

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE

ALINE MONEZI MONTEL

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPLEXOS FOSFÍNICOS DE
RUTÊNIO (II) SINTÉTICOS E ATIVADOS NEUTRONICAMENTE
SOBRE LINHAGENS CELULARES DE GLIOBLASTOMA**

JATAÍ - GO
2015

ALINE MONEZI MONTEL

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPLEXOS FOSFÍNICOS DE
RUTÊNIO (II) SINTÉTICOS E ATIVADOS NEUTRONICAMENTE
SOBRE LINHAGENS CELULARES DE GLIOBLASTOMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Gouvêa dos Santos
Co-orientadora: Dra. Raquel Gouvêa dos Santos

JATAÍ – GO

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Monezi Montel, Aline
[manuscrito] / Aline Monezi Montel. -
2015. xx, 92 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Gouvêa dos Santos; co-orientadora
Dra. Raquel Gouvêa dos Santos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Regional
Jataí, Jataí, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas
a Saúde, Jataí, 2015.

Bibliografia.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico,
tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Apoptose. 2. Ativação neutônica. 3. Citotoxicidade. 4.
Complexos metálicos. 5. Rutênio II. I. Gouvêa dos Santos, Wagner ,
orient. II. Gouvêa dos Santos, Raquel , co-orient. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS JATAÍ



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE

Rod. BR 364, km 192, n. 3800, Setor Industrial
75.801.615 – Jataí/GO- Brasil

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

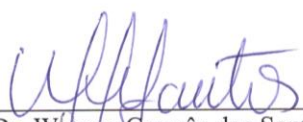
Aos vinte e quatro dias do mês de abril do ano de 2015, às 08:00h na Cidade Universitária José Cruciano de Araújo, UFG/Regional Jataí realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação, intitulada.. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPLEXOS FOSFÍNICOS DE RUTÊNIO (II) SINTÉTICOS E ATIVADOS NEUTRONICAMENTE SOBRE LINHAGENS CELULARES DE GLIOBLASTOMA, de autoria da Candidata ALINE MONEZI MONTEL, aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Saúde, em nível de Mestrado. A Comissão Examinadora esteve constituída pelos professores: Prof. Dr. WAGNER GOUVÊA DOS SANTOS, Presidente, Profª. Dra. MARINA PACHECO MIGUEL, Profª. Dra. VERA APARECIDA SADDI e Prof. Dr. SAULI DOS SANTOS JÚNIOR.

Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, os membros da banca consideraram o projeto de dissertação:

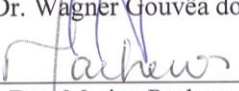
☒ aprovado

() reprovado

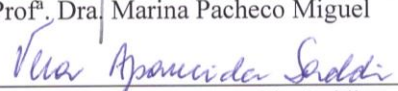
Banca Examinadora:



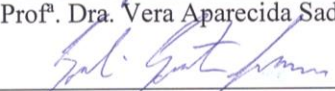
Prof. Dr. Wagner Gouvêa dos Santos



Profª. Dra. Marina Pacheco Miguel



Profª. Dra. Vera Aparecida Saddi



Prof. Dr. Sauli dos Santos Júnior

Foi concedido um prazo máximo de 30 dias, a contar da data de defesa, para a candidata efetuar as correções sugeridas pela Comissão Examinadora e apresentar o trabalho em sua redação definitiva, sob pena de não expedição do Diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão.



Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo à Universidade Federal de Goiás – UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autora:	Aline Monezi Montel		
Email:	alinemonezi@hotmail.com		
Título:	Avaliação dos efeitos de complexos fosfinicos de rutênio (II) sintéticos e ativados neutronicamente sobre linhagens celulares de glioblastoma.		
Palavras-chave:	Apoptose, Ativação neutrônica, Citotoxicidade, Complexos metálicos, Glioma, Rutênio II		
Título em outra língua:	Evaluation of the ruthenium II fosfinic complexes synthetic and neutronic activated effects in glioblastoma cells.		
Palavras-chave em outra língua:	Apoptosis, Cytotoxicity, Glioma, Metal complexes, Neutronic activation, Ruthenium II		
Número de páginas:	92	Data defesa:	24/04/2015
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde		
Orientador:	Prof. Dr. Wagner Gouvêa dos Santos		
E-mail:	wagbrpt@hotmail.com		
Co-orientadora:	Dra. Raquel Gouvêa dos Santos		
E-mail:	gouvears@gmail.com		

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM ☒ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua publicação serão bloqueados através dos procedimentos de segurança (criptografia e para não permitir cópia e extração de conteúdo) usando o padrão do Acrobat Writer.

Aline Monezi Montel
Assinatura do(a) autor(a)

Data: 21 / 05 / 2015.

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Dedico este trabalho à minha família, por sempre estarem ao meu lado... aos meus pais, Afonso e Vera Márcia, por todo amor e dedicação, que nunca mediram esforços para me ajudar. Às minhas irmãs, Camila e Lays, pelo apoio e compreensão. À minha avó, Lúcia, por todo carinho e cuidado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fonte inesgotável, por sempre guiar meus passos, ter me dado força e coragem para superar as dificuldades e, por ter colocado pessoas tão especiais em minha vida, que me ajudaram durante esta trajetória.

À minha família, meu porto seguro, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando. Obrigada pelo amor, cuidado e proteção.

Ao Prof. Dr. Wagner Gouvêa dos Santos, pela orientação. Agradeço pela confiança, paciência e por todos os ensinamentos e oportunidades concedidas.

À minha co-orientadora, Dra. Raquel Gouvêa dos Santos, por ter me recebido no Departamento de Radiobiologia (CDTN - Belo Horizonte). Obrigada pela oportunidade e prontidão, por todo o apoio e pelos valiosos ensinamentos.

À prof^a. Dra. Nadya da Silva Castro, pela oportunidade de estágio em docência, por seus ensinamentos, conselhos e pelo constante incentivo, sempre contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço muito pelo carinho e pela amizade valiosa e sincera.

Agradeço a colaboração da prof. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda, por ter gentilmente cedido os compostos de Rutênio para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sauli dos Santos Júnior, pelo auxílio com a estrutura dos compostos.

Aos amigos de Belo Horizonte: Ariene Chamon, Thamara Fernandes, Gabriel Chamom, Guilherme e João Silva, por terem me recebido tão bem. Agradeço a acolhida, o cuidado e por desfrutarmos de ótimos momentos juntos.

Agradeço imensamente à Pryscila Rodrigues, Felipe Henrique, Luíza Ferreira, Lucilene Gabriel e Léo Tafas que se prontificaram a me ajudar e me acompanhar durante a realização dos experimentos no laboratório de cultivo celular (Departamento de Radiobiologia - CDTN). Obrigada pelo auxílio, colaboração e agradável companhia. Aprendi muito com vocês.

Às equipes do reator nuclear e de radioproteção (CDTN), Dr. Luís Cláudio Andrade, Fausto Maretti, Dante Zangirolami, Paulo Fernando Oliveira, Luíz Otávio Sette

Câmara, Carlos Alberto Rodrigues, Antônio Carlos Rocha, Geraldo Frederico Kastner, pela ativação neutrônica dos compostos, orientação e serviços prestados.

Às amigas de mestrado, Allana Souza e Dayane Moraes, pelo companheirismo, apoio, amizade e também pela força nos momentos de dificuldade. Nestes dois anos compartilhamos de bons e divertidos momentos juntas. Agradeço também aos colegas de mestrado pela convivência e pelos agradáveis encontros que fazíamos aos finais de semestre.

Aos meus queridíssimos amigos Viviane Palladino, Janayna Marques, Jackeline Oliveira, Nathanne Ferreira, Ângara Nayane, Taíza Márcia, Mayara Vila Verde, Giovanna Palladino, Nicolly Palladino, Matheus Luz e Cleomar Júnior pela amizade, prontidão, apoio e torcida, pelas orações e palavras que me fortaleceram nesta caminhada.

À Eliane Alves e ao Jefferson Naves pelo auxílio, pelas dicas e conselhos. Obrigada pela boa convivência durante o tempo que estive no Laboratório de Genética (UFG/Regional Jatai).

À FAPEG pela bolsa de mestrado.

À Universidade Federal de Goiás, FAPEMIG e CDTN, pelo apoio e auxílio prestado para a execução deste trabalho.

Aos professores convidados, pela prontidão e por aceitarem o convite para participar da banca de dissertação.

Meus sinceros agradecimentos a todos os professores, familiares, amigos e colegas que participaram desta trajetória, torcendo, incentivando e contribuindo para a realização deste trabalho.

A todos vocês, minha gratidão!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas
o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

*“O que vale na vida não é o ponto de
partida e sim a caminhada. Caminhando e
semeando, no fim terás o que colher.”*

Cora Coralina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Câncer	21
1.1.1. Glioblastoma multiforme	22
1.2. Principais formas de tratamento do câncer	23
1.2.1. Radiações ionizantes	26
1.3. Características e formação das células tumorais.....	28
1.3.1. Ciclo celular e câncer	29
1.4. Tipos de morte celular.....	32
1.5. Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS).....	37
1.6. A busca por novas terapias.....	38
1.6.1. Complexos metálicos como quimioterápicos.....	38
1.7. Complexos de Rutênio como agentes quimioterápicos	40
1.7.1. Propriedades do Rutênio	40
1.7.2. Atividade Antitumoral de complexos de Rutênio	42
1.7.3. Novas estratégias de uso de compostos de Rutênio	44
2. JUSTIFICATIVA.....	46
3. OBJETIVOS	48
3.1. Objetivo geral	48
3.2. Objetivos específicos	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1. Drogas teste.....	49
4.1.1. Complexos de Rutênio	49
4.1.2. Ativação neutrônica dos complexos de Rutênio	50
4.2. Cultura e manutenção de células	52
4.3. Avaliação do efeito das drogas.....	52
4.3.1. Análise morfológica	52
4.3.2. Estudo da citotoxicidade <i>in vitro</i> de CFRs em células tumorais.....	53
4.3.3. Análise das alterações do DNA cromossomal induzidas pelos CFRs, através da coloração DAPI	54
4.3.4. Determinação do tipo de morte induzida por CFRs através da coloração Laranja de Acridina/ Brometo de etídeo	54
4.3.5. Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)	55
4.4. Análises estatísticas.....	56

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. Produção de CFRs ativados neutronicamente	57
5.2. Avaliação do efeito das drogas.....	59
5.2.1. Alterações morfológicas.....	59
5.2.2. Estudo da citotoxicidade <i>in vitro</i> de CFRs em células tumorais.....	62
5.2.3. Análise das alterações do DNA cromossomal induzidas pelos CFRs através da coloração DAPI	69
5.2.4. Determinação do tipo de morte induzida pela coloração Laranja de Acridina/Brometo de etídeo	72
5.2.5. Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)	75
6. CONCLUSÃO	82
7. PERSPECTIVAS.....	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo da capacidade de penetração e atenuação das radiações ionizantes.....	27
Figura 2: Mecanismos de proliferação e propriedades das células tumorais envolvidos no processo de desenvolvimento do câncer.....	29
Figura 3: Representação esquemática das etapas, intérfase e mitose, do ciclo celular incluindo suas fases G1, S, G2 e os pontos de checagem de erros.....	30
Figura 4: Características e propriedades das proteínas p53 nativa e p53 mutante destacando suas diferenças: (a) duração da meia-vida; (b) capacidade de reconhecimento e ligação a uma sequência específica na molécula de DNA. (c) efeitos observados na atividade das proteínas após danos induzidos no DNA.....	32
Figura 5: Representação esquemática das vias moleculares, intrínseca e extrínseca, de ativação de apoptose. Ambas as vias envolvem a atividade de caspases elicítadas respectivamente por sinais intracelulares ou por interações entre receptores e ligantes de morte externos.	34
Figura 6: Esquema ilustrativo do processo celular de autofagia. A indução da autofagia ocorre em resposta a vários estímulos celulares. Neste processo, há o sequestro de proteínas e organelas citosólicas em estruturas denominadas autofagossomos. O autofagossomo funde-se com o lisossomo, originando o autolisossomo, estrutura onde os componentes citosólicos são degradados pela ação de hidrolases lisossomais	35
Figura 7: Características morfológicas de apoptose, autofagia e necrose. Em apoptose observa-se formação de corpos apoptóticos caracterizados por condensação de cromatina, envolvidos por membranas. No processo de autofagia, ocorre o envolvimento de proteínas associadas a organelas citosólicas e formação de uma estrutura denominada autofagossomos. Em necrose, ocorre aumento do volume células culminando em sua ruptura e extravasamento do conteúdo citoplasmático podendo levar a um processo inflamatório.....	36
Figura 8: Esquema representando a seletividade da absorção de transferrina por células cancerosas devido a um aumento no número de receptores. Rutênio mimetizando o ferro na ligação à transferrina seria absorvido em maior quantidade pelas células cancerosas do que por uma célula normal. A transferrina carregada de metal é distribuída, conforme o número de receptores nas superfícies celulares.....	42
Figura 9: Esquema molecular da estrutura dos compostos KP1019 e NAMI-A	43
Figura 10: Estruturas moleculares tridimensionais dos complexos 1) Rudppb, 2) Rudppe, 3) Rudppf e 4) Rudppp, geradas pelo programa ORTEP (<i>Oak ridge ellipsoid plot</i>).....	49
Figura 11: Esquema do MTT sendo reduzido a cristais de formazan, por meio das enzimas desidrogenases de células metabolicamente viáveis. Após redução do MTT, de	

cor amarela, ocorre a formação dos cristais de formazan, de cor violeta, que podem ser quantificados por espectrofotometria. 53

Figura 12: Espectro dos compostos de rutênio ativados neutronicamente no tubo central do reator Triga Mark IPR-R1. O espectro mostra o fotopico principal do ^{103}Ru do gráfico no valor de 497 keV. A) Espectro indicando as energias características das emissões de Ru-103 medidas no sistema de espectrometria com detector de germânio HPGe de eficiência relativa de 50% para identificação mais precisa da energia do fotopico principal (497keV). B) Espectro no detector NaI (Wizard) para quantificação da atividade específica.....58

Figura 13: Fotomicrografias das células T98, U87 e MRC5 controle e tratadas com os CFRs (Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp) não radioativos. Células controle e tratadas por 24h, com CFRs ($10\mu\text{mol.L}^{-1}$). As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao microscópio óptico (Aumento: 400x). Alterações como redução do volume celular - arredondamento e encolhimento (seta fechada preta), irregularidades na membrana (seta aberta) e formação de corpos apoptóticos (seta fechada branca) foram observadas nas células tratadas 60

Figura 14: Fotomicrografias das células T98, U87 e MRC5 controle e tratadas com os CFRs ($^{103}\text{Rudppb}$, $^{103}\text{Rudppe}$, $^{103}\text{Rudppf}$ e $^{103}\text{Rudppp}$) radioativos. Células controle e tratadas por 24h, com CFRs ($10\mu\text{mol.L}^{-1}$). As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao microscópio óptico (Aumento: 400x). Alterações como redução do volume celular (arredondamento e encolhimento) (seta fechada preta), irregularidades na membrana (seta aberta) e formação de corpos apoptóticos (blebs) (seta branca) foram observados nas células tratadas 61

Figura 15: Efeito citotóxico dos CFRs (Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp) não radioativos em células T98, após 24h de tratamento.....62

Figura 16: Efeito citotóxico dos CFRs (Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp) não radioativos em células U87, após 24h de tratamento 63

Figura 17: Efeito citotóxico dos CFRs (Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp) não radioativos em células MRC5, após 24h de tratamento 63

Figura 18: Efeito citotóxico dos CFRs ($^{103}\text{Rudppb}$, $^{103}\text{Rudppe}$, $^{103}\text{Rudppf}$ e $^{103}\text{Rudppp}$) radioativos em células T98, após 24h de tratamento.....64

Figura 19: Efeito citotóxico dos CFRs ($^{103}\text{Rudppb}$, $^{103}\text{Rudppe}$, $^{103}\text{Rudppf}$ e $^{103}\text{Rudppp}$) radioativos em células U87, após 24h de tratamento 64

Figura 20: Efeito citotóxico dos CFRs ($^{103}\text{Rudppb}$, $^{103}\text{Rudppe}$, $^{103}\text{Rudppf}$ e $^{103}\text{Rudppp}$) radioativos em células MRC5, após 24h de tratamento 65

Figura 21: Análise do DNA cromossomal das células T98, U87 e MRC5 tratadas com CFRs (Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp) não radioativo, por 24 h. As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao microscópio óptico de fluorescência (Aumento: 400x). Células controle apresentam uma coloração azul opaca. Nas células de GBM tratadas foram observadas: condensação da cromatina (células de

cor azul brilhante - setas), fragmentação nuclear (asteriscos brancos) e corpos apoptóticos (asteriscos amarelos) (Concentração: $10\mu\text{mol.L}^{-1}$). 70

Figura 22: Análise do DNA cromossomal das células T98, U87 e MRC5 tratadas com CFRs ($^{103}\text{Rudppb}$, $^{103}\text{Rudppe}$, $^{103}\text{Rudppf}$ e $^{103}\text{Rudppp}$) radioativo, por 24h. As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao microscópio óptico de fluorescência (Aumento: 400x). Nas células de GBM tratadas foram observadas alterações como: condensação da cromatina (células de cor azul brilhante - setas), fragmentação nuclear (asteriscos brancos) e corpos apoptóticos (asteriscos amarelos) (Concentração: $10\mu\text{mol.L}^{-1}$). 71

Figura 23: Análise do tipo de morte induzido nas células T98, U87 e MRC5 tratadas com CFRs (Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp) não radioativo. As células foram coradas com Laranja de Acridina/Brometo de etídeo, após 24h de tratamento com CFRs ($10\mu\text{mol.L}^{-1}$). As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao microscópio óptico de fluorescência (Aumento: 400x). Células viáveis (apresentam núcleo uniformemente verde brilhante), células em fase inicial de apoptose (setas brancas - indicam corpos apoptóticos e condensação de cromatina), células autofágicas (setas amarelas – indicam autofagolisossomos) e presença de algumas células necróticas (setas vermelhas – indicam células avermelhadas) puderam ser observadas.....73

