragmentation, externalization of phosphatidylserine, loss of mitochondrial transmembrane potential and activation of caspase-3, -8 and -9. In addition, the apoptosis induced by RCX was prevented by pretreatment with a pan-caspase inhibitor, a caspase-8 inhibitor and a caspase-9 inhibitor. Indeed, ruthenium complexes with different ligands have been detected to have DNA-binding ability in cell nuclei, leading to the inhibition of DNA synthesis and the induction of apoptosis through the death receptor, mitochondria and/or oxidative stress pathways^{6–9,21–23}.

RNA transcript analysis revealed changes in genes related to cell cycle control, apoptosis and the MAPK pathway. Of the genes related to cell cycle control, one is required for cell cycle G₁/S transition (CDKN2A), and the genes related to apoptosis included the pro-apoptotic genes (BCL2L11, FAS and E2F1). In fact, S-phase arrest was observed in RCX-treated HepG2 cells, followed by the induction of the caspase-mediated apoptosis pathway. Jovanović *et al.*²⁴ reported that a ruthenium-arene complex with an isoquinoline-3-carboxylic acid ligand caused S-phase arrest and cell death through the intrinsic (mitochondrial) apoptotic pathway, which was mediated

by ROS. The ruthenium complex [Ru(dmp)₂(NMIP)](ClO₄)₂ also arrested cell growth at the S-phase and led to cell death by apoptosis in osteosarcoma cells²⁵.

In regards to the role of MAPK signaling in RCX-treated HepG2 cells, RCX induced the phosphorylation of ERK1/2. In addition, pretreatment with an MEK inhibitor (U-0126) prevented the RCX-induced apoptosis, indicating the activation of ERK1/2-mediated apoptosis in HepG2 cells. Although ERK1/2 has a pro-survival function in the MAPK signaling pathway, ERK1/2 activation can also promote apoptosis. Etoposide, platinum compounds and other DNA-damaging agents activate ERK1/2 in different cell lines, and the inhibition of ERK1/2 activation attenuates the apoptosis induced by these molecules^{26–29}. ERK1/2-mediated apoptosis caused by DNA-damaging agents can occur by direct DNA damage or via ROS production. We found here that RCX does not target oxidative stress but induces DNA intercalation. Additionally, the p53 pathway is also activated during cell DNA damage. In contrast, although there are links between ERK and p53 activation during DNA damage-induced stress, ERK activation can induce apoptosis by either a p53-dependent or p53-independent pathway^{30,31}. Interestingly, pretreatment with a p53 inhibitor (cyclic pifithrin- α) did not prevent RCX-induced apoptosis, indicating the activation of ERK1/2-mediated apoptosis in HepG2 cells by the p53-independent pathway.

RCX also reduced HepG2 cell growth in the xenograft model more efficiently than doxorubicin and 5-fluorouracil and reduced the number of mitotic figures in HepG2 cells. Deng *et al.*²³ demonstrated that the ruthenium complex with the phenylterpyridine derivative inhibited *in vivo* A375 tumor development in a xenograft tumor model. The ruthenium imidazole complex also significantly inhibited tumor growth in mice bearing A549 xenografts³².

(see figure on previous page)

Fig. 8 Effect of ruthenium complex with xanthoxylin (RCX) on ERK1/2 (pT202/pY204), JNK/SAPK (pT183/pY185) and p38 MAPK (pT180/pY182) levels, as determined by Phosflow analysis of HepG2 cells treated with 12 μ M RCX for an acute (15 or 30 min) or prolonged (24 h) incubation. a Representative flow cytometry histograms. **b** Quantification of ERK1/2 (pT202/pY204), JNK/SAPK (pT183/pY185) and p38 MAPK (pT180/pY182) levels. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.2% DMSO) used for diluting the tested compound. Doxorubicin (DOX, 2 μ M) was used as the positive control. Data are presented as the means \pm S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. Ten thousand events were evaluated per experiment, and cellular debris was omitted from the analysis. * $P < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test. NS Non-stained cells (basal cell fluorescence); IST Isotype control

In summary, our study revealed that RCX exhibits potent cytotoxicity in a panel of different cancer cells, which was associated with DNA intercalation and the inhibition of DNA synthesis. We observed S-phase arrest, followed by the induction of caspase-mediated and ERK1/2-mediated apoptosis in HepG2 cells by a p53-independent pathway (Fig. 11). Moreover, RCX reduced HepG2 cell growth in the xenograft model, indicating that RCX is a novel anticancer drug candidate.

Materials and methods

Synthesis of novel ruthenium complex with xanthoxylin

The $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, lithium chloride (LiCl), 1,10'-phenanthroline (phen) and xanthoxylin (xant) were all purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and were used to synthesize RCX with the chemical formula *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆). The precursor *cis*-RuCl₂(phen)₂H₂O was obtained as dark violet crystals following the procedure previously described³³. Xanthoxylin (0.0549 g, 0.28 mmol) and triethylamine (39 mL, 0.28 mmol) were dissolved in a 1:1 EtOH/H₂O mixture (30 mL), and 0.15 g (0.26 mmol) of *cis*-[RuCl₂(phen)₂], was added. The solution was stirred under an N₂ atmosphere for 8 h under reflux. A stoichiometric amount of NH₄PF₆ was added to precipitate the complex, and the resulting mixture was cooled at 0 °C overnight. The *cis*-[Ru(phen)₂(xant)](PF₆) was filtered, washed with cool water, ethanol and diethyl ether and dried under vacuum (80% yield).

¹H NMR spectra were measured in a DMSO-*d*₆ solution using a Bruker DRX-400 or DRX-500 spectrometer (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Germany). All chemical shifts (δ) are given in ppm with reference to the hydrogen signal of the methyl group of tetramethylsilane as the internal standard, and the coupling constants (*J*) are in Hz. Electrochemical measurements were recorded using a μ Autolab Type III (Eco-Chemie B.V., Utrecht, The Netherlands) potentiostat. Dimethylformamide solutions typically contained 1.0×10^{-3} mol L⁻¹ of the ruthenium complex. A platinum disk served as the working ($d = 0.2$ mm) and counter ($d = 0.5$ mm) electrode, and Ag⁺/Ag wire was used as the reference electrode. Solutions contained 0.1 M tetra-*n*-butylammonium hexafluorophosphate (TBAPF₆) as the supporting electrolyte. Optical spectra were recorded on an Agilent 8453 UV-vis

spectrophotometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). IR spectra were recorded on an FT-IR Bomem Michelson FT spectrometer in the 4000–400 cm⁻¹ region.

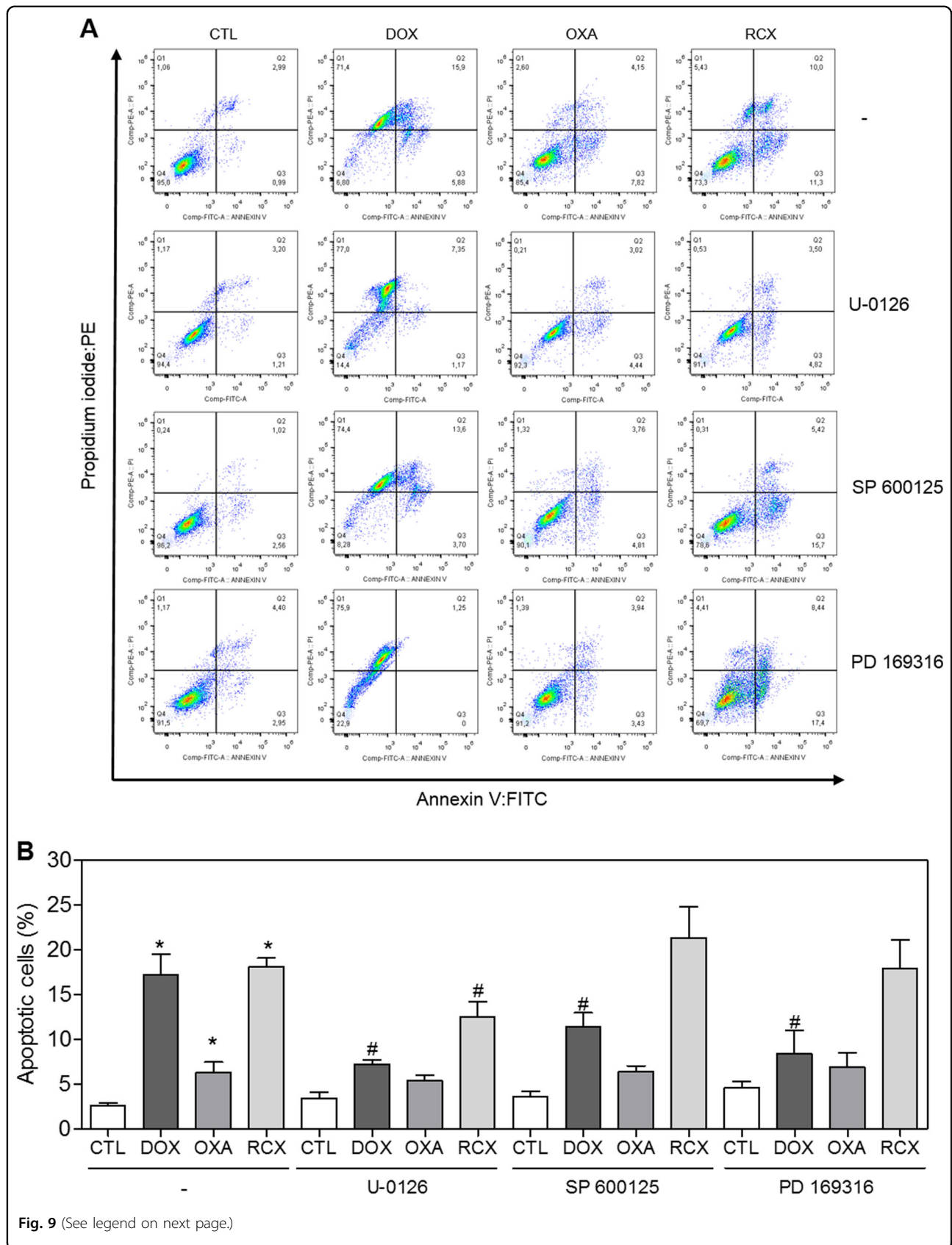
In vitro assays

Cells

A panel of 15 cancer cell lines, 3 non-cancer cells and 1 mutant and its parental cell line were selected for this study, as detailed in Table S5. The cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) with 10% fetal bovine serum (Life, Carlsbad, CA, USA), 2 mM L-glutamine (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, RJ, Brazil) and 50 μ g/mL gentamycin (Life, Carlsbad, CA, USA). Adherent cells were collected by treatment with 0.25% trypsin EDTA solution (Gibco-BRL). All cell lines were cultured in flasks at 37 °C in 5% CO₂ and subcultured every 3–4 days to maintain exponential growth. All cell lines were tested for mycoplasma using a mycoplasma stain kit (Sigma-Aldrich) to validate the use of cells free from contamination. Heparinized blood was collected from 20- to 35-year-old, non-smoker healthy donors who had not taken any drugs for at least 15 days prior to sample collection, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using a Ficoll density gradient with GE Ficoll-Paque Plus reagent (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden). PBMCs were washed and resuspended at a concentration of 3×10^5 cells/mL in RPMI 1640 medium with 20% fetal bovine serum, 2 mM glutamine and 50 μ g/mL gentamycin at 37 °C with 5% CO₂. Concanavalin A (ConA, Sigma-Aldrich) was used as a mitogen to trigger cell division in T-lymphocytes. ConA (10 μ g/mL) was added at the beginning of culture, and the cells were treated with the complex and tested after 24 h. Cell viability in all experiments was examined using the TBE assay. Over 90% of the cells were viable at the beginning of the culture. The Research Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (Salvador, Bahia, Brazil) approved the experimental protocol (# 031019/2013). All participants signed a written informed consent to participate in the study.