Figura 24: Análise do tipo de morte induzido nas células T98, U87 e MRC5 tratadas com CFRs ($^{103}\text{Rudppb}$, $^{103}\text{Rudppe}$, $^{103}\text{Rudppf}$ e $^{103}\text{Rudppp}$) Radioativo. As células foram coradas com Laranja de Acridina/Brometo de etídeo, após 24h de tratamento com CFRs Radioativo ($10\mu\text{mol.L}^{-1}$). As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao microscópio óptico de fluorescência (Aumento: 400x). Células viáveis (apresentam núcleo uniformemente verde brilhante), células em fase inicial de apoptose (setas brancas) e células autofágicas (setas amarelas – indicam vacúolos ácidos) foram observadas 74

Figura 25: Geração de espécies reativas de oxigênio nas células T98, U87 e MRC5 tratadas com CFRs (Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp) não radioativo. As células foram coradas com DCF, após 24h de tratamento com CFRs não Radioativo ($10\mu\text{mol.L}^{-1}$). As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao microscópio óptico de fluorescência (Aumento: 400x). Células tratadas apresentaram aumento da intensidade de fluorescência 76

Figura 26: Produção de ROS em linhagens celulares de GBM e células de fibroblastos (MRC5) tratadas com $10\mu\text{mol.L}^{-1}$ dos CFRs não radioativos, por 24h. Os valores são expressos como médias $\pm$ desvio padrão (em porcentagem). *Diferença em relação a T98, **Diferença em relação a MRC5; ($p<0,05$) 77

Figura 27: Análise de produção de espécies reativas de oxigênio nas células T98, U87 e MRC5 tratadas com CFRs ($^{103}\text{Rudppb}$, $^{103}\text{Rudppe}$, $^{103}\text{Rudppf}$ e $^{103}\text{Rudppp}$) Radioativo. As células foram coradas com DCF, após 24h de tratamento com CFRs Radioativo ($10\mu\text{mol.L}^{-1}$). As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao

microscópio óptico de fluorescência (Aumento: 400x). Células tratadas apresentaram aumento da intensidade de fluorescência 78

Figura 28: Produção de ROS em linhagens celulares de GBM e células de fibroblastos (MRC5) tratadas com $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dos CFRs radioativos, por 24h. Os valores são expressos como médias $\pm$ desvio padrão (em porcentagem). *Diferença em relação a T98, **Diferença em relação a MRC5; ($p < 0,05$) 79

Figura 29: Produção de ROS em células T98 tratadas ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) dos CFRs não radioativos e radioativos, por 24h. Os valores são expressos como médias $\pm$ desvio padrão (em porcentagem). *Diferença entre os tratamentos não-radioativos e radioativos $p < 0,05$ 80

Figura 30: Produção de ROS em células U87 tratadas ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) dos CFRs não radioativos e radioativos, por 24h. Os valores são expressos como médias $\pm$ desvio padrão (em porcentagem). *Diferença entre os tratamentos não-radioativos e radioativos $p < 0,05$ 80

Figura 31: Produção de ROS em células MRC5 tratadas ($10 \mu\text{M}$) dos CFRs não radioativos e radioativos, por 24h. Os valores são expressos como médias $\pm$ desvio padrão (em porcentagem). *Diferença entre os tratamentos não-radioativos e radioativos $p < 0,05$ 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomes dos compostos testados e seus respectivos ligantes	49
Tabela 2: Propriedades físicas dos isótopos de Rutênio ^{97}Ru e ^{103}Ru	58
Tabela 3: Citotoxicidade dos CFRs não radioativos em linhagens celulares de GBM U87 e T98, e em MRC5.....	65
Tabela 4: Citotoxicidade dos CFRs radioativos em linhagens celulares de GBM, U87 e T98, e MRC5.....	68
Tabela 5: Dose absorvida pelas células expostas ao radioisótopo ^{103}Ru (Gy).....	68
Tabela 6: Índice de seletividade dos CFRs radioativos e não radioativos sobre linhagens celulares de GBM	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Apaf-1.....	Fator de ativação de apoptose
ATP.....	Adenosina trifosfato
BH.....	Barreira hematoencefálica
Bi.....	Bismuto
Bipy.....	2,2' - bipyridina
Bq.....	Bequerel
Caspases.....	Do inglês, Cysteine-dependent aspartate-specific proteases
CDK.....	Ciclina dependente de quinase
CDTN.....	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
Ci.....	Curie
CFRs.....	Complexos fosfínicos de rutênio II
CNEN.....	Centro Nacional de Energia Nuclear
DAPI.....	4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido
DCF.....	Diclorofluoresceína
DCFH-DA.....	2,7-diclorodihidrofloreseína diacetato
DMEM.....	Meio Dulbecco's modified Eagle's
DMSO.....	Dimetilsufóxido
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
dppb.....	1,4 – bis (difenilfosfino) butano
dppe.....	1,2 – bis (difenilfosfino) etano
dppf.....	1,1' – bis (difenilfosfino) ferroceno
dppp.....	1,3 – bis (difenilfosfino) propano
dps.....	Desintegração por segundo
GBM.....	Glioblastoma multiforme
GBq.....	Gigabecquerel
Gy.....	Gray
h.....	Horas
HPV.....	Papilomavírus humano

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
INCA.....	Instituto Nacional do Câncer
ITC.....	Instituto de Tratamento do Câncer
IS.....	Índice de seletividade
keV.....	Quiloelétron volt
KP1019.....	{trans-[tetraclorobisindazolrutênio(III)]}
LET.....	Transferência linear de energia
Lu.....	Lutécio
M.....	Molar
mGy.....	MiliGray
mg/mL.....	Miligramas por mililitros
mol.L ⁻¹	Mol por litro (equivalente a molar)
MRC5.....	Linhagem celular de fibroblastos pulmonar humano
MTT.....	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]
NAMI-A.....	{(IMH)trans-[Ru(Im)(Me ₂ SO)Cl ₄]}
nm.....	Nanômetro
OH [•]	Hidroxila
O ₂ ^{•-}	Superóxido
OMS.....	Organização Mundial da Saúde
ORTEP.....	Do inglês, Oak ridge ellipsoid plot
PBS.....	Tampão fosfato salina, do inglês, Phosphate-Buffered Saline
PET.....	Tomografia por emissão de pósitrons, do inglês, Positron Emission Tomography
pic.....	Íon picolinato
ROO [•]	Peroxila
ROS.....	Espécies reativas de oxigênio, do inglês, Reactive oxygen species
Ru.....	Rutênio
SNC.....	Sistema nervoso central
SOD.....	Enzima superóxido dismutase
SPECT.....	Tomografia por emissão de fóton único, do inglês, Single-Photon Emission Computed Tomography

T98.....	Linhagem celular de Glioblastoma
TMZ.....	Temozolomida
TNF.....	Fator de necrose tumoral, do inglês, Tumor Necrose Factor
TR.....	Terapia por radionuclídeos
TRIGA.....	Do inglês, Training Research Isotopes General Atomic
U87.....	Linhagem celular de Glioblastoma
UV.....	Ultravioleta
WHO.....	Do inglês, World Health Organization

RESUMO

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor cerebral maligno mais frequente em adultos, caracterizado por uma alta capacidade proliferativa e invasiva, além da alta resistência aos tratamentos disponíveis. Por isso, a investigação de novos agentes que possam melhorar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes com GBM é extremamente necessária. Os compostos de rutênio têm se revelado bons candidatos como drogas antitumorais, apresentando atividade antiproliferativa em alguns tipos de câncer, tais como: mama, próstata e pulmão. Além das propriedades químicas, específicas destes compostos, o rutênio apresenta também radioisótopos que podem ser potencialmente usados na terapia por radionuclídeos (TR). Neste trabalho investigou-se o efeito antitumoral dos complexos fosfínicos de Rutênio (II) (CFRs): [Ru(pic)(bipy)(dppb)]PF₆, [Ru(pic)(bipy)(dppe)]PF₆, [Ru(pic)(bipy)(dppf)]PF₆ e [Ru(pic)(bipy)(dppp)]PF₆, não radioativos e radioativos, sobre linhagens celulares de GBM e avaliou-se o seu potencial uso em TR. As linhagens celulares de GBM: U87 (proteína p53 nativa) e T98 (proteína p53 mutante), assim como, células de fibroblastos pulmonares humanos (MRC5) foram tratadas com diferentes concentrações dos CFRs não radioativos ou radioativos. Os CFRs radioativos contendo ¹⁰³Ru foram ativados neutronicamente utilizando o reator nuclear TRIGA MARK-I IPR-RI, com fluxo neutrônico de $4,3 \times 10^{12}$ n.cm⁻².s⁻¹. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, alterações morfológicas e mecanismo de morte induzido pelos CFRs nas células tratadas foram identificados por microscopia de contraste de fase e de fluorescência utilizando coloração com DAPI ou dupla coloração com Laranja de acridina/Brometo de etídeo. A capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos CFRs foi detectada pelo ensaio com diclorofluoresceína (DCF) e a quantificação da fluorescência produzida foi analisada no software image J (NIH, Bethesda, MD, USA). Todos os compostos foram citotóxicos de maneira dose-dependente, apresentando valores de IC₅₀ variando de 1,49 µM a 27,8 µM e entre $2,3 \times 10^{-4}$ µM a $6,2 \times 10^{-4}$ µM em células de GBM para os compostos não radioativos e radioativos, respectivamente. Os compostos induziram alterações morfológicas indicativas de morte por apoptose e/ou necrose, como encolhimento e arredondamento celular, fragmentação nuclear, condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos. Os CFRs ativados neutronicamente apresentaram maior atividade citotóxica que os CFRs não-radioativos, indicando que os isótopos ¹⁰³Ru, emissores de partículas β apresentaram efeito antitumoral sinérgico. Portanto, os complexos a base de rutênio podem servir como protótipo para o desenvolvimento de novos antineoplásicos, assim como, a utilização de seus radioisótopos podem ser considerados para TR. Com base na literatura, até a presente data, este é o primeiro relato do uso de compostos radioativos de rutênio em GBM.

Palavras-chave: Apoptose, Ativação neutrônica, Citotoxicidade, Complexos metálicos, Glioma, Rutênio II.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the malignant brain tumor most frequent in adults characterized by its high proliferative and invasive properties in addition of its high resistance to the available treatments. Therefore, the investigation of novel agents able to improve survival and overall life quality of GBM patients is extremely needed. Ruthenium compounds have revealed to be good candidates as antitumor drugs demonstrating antiproliferative activity in some types of cancer such as breast, prostate and lung. Besides the chemical properties specific for these compounds, ruthenium also presents a variety of radioisotopes that can be potentially used in radionuclide therapy (RT). In this work we investigated the antitumor effect of non-radioactive and radioactive Ruthenium II Fosfinic Complexes (RFCs) [Ru(pic)(bipy)(dppb)]PF₆, [Ru(pic)(bipy)(dppe)]PF₆, [Ru(pic)(bipy)(dppf)]PF₆ and [Ru(pic)(bipy)(dppp)]PF₆ on GBM cell lines and evaluated its potential use for RT. The GBM cell lines: U87 (expressing native p53 protein) and T98 (expressing mutant p53 protein), as well as human pulmonary fibroblast (MRC5) were treated with different concentrations of non radioactive and radioactive RFCs. Radioactive ruthenium complexes containing ¹⁰³Ru were produced by neutron activation at the TRIGA MARK-I IPR-RI with a thermal neutronic flux of 4.3×10^{12} n.cm⁻².s⁻¹. Cell viability were evaluated by MTT assay, morphological alterations and RFCs mechanism of action were analyzed by phase contrast and fluorescence microscopy with DAPI and double acridine orange/ethidium bromide staining. Generation of oxygen reactive species (ROS) by RFCs was detected by diclorofluorescein (DCF) assay and quantification of the produced fluorescence was analyzed in ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). All tested compounds were cytotoxic to the cells in a dose-dependent manner presenting IC₅₀ in the range of 1.49 μM to 27.8 μM and between 2.3×10^{-4} μM to 6.2×10^{-4} μM for non-radioactive and radioactive RFCs respectively. The RFCs induced morphological alterations indicative of cell death by apoptosis and/or necrosis such as decreasing cell size, cell roundness, nuclear fragmentation, cromatin condensation and formation of apoptotic bodies. RFCs neutronic activated demonstrated higher cytotoxic activity than its non-radioactive counterparts suggesting that upon neutronic activation ¹⁰³Ru, β particles emitter, showed synergistic antitumor effect. Therefore, ruthenium based complexes can serve as a prototype for the development of new anticancer drugs, as well as, the use of its radioisotopes may be considered for RT. Based on the published literature and to the best of our knowledge so far this is the first report describing the potential use of radioactive ruthenium compounds in GBM.

Keywords: Apoptosis, Cytotoxicity, Glioma, Metal complexes, Neutronic activation, Ruthenium II.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

Câncer é o termo utilizado para definir a doença caracterizada pela multiplicação rápida e desordenada de células que podem se infiltrar em órgãos e tecidos através do processo de metástase (WHO, 2014). As células tumorais distinguem-se das células normais, por apresentarem características como proliferação descontrolada, desdiferenciação, capacidade de invasão de tecidos adjacentes e metástases. Estas características são consequentes de uma série de alterações genéticas que em conjunto determinam ganho ou perda de função de proteínas (RANG et al., 2004).

As causas que originam o câncer são variadas, dentre as quais se podem citar alguns fatores externos ao organismo, categoricamente classificados em químicos, físicos e biológicos. Dentre os agentes químicos destacam-se o tabaco, agrotóxicos, aflatoxina e anilina, um corante artificial. Os principais agentes físicos são a radiação ionizante e os raios UV (ultravioleta). Entre os agentes biológicos podem-se citar os papilomavírus (HPV) que causam o câncer de colo de útero em mulheres e a bactéria *Helicobacter pylori* que pode originar tumores no estômago. Todos estes fatores em associação com a constituição genética do indivíduo são responsáveis por desencadear o desenvolvimento do câncer de uma forma geral. O surgimento do câncer depende da intensidade e duração da exposição das células aos agentes causadores da doença (WARD, 2002; WHO, 2014).

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, responsável por aproximadamente 8,2 milhões de mortes no ano de 2012. É a primeira causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda causa de morte nos países em desenvolvimento, atrás apenas das doenças cardiovasculares. Nestes últimos países, a incidência do câncer pode aumentar ainda mais, pois, o aumento da urbanização, da industrialização e a maior expectativa de vida da população favorecem tanto a produção de agentes carcinógenos, quanto, as exposições mais prolongadas a estes agentes (WHO, 2014).

Estima-se que, em 2030 serão notificados 27 milhões de novos casos de câncer e 17 milhões de mortes por câncer, no mundo (WHO, 2014). No Brasil, os dados do Instituto Nacional do Câncer apontam a incidência de 576 mil novos casos de câncer no

ano de 2015. Os tipos mais incidentes, com exceção do câncer de pele, serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, câncer de mama, cólon e reto, colo de útero, pulmão e glândula tireoide (INCA, 2014).

1.1.1. Glioblastoma multiforme

Existem diferentes tipos de tumores cerebrais, sendo representados por uma população heterogênea e distinta de neoplasias benignas e malignas (NATIONAL BRAIN TUMOR SOCIETY, 2012). Os tumores cerebrais representam cerca de 1 a 2% dos casos de tumores sólidos em adultos, porém, são de difícil prognóstico e a sobrevida dos pacientes ainda é baixa. Classificam-se de acordo com o sistema da Organização Mundial da Saúde (OMS) que, na maioria dos casos, são nomeados de acordo com os tipos de células de origem (NUTT et al., 2003). O glioma, um dos tipos mais comuns de tumores cerebrais primários (NUTT et al., 2003; BARTEK et al., 2012; MIZOGUCHI et al., 2013; TANAKA et al., 2013), é derivado das células da glia. O astrocitoma é um tipo de glioma, e pode ser classificado de I a IV, de acordo com o grau de agressividade. O astrocitoma mais agressivo é o de grau IV, também denominado de glioblastoma multiforme (GBM) (NATIONAL BRAIN TUMOR SOCIETY, 2012).

O Glioblastoma multiforme é o tipo de tumor cerebral maligno mais frequente em adultos, possuindo uma alta capacidade proliferativa e invasiva (HORMIGO et al., 2007; MANGIOLA et al., 2013). Estas características conferem um prognóstico bastante desfavorável para os pacientes com GBM que apresentam em média uma sobrevida de aproximadamente um ano, a partir do diagnóstico (STUPP et al., 2005; FERRETTI et al., 2013). A determinação do perfil histológico dos gliomas é muito importante para confirmação do grau de evolução tumoral e a definição da estratégia de tratamento dos pacientes com GBM. Nas situações em que as lesões não podem ser removidas ou em casos em que as condições clínicas dos pacientes não permitem uma cirurgia mais ampla, a biópsia pode ser a única maneira de diagnóstico da doença (NÚCLEO DE AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIA EM SAÚDE - NATS, 2011).

Atualmente, o tratamento padrão consiste na ressecção cirúrgica seguida por radioterapia adjuvante, associada ao tratamento com temozolomida (TMZ), um agente alquilante com razoável penetração da barreira hematoencefálica (BHE). Apesar dos avanços no tratamento quimioterápico do GBM, cerca de 80% dos pacientes ainda apresentam baixa estimativa de vida, tornando-se necessário o estudo de novos agentes

que possam melhorar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes com GBM (FERRETTI et al., 2013; MANGIOLA et al., 2013).

Ao longo das últimas décadas, o prognóstico dos pacientes com GBM apresentou apenas algumas melhorias comparado a outras neoplasias malignas (BLEKER et al., 2012). Apesar de não haver um tratamento eficaz para a cura do GBM, fato que contribui para alta mortalidade observada, a pesquisa contínua pode levar a um futuro promissor em relação a novas terapias mais direcionadas e individualizadas (ANTON et al., 2012), considerando que melhores métodos de tratamento para o GBM e outros tumores no cérebro são urgentemente necessários.

Um dos grandes problemas na terapia de GBM e de outras doenças que acometem o sistema nervoso central (SNC) é a passagem das drogas para o cérebro. A barreira hematoencefálica impede o transporte sistematicamente de vários tipos de moléculas para o cérebro (ZHOU et al., 2012). Outro fator agravante é a alta resistência das células tumorais a diversos tipos de agentes quimioterápicos utilizados (ZHOU et al., 2012). Portanto, a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias de distribuição de drogas dirigidas para o local onde se encontra o tumor também se torna um desafio a ser ultrapassado.