Cytotoxic activity assay

Cell viability was quantified colorimetrically using the alamar blue assay according to Ahmed *et al.*³⁴. Briefly, cells



(see figure on previous page)

Fig. 9 Effect of the MEK inhibitor (U-0126), JNK/SAPK inhibitor (SP 600125) and p38 MAPK inhibitor (PD 169316) on the apoptosis induced by the ruthenium complex with xanthoxylin (RCX) in HepG2 cells, as determined by flow cytometry using Annexin V-FITC/PI staining. a

Representative flow cytometric dot plots showing the percent of cells in the viable, early apoptotic, late apoptotic and necrotic stages. **b** Quantification of apoptotic HepG2 cells. For protection assays, the cells were pretreated for 2 h with 5 μ M U-0126, 5 μ M SP 600125 or 5 μ M PD 169316 and then incubated with 12 μ M RCX for 48 h. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (0.2% DMSO) used for diluting the tested compound. Doxorubicin (DOX, 2 μ M) and oxaliplatin (OXA, 10 μ M) were used as positive controls. Data are presented as the means \pm S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. Ten thousand events were evaluated per experiment, and cellular debris was omitted from the analysis. * $P < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test. # $P < 0.05$ compared with the respective treatment without inhibitor by ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test

were inserted in 96-well plates for all experiments (7×10^4 cells/mL or 3×10^5 cells/mL for adherent and non-adherent cells, respectively, in 100 μ L of medium) and incubated at 37 $^{\circ}$ C in 5% CO₂ atmosphere overnight. Then, RCX was dissolved in 0.5% DMSO at a range of eight different concentrations from 0.19 to 25 μ g/mL, was added to each well and incubated for 72 h. Negative controls were treated with the vehicle that was used for diluting the

tested compound. Doxorubicin (purity $\geq 95\%$, doxorubicin hydrochloride, Laboratory IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) and oxaliplatin (Sigma-Aldrich) were used as the positive controls. Four (for cell lines) or twenty-four hours (for PBMcs) before the end of incubation, 20 μ L of alamar blue (resazurin, Sigma-Aldrich) stock solution (0.312 mg/mL) was added to each well. Absorbance was measured at 570 nm and 600 nm using the SpectraMax 190

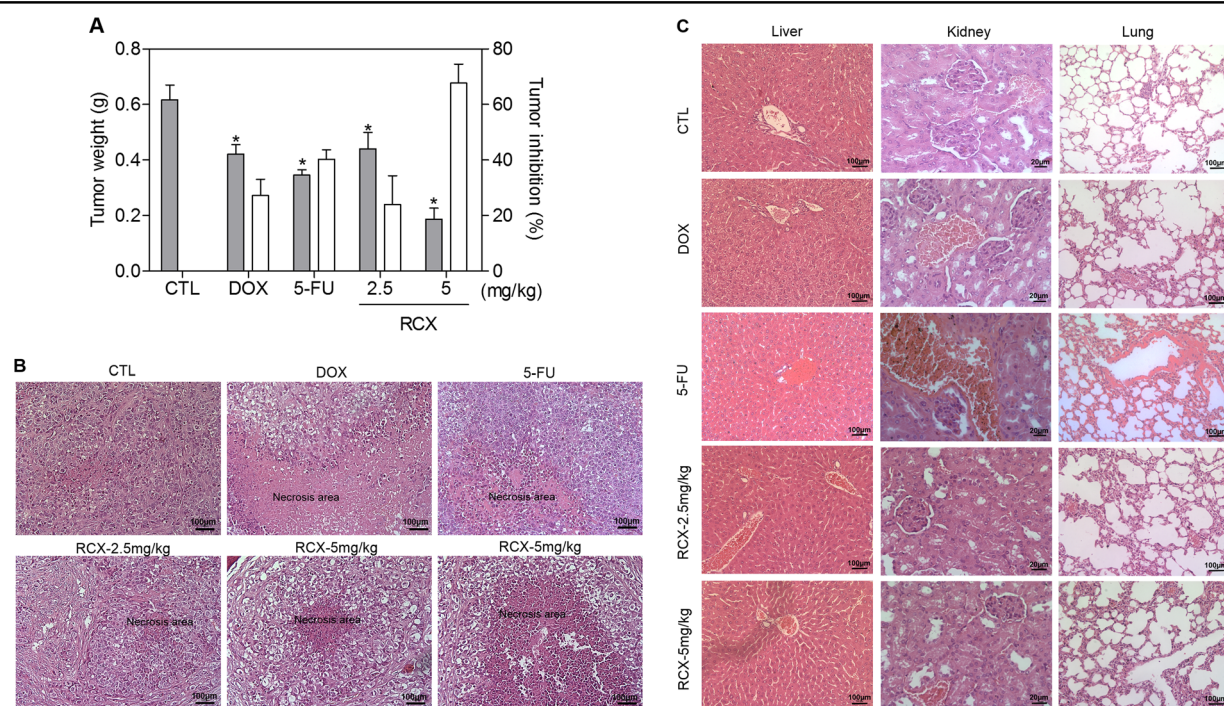
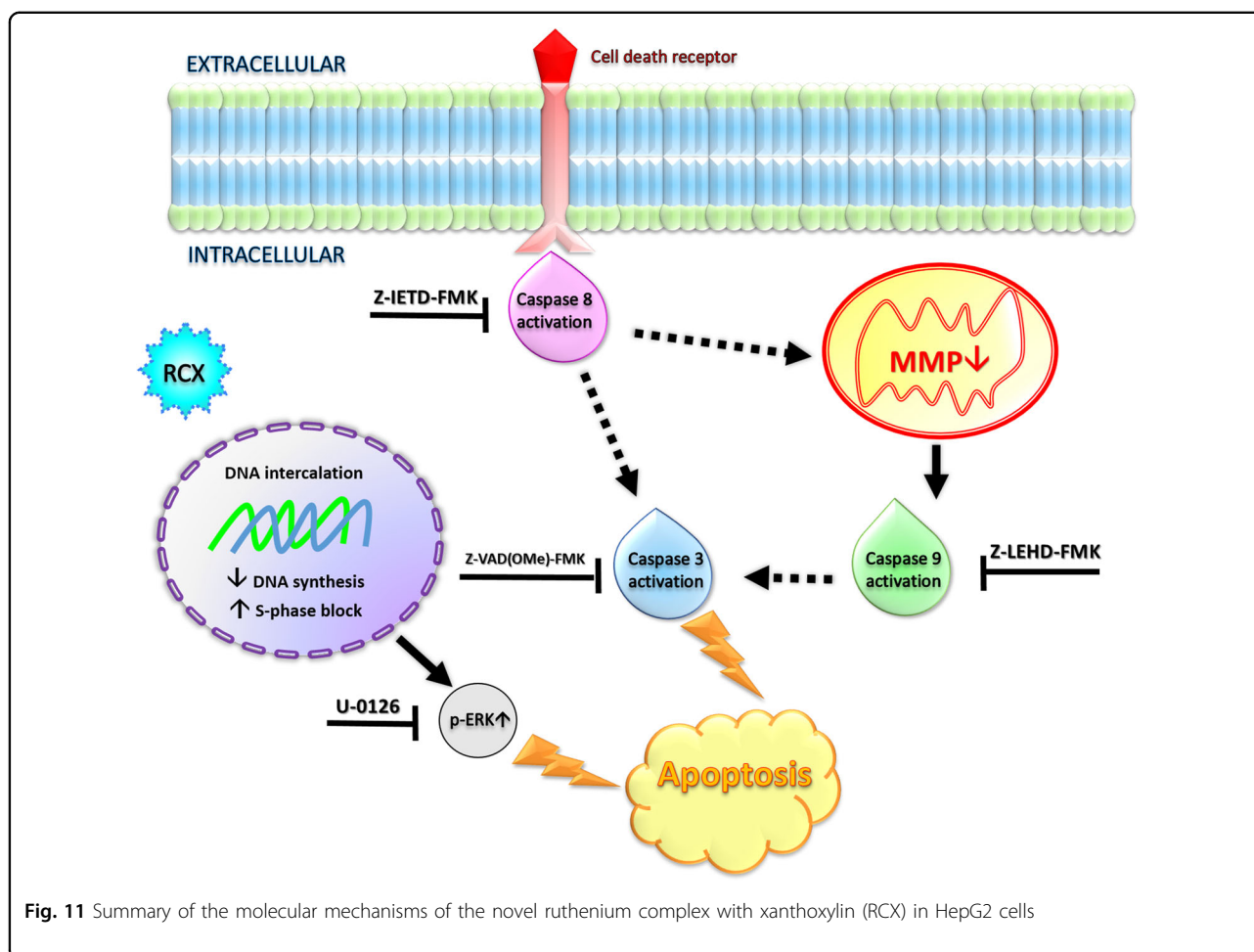


Fig. 10 In vivo antitumor activity of the ruthenium complex with xanthoxylin (RCX) in C.B-17 SCID mice with HepG2 cell xenografts. a

Quantification of tumor weight and tumor inhibition. The gray bars represent tumor weight (g) and the white bars represent tumor inhibition (%). Data are presented as the means \pm S.E.M. of 7–15 animals. * $P < 0.05$ compared with the negative control by ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test. **b** Representative histological analysis of the tumors stained with hematoxylin and eosin and analyzed by light microscopy. **c** Representative histological analyses of livers, kidneys and lungs stained with hematoxylin and eosin and analyzed by light microscopy. The negative control (CTL) was treated with the vehicle (5% DMSO) used for diluting the tested compound. Doxorubicin (DOX, 0.3 mg/kg) and 5-fluorouracil (5-FU, 10 mg/kg) were used as positive controls. Beginning 1 day after tumor implantation, the animals were treated through the intraperitoneal route for 21 consecutive days



Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), and the drug effect was quantified as a percent of the absorbance of the control-treated cells.