1.2. Principais formas de tratamento do câncer

O diagnóstico correto e precoce é essencial para delinear o tipo de tratamento a ser realizado, haja vista que cada tipo de câncer exige tratamentos específicos, podendo abranger uma ou mais formas de tratamento (WHO, 2014). As principais formas de tratamento para o câncer incluem a quimioterapia, cirurgia, radioterapia ou terapia biológica (ALMEIDA et al., 2005). A escolha do tratamento ideal depende, principalmente, do tipo e estágio de desenvolvimento do tumor e do estado de saúde do paciente (RANG et al., 2004).

A quimioterapia, também conhecida como terapia citotóxica, consiste na utilização de substâncias químicas, isoladas ou em combinação, para tratar neoplasias malignas. Os diferentes tipos de quimioterápicos, ou antineoplásicos, atuam comumente nas células interferindo no crescimento, proliferação e divisão. Podem ser classificados de acordo com sua atuação no ciclo celular ou em relação a sua estrutura química e função celular (INCA, 2014; WHO, 2014). Estes medicamentos atuam especialmente

em células que estão se dividindo ativamente, sendo mais eficazes quando utilizados precocemente. Esta forma de terapia tem como objetivo primário destruir células neoplásicas, conservando as células normais. Porém, grande parte dos antineoplásicos atua de forma não específica, assim ao lesar as células malignas também pode haver o comprometimento de células normais, particularmente daquelas que crescem rapidamente, como as capilares, gastrointestinais e do sistema imunológico (ALMEIDA et al., 2005).

De acordo com a *American Cancer Society* (2014) e INCA (2014), a quimioterapia pode ser 1) curativa, apresentando a finalidade de controlar e erradicar o tumor (podendo ou não estar associada à cirurgia e à radioterapia; 2) adjuvante, sendo mais indicada após tratamento curativo, cirúrgico ou radioterápico, com o intuito de eliminar células residuais metastáticas; 3) neoadjuvante, é o tipo de quimioterapia que antecede o tratamento principal, e tem a finalidade de reduzir parcialmente o tumor, melhorando o prognóstico do paciente e, por fim, 4) paliativa, indicada para melhorar a qualidade de vida do paciente.

A cirurgia é o método de tratamento mais antigo, e possui caráter curativo ou paliativo. A cirurgia curativa está relacionada aos casos iniciais de tumores sólidos, dependendo da localização e anatomia do tumor. A cirurgia paliativa visa reduzir o tamanho do tumor ou diminuir sintomas que comprometem a qualidade de vida do paciente. Nesta modalidade estão a descompressão de estruturas vitais, o controle de hemorragias, a desobstrução de vias aéreas, digestivas e urinárias e o controle da dor. Cerca de 60% dos pacientes são submetidos à cirurgia isoladamente ou em associação com outras quimioterapias (INCA, 2014; ITC, 2014).

Outra forma de terapia para o câncer é a radioterapia, capaz de destruir células tumorais por meio de feixes de radiação ionizante. Esse tipo de radiação, ao interagir com os tecidos, é capaz de ionizar átomos e moléculas promovendo uma série de danos biológicos que levam à morte celular. É realizada de forma localizada e restrita para uma determinada área do corpo, diferentemente da quimioterapia. A aplicação é feita com uma dose pré-calculada em um determinado período de tempo, a um volume que envolve o tumor, com a finalidade de extinguir todas as células tumorais, causando o menor dano possível às células normais que se localizam ao redor do tumor, obtendo assim a regeneração da área irradiada (INCA, 2014). A reação dos tecidos ao tratamento radioterápico pode ser influenciada por vários fatores como a localização e oxigenação

do tumor e a sensibilidade do tumor à radiação, assim como a energia e dose total de radiação utilizada (HALL & GIACCIA, 2006; INCA, 2014).

As principais formas de aplicação da radioterapia são a teleterapia ou radioterapia externa e a braquiterapia ou radioterapia interna (INCA, 2014). A forma mais utilizada é a teleterapia, em que a fonte de radiação (aparelho) está a uma determinada distância do paciente e para isto apresenta uma energia suficientemente alta para alcançar o local do tumor. Nesta técnica destacam-se os emissores de raios gama (cobalto 60) e os aceleradores lineares, que produzem raios X de alta energia e elétrons (FALK, 2003). Já a braquiterapia consiste no método em que a fonte de radiação é inserida diretamente ou a uma curta distância da área do tumor, apresentando menores riscos às células normais, circunvizinhas. Pode ser utilizada para a administração de elevadas doses de radiação em uma pequena área, por um período de tempo relativamente curto, sendo viável a tumores que necessitam de alta dose de radiação ou que se encontram próximos a tecidos normais que podem ser facilmente lesados (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Desta forma, nessa modalidade, fontes de emissores β^- ou γ encapsuladas são depositadas a poucos centímetros da massa tumoral (SBRT, 2006).

A radioterapia alvo ou terapia por radionuclídeos (TR) consiste em danificar ou destruir as células pela deposição seletiva de radiação ionizante, a partir de radionuclídeos ligados a biomoléculas específicas (radioimunoterápicos). Ao contrário da teleterapia, TR é semelhante à quimioterapia, pois é um tratamento sistêmico que utiliza uma molécula acoplada a um radionuclídeo para liberar níveis tóxicos de radiação para a área tumoral (COMMITTEE ON STATE OF THE SCIENCE OF NUCLEAR MEDICINE, 2007). A TR tem mostrado grandes vantagens em relação à radioterapia externa, principalmente em pacientes em que a ressecção cirúrgica não é possível ou em doenças multifocais como tumores neuroendócrinos, retroperitoneais e metástases ósseas disseminadas (NEVES et al., 2005). O impacto clínico da TR em tumores utilizando emissores de partículas β aumentou muito e, com isso cresceu também o interesse no desenvolvimento de métodos de tratamento para doenças malignas com prognóstico desfavorável (GRAF et al., 2014).

1.2.1. Radiações ionizantes

As radiações podem ser definidas como ondas eletromagnéticas ou partículas que se propagam com alta velocidade e carregando energia, eventualmente carga elétrica e magnética, e que, ao interagir com a matéria podem desencadear variados efeitos biológicos. Denominam-se ionizantes aquelas radiações que possuem energia suficiente para atravessar a matéria e remover elétrons, ionizando os átomos e moléculas. As radiações ionizantes podem ser particuladas (partículas alfa ou beta) e ondas eletromagnéticas (raios gama e raios X) (HALL & GIACCIA, 2006; NOUAILHETAS et al., 2014).

Além de suas propriedades terapêuticas, já citadas, as radiações ionizantes também são utilizadas em técnicas de diagnóstico por imagem, que dentre outras, destacam-se a tomografia por emissão de fóton único (SPECT) e tomografia por emissão de pósitrons (PET), que permitem a caracterização funcional e metabólica dos tecidos, complementando os dados anatômicos, capaz de auxiliar no diagnóstico de câncer e, principalmente, no acompanhamento do tratamento de pacientes com esta doença (OLIVEIRA et al., 2006).

As partículas *alfa* (α) são constituídas por dois prótons e dois nêutrons. Apresentam reduzido poder de penetração, devido ao alto peso e tamanho, sendo inofensivas às exposições externas, pois não conseguem atravessar as camadas epiteliais mais superficiais. A partícula *beta* (β) pode apresentar carga elétrica negativa (β^-), de um elétron comum, ou positiva (β^+) quando um núcleo emite elétrons positivamente carregados. Possuem baixo poder de penetração, porém superior ao da partícula alfa, podendo ser absorvidas por alguns centímetros de acrílico ou plástico. Em relação ao tecido humano, consegue atravessar alguns milímetros de espessura. Por fim, as radiações eletromagnéticas X e gama (γ) apresentam alto poder de penetração e, dependendo de sua energia se tornam capazes de atravessar vários centímetros do tecido humano até alguns metros de blindagem de concreto. Por isso, geralmente são utilizadas blindagem de chumbo (Figura 1) (OKUNO, 2013; NOUAILHETAS et al., 2014).

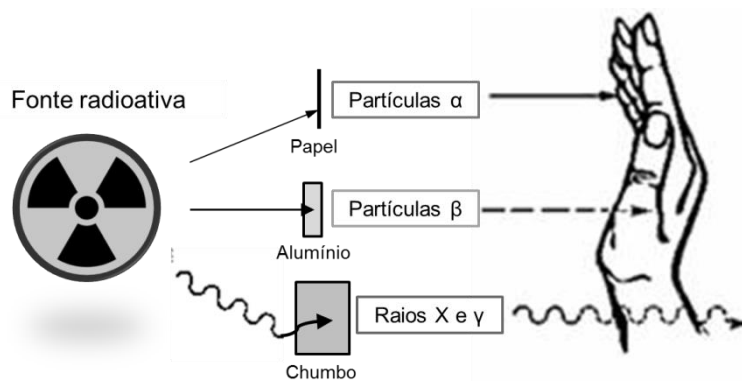


Figura 1: Esquema ilustrativo da capacidade de penetração e atenuação das radiações ionizantes (Adaptado de NDHEALTH, 2014).

As radiações ionizantes interagem com a matéria por meio da transferência linear da sua energia (LET) para o meio irradiado, promovendo a ionização ou excitação do meio. Essa transferência linear é uma das responsáveis pelos danos biológicos causados. As partículas *alfa* transferem alta quantidade de energia e, por isso, são classificadas como radiações de alto LET. As partículas *beta* e radiações eletromagnéticas transferem baixa quantidade de energia sendo classificadas como radiações de baixo LET (HUNTER & MUIRHEAD, 2009). Os efeitos biológicos causados no organismo estão relacionados com a propriedade de provocar ionização da matéria com a qual interage, isto é, devido à produção de íons e, disposição da energia, podendo danificar diretamente moléculas importantes como o DNA. Indiretamente, pode ocorrer também a produção de radicais livres, moléculas quimicamente reativas que apresentam elétrons desemparelhados, decorrentes da interação da radiação com os tecidos e da radiólise das moléculas de água presentes no organismo, que induz a quebras cromossômicas e aberrações de diversos tipos (OKUNO, 2013; NOUAILHETAS et al., 2014).

Os efeitos biológicos produzidos dependem da dose de radiação, e podem ser classificados em determinísticos ou estocásticos. Os efeitos determinísticos são aqueles que exigem um limiar de dose para sua ocorrência, ou seja, em pequenas doses de radiação a probabilidade de causar danos é mínima, porém, acima da dose limiar a probabilidade e a gravidade dos danos aumentam. Citando como exemplo, queimaduras e catarata induzida por radiação. Por outro lado, os efeitos estocásticos se referem a alterações que independem da dose limiar para ocorrer, assim como a gravidade delas, mas a probabilidade de sua ocorrência aumenta com a dose. Deste modo, as alterações

causadas em células normais, por exemplo, podem originar o câncer (efeito somático) e alterações em células sexuais que podem transmitir informações hereditárias incorretas aos seus descendentes (efeitos hereditários) (OKUNO, 2013).

Muitos isótopos radioativos são produzidos artificialmente por meio de reações de ativação neutrônica, através do reator nuclear. Os elementos naturais são colocados junto ao núcleo do reator e irradiados por nêutrons térmicos e, com isso o equilíbrio energético do núcleo do átomo excitado é obtido pela liberação de energia, ou seja, emitindo radiação. Este fenômeno denomina-se radioatividade, e a atividade de uma amostra com isótopos radioativos é expressa em *Becquerel* (Bq), unidade padrão e que, equivale a um átomo se desintegrando por segundo ($1 \text{ Bq} = 1 \text{ dps}$). Outra unidade de medida também conhecida é o *Curie* (Ci), sendo que uma unidade de Ci equivale a $3,7 \times 10^{10} \text{ Bq}$. O tempo de meia-vida ($T_{1/2}$) pode ser definido como o tempo necessário para que metade dos átomos de um elemento se desintegre, tornando-os estáveis (OLIVEIRA et al., 2006; NOUAILHETAS et al., 2014). A unidade utilizada para a dose absorvida é o Gray (Gy). A dose média de radiação, provenientes do ambiente, absorvida naturalmente pela população mundial é de $2,6 \text{ Gy} \times 10^{-3} \times \text{ano}^{-1}$, isto é, 2,6 mGy por ano (NOUAILHETAS et al., 2014).

1.3. Características e formação das células tumorais

Todas as células normais passam por etapas de multiplicação, crescimento, diferenciação e morte, as quais são influenciadas pelo controle genético e um complexo sistema de sinais bioquímicos. Os genes envolvidos no câncer podem ser incluídos em duas categorias distintas: os oncogenes e os genes supressores tumorais. Os oncogenes são genes mutantes de uma classe de genes celulares normais conhecidos como proto-oncogenes. Quando ativados, os oncogenes facilitam a transformação maligna por mecanismos que induzem a proliferação, o aumento de suprimento de sangue para o tumor e a inibição de apoptose. Os genes supressores tumorais, como sugere o nome, bloqueiam o desenvolvimento de um tumor, regulando o crescimento celular. Mutações nestes genes podem levar a perda de função de suas proteínas codificadas, levando também a uma divisão celular descontrolada e a um crescimento celular anormal (MCINNES et al., 2001; INCA, 2014).

O processo de formação do câncer denominado carcinogênese ou oncogênese, geralmente ocorre lentamente podendo levar alguns anos desde a proliferação da célula

cancerosa até o desenvolvimento do tumor visível. Este processo consiste em três etapas diferentes. O estágio de iniciação, na qual as células estão expostas aos agentes cancerígenos e, portanto, sofrendo modificações em seus genes. Em seguida, passam pelo estágio de promoção em que os oncopromotores (agentes cancerígenos) atuam nas células já alteradas. Destacando que, a suspensão do contato com os oncopromotores pode interromper o processo nesta fase. Por fim, no estágio de progressão, as células alteradas se multiplicam descontroladamente de forma irreversível (INCA, 2014).

Em consequência, as células tumorais adquirem diferentes mecanismos que lhe proporcionam a proliferação ilimitada e possibilitam a infiltração tecidual favorecendo a disseminação metastática (Figura 2).

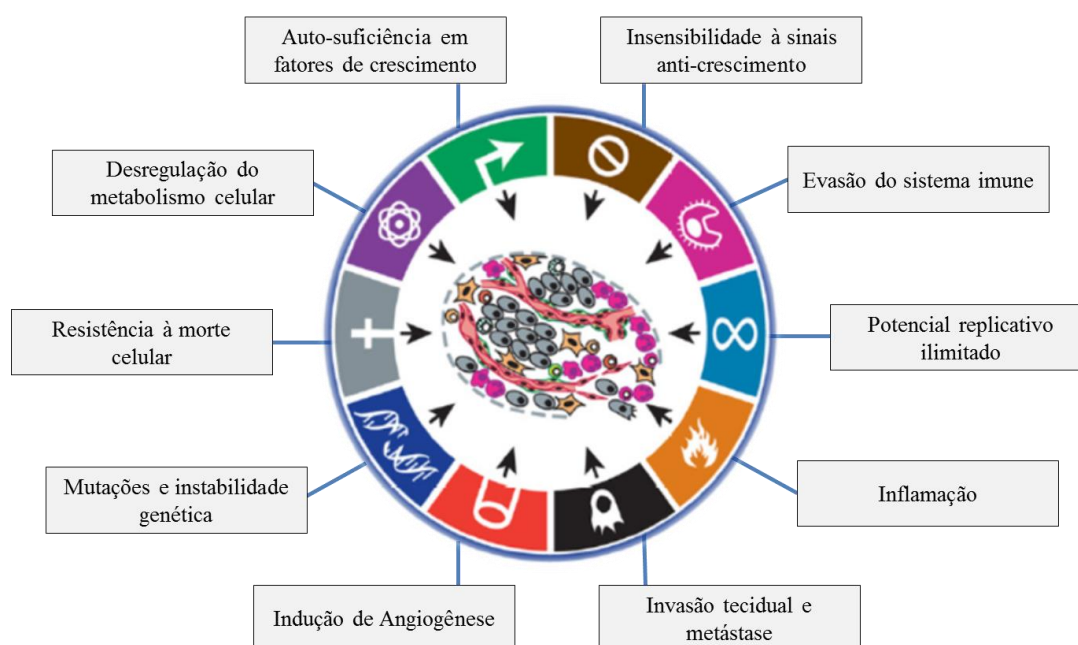


Figura 2: Mecanismos de proliferação e propriedades das células tumorais envolvidos no processo de desenvolvimento do câncer (Adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011).

1.3.1. Ciclo celular e câncer

Resumidamente, o crescimento e a proliferação de células normais são controlados cuidadosamente através do ciclo celular, que por sua vez são regulados por sinais extracelulares, como fatores de crescimento e disponibilidade de nutrientes. As ciclinas e proteínas quinases dependentes de ciclina, conhecidas como CDKs também são responsáveis pela regulação do ciclo celular. Para garantir que as fases do ciclo

celular ocorram sempre na mesma ordem e seguindo uma sequência, o controle do ciclo celular ocorre por meio de pontos de checagem (“freios moleculares”), que são pontos específicos do ciclo que agem de modo a permitir a próxima fase somente após o término do estágio anterior (PERES & CURI, 2005). Anormalidades nos oncogenes (que estimulam a divisão celular) ou nos genes supressores tumorais (protetores ou bloqueadores do ciclo celular), levam as células a adquirirem características peculiares de desenvolvimento e proliferação, em relação às células normais. Mutações nestes genes acarretam a perda dos mecanismos controladores do ciclo celular. Desta forma, as células tumorais apresentam desregulação do controle do ciclo celular (WARD, 2002; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Dentre outros fatores, a compreensão do ciclo celular é essencial para o uso de muitos agentes antitumorais e também para a descoberta de novos fármacos, pois grande parte dos potenciais agentes citotóxicos pode atuar em fases específicas do ciclo celular (LOPEZ-MEJIA & FAJAS, 2014).

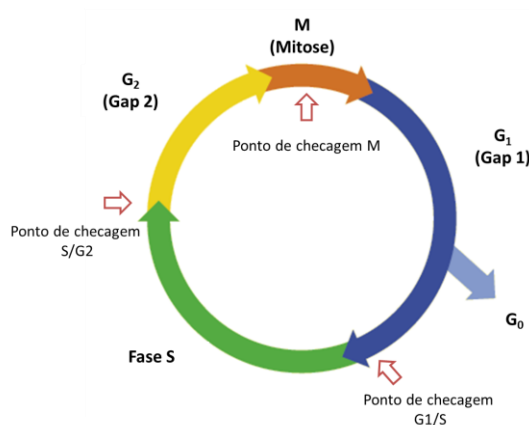


Figura 3: Representação esquemática das etapas, intérfase e mitose, do ciclo celular incluindo suas fases G1, S, G2 e os pontos de checagem de erros (FALK, 2006).