3D multicellular spheroid culture

HepG2 cells were cultivated in 3D multicellular spheroids. Briefly, 100 μL of cell solution (0.5×10^6 cells/mL) was added to a 96-well plate with a cell-repellent surface (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) and cultured in complete medium plus 3% Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Spheroids with stable structures formed after three days. Then, the spheroids were exposed to a range of drug concentrations for 72 h. The negative control received the vehicle that was used for diluting the complex tested. In the end of the experiment, morphological changes were examined by light microscopy (Olympus BX41, Tokyo, Japan) using Image-Pro software (Media Cybernetics, Inc. Silver Spring, USA), and cell viability was quantified by alamar blue assay as described above.

Trypan blue exclusion assay

The TBE assay was used to confirm the cytotoxic effect of the complex tested. The number of viable cells and non-viable (take up trypan blue) cells were counted. Briefly, 90 μL was removed from the cell suspension and 10 μL of trypan blue (0.4%) was added. Cell counting was performed using a light microscope with a hemocytometer filled with an aliquot of the homogenized cell suspension.

Ruthenium subcellular distribution

The analysis of the subcellular distribution of ruthenium in HepG2 cells was performed by EDS³⁵. Briefly, cells were fixed in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde for at least 2 h. After washing, the cells were dehydrated in an acetone series and embedded in Polybed epoxy resin (Polysciences; Warrington, PA). Ultrathin sections were examined under a JEM-1230 TEM integrated with an EDS microanalytics system (JEOL USA, Inc., Peabody, MA, USA).

DNA intercalation assay

DNA intercalation was assessed by examining the ability of the complex to displace ethidium bromide from ctDNA (Sigma-Aldrich)³⁶. The assay was conducted in 96-well plates, and the reaction mixture contained 15 µg/mL ctDNA, 1.5 µM ethidium bromide and either 10 or 20 µM RCX in 100 µL of saline solution. After a 15 min of incubation at room temperature, fluorescence was measured using the excitation and emission wavelengths of 320 nm and 600 nm, respectively, using the Spectramax Microplate Reader (Molecular Devices).

DNA synthesis quantification

Cellular DNA synthesis was quantified by the incorporation of methyl-[³H]-thymidine. Methyl-[³H]-thymidine is a radiolabeled DNA precursor that is incorporated into newly synthesized DNA. Briefly, the complex was added along with 1 µCi of methyl-[³H]-thymidine (PerkinElmer; Shelton, CT, USA) and incubated for 3 h. After this incubation period, cultures were harvested using a cell harvester (Brandel, Inc., Gaithersburg, MD, USA), and the amount of incorporated ³H-thymidine was determined using a liquid scintillation cocktail Hidex Maxilight (PerkinElmer Life Sciences; Groningen, GE, Netherlands) and a plate CHAMELEON V multilabel Counter (Musionkatu 2, Turku, Finland). Mitoxantrone (Sigma-Aldrich) was used as the positive control.

Internucleosomal DNA fragmentation and cell cycle distribution

Internucleosomal DNA fragmentation and cell cycle distribution analyses followed the procedure previously described³⁷. Briefly, the cells were harvested in a permeabilization solution containing 0.1% Triton X-100, 2 µg/mL PI, 0.1% sodium citrate and 100 µg/mL RNase (all from Sigma-Aldrich) and incubated in the dark for 15 min at room temperature. Finally, cell fluorescence was measured by flow cytometry with a BD LSRFortessa cytometer using BD FACSDiva Software (BD Biosciences) and FlowJo Software 10 (FlowJo Lcc; Ashland, OR, USA). Ten thousand events were evaluated per experiment, and cellular debris was omitted from the analysis.

Morphological analysis

To evaluate alterations in morphology, cells were cultured on a coverslip and stained with May-Grunwald-Giemsa. Morphological changes were examined by light microscopy (Olympus BX41) using Image-Pro software (Media Cybernetics). Light scattering features were determined by flow cytometry, as described above. In addition, cells were fixed in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde for at least 2 h. After washing, the cells were treated with 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium

ferricyanide and 5 mM calcium chloride for 1 h. After another washing, the cells were dehydrated in acetone series and embedded in Polybed epoxy resin. Ultrathin sections were stained with 2% aqueous uranyl acetate and 2% aqueous lead citrate, and the ultrastructure analysis was performed by TEM using a JEM-1230 microscope (JEOL USA, Inc.).

Annexin V/PI staining assay

For apoptosis detection, we used the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences), and the analysis was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were washed twice with saline and then resuspended in 100 µL of binding buffer with 5 µL of PI and 5 µL of FITC Annexin V. The cells were gently mixed by vortexing and incubated for 15 min at room temperature in the dark. Afterwards, 400 µL of binding buffer was added to each tube, and the cell fluorescence was determined by flow cytometry, as described above. The percent of viable, early apoptotic, late apoptotic and necrotic cells were determined. Protection assays using the pan-caspase inhibitor (Z-VAD (Ome)-FMK, Cayman Chemical; Ann Arbor, MI, USA), caspase-8 inhibitor (Z-IETD-FMK; BD Biosciences), caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK; BD Biosciences), MEK inhibitor (U-0126; Cayman Chemical), JNK/SAPK inhibitor (SP 600125; Cayman Chemical), p38 MAPK inhibitor (PD 169316; Cayman Chemical) and p53 inhibitor (cyclic pifithrin- α ; Cayman Chemical) were also performed. In brief, the cells were pretreated for 2 h with 50 µM Z-VAD(Ome)-FMK, 20 µM Z-IETD-FMK, 20 µM Z-LEHD-FMK, 5 µM U-0126, 5 µM SP 600125, 5 µM PD 169316 or 10 µM cyclic pifithrin- α , followed by incubation with 12 µM RCX for 48 h. The cells were then trypsinized, and the FITC Annexin V Apoptosis Detection assay was conducted as described above.

Measurement of the mitochondrial transmembrane potential

Mitochondrial transmembrane potential was determined by the retention of the rhodamine 123 dye³⁸. Cells were incubated with rhodamine 123 (5 µg/mL, Sigma-Aldrich Co.) at 37 °C for 15 min in the dark and washed with saline. The cells were then incubated again in saline at 37 °C for 30 min in the dark, and the cell fluorescence was determined by flow cytometry, as described above.

Caspase-3, -8 and -9 activation assays

A caspase-3 colorimetric assay kit (Sigma-Aldrich), caspase-8 colorimetric assay kit (BioVision Inc.; Milpitas, CA, USA) and caspase-9 colorimetric assay kit (Invitrogen; Frederick, MD, USA) were used to investigate the activation of caspase-3, -8 and -9 in RCX-treated HepG2, respectively. The analysis was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were lysed by

incubation with cell lysis buffer on ice for 10 min and then centrifuged. Enzyme reactions were carried out in a 96-well flat-bottom microplate. To each reaction mixture, 5 μ L of cell lysate was added. Absorbance at 405 nm was measured using the SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices). The results are expressed as the specific activity (IU/mg protein) of each caspase.

Measurement of intracellular reactive oxygen species levels

The production levels of ROS were measured according to a previously described method³⁹ using DCF-DA (Sigma-Aldrich). In brief, cells were treated with RCX for 1 or 3 h. Then, the cells were collected, washed with saline and resuspended in FACS tubes with saline containing 5 μ M DCF-DA for 30 min. Finally, the cells were washed with saline, and cell fluorescence was determined by flow cytometry as described above. A protection assay using the antioxidant NAC (Sigma-Aldrich) was also performed. In brief, the cells were pretreated for 1 h with 5 mM NAC and then incubated with 12 μ M RCX for 24 h. The cells were then trypsinized, and the TBE assay was performed.

Gene expression analysis by qPCR array

HepG2 cells were plated in bottles for cell culture (7×10^4 cells/mL). After 12 h of incubation with 12 μ M RCX, total RNA was isolated from the cells using an RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen; Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The RNA was evaluated by fluorimetry using QuBit (Life Technologies; Camarillo, CA, USA). RNA reverse transcription was performed using a Superscript VILO™ Kit (Invitrogen Corporation; Waltham, MA, USA). A 96-well plate TaqMan® Array Human Molecular Mechanisms of Cancer (ID 4418806, Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA) was used for the gene expression study by qPCR. The reactions were conducted in an ABI ViiA7 system (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). The cycle conditions comprised 2 min at 50 °C, 20 s at 95 °C, then 40 cycles of 3 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. The relative quantification (RQ) of mRNA expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method⁴⁰ using Gene Expression Suite™ Software (Applied Biosystems™), and the cells treated with the negative control (0.2% DMSO) were used as a calibrator. The reactions were normalized by the geometric mean of the RQ of the reference genes GAPDH, 18S and HPRT1. All experiments were performed in DNase/RNase-free conditions. The genes were considered to be up-regulated if the RQ ≥ 2 , which means that the gene expression in RCX-treated cells was at least twice that of the negative control-treated cells. Similarly, the genes were considered to be down-regulated if RQ ≤ 0.5 , which means that the gene expression in RCX-treated cells was at least half of that of the negative control-treated cells.

Phosflow analysis

Phosphorylated ERK 1/2, JNK/SAPK and p38 MAPK were analyzed by flow cytometry⁴¹. In brief, cells were collected and resuspended in 0.5–1 mL of 4% formaldehyde and fixed for 10 min at 37 °C. Then, the tubes were chilled on ice for 1 min. The cells were permeabilized by slowly adding ice-cold 100% methanol to pre-chilled cells while gently vortexing to a final concentration of 90% methanol and were incubated for 30 min on ice. After washing with incubation buffer (0.5% bovine serum albumin in PBS), PE mouse anti-ERK1/2 (pT202/pY204), PE mouse anti-JNK/SAPK (pT183/pY185), PE mouse anti-p38 MAPK (pT180/pY182) or PE mouse IgG₁, κ isotype control antibodies, all from BD Biosciences, were added and incubated for 1 h at room temperature. Finally, the cells were washed with PBS, and cell fluorescence was determined by flow cytometry as described above.