O ciclo celular é basicamente dividido em duas etapas principais: a mitose ou fase M, que consiste no estágio em que ocorre a divisão celular, e a intérfase que compreende o período entre uma mitose e a próxima mitose. A intérfase é dividida em três fases: 1) fase G1 (*Gap 1*), posterior à fase M e é onde ocorre a preparação das células para sintetizar o DNA. 2) Fase S, em que a célula realiza a replicação do seu DNA. Nesta etapa, acontece a duplicação do DNA do conteúdo celular e replicação dos cromossomos. Por fim, 3) fase G2 (*Gap 2*), caracterizada pelo crescimento celular e

pela síntese de proteínas em preparação para a mitose (PERES & CURI, 2005) (Figura 3).

Casualmente, as células podem permanecer em um estado não-proliferante, em que ao sair da fase G1 entram em estado de dormência, também conhecido como fase G0 ou quiescência, em relação ao crescimento (Figura 3). Neste período, as células mantêm baixo metabolismo e não respondem a fatores de crescimento (PERES & CURI, 2005).

Além dos tradicionais reguladores do ciclo celular, já citados, há também alguns fatores de transcrição que exercem papel fundamental na proliferação e parada do ciclo celular como o gene TP53, supressor tumoral localizado no cromossomo 17p13. Este gene é responsável por codificar a proteína p53, que atua não somente na regulação de apoptose (tipo de morte celular programada), mas também como um regulador direto da integridade e replicação do DNA mitocondrial, e de autofagia (LOPEZ-MEJIA & FAJAS, 2014). O gene TP53 é ativado em resposta a sinais de dano celular e é capaz de interagir com outros genes na tentativa de reparo do DNA danificado. Como alternativa, nos casos em que os danos não podem ser reparados, a proteína p53 atua na indução de apoptose. Em adição, p53 também promove pontos de checagem da fase S para G2, da intérfase (CONTE-FETE & SALLES, 2002). Desta maneira, a proteína p53 age inibindo a formação de células malignas e, por isso, ela se tornou conhecida como “guardiã do genoma”. Isto reflete o fato de que mais de 70% dos cânceres apresentam mutações nestes genes, e praticamente todos têm defeitos em genes que estão diretamente ligados à p53 (BERTRAM, 2001).

Assim, quando há mutações em TP53, as células com danos no DNA não são reparadas adequadamente e conseguem escapar à destruição, podendo dar início a transformação maligna (CONTE-FETE & SALLES, 2002). Curiosamente, proteínas p53 mutantes apresentam como características meia-vida prolongada, em relação à proteína p53 normal (nativa), e também são incapazes de reconhecer sítios de ligação específicos da proteína p53 presentes no DNA (Figura 4) (STRANO et al., 2007). A expressão de proteína p53 mutante ou não funcional acarreta, frequentemente, a inativação da via p53 no câncer, e desta forma pode estar diretamente associada à falha na indução de apoptose após o dano celular (VOUSDEN et al., 2009; ANDREOTTI et al., 2011), sendo, consequentemente, capaz de influenciar também na resposta ao

tratamento quimioterápico, pois as células tumorais se tornam quimioresistentes (STRANO et al., 2007). Porém, muitos estudos têm buscado alcançar algumas formas de contornar a resistência de células tumorais a apoptose, a fim de se obter maior eficácia no tratamento do câncer (de BRUIN & MEDEMA, 2008).

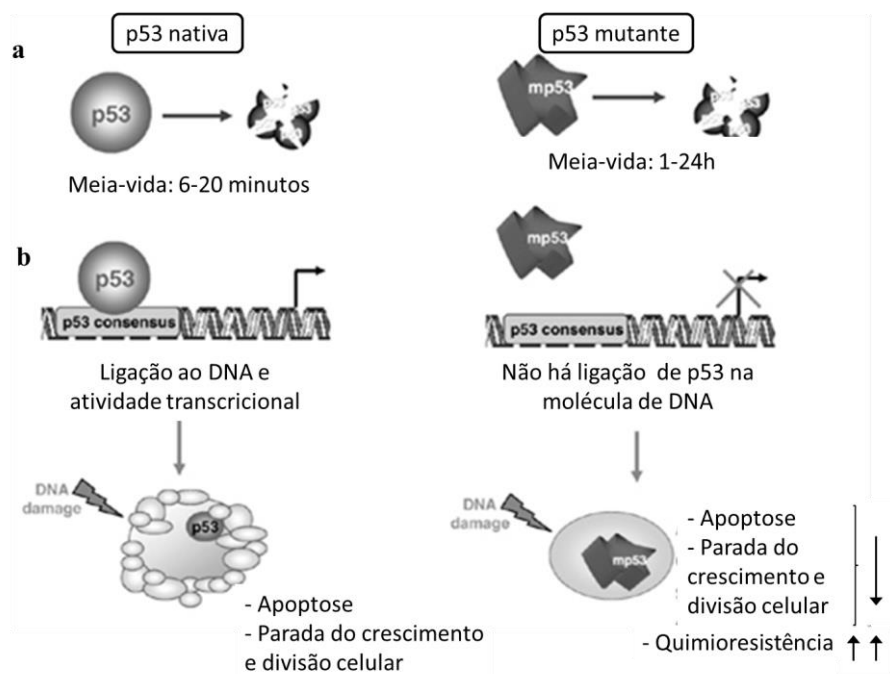


Figura 4: Características e propriedades das proteínas p53 nativa e p53 mutante destacando suas diferenças: (a) duração da meia-vida; (b) capacidade de reconhecimento e ligação a uma sequência específica na molécula de DNA. (c) efeitos observados na atividade das proteínas após danos induzidos no DNA (Adaptado de STRANO et al., 2007).

1.4. Tipos de morte celular

Os vários tipos de morte celular são classificados de acordo com as alterações morfológicas das células, critérios enzimáticos (podendo ter ou não o envolvimento de nucleases ou de diferentes classes de proteases), aspectos funcionais (programada ou acidental, fisiológica ou patológica) ou características imunológicas. De acordo com estes critérios, de uma forma geral, os tipos de morte celular podem ser típicos, como a apoptose (tipo I), autofagia (tipo II), necrose (tipo III) e cornificação (tipo IV) e, existem as mortes atípicas como a catástrofe mitótica, anóiquis, entose, piroptose, paraptose e pironecrose, dentre outras, citadas como novas modalidades de morte celular (KROEMER et al., 2009).

Basicamente, os principais tipos de morte celular: apoptose, autofagia e necrose. A apoptose, tipo clássico de morte celular programada, é uma resposta normal do processo fisiológico das células e atua como um importante mecanismo de defesa que promove seletivamente a remoção de células danificadas, que são indesejáveis ao organismo. Ocorre mediante a ativação de um programa bioquímico controlado, de desmontagem dos componentes celulares, que requer energia e não envolve inflamação (PERES & CURI, 2005; WANG et al., 2014).

No processo apoptótico, as células apresentam alterações morfológicas específicas como a condensação da cromatina, aparecimento de pequenos fragmentos nucleares, encolhimento celular, formação de protuberâncias na membrana plasmática (*blebs*) e de corpos apoptóticos (LOCKSHIN & ZAKERI, 2004; WANG et al., 2014). Os corpos apoptóticos que surgem durante a apoptose são fagocitados por macrófagos, devido à externalização na superfície da membrana da fosfatidilserina. A indução de apoptose é o principal mecanismo da maioria de agentes quimio e radioterápicos. Isto porque, grande parte dos cânceres apresentam mutações no gene TP53/proteína p53 e, consequentemente, resistência à apoptose (LOCKSHIN & ZAKERI, 2004; ZHAO et al., 2012).

Duas vias básicas podem desencadear a apoptose e, são conhecidas como via intrínseca ou mitocondrial e via extrínseca ou de receptores de morte (Figura 5). A família das proteínas Bcl-2 é um dos mais importantes reguladores da via intrínseca, dentre as quais existem as proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bid) e proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-x). As proteínas antiapoptóticas atuam como repressoras da apoptose, bloqueando a liberação do *citocromo c*, e as proteínas pró-apoptóticas atuam estimulando a apoptose. A ativação pela via intrínseca ocorre por meio de sinais de estresse celular, tais como estresse oxidativo, danos ao DNA e retirada do fator de crescimento, que atuam estimulando a ligação de proteínas pró-apoptóticas (como Bax, Bak e Bid) à superfície da mitocôndria, onde se encontram as proteínas anti-apoptóticas (como Bcl-2). Após a ligação, as proteínas pró-apoptóticas atuam inativando as proteínas anti-apoptóticas, processo que dispara a abertura de poros na mitocôndria que, consequentemente, libera *citocromo c* para o citoplasma, onde se liga a ATP, ao fator de ativação de apoptose (Apaf-1) e à pró-caspase-9 formando um complexo denominado apoptossoma. Este complexo cliva uma série de caspases subsequentes, que induzem a apoptose (GALLUZZI et al., 2012).

A via extrínseca ocorre por meio da associação de ligantes de morte, como o TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa), receptor Fas (Ligante de Receptor de Morte Celular) e TRAIL (Ligante Indutor de Apoptose relacionado ao Fator de Necrose Tumoral), com um grupo de receptores de morte presentes na superfície celular, pertencentes à família dos TNF, responsáveis por receberem os sinais de dano celular (Figura 5). Estes receptores interagem entre si e formam agregados na forma de trímeros. Após, se ligam à pró-caspases 8, formando um complexo conhecido como DISC (Complexo Sinalizador Indutor de Morte), resultando na ativação da caspase 8. Esta por sua vez, é capaz de ativar as caspases efetoras, diretamente ou através da via mitocondrial, induzindo, por fim, a apoptose.

As caspases (*Cysteine Aspartate Proteases*) consistem em uma família de proteases que possuem cisteína em seus sítios ativos e têm a capacidade de clivar resíduos de ácido aspártico de proteínas específicas. Possuem papel fundamental no processo de apoptose, pois, podem ser ativadas por sinais intrínsecos ou extrínsecos e, portanto, são alvos para o desenvolvimento de novos fármacos, podendo inibir ou induzir a apoptose (JOHNSTONE et al., 2002; ALLAN et al., 2009; GALLUZZI et al., 2012).

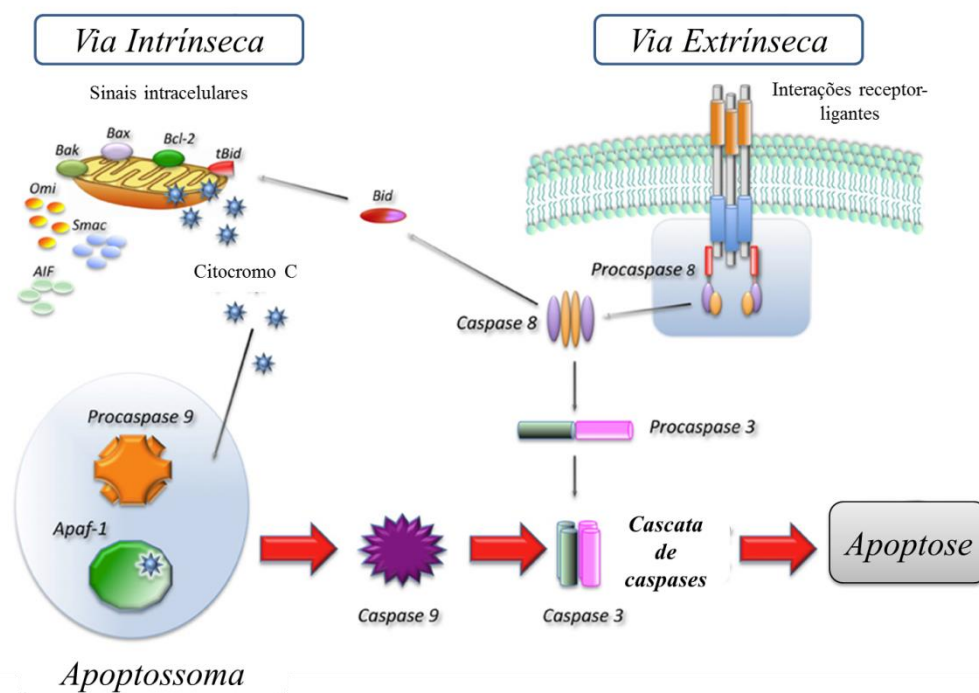


Figura 5: Representação esquemática das vias moleculares, intrínseca e extrínseca, de ativação de apoptose. Ambas as vias envolvem a atividade de caspases elicítadas

respectivamente por sinais intracelulares ou por interações entre receptores e ligantes de morte externos. (Adaptado de FAVALORO et al., 2012).

A autofagia, inicialmente, consiste num mecanismo de sobrevivência celular ativado em condições de privação de nutrientes, porém com a continuidade do estresse celular este processo pode desencadear a morte celular (KRYSKO et al., 2008). A morte celular autofágica ou do tipo II consiste no processo em que proteínas e organelas celulares são degradadas por proteinases lisossomais, no interior de vesículas fundidas aos lisossomos denominados autofagolisossomos (LOCKSHIN & ZAKERI, 2004; WANG et al., 2014). Este processo é independente à ativação de caspases, e requer a participação de genes e proteínas específicas, tais como: os genes relacionados à autofagia (ATG), a proteína Beclina-1 e fosfatidilinositol 3- cinase de classe III (PI3KC3), que atuam recrutando a proteína LC3, fundamental para a formação de autofagossomos, estruturas que se fundem com os lisossomos para então formar os autofagolisossomos (Figura 6). Assim como em apoptose, o efeito do estresse gerado pela radiação ionizante, por espécies reativas de oxigênio e quimioterápicos é capaz de induzir a autofagia, envolvendo uma resposta mediada pela proteína p53 (LOCKSHIN & ZAKERI, 2004; de BRUIN & MEDEMA, 2008; KRYSKO et al., 2008; WANG et al., 2011; POILLET-PEREZ, 2015).

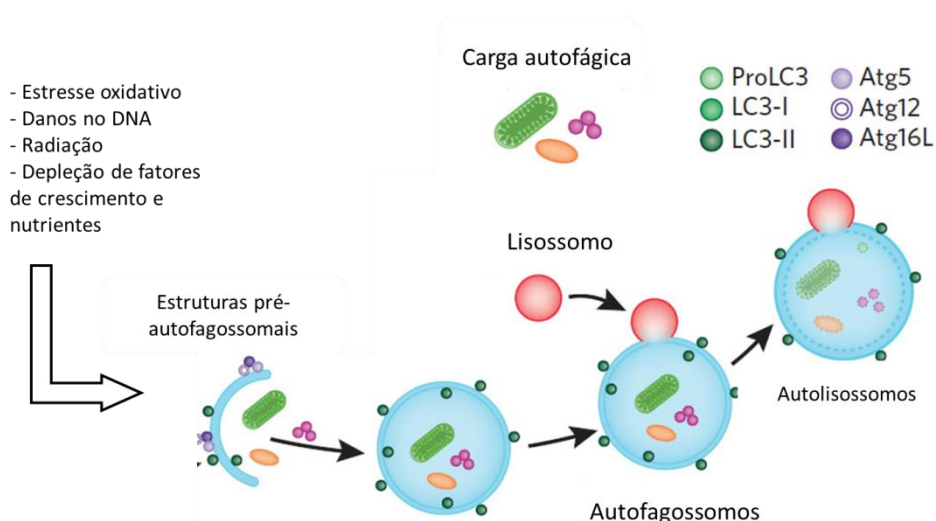


Figura 6: Esquema ilustrativo do processo celular de autofagia. A indução da autofagia ocorre em resposta a vários estímulos celulares. Neste processo, há o sequestro de proteínas e organelas citosólicas em estruturas denominadas autofagossomos. O autofagossomo funde-se com o lisossomo, originando o autolisossomo, estrutura onde

os componentes citosólicos são degradados pela ação de hidrolases lisossomais (Modificado FLEMING et al., 2011).

Por fim, a necrose ou morte celular do tipo III ocorre em virtude de uma resposta a danos severos sofridos pelas células, sendo um processo irreversível que envolve resposta inflamatória. Células necróticas apresentam alterações características, tais como, perda de integridade da membrana, inchaço citoplasmático, ruptura da membrana com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração das organelas. A deficiência de nutrientes e oxigênio ocasiona a autodestruição celular por ativação de hidrolases, resultando na desorganização progressiva e desintegração completa da região acometida (PERES & CURI, 2005; WANG et al., 2014).

A Figura 7 mostra um esquema ilustrativo com as alterações morfológicas características dos principais tipos de morte celular citados.

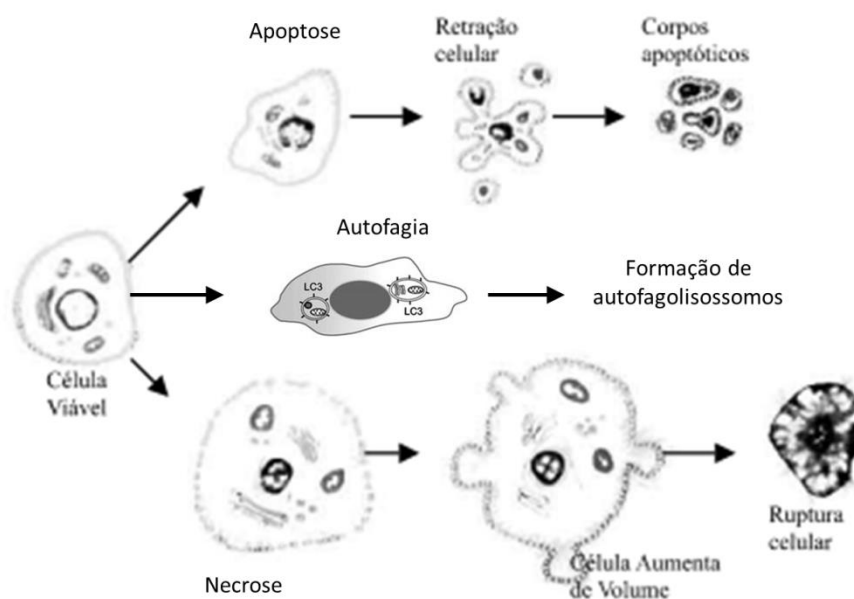


Figura 7: Características morfológicas de apoptose, autofagia e necrose. Em apoptose observa-se formação de corpos apoptóticos caracterizados por condensação de cromatina, envolvidos por membranas. No processo de autofagia, ocorre o envolvimento de proteínas associadas a organelas citosólicas e formação de uma estrutura denominada autofagossomos. Em necrose, ocorre aumento do volume células culminando em sua ruptura e extravasamento do conteúdo citoplasmático podendo levar a um processo inflamatório (Adaptado de GRIVICICH et al., 2007; de BRUIN & MEDEMA, 2008).

As terapias por radiação, assim como outros tratamentos antitumorais, têm como principal alvo biológico, a molécula de DNA, e podem interagir diretamente com o DNA e gerar os danos celulares. E também, interage de forma indireta através dos danos causados à molécula de DNA, por meio da geração de radicais livres provenientes da ionização ou excitação dos componentes de moléculas de água, presente nas células (BASKAR et al.; 2012). Assim, a radioterapia pode levar à morte celular por vários mecanismos, porém, a elucidação da resposta celular à irradiação ainda é complexa.

1.5. Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS)

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a geração de oxidantes e os mecanismos de defesa antioxidantes, que pode levar a uma desordem da sinalização e do controle redox podendo resultar em danos moleculares. A oxidação exerce um importante papel no metabolismo humano e, com isso, as espécies reativas de oxigênio são produzidas naturalmente no organismo ou devido a alguma disfunção biológica (BARREIROS et al., 2006; FILIPPIN et al., 2008).

As espécies reativas de oxigênio podem ser definidas como moléculas que contêm oxigênio com um elétron não-pareado em sua órbita externa e são produzidas, *in vivo*, através de reações de oxido-redução (OZBEN, 2007; REIS et al., 2008; DEWAELE et al., 2010). Em células saudáveis, ROS são produzidas essencialmente na mitocôndria por meio da cadeia transportadora de elétrons e estão relacionadas à produção de energia (ATP), fagocitose, controle do desenvolvimento celular e síntese de substâncias biológicas. Contudo, a produção de ROS em excesso é capaz de gerar danos na membrana celular, lipídeos, enzimas, proteínas e DNA (BARREIROS et al., 2006; POILLET-PEREZ et al., 2015). Dessa forma, o estresse oxidativo pode estar relacionado com a patogênese do câncer e de várias outras doenças (BARREIROS et al., 2006).

As principais ROS se distribuem em dois grupos, os radicais livres como hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e, peroxila ($\text{ROO}^\bullet$) e no grupo dos não-radicaais estão o oxigênio e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O superóxido, formado a partir da redução do oxigênio molecular, é espontaneamente convertido em peróxido de hidrogênio e pode ser catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD). O peróxido de hidrogênio e o superóxido, na presença de íons ferro e cobre ou outros metais de transição são convertidos a radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), molécula mais deletéria ao

organismo, por meio das reações de Fenton/Haber-Weiss (OZBEN, 2007; BARBOSA et al., 2010), que também podem ser formadas através da hidrólise da água por exposição a radiação ionizante (POLI et al., 2004; BARREIROS et al., 2006).

O radical $\text{OH}^\bullet$ parece ser a principal responsável pela toxicidade celular associada às ROS e, quando formado reage rapidamente com moléculas mais próximas, podendo provocar alterações em qualquer estrutura celular (BARBOSA et al., 2010). Estudos apontam que altos níveis de superóxido e radical hidroxila danificam a molécula de DNA mitocondrial, culminado em apoptose celular. O mecanismo pelo qual estes danos levam à via apoptótica ainda não é totalmente compreendido, porém, sugere-se que este processo ocorra através da peroxidação lipídica (OZBEN, 2007; CIRCU & AW, 2010). Outros estudos indicam que ROS estimulam a autofagia, em resposta às lesões, nas células tumorais, desempenhando um importante papel no controle do equilíbrio redox (DEWAELE et al., 2010; POILLET-PEREZ et al., 2015).

O entendimento destes mecanismos tem possibilitado o desenvolvimento de novos agentes quimio e radioterápicos com propriedades capazes de modificar o equilíbrio redox, durante o tratamento do câncer. Estes agentes têm a função de induzir a geração de ROS e promover o estresse oxidativo, para levar à morte programada das células tumorais (OZBEN, 2007; STOJNEV et al., 2013).

1.6. A busca por novas terapias

1.6.1. Complexos metálicos como quimioterápicos

A principal limitação para o sucesso do tratamento para a cura do câncer em estágio avançado é a resistência à terapia. Acredita-se que a ampla ocorrência de resistência a drogas, por um lado, acontece devido à instabilidade genética de células tumorais, permitindo uma rápida adaptação aos danos quimioterápicos. Por outro lado, a resistência pode ser considerada como uma característica herdada de seus respectivos tecidos normais (HEFFETER et al., 2008).

Os mecanismos de resistência às drogas anticancerígenas podem ser divididos basicamente em dois tipos. Primeiramente, as drogas não podem alcançar os seus principais alvos intracelulares devido à vascularização inadequada ou deficiente. Em segundo lugar, as células tumorais podem sobreviver à quimioterapia, apesar de serem alvos principais, devido a um sistema de reparação avançado de danos ou inativação dos

mecanismos de morte celular programada. Portanto, várias alterações genéticas e epigenéticas que envolvem amplificação gênica, mutação, ativação da transcrição e/ou repressão gênica podem contribuir para a resistência às drogas anticancerígenas (HEFFETER et al., 2008). Este quadro corrobora o fato de que tumores sólidos metastáticos representam um desafio para a ciência e constituem uma barreira para a busca de terapias eficientes para este tipo de câncer. No caso de GBM a terapia por drogas parece ser a melhor opção, pois a cirurgia e/ou radioterapia tem se mostrado pouco eficientes (KOSTOVA, 2006).

Durante as últimas décadas, vários complexos metálicos têm sido testados em terapia anticâncer, pois atuam aumentando a atividade terapêutica e/ou reduzindo os efeitos colaterais (ORVIG & ABRAMS, 1999; SILVA, 2010). Assim, como as drogas que não são à base de metais, devem preencher os dois principais critérios – efeito benéfico do medicamento e o mínimo de efeitos colaterais tóxicos (SILVA, 2010).

Sabe-se que os centros metálicos são excelentes ligantes para íons metálicos, carregados positivamente e favorecem a ligação de biomoléculas carregadas negativamente: constituintes de proteínas e ácidos nucleicos. Esta propriedade indica que os metais possuem grande potencial para o uso farmacêutico (ZHANG & LIPPARD, 2003).

As vantagens dos compostos à base de metais de transição em relação aos produtos farmacêuticos comuns são, dentre outras: diversidade estrutural, variação na coordenação e geometria, e estados de oxidação acessíveis (SILVA, 2010). Por outro lado, deve-se ter cuidado com a acumulação de íons metálicos no organismo, pois em grande quantidade podem produzir efeitos deletérios.

Em 1969, Rosenberg descobriu a atividade farmacológica da platina, o primeiro antitumoral puramente inorgânico, usado na prática clínica (HEFFETER, 2005). Três agentes anticancerígenos baseados em platina são clinicamente utilizados: cisplatina, carboplatina e oxaliplatina (ANTONARAKIS & EMADI, 2010). A cisplatina é altamente eficaz no tratamento de diversos tipos de câncer, tais como cânceres de ovários e próstata, e apesar de seu mecanismo de ação não ser totalmente elucidado, sabe-se que estes compostos agem se ligando a moléculas de DNA, por ligação covalente, através de aductos, dando origem a ligações intra e interfitas, responsáveis por alterações estruturais no DNA. Essas alterações interferem em processos de

replicação e transcrição do DNA, provocando a morte celular (FONTES et al., 2005). No entanto, drogas a base de platina juntamente com outros tipos de drogas anticancerígenas apresentam duas grandes limitações: (a) toxicidade grave, principalmente nefrotoxicidade e neurotoxicidade (MENG et al, 2009), além de sintomas gastrointestinais como náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais e (b) aplicabilidade limitada a uma estreita gama de tumores, pois vários deles apresentam resistência natural ou induzida (MENG et al., 2009; ANTONARAKIS & EMADI, 2010).

O sucesso de platina como agente anticancerígeno tem estimulado, nos últimos anos, a busca por outros compostos metálicos citotóxicos que apresentem atividade antitumoral maior ou equivalente e com menor toxicidade (ANTONARAKIS & EMADI, 2010). Os complexos de Rutênio parecem ser os compostos metálicos mais promissores, pois apresentam atividade antimetastática seletiva e baixa citotoxicidade quando comparados com a cisplatina. Nas últimas décadas, um grande número de agentes contendo rutênio têm sido sintetizados e testados para a potencial atividade antitumoral (KOSTOVA, 2006).

1.7. Complexos de Rutênio como agentes quimioterápicos

1.7.1. Propriedades do Rutênio

O Rutênio é um metal de transição do grupo da platina (grupo 8B da tabela periódica), e foi visto como primeira opção para exercer seus efeitos antitumorais, devido sua interação com o DNA, através da formação de aductos e, consequentemente, induzindo a morte celular, como observado com a platina (ANTONARAKIS & EMADI, 2010). Além da interação com a molécula de DNA, estudos mostram que alguns complexos de rutênio também são capazes inibir a atividade de topoisomerasas, enzimas nucleares essenciais para processos de replicação e transcrição (HE et al., 2013; ZHANG et al., 2015). Apesar das propriedades semelhantes, este metal pode diferir significativamente da platina e dos outros metais deste grupo (ródio, paládio, irídio e ósmio), por ser o único a apresentar uma grande variação nos estados de oxidação (KOSTOVA, 2006; SILVA, 2010).

O Rutênio possui três propriedades que contribuem para a sua potencialidade como candidato a aplicação na medicina, tais como: (I) cinética da troca de ligantes: (II)

vários estados de oxidação acessíveis e (III) capacidade para mimetizar o ferro na ligação com várias moléculas biológicas (ANTONARAKIS & EMADI, 2010).

Com relação à capacidade de troca de ligantes, os complexos de Ru(II) e Ru(III) apresentam cinética semelhante aos de platina – Pt(II), um importante fator para as drogas atingirem o alvo biológico a serem modificados. Além disso, sua geometria octaédrica oferece possibilidades únicas para se ligarem aos ácidos nucleicos (ALLARDYCE & DYSON, 2001; BERGAMO et al., 2012), afetando sua conformação de maneira diferente da ação da cisplatina e seus análogos (BRABEC & NANOVA, 2006). Por outro lado, o potencial redox entre os diferentes estados de oxidação acessíveis dos complexos de rutênio permite que o organismo estimule reações de oxidação e redução, dependendo do ambiente fisiológico (ALLARDYCE & DYSON, 2001; SILVA, 2010).

Alterações do metabolismo, próprias de áreas tumorais, tais como baixa concentração de oxigênio, altos níveis de glutatona e pH diminuído criam um ambiente fortemente redutor permitindo os complexos de rutênio serem ativados seletivamente nos tecidos tumorais. O rutênio permanece em seu estado de oxidação, Ru(III), relativamente inativo, até atingir o local do tumor. Neste ambiente, ocorre a redução para o Ru(II), estado mais reativo. Esta reação, denominada ativação por redução, oferece maior seletividade para o tumor alvo e, também pode direcionar atividade citotóxica para tumores hipóxicos, que provavelmente são mais resistentes à quimioterapia e radiação (ANTONARAKIS & EMADI, 2010).

Já sobre a semelhança com o ferro, o rutênio pode mimetizar este metal na ligação com proteínas séricas e albumina (ANTONARAKIS & EMADI, 2010) e, por este mecanismo, pode entrar nas células e induzir a morte celular (CASTONGUAY et al., 2012). Acredita-se que, a baixa toxicidade das drogas de rutênio se dá devido à capacidade que este elemento tem de imitar o ferro na ligação com várias moléculas biológicas. Uma vez que as células tumorais se dividem rapidamente, considera-se que elas necessitam de um maior requerimento de ferro, aumentando assim o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, o número de receptores para transferrina, que se localizam nas suas superfícies celulares (Figura 8). Desta forma, em tecidos normais, a concentração da droga será menor e sua toxicidade reduzida (ALLARDYCE & DYSON, 2001).

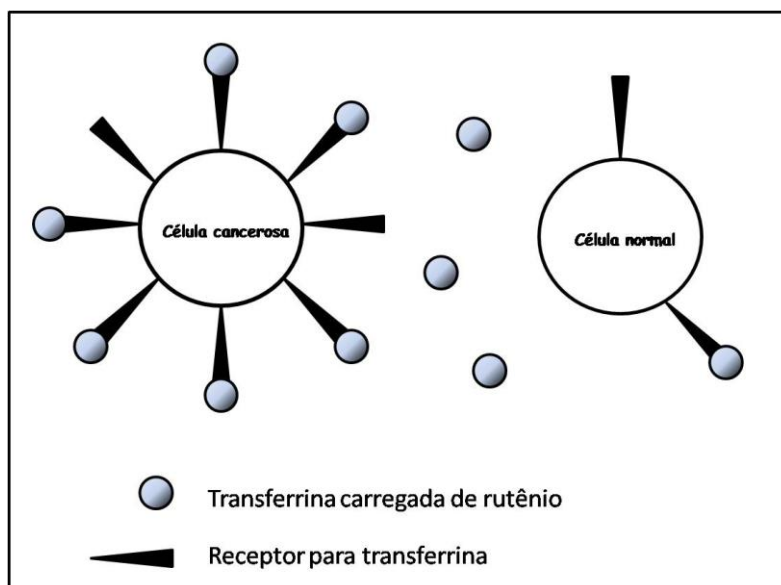


Figura 8: Esquema representando a seletividade da absorção de transferrina por células cancerosas devido a um aumento no número de receptores. Rutênio mimetizando o ferro na ligação à transferrina seria absorvido em maior quantidade pelas células cancerosas do que por uma célula normal. A transferrina carregada de metal é distribuída, conforme o número de receptores nas superfícies celulares (Adaptado de ALLARDYCE & DYSON, 2001).

Todos estes dados indicam que, algumas propriedades químicas dos complexos de rutênio os tornam adequados para a aplicação terapêutica e, como uma alternativa no tratamento dos tipos de câncer resistentes à cisplatina.

1.7.2. Atividade Antitumoral de complexos de Rutênio

Através de estudos já desenvolvidos com vários tipos de complexos de Rutênio (II) e (III) com diferentes ligantes (arene, polipiridil, nitrosil, dentre outros), foram observadas algumas vantagens destes compostos em relação às drogas derivadas da platina (cisplatina carboplatina e oxaliplatina), pois: foram ativos contra linhagens celulares que se mostraram resistentes à cisplatina, e por causarem baixa ocorrência de efeitos colaterais, devido sua maior seletividade para células tumorais (AIRD et al., 2002; CHEN et al., 2010; HEINRICH et al., 2011; CASTONGUAY et al., 2012;). Assim como a cisplatina, os complexos de rutênio interagem com DNA, mas como esperado, interagem de forma diferente. Curiosamente, alguns compostos se ligam fortemente, levando a um produto adicional que é resistente aos mecanismos de reparação celular (CASTONGUAY et al., 2012).

Além da considerável atividade antitumoral, os compostos de rutênio mostraram grande potencial para diversas outras aplicações clínicas como, por exemplo, supressor imunológico, fotossensibilizador, atividade antimicrobiana e antimalárica (SILVA, 2010).

Um dos primeiros compostos de rutênio descritos por apresentar atividade antitumoral foi o vermelho de rutênio, que além de demonstrar capacidade de inibir crescimento tumoral, exibiu atividade imunossupressora (MENG et al, 2009; SILVA, 2010). Desde então, muitos pesquisadores têm buscado e mostrado o potencial anticancerígeno das drogas contendo rutênio.

Os primeiros resultados das pesquisas, sobre a potencial atividade antitumoral, foram dois compostos de rutênio (III), conhecidos como KP1019 {trans-[tetraclorobisindazolrutênio(III)]} e NAMI-A {(IMH)trans-[Ru(Im)(Me₂SO)Cl₄] } (MENG et al., 2009; SILVA, 2010; KALUDEROVIC & PASCHKE, 2011), já entraram na fase II dos ensaios clínicos, sendo testados em pacientes com câncer (CASTONGUAY et al., 2012). Apesar da semelhança estrutural e química (Figura 9), estes dois complexos apresentam diferentes atividades antitumorais (SILVA, 2010; MENG et al., 2009). O composto KP1019 foi desenvolvido para tumores sólidos, enquanto NAMI-A tem sido preparado como drogas antimetastática (CASTONGUAY et al., 2012).

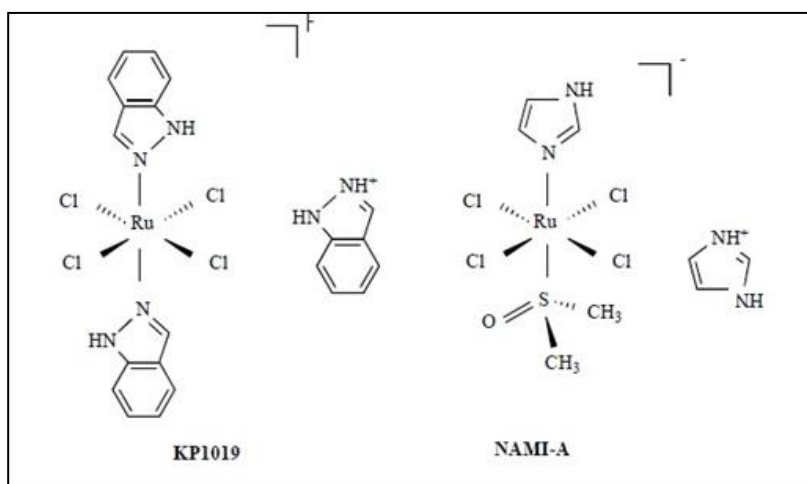


Figura 9: Esquema molecular da estrutura dos compostos KP1019 e NAMI-A (Fonte: Silva, 2010).

1.7.3. Novas estratégias de uso de compostos de Rutênio

Os radiofármacos são muito utilizados em diagnóstico por imagem, e nos últimos anos têm se destacado também em outras áreas da medicina, especialmente como terapia oncológica. Devido à sua toxicidade limitada, podem influenciar no tempo de sobrevida e qualidade de vida do paciente, quando comparados a outras terapias antitumorais (NEVES et al., 2005). Devido ao potencial uso dos radiofármacos, surgiram novas técnicas moleculares capazes de fornecer alternativas para a deposição seletiva de radioatividade próxima às células tumorais. A análise cuidadosa para a seleção de radionuclídeos adequados, em conjunto com a localização *in vivo* e as propriedades farmacocinéticas do composto, são elementos essenciais para o desenvolvimento de radioterápicos eficazes (FERREIRA et al., 2012).

Além do potencial uso antitumoral de compostos metálicos de rutênio, uma nova possibilidade de uso destes metais pode ser explorada considerando seus radioisótopos, principalmente o rutênio-97 (^{97}Ru), que emite fótons gama e partículas beta ($E_\gamma = 215,718 \text{ keV}$ com 86% de abundância, e $E_\beta = 892,29$ com 87% de abundância (FIRESTONE, 2000) com meia-vida de 2,9 dias e, rutênio-103 (^{103}Ru), predominantemente um emissor β^- , com meia vida de 39,26 dias emite fótons gama ($E_\gamma: 497 \text{ keV}$) e partículas beta ($E_\beta: 226,56$ com 92% de abundância (FIRESTONE, 2000) e, rutênio-106 (^{106}Ru), que é também um emissor β^- ($E_\beta: 39,40 \text{ keV}$) e possui meia-vida de 373,59 dias (FIRESTONE, 2000). Ambos são investigados como alternativas de radioisótopos a serem utilizados para desenvolvimento de radiofármacos com potencial uso em braquiterapia (NEVES et al., 2005; PAPAGEORGIOU et al., 2011; Pe'er, 2012). Dentre vários radionuclídeos utilizados para este fim, destacam-se o cobalto-60 (^{60}Co), o Iodo-125 (^{125}I), o irídio-192 (^{192}Ir), o paládio-103 (^{103}Pd), além do ^{106}Ru . Neste caso, ^{106}Ru tem sido utilizado com sucesso em tumores oculares como melanoma uveal (PAPAGEORGIOU et al., 2011; Pe'er, 2012), e tem sido descrito com relativo sucesso também para o tratamento de outros tumores oculares, como por exemplo o retinoblastoma (FINGER, 2003). Por ser um emissor beta de baixa energia, e assim apresentar penetração limitada, o ^{106}Ru possui várias vantagens em relação a outros, pois, pacientes, cirurgiões e profissionais da saúde não ficam expostos a radiação de alta energia, como a energia gama, produzida por exemplo, pelo ^{60}Co (FINGER, 2003).

Devido à localização diferenciada dos tumores cerebrais, a braquiterapia ou radioterapia interna envolvendo rutênio como fonte radioativa se apresenta como uma nova possibilidade inovadora de intervenção e estratégia de tratamento.

2. JUSTIFICATIVA

Embora compostos a base de platina constituam uma classe de drogas usadas na clínica, tanto com atividades antitumorais quanto antivirais, o desenvolvimento de resistência e os efeitos colaterais por eles gerados são fatores limitantes para seu uso na prática clínica. Essas limitações têm estimulado a busca por outros agentes, à base de metais de transição, mais efetivos e menos tóxicos que sejam diferentes de platina.

Para que um composto químico seja utilizado como droga antineoplásica, necessita-se que o mesmo passe por um longo processo de pesquisa utilizando-se células isoladas, animais experimentais e seres humanos para comprovar sua eficácia e segurança. As pesquisas científicas podem gerar conhecimento sobre os efeitos citotóxicos, clastogênicos e genotóxicos do composto, além de determinar doses efetivas, para um possível tratamento terapêutico, cujo objetivo seja maior eficácia, seletividade e menor efeito colateral do que os compostos atualmente utilizados.

Estudos desenvolvidos recentemente têm mostrado a atividade antitumoral de complexos metálicos de Rutênio para alguns tipos de câncer, tais como, câncer de mama, de próstata e de pulmão, demonstrando um futuro promissor para esta classe de drogas como composto antitumoral. Várias vantagens já foram demonstradas pelos compostos de Rutênio em relação a outras drogas antitumorais, como, por exemplo, a cisplatina.

O GBM, tumor cerebral maligno mais frequente em adultos, é caracterizado pela sua rápida propriedade proliferativa e invasiva. Devido à resistência a tratamentos quimio e radioterápicos convencionais, a estimativa de vida dos pacientes diagnosticados com glioblastoma é extremamente baixa e poucas drogas estão disponíveis no mercado para o tratamento deste tipo de câncer. De acordo com essas características, necessita-se urgente de novos agentes terapêuticos que apresentem mecanismos de ação definidos e atividade antitumoral em aplicações isoladas ou em combinações com outras formas de terapia.

Diante do exposto e considerando que: existe uma grande e urgente necessidade de se encontrar novas drogas e métodos de tratamento eficazes para este tumor altamente agressivo, compostos de Rutênio têm se destacado por apresentar efeitos antitumorais, e que, pouquíssimos estudos foram desenvolvidos, avaliando o efeito de

drogas com estrutura química complexada com Rutênio em GBM, o presente estudo se justifica por apresentar uma alternativa para se identificar novos compostos com atividade antitumoral com potencialidades de uso no tratamento de GBM, além de, possibilitar a elucidação do possível mecanismo de ação antitumoral de complexos metálicos de rutênio.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar os efeitos dos complexos fosfínicos de Rutênio (II), sintéticos e ativados neutronicamente, $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{bipy})(\text{dppe})]\text{PF}_6$, $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{bipy})(\text{dppf})]\text{PF}_6$ e $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{bipy})(\text{dppp})]\text{PF}_6$ em linhagens celulares de Glioblastoma.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos CFRs analisando a indução de possíveis alterações morfológicas por microscopia;

3.2.2. Produzir CFRs ativados neutronicamente e avaliar as suas citotoxicidades;

3.2.3. Quantificar a citotoxicidade dos CFRs *in vitro*, por meio de ensaios de viabilidade celular e, determinar a concentração inibitória (IC_{50}) destes complexos;

3.2.4. Investigar o mecanismo de ação dos complexos de rutênio através de ensaios de apoptose e avaliação de dano no DNA;

3.2.5. Determinar através de intensidade de fluorescência a capacidade dos CFRs em gerar espécies reativas de oxigênio (ROS).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Drogas teste

4.1.1. Complexos de Rutênio

Foram utilizados complexos fosfínicos de rutênio (II): [Ru(pic)(bipy)(dppb)]PF₆, [Ru(pic)(bipy)(dppe)]PF₆, [Ru(pic)(bipy)(dppf)]PF₆ e [Ru(pic)(bipy)(dppp)]PF₆, representados no decorrer do texto por Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp, respectivamente. Os compostos foram sintetizados no Laboratório de Química do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos (Tabela 1 e Figura 10). Realizou-se o preparo de soluções estoque a 0,02 M dos compostos em dimetilsulfóxido (DMSO) que, em seguida foram armazenadas a -20°C. A concentração de DMSO nos experimentos foi sempre menor que 0,5%

Tabela 1: Nomes dos compostos testados e seus respectivos ligantes.

Compostos	Ligante
[Ru(pic)(bipy)(dppb)]PF ₆	Butano
[Ru(pic)(bipy)(dppe)]PF ₆	Etano
[Ru(pic)(bipy)(dppf)]PF ₆	Ferroceno
[Ru(pic)(bipy)(dppp)]PF ₆	Propano

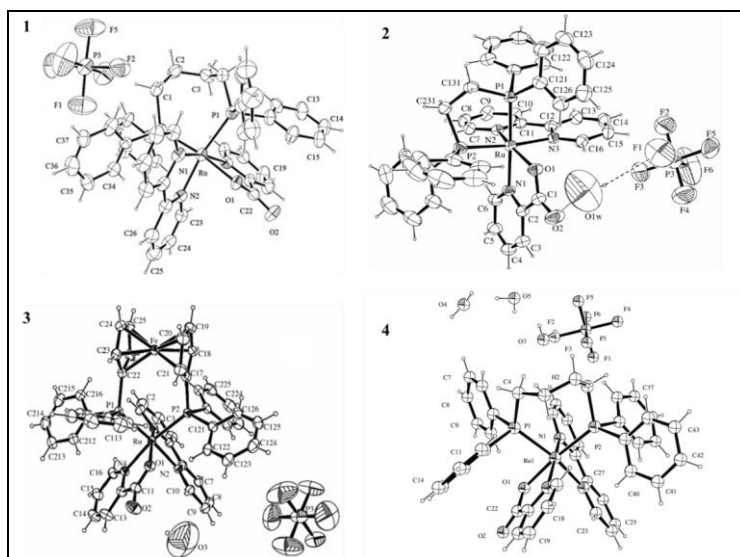


Figura 10: Estruturas moleculares tridimensionais dos complexos 1) Rudppb¹, 2) Rudppe², 3) Rudppf² e 4) Rudppp, geradas pelo programa ORTEP (*Oak ridge ellipsoid plot*) (¹PAVAN et al.; 2011; ²LIMA, 2010).

4.1.2. Ativação neutrônica dos complexos de Rutênio

A ativação neutrônica dos CFRs foi realizada pela equipe do Serviço do reator e técnicas analíticas (SERTA) do Centro Nacional da Tecnologia Nuclear, onde se localiza o reator TRIGA Mark I do CDTN/CNEN. O IPR-R1 é um reator TRIGA (*Training, Research, Isotopes, General Atomics*) Mark I fabricado pela *General Atomics* (EUA), e contém três dispositivos principais para irradiação de amostras: TUBO CENTRAL, MESA GIRATÓRIA e terminal pneumático (ZANGIROLAMI, 2009).

Alíquotas das amostras de CFRs Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp foram irradiadas por 8h em frascos cilíndricos de poliestireno, no TUBO CENTRAL, próximo ao núcleo do reator, local onde o fluxo é máximo ($4,3 \times 10^{12} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$), ativando moléculas em maior quantidade.

A liberação das amostras foi realizada de acordo com a norma do CNEN-NE-6.02. Aproximadamente, 18 h após a irradiação dos CFRs no reator, as amostras preservadas em blindagens de chumbo (“castelos”) foram monitoradas e, em seguida, transportadas para o laboratório de radiobiologia.

Depois de irradiadas no reator TRIGA-IPR-R1, as amostras dos CFRs foram analisadas por espectrometria gama para sua quantificação e determinação de suas atividades específicas. Para estas análises foram utilizados os sistemas de espectrometria gama para contagem da radioatividade na Unidade de Radiobiologia usando-se um espectrômetro gama Wizard 2480 com detector de NaI, e no Laboratório de Radioquímica do CDTN com um detector HPGe (*Hiper Pure Germanium*) modelo CANBERRA 5019, (eficiência de contagem: 50%; resolução: FWHM 1,85 keV para a energia 1332 keV do Co^{60}). O programa computacional Gennie 2000 v2.0, CANBERRA, foi usado para processar os espectros e determinar a área de pico.

Estes dois sistemas de contagens permitiram a aquisição de espectros e, consequentemente, a análise de fotopicos com suas energias determinadas em keV.

Desse modo, foi possível determinar e caracterizar os isótopos presentes nas amostras, assim como suas atividades específicas. O cálculo das atividades específicas das amostras foi determinado pela relação entre área de contagem, geometria de contagem, tempo de irradiação, tempo de contagem $t_c = t_f - t_i$, (t_i é o instante do início da medida e t_f do final da mesma), meia-vida dos isótopos ($T_{1/2}$), correção do decaimento, eficiência do detector e rendimento gama (Y_γ) dos isótopos, seguindo os cálculos das equações abaixo.

A taxa de contagem dos fotopicos $\dot{C}_{(t)}$ no espectrômetro gama é proporcional à atividade da amostra (KASTNER et al., 2005):

$$\dot{C}_{(t)} = g A_{(t)} \quad (1)$$

Onde a constante de proporcionalidade g é dada por:

$$g = \varepsilon \gamma Y \gamma \quad (2)$$

Sendo que $\varepsilon \gamma$ é a eficiência de contagem e $Y \gamma$ é o rendimento gama. Integrando-se (eq. 1), obtém-se a contagem total durante o intervalo de medida:

$$C = \varepsilon_r Y_r \left(\frac{-1}{\lambda} \right) N \phi \sigma (1 - e^{-\lambda t}) (e^{-\lambda t_f} - e^{-\lambda t_i}) \quad (3)$$

Onde N é o número de núcleos alvos na amostra, σ é a seção de choque para captura neutrônica do elemento alvo, ϕ é o fluxo total de nêutrons térmicos no reator, λ é a constante de decaimento do radioisótopo ($\lambda = \ln 2 / T_{1/2}$, sendo $T_{1/2}$ a meia-vida do radioisótopo). As atividades induzidas A do rutênio-103 e rutênio-97 foram calculadas, sabendo-se que:

$$A = \frac{C}{\varepsilon_r Y_r} \quad (4)$$

A atividade específica $A_{esp.}$ foi calculada pela equação abaixo:

$$A_{esp.} = \frac{A}{m} \quad (5)$$

Sendo que, A é atividade induzida e m é a massa em gramas do composto.

Para os experimentos, foram preparadas soluções estoque de diferentes concentrações após diluição, dos compostos produzidos por ativação neutrônica em meio DMEM, a partir de soluções estoques a 0,02 M dos compostos Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp em DMSO. As diluições foram feitas de modo a manter a concentração de DMSO menor que 0,5%.

Todos os experimentos foram realizados seguindo os cuidados de radioproteção, conforme a norma CNEN-NE-3.01. Uso de blindagem de chumbo, utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs), tais como jalecos, luvas cirúrgicas descartáveis, óculos de segurança com vidro plumbífero e dosímetros individuais. Para evitar a contaminação, as bancadas foram forradas com uma camada de plásticos e outra

de papel toalha. Durante e após os procedimentos com o material radioativo, as superfícies foram monitoradas com o detector Geiger-Muller.

Os rejeitos radioativos, sólido ou líquido, foram separados e armazenados em sacos plásticos, lixeiras blindadas e bombonas de polipropileno e isoladas até o decaimento total. Após o decaimento, os rejeitos foram recolhidos pelo setor de rejeitos do CDTN.

4.2. Cultura e manutenção de células

As linhagens celulares tumorais de glioblastoma U87 (expressando proteína p53 selvagem), T98 (expressando proteína p53 mutante) e células MRC5 (fibroblastos pulmonar humano) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, USA). As células foram mantidas em meio *Eagle* modificado por Dubecco (DMEM, Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®), em 1% de penicilina e cultivadas em estufa de CO₂ (5% de CO₂) com atmosfera umidificada a 37°C. Subculturas celulares foram realizadas semanalmente após tripsinização e a determinação do número de células foi feita com o auxílio de uma câmara de Neubauer. A viabilidade celular, em cultura, foi determinada por meio da coloração com azul de tripan a 4%. Nos experimentos utilizaram-se sempre células viáveis cujo crescimento em cultura apresentou aproximadamente 70-80% de confluência.

4.3. Avaliação do efeito das drogas

4.3.1. Análise morfológica

Para identificar as possíveis alterações morfológicas, causadas pelos CFRs nas células T98, U87 e MRC5, foi utilizada microscopia de contraste de fase, 24h após incubação com diferentes concentrações dos compostos. As células foram visualizadas em Microscópio Óptico Invertido Nikon e as imagens fotográficas foram obtidas com uma câmera digital (Nikon Coolpix 4500) acoplada ao microscópio. Foram procuradas evidências de alterações sugestivas de morte celular por apoptose ou necrose nas linhagens celulares tratadas, como: diminuição do número de células, arredondamento e encolhimento celular ou aumento do volume celular, redução do volume citoplasmático, irregularidades (blebs) ou desintegração da membrana plasmática e formação de vacúolos citoplasmáticos ou corpos apoptóticos.

4.3.2. Estudo da citotoxicidade *in vitro* de CFRs em células tumorais

A metodologia básica deste ensaio é realizada por meio de um ensaio colorimétrico capaz de mensurar a viabilidade metabólica das células. Consiste na redução do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], um sal de tetrazolium de coloração amarelada (solúvel em água), a cristais de formazan de coloração violeta, por meio de enzimas desidrogenases de células metabolicamente viáveis (Figura 11). Os cristais de formazan são insolúveis em água, mas são facilmente solubilizados em detergente.

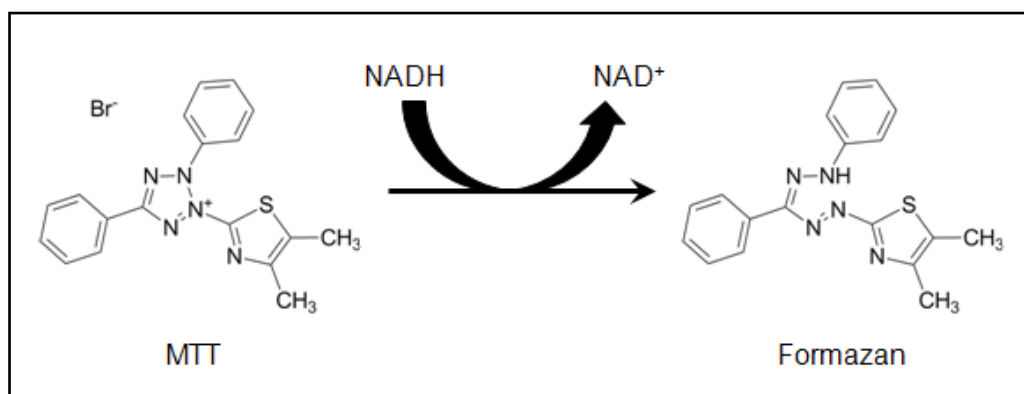


Figura 11: Esquema do MTT sendo reduzido a cristais de formazan, por meio das enzimas desidrogenases de células metabolicamente viáveis. Após redução do MTT, de cor amarela, ocorre a formação dos cristais de formazan, de cor violeta, que podem ser quantificados por espectrofotometria. Fonte: (RISS et al., 2013)

As células foram distribuídas em placas de 96 poços, a uma densidade de 1.500 células/poço e, após 24 h de incubação foram tratadas com concentrações que variaram de 1×10^{-10} à 1×10^{-4} mol.L⁻¹ de CFRs não radioativos e radioativos. Após 24 h de tratamento, as células foram incubadas com o MTT (0,5mg/mL) por 4 h a 37°C, ao abrigo da luz. Após, o sobrenadante contendo MTT foi retirado com o auxílio de uma bomba a vácuo, e em seguida, 100 µL de DMSO foram adicionados em cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A leitura da placa foi realizada através de espectrofotometria por uma leitora de microplaca UV-visível (*Molecular Devices*), a 570 nm. Em paralelo, foram feitos testes utilizando DMSO (0.5% em DMEM) como controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos em pelo menos três ensaios independentes com concordância entre os resultados. A porcentagem da viabilidade celular foi determinada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{Abs. Tratamento}}{\text{Abs. Controle negativo}} * 100$$

Os valores de IC₅₀ (concentração da droga que inibiu 50% de sobrevivência celular) foram calculados utilizando programa *Graphpad prism 5*, a partir da curva de sobrevivência.

Em seguida, o índice de seletividade (IS) dos compostos testados foi calculado, através dos valores de IC₅₀ obtidos ($IS = IC_{50MRC5}/IC_{50U87 \text{ ou } T98}$). Através desta relação, foi possível avaliar se os compostos foram mais seletivos para as linhagens tumorais de GBM. IS com valores maiores ou iguais a 2 foram considerados indicativos de boa seletividade. O índice de seletividade indica a seletividade dos compostos estudados e sua potencial utilização para os testes pré-clínicos e clínicos.

4.3.3. Análise das alterações do DNA cromossomal induzidas pelos CFRs, através da coloração DAPI

O corante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido) é capaz de se ligar às fitas duplas, especificamente A-T, do DNA cromossomal, possui alta fluorescência e quando excitado pela luz UV e emite fluorescência azul (PERES & CURI, 2005).

Para este ensaio, células U87, T98 e MRC5 foram semeadas em placas de 96 poços e, após 24 h, tratadas com os CFRs ($1 \times 10^{-5} M$). Após 24 h de tratamento, as células foram lavadas 1x com PBS e fixadas com metanol (gelado) por 20 minutos. Depois de fixadas, as células foram lavadas novamente com PBS e incubadas, por 30 minutos, com solução DAPI (SIGMA – Chemical Co.), na concentração de 400 ng.mL^{-1} , diluído em PBS. Após incubação, retirou-se o sobrenadante contendo DAPI e as células foram lavadas 5x com PBS. Os núcleos das células coradas com DAPI foram visualizados por microscopia de fluorescência invertido (Nikon – 385-410nm) e fotografados. Foram procuradas evidências de alterações do DNA cromossomal em células tratadas com os CFRs, tais como: corpos apoptóticos, fragmentação nuclear e condensação de cromatina.

4.3.4. Determinação do tipo de morte induzida por CFRs através da coloração Laranja de Acridina/ Brometo de etídeo

Laranja de Acridina, uma base fraca, é utilizada em diferentes áreas da biologia celular e molecular. Nos últimos anos tem sido objeto de estudos, devido às suas

propriedades de coloração metacromática. E em conjunto com o brometo de etídeo, pode ser utilizada para diferenciação de células vivas, apoptóticas, necróticas e autofágicas (PERES & CURI, 2005; SOARES et al., 2012).

Para determinar o tipo de morte induzida pelos CFRs, as células foram semeadas em placas de 96 poços, e após 24 h, tratadas com os CFRs (Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp) - radioativos e não radioativos. Depois de 24 h de tratamento, as células foram lavadas 1x com PBS e incubadas com meio de cultura (DMEM completo) contendo $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Laranja de Acridina (Sigma) e $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ de brometo de etídeo (Sigma) durante 15 minutos. Em seguida, o meio de cultura foi removido e fotomicrografias foram obtidas utilizando o microscópio de fluorescência invertido (Nikon – 530-650nm) e câmera (Nikon). Neste ensaio, as células viáveis apresentam núcleo verde brilhante uniforme; células em fases iniciais de apoptose (que ainda possuem a membrana intacta e não se coram com o brometo de etídeo) apresentam núcleo verde com pontos visíveis de condensação da cromatina, não sendo uniformemente coradas e nelas também ocorre clivagem do DNA e/ou fragmentação nuclear; as células autofágicas apresentam vacúolos com a cor alaranjada, devido à capacidade da laranja de acridina apresentar esta coloração, em meio ácido (presença dos autofagossomos). Em contraste, as células necróticas, se coram com brometo de etídeo, apresentam núcleo uniformemente laranja-avermelhado, sem cromatina condensada (KASIBHATLA et al, 2006; BASKIC et al., 2006 apud SOARES et al, 2012).

Através deste ensaio de dupla coloração, realizou-se a identificação do tipo de morte induzida pelos CFRs diferenciando células viáveis, apoptóticas, necróticas e autofágicas.

4.3.5. Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para a avaliação de geração de ROS, induzida pelo tratamento com CFRs (Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp) - radioativos e não radioativos, as células foram semeadas em placas de 96 poços e, após 24h, tratadas. Depois de 24h de tratamento, as células foram lavadas 2x com PBS e incubadas com $50\mu\text{M}$ de 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) diluído em PBS, por 30 minutos. A molécula esterificada de DCFH-DA é capaz de atravessar a membrana celular por difusão passiva e ao entrar em contato com espécies reativas de oxigênio, é oxidada formando diclorofluoresceína (DCF) fluorescente, podendo ser detectada através da

microscopia de fluorescência (THANNICKAL & FANBURG, 2000). Em seguida, as células foram lavadas, novamente, 2x com PBS, e posteriormente observadas em microscópio de fluorescência invertido (Nikon - 530-650nm) e fotomicrografias obtidas (Nikon). A intensidade de fluorescência de DCF é proporcional à capacidade oxidativa das células.

Em seguida, de forma a quantificar a intensidade de fluorescência presente nas células, imagens foram analisadas utilizando o software Image J (Image J, *National Institute of Health*, Bethesda, MD, USA) e os resultados foram expressos como porcentagem do respectivo controle de células não tratadas com os compostos.

4.4. Análises estatísticas

Os dados de viabilidade e proliferação celular foram expressos como a média $\pm$ Desvio Padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, inclusive os grupos controles. Para comparar os efeitos das diferentes drogas utilizadas entre células tratadas e não tratadas, foram realizados teste “t” de *student* e análise de variância (ANOVA), com nível de significância $p < 0,05$. As análises foram realizadas através do *software GraphPad prism 5*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção de CFRs ativados neutronicamente

Após irradiação de alíquotas dos CFRs, por 8h, no reator TRIGA IPR-R1 os compostos foram analisados por espectrometria gama, nos sistemas de contagem descritos na metodologia. A partir da análise dos espectros dos compostos, foi possível determinar as áreas dos fotopicos e, conseqüentemente, as atividades específicas induzidas dos radioisótopos de Rutênio presentes nos compostos. Pela reação de captura neutrônica $^{102}\text{Ru}(n, \gamma)$, foi gerado o emissor ^{103}Ru que sofre decaimento β^- e emite fóton γ de energia 497 keV (90% abundância) e partículas β^- de 226 keV. O fotopico correspondente ao radioisótopo ^{103}Ru foi o mais abundante dos radioisótopos de rutênio gerados. Esperava-se que, pela reação $^{96}\text{Ru}(n, \gamma)$ fosse produzido o ^{97}Ru que sofre elétron captura (CE) e emite fótons γ com energia de 215 keV (86% de abundância) (FIRESTONE, 2000), no entanto, este fotopico não foi observado ou foi produzido em quantidade negligenciável. O espectro total apresentado na figura 12 mostra que o pico majoritário corresponde ao fotopico ^{103}Ru . Após a ativação neutrônica dos compostos, foi induzida uma atividade específica que variou de 1,32 a 1,55 GBq/mol de composto.

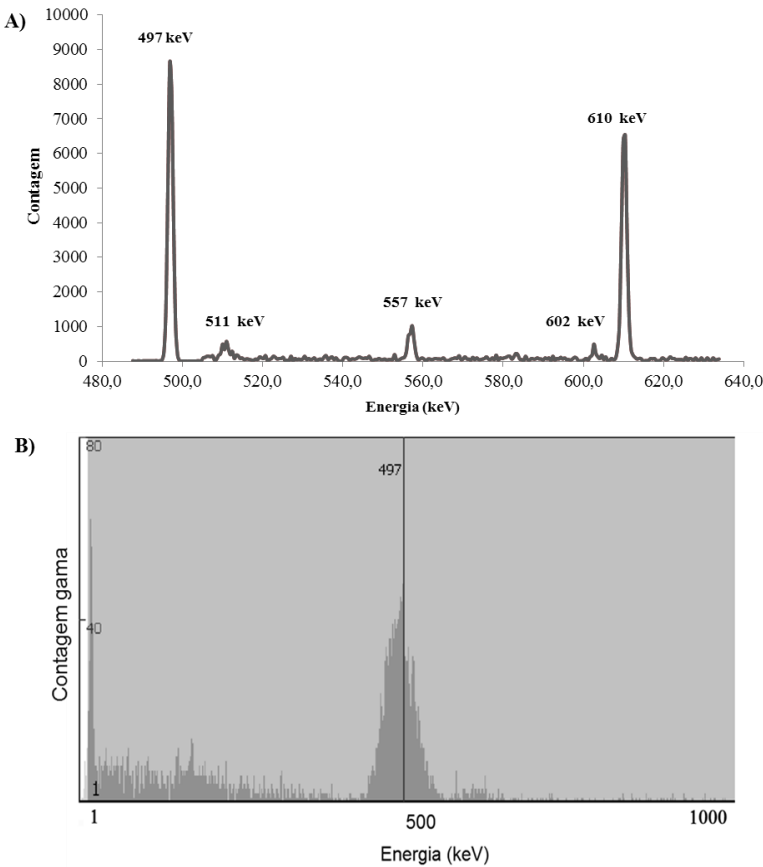


Figura 12: Espectro dos compostos de rutênio ativados neutronicamente no tubo central do reator Triga Mark IPR-R1. O espectro mostra o fotopico principal do ^{103}Ru do gráfico no valor de 497 keV. A) Espectro indicando as energias características das emissões de Ru-103 medidas no sistema de espectrometria com detector de germânio HPGe de eficiência relativa de 50% para identificação mais precisa da energia do fotopico principal (497keV). B) Espectro no detector NaI (Wizard) para quantificação da atividade específica

Tabela 2: Propriedades físicas dos isótopos de Rutênio ^{97}Ru e ^{103}Ru

Propriedades físicas	^{97}Ru	^{103}Ru
Meia-vida	2,9 dias	39,8 dias
Modo de decaimento	CE ^a	β^-
Energia liberada por decaimento de elétrons (keV)	-	226, 56
Energia liberada por decaimento de fótons (keV)	215,72	497,08

^a Captura por elétrons (FIRESTONE, 2000)

Em relação aos radioisótopos presentes na amostra, observou-se que o radioisótopo ^{97}Ru embora pudesse ter sido formado em quantidades muito pequenas e minimamente detectado, considerou-se ainda o seu tempo de meia-vida relativamente curto e que os experimentos com as amostras ativadas neutronicamente tiveram início cerca de aproximadamente 24 h após sua ativação. Desta forma, mesmo que este radioisótopo estivesse presente, sua contribuição seria muito pequena para explicar o efeito observado nas células.

5.2. Avaliação do efeito das drogas

5.2.1. Alterações morfológicas

As figuras 13 e 14 mostram as alterações morfológicas das células tratadas com os CFRs não radioativo e radioativo, respectivamente. Todos os compostos, tanto no tratamento não radioativo quanto no radioativo causaram alterações significativas nas células de GBM.

As alterações mais observadas foram: diminuição do número de células, arredondamento e encolhimento celular, redução do volume citoplasmático, irregularidades na membrana e formação de vacúolos citoplasmáticos e corpos apoptóticos (blebs), sugestivas de indução de morte celular programada. Para um mesmo tempo de incubação, estas alterações observadas foram mais intensas à medida que se aumentou a concentração dos CFRs.

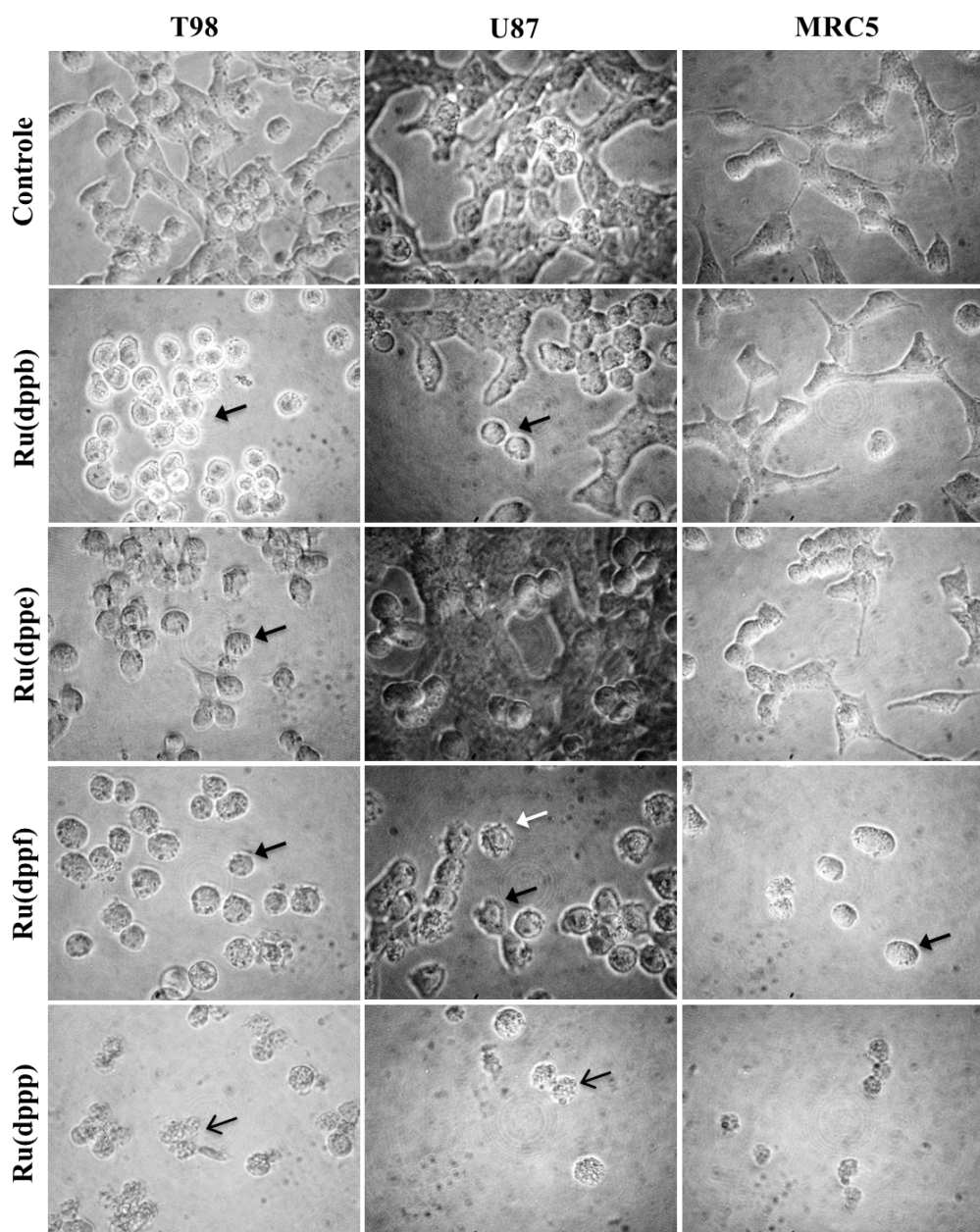


Figura 13: Fotomicrografias das células T98, U87 e MRC5 controle e tratadas com os CFRs (Ru(dppb), Ru(dppe), Ru(dppf) e Ru(dppp)) não radioativos. Células controle e tratadas por 24h, com CFRs ($10\mu\text{mol.L}^{-1}$). As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao microscópio óptico (Aumento: 400x). Alterações como redução do volume celular - arredondamento e encolhimento (seta fechada preta), irregularidades na membrana (seta aberta) e formação de corpos apoptóticos (seta fechada branca) foram observadas nas células tratadas.

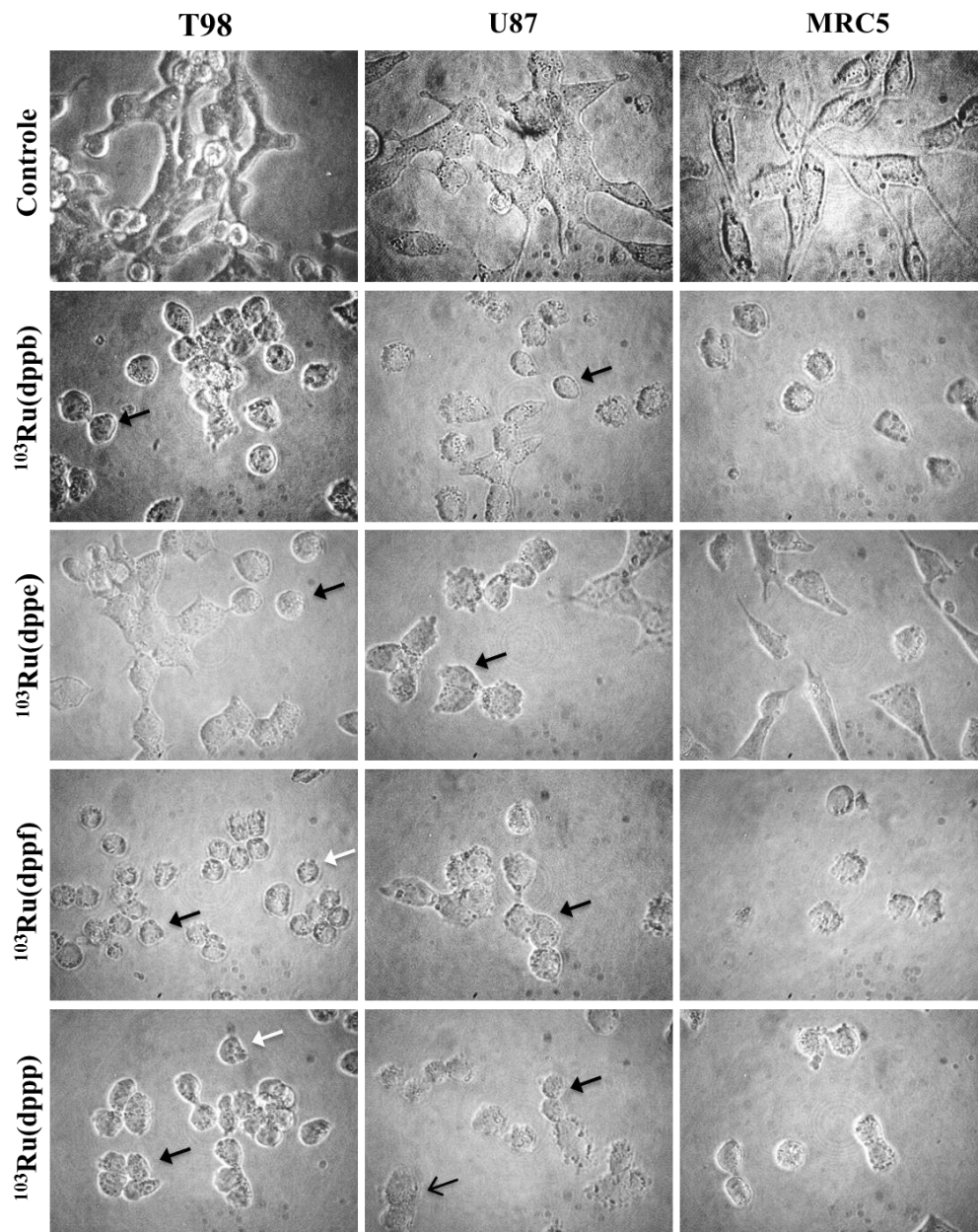


Figura 14: Fotomicrografias das células T98, U87 e MRC5 controle e tratadas com os CFRs ($^{103}\text{Ru}(\text{dppb})$, $^{103}\text{Ru}(\text{dppe})$, $^{103}\text{Ru}(\text{dppf})$ e $^{103}\text{Ru}(\text{dppp})$) radioativos. Células controle e tratadas por 24h, com CFRs ($10\mu\text{mol.L}^{-1}$). As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao microscópio óptico (Aumento: 400x). Alterações como redução do volume celular (arredondamento e encolhimento) (seta fechada preta), irregularidades na membrana (seta aberta) e formação de corpos apoptóticos (blebs) (seta branca) foram observados nas células tratadas.

5.2.2. Estudo da citotoxicidade *in vitro* de CFRs em células tumorais

A avaliação dos efeitos citotóxicos de CFRs radioativos e não radioativos em células tumorais de GBM T98 (p53 mutante), U87 (p53 selvagem) e células MRC5 de fibroblastos, utilizada como modelo de células normais, foi realizada por meio do ensaio de MTT. Através deste ensaio, foi possível determinar os valores de IC₅₀ (concentração da droga que inibiu 50% de sobrevivência celular). Utilizou-se a cisplatina como controle positivo.

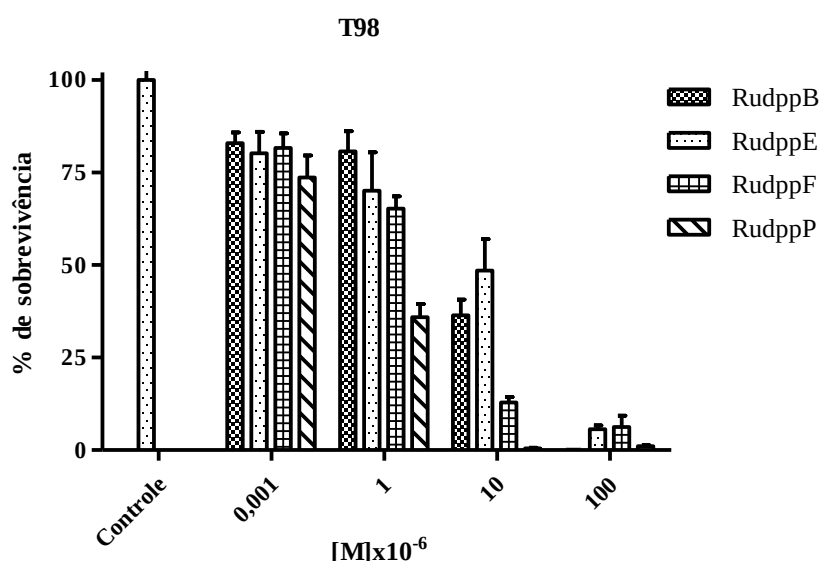


Figura 15: Efeito citotóxico dos CFRs (Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp) não radioativos em células T98, após 24h de tratamento.

As figuras de 15 a 20 mostram a porcentagem de sobrevivência das células tratadas com as diferentes concentrações de CFRs não radioativos e radioativos, e controle negativo, apenas com DMEM, (apresentando 100% de sobrevivência). De acordo com os resultados obtidos, observou-se que todos os CFRs, não radioativos e radioativos, foram citotóxicos de maneira dose dependentes para as linhagens celulares de GBM. No tratamento não radioativo verificou-se que os compostos Rudppf e Rudppp apresentaram maior citotoxicidade para as células, observando que o tratamento com estes dois compostos nas concentrações mais altas foi capaz de destruir, praticamente, todas as células (Figuras 15, 16 e 17).

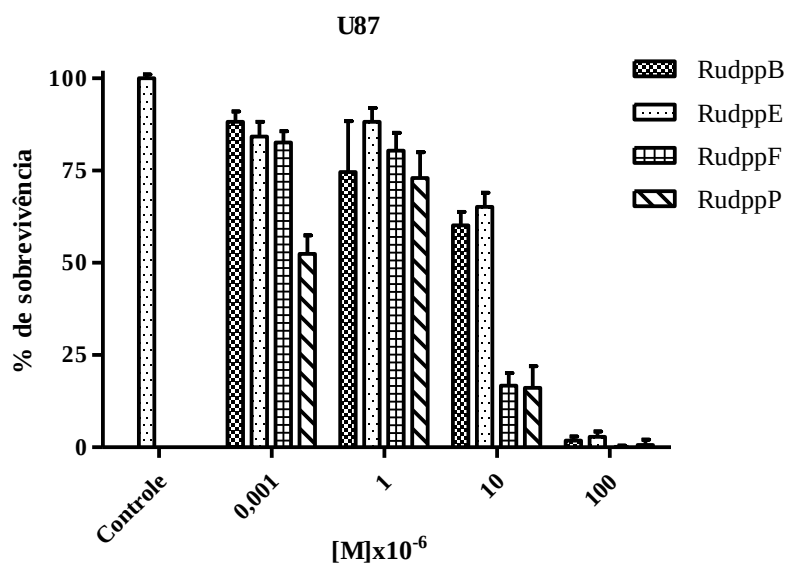


Figura 16: Efeito citotóxico dos CFR (Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp) não radioativos em células U87, após 24 de tratamento.

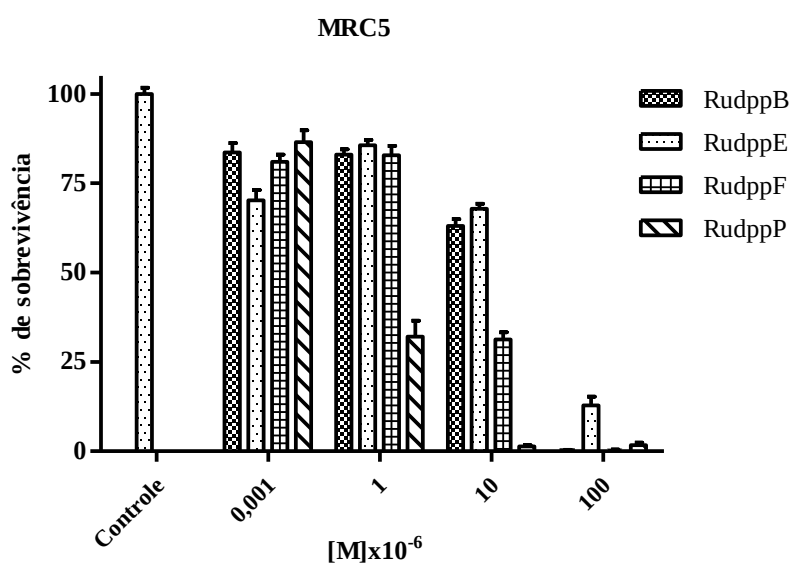


Figura 17: Efeito citotóxico dos CFRs (Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp) não radioativos em células MRC5, após 24h de tratamento.

No tratamento radioativo (Figuras 18, 19 e 20), todos os compostos foram mais citotóxicos que no tratamento não radioativo, pois mesmo em baixas concentrações, por volta de $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$, os CFRs apresentaram citotoxicidade.

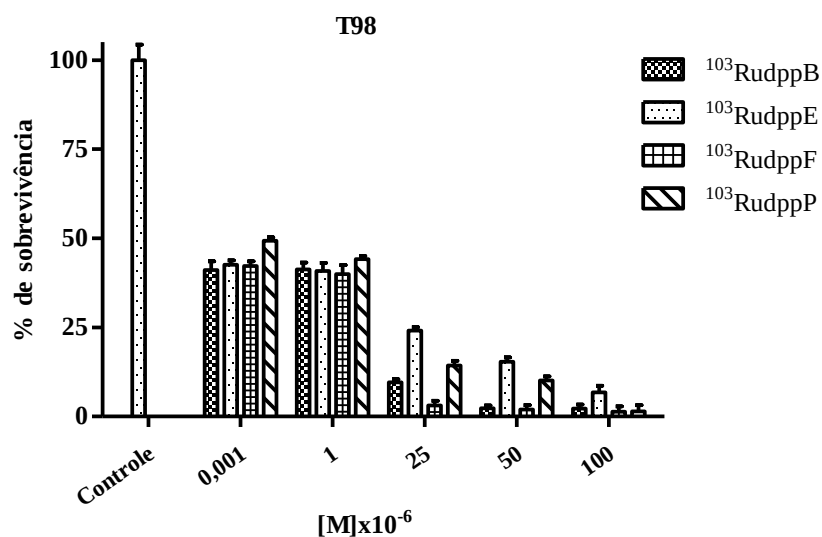


Figura 18: Efeito citotóxico dos CFRs ($^{103}\text{Rudppb}$, $^{103}\text{Rudppe}$, $^{103}\text{Rudppf}$ e $^{103}\text{Rudppp}$) radioativos em células T98, após 24h de tratamento.

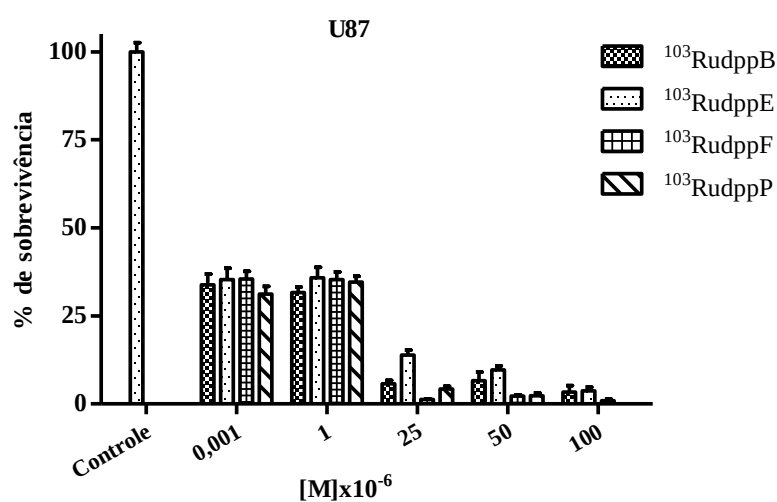


Figura 19: Efeito citotóxico dos CFRs ($^{103}\text{Rudppb}$, $^{103}\text{Rudppe}$, $^{103}\text{Rudppf}$ e $^{103}\text{Rudppp}$) radioativos em células U87, após 24h de tratamento.

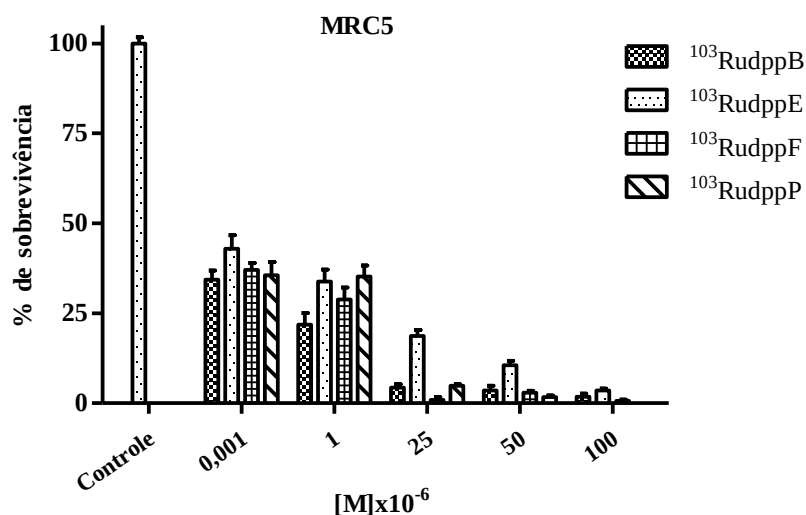


Figura 20: Efeito citotóxico dos CFRs (¹⁰³Rudppb, ¹⁰³Rudppe, ¹⁰³Rudppf e ¹⁰³Rudppp) radioativos em células MRC5, após 24h de tratamento.

Os valores de IC₅₀ foram obtidos através de curvas de sobrevivência, por meio do *Graphpad prism 5*. Como observado na Tabela 3, os CFRs apresentaram IC₅₀ entre 3,98 μM e 27,8 μM em células U87 e de 1,49μM a 19,0 μM em células T98. Dentre os compostos testados, Rudppf e Rudppp mostraram ligeiramente maior atividade citotóxica para as linhagens de GBM, com IC₅₀ de 3,98 μM e 4,92 μM, respectivamente, nas células U87 e de 3,05 e 1,49 μM nas células T98. Este fato demonstra a importância da relação estrutura-atividade de um composto e a necessidade de realização de testes experimentais para avaliar o seu potencial.

Tabela 3: Citotoxicidade dos CFRs não radioativos em linhagens celulares de GBM U87 e T98, e em MRC5.

Compostos não radioativos	IC ₅₀ (μM)		
	U87	T98	MRC5
Rudppb	16,1± 3,32	11,9 ± 5,88	41,0 ± 10,1
Rudppe	27,8 ± 11,7	19,0 ± 5,91	82,1 ± 9,13
Rudppf	3,98 ± 0,85	3,05 ± 0,72	8,88 ± 2,27
Rudppp	4,92 ± 2,46	1,49 ± 0,50	1,47 ± 0,62
Cisplatina ¹	1,76 ± 0,22	5,31 ± 1,94	5,05 ± 0,71

¹Dados obtidos pelo grupo de pesquisa do laboratório de radiobiologia/CDTN

Em células U87 o composto Rudppf se mostrou mais ativo, enquanto nas células T98 o composto Rudppp foi o que apresentou maior atividade. Uma observação interessante é que nas células T98 estes dois compostos se mostraram ligeiramente mais potentes que a cisplatina, diferentemente do observado nas células U87. Por outro lado, os CFRs apresentaram menor citotoxicidade em MRC5, quando comparados à cisplatina, com exceção do composto Rudppp.

Interessante mencionar que, a maioria dos cânceres apresenta mutação no gene TP53, que codifica a proteína p53 alterada. Este fato, nos leva a inferir que estas células são mais resistentes a um determinado tratamento, considerando que reparo no DNA dependente de p53 pode estar comprometido, assim como, as vias de indução de apoptose ativadas pela proteína p53 nativa. Isto levaria a um acúmulo, cada vez maior, de mutações e adaptações da célula tumoral, aumentando a sua sobrevivência. Os valores absolutos de IC_{50} obtidos foram menores para T98 (p53 mutante), quando comparados ao IC_{50} das células U87. Este fato poderia sugerir uma maior eficácia dos CFRs para tumores com p53 mutadas, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Por outro lado, não podemos descartar que outras mutações envolvidas na resistência tumoral podem estar influenciando esta diferença observada nos valores de IC_{50} , como por exemplo, diferenças na expressão de genes de resistência a multidrogas (MDRs), amplificação de genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo, dentre outros. Este fato pode servir como estímulo para estudos adicionais, direcionados para avaliar como outras vias de sinalização são afetadas pelos CFRs. E apesar da diferença não ter se mostrado significativa, ainda assim, tal achado está em contraste com alguns estudos *in vitro* que mostraram que a expressão de proteínas p53 mutantes em culturas celulares as tornam quimioresistentes, como nos estudos citados por Strano et al. (2007), em que células p53 mutantes apresentaram maior resistência ao etoposídeo e cisplatina, dois importantes agentes antitumorais já utilizados na prática clínica. No entanto, é importante lembrar que, as duas linhagens celulares utilizadas neste estudo são de origens diferentes e, portanto, possuem um perfil genético global também diferente, de forma que para se concluir quanto a influência do “status” da proteína p53 na resposta à compostos de rutênio, seria necessário utilizar uma mesma linhagem celular com o mesmo perfil genético.

Em seu estudo Lima (2010) testou os compostos Rudppe, Rudppf e Rudppp em linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB 231) e obtiveram IC_{50} de 7,6 μM , 0,4 μM e 3,3 μM , respectivamente. Outro estudo, realizado por Lima et al. (2014) avaliou a citotoxicidade de cinco complexos de rutênio (II), coordenados a diferentes aminoácidos, em linhagens celulares de sarcoma murino e apresentaram valores de IC_{50} que variaram de 22,53 μM a 50,18 μM . Comparando estes dados, com os resultados obtidos em nosso estudo, em linhagens celulares de GBM (Tabela 3), observou-se que os valores de IC_{50} de ambos os estudos estão bem próximos e na ordem de micromolar (μM), considerando que o potencial antitumoral destes compostos é similar em ambos os tipos de tumores.

Os compostos radioativos foram mais potentes em células de GBM do que os compostos não radioativos ($p < 0,05$). Apresentaram IC_{50} entre 0,00023 μM e 0,00042 μM em células U87 e de 0,00034 μM a 0,00062 μM em células T98 (Tabela 4). Enquanto, os valores de IC_{50} para os compostos não radioativos variaram de 3,98 μM e 16,1 μM nas células U87 e de 1,49 μM a 19,0 μM em células T98. Porém, com exceção do composto Rudppe em U87 ($p < 0,05$), todos os compostos radioativos também foram igualmente citotóxicos em células MRC5 ($p > 0,05$). Em GBM, os tumores são localizados especificamente no cérebro. Neste caso, terapias direcionadas para o tumor local por estereotaxia poderiam ser uma estratégia de utilização destes compostos, evitando a exposição desnecessária de outros órgãos. Isto poderia contornar possíveis problemas de efeitos colaterais. Por outro lado, de forma a minimizar os efeitos da radioatividade em células normais, moléculas-alvo específicas ou superexpressas em células tumorais podem ser direcionadas através do acoplamento ou ligação de rutênio às moléculas ligantes como, por exemplo, o caso da transferrina, em que o rutênio radioativo seria transportado em maior