In vivo assays

Animals

A total of 78 C.B-17 SCID mice (females, 25–30 g) was obtained and maintained at the animal facilities from Gonçalo Moniz Institute-FIOCRUZ (Salvador, Bahia, Brazil). Animals were housed in cages with free access to food and water. All animals were kept under a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 6:00 a.m.). The local Animal Ethics Committee approved the experimental protocol (number 06/2015).

Human hepatocellular carcinoma xenograft model

HepG2 cells (1×10^7 cells per 500 μ L) were implanted subcutaneously into the left front armpit of the mice. At the beginning of the experiment, mice were randomly divided into five groups: group 1 animals received injections of vehicle with 5% DMSO solution ($n = 15$); group 2 animals received injections of doxorubicin (0.3 mg/kg, $n = 14$); group 3 animals received injections of 5-fluorouracil (10 mg/kg, $n = 15$, Sigma-Aldrich); group 4 animals received injections of RCX at 2.5 mg/kg ($n = 14$); and group 5 animals received injections of RCX at 5 mg/kg ($n = 14$). The treatments were initiated one day after the tumor cell injection. The animals were treated intraperitoneally (200 μ L per animal) once daily for 21 consecutive days. On the 22nd day, the animals were anesthetized, and peripheral blood samples were collected from the brachial artery. Animals were euthanized by anesthetic overdose, and tumors were excised and weighed.

Toxicological evolution

To assess the toxicological effects, mice were weighed at the beginning and at the end of the experiment. Animals were observed for signs of abnormalities throughout the study. Hematological analysis was performed using light microscopy. Livers, kidneys, lungs and hearts were

removed, weighed and examined for any signs of gross lesions, color changes and/or hemorrhages. After gross macroscopic examination, the tumors, livers, kidneys, lungs and hearts were fixed in 4% formalin buffer and embedded in paraffin. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin chromogens, and a pathologist performed the analysis under a light microscope.

Statistical analysis

Data are presented as the means \pm S.E.M. or as IC₅₀ values with 95% confidence intervals (CI 95%) obtained by nonlinear regression. Differences among experimental groups were compared using analysis of variance (ANOVA) followed by the Student–Newman–Keuls test ($P < 0.05$). All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (Intuitive Software for Science; San Diego, CA, USA).

Acknowledgements

The authors are grateful to the flow cytometry, histotechnology and electron microscopy cores of FIOCRUZ-Bahia for collecting the flow cytometric data, performing the histological techniques and acquiring the TEM and EDS data. This work received financial support and fellowships from Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Author details

¹Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ/BA), Salvador, Bahia 40296-710, Brazil. ²Department of Biomorphology, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia 40110-902, Brazil. ³Center of Biotechnology and Cell therapy, Hospital São Rafael, Salvador, Bahia 41253-190, Brazil. ⁴Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo 13561-901, Brazil. ⁵Department of Chemistry, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe 49100-000, Brazil

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary information

The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41419-017-0104-6>) contains supplementary material.

Received: 24 July 2017 Revised: 2 October 2017 Accepted: 30 October 2017
Published online: 23 January 2018

References

- Ferlay, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359–E386 (2015).
- Yeo, W. et al. A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 1532–1538 (2005).
- Llovet, J. M. et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **359**, 378–390 (2008).
- Rosamel, L. & Blanc, J. F. Emerging tyrosine kinase inhibitors for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Expert. Opin. Emerg. Drugs*. **12**, 1–16 (2017).
- Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265–7279 (2003).
- Zeng, L. et al. Ruthenium(II) complexes with 2-phenylimidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline derivatives that strongly combat cisplatin-resistant tumor cells. *Sci. Rep.* **6**, 19449 (2016).
- Milutinović, M. M. et al. New 4'-(4-chlorophenyl)-2,2',6',2"-terpyridine ruthenium(II) complexes: synthesis, characterization, interaction with DNA/BSA and cytotoxicity studies. *J. Inorg. Biochem.* **169**, 1–12 (2017).
- Wan, D. et al. Ruthenium (II) polypyridyl complexes: synthesis, characterization and anticancer activity studies on BEL-7402 cells. *J. Inorg. Biochem.* **173**, 1–11 (2017).
- Costa, C.O.D. et al. Novel piplartine-containing ruthenium complexes: synthesis, cell growth inhibition, apoptosis induction and ROS production on HCT116 cells. *Oncotarget* (in press). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22248>
- Lentz, F. et al. Pharmacokinetics of a novel anticancer ruthenium complex (KP1019, FFC14A) in a phase I dose-escalation study. *Anticancer Drugs*. **20**, 97–103 (2009).
- Leijen, S. et al. Phase III study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. *Invest. New Drugs*. **33**, 201–214 (2015).
- Calixto, J. B., Miguel, O. G., Yunes, R. A. & Rae, G. A. Action of 2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone isolated from *Sebastiania schottiana*. *Planta Med.* **56**, 31–35 (1990).
- Godoy, G. F., Miguel, O. G. & Moreira, E. A. Antibacterial activity of xanthoxylin, constituent of *Sebastiania schottiana*. *Fitoterapia* **62**, 269–270 (1991).
- Cechinel, V. F., Vaz, Z. R., Zunino, L., Calixto, J. B. & Yunes, R. A. Synthesis of xanthoxylin derivatives with antinociceptive and antioedematogenic activities. *Eur. J. Med. Chem.* **31**, 833–839 (1996).
- Simonsen, H. T. et al. Antifungal constituents of *Melicope borbonica*. *Phytother. Res.* **18**, 542–545 (2004).
- Oliveira, R. M. M., Daniel, J. F. S. & Carlos, R. M. Synthesis, spectroscopic characterization and biological activity of cis-[Ru(hesperidin)(1,10'-phenanthroline)2](PF6) complex. *J. Mol. Struct.* **1031**, 269–274 (2013).
- Oliveira, R. M. M. et al. Structural effects on the hesperidin properties obtained by chelation to magnesium complexes. *J. Inorg. Biochem.* **129**, 35–42 (2013).
- Mohammadi, K. et al. Synthesis and characterization of dual function vanadyl, gallium and indium curcumin complexes for medicinal applications. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 2217–2225 (2005).
- Song, Y. M. et al. Syntheses, characterization and biological activities of rare earth metal complexes with curcumin and 1,10-phenanthroline-5,6-dione. *J. Inorg. Biochem.* **103**, 396–400 (2009).
- Byabartta, P. Ruthenium(II)-arylaizimidazole-8-hydroxyquinolate complexes: synthesis, spectral study (H, C, COSY, HMQC-NMR) and redox properties. *Russ. J. Inorg. Chem.* **54**, 1401–1406 (2009).
- Jain, S. S. et al. RNA binding and inhibition of primer extension by a Ru(III)/Pt(II) metal complex. *Chem. Commun.* **49**, 5031–5033 (2013).
- Alagesan, M., Bhuvanesh, N. S. & Dharmaraj, N. An investigation on new ruthenium(II) hydrazone complexes as anticancer agents and their interaction with biomolecules. *Dalton. Trans.* **43**, 6087–6099 (2014).
- Deng, Z. et al. Ruthenium complexes with phenylterpyridine derivatives target cell membrane and trigger death receptors-mediated apoptosis in cancer cells. *Biomaterials* **129**, 111–126 (2017).
- Jovanović, K. K. et al. Cell cycle, apoptosis, cellular uptake and whole-transcriptome microarray gene expression analysis of HeLa cells treated with a ruthenium(II)-arene complex with an isoquinoline-3-carboxylic acid ligand. *J. Inorg. Biochem.* **163**, 362–373 (2016).
- Zhu, J. W. et al. Anticancer activity studies of ruthenium(II) complex toward human osteosarcoma HOS cells. *J. Membr. Biol.* **249**, 483–492 (2016).
- Wang, X., Martindale, J. L. & Holbrook, N. J. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 39435–3943 (2000).
- Wu, D. et al. ERK activity facilitates activation of the S-phase DNA damage checkpoint by modulating ATR function. *Oncogene* **25**, 1153–1164 (2006).
- Yan, Y., Black, C. P. & Cowan, K. H. Irradiation-induced G₂/M checkpoint response requires ERK1/2 activation. *Oncogene* **26**, 4689–4698 (2007).
- Wei, F., Xie, Y., Tao, L. & Tang, D. Both ERK1 and ERK2 kinases promote G₂/M arrest in etoposide-treated MCF7 cells by facilitating ATM activation. *Cell Signal.* **22**, 1783–1789 (2010).
- Tang, D. et al. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J. Biol. Chem.* **277**, 12710–12717 (2002).

31. Singh, S., Upadhyay, A. K., Ajay, A. K. & Bhat, M. K. p53 regulates ERK activation in carboplatin induced apoptosis in cervical carcinoma: a novel target of p53 in apoptosis. *FEBS Lett.* **581**, 289–295 (2007).
32. Chen, L. et al. The induction of autophagy against mitochondria-mediated apoptosis in lung cancer cells by a ruthenium (II) imidazole complex. *Oncotarget* **7**, 80716–80734 (2016).
33. Dwyer, F. P., Goodwin, H. A. & Gyarfás, E. C. Mono- and bis-(2,2'-bipyridine) and -(1,10-phenanthroline) chelates of ruthenium and osmium. II. bischelates bivalent trivalent ruthenium. *Aust. J. Chem.* **16**, 544–548 (1963).
34. Ahmed, S. A., Gogal, R. M. Jr & Walsh, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods* **170**, 211–224 (1994).
35. Kirk, R. G., Gates, M. E., Chang, C. S. & Lee, P. Quantitative X-ray imaging of labelled molecules in tissues and cells. *J. Microsc.* **183**, 181–186 (1996).
36. Glass, L. S., Bapat, A., Kelley, M. R., Georgiadis, M. M. & Long, E. C. Semi-automated high-throughput fluorescent intercalator displacement-based discovery of cytotoxic DNA binding agents from a large compound library. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 1685–1688 (2010).
37. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. & Riccardi, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **139**, 271–279 (1991).
38. Sureda, F. X. et al. Mitochondrial membrane potential measurement in rat cerebellar neurons by flow cytometry. *Cytometry* **28**, 74–80 (1997).
39. LeBel, C. P., Ischiropoulos, H. & Bondy, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 227–231 (1992).
40. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
41. Chow, S., Patel, H. & Hedley, D. W. Measurement of MAP kinase activation by flow cytometry using phospho-specific antibodies to MEK and ERK: potential for pharmacodynamic monitoring of signal transduction inhibitors. *Cytometry* **46**, 72–78 (2001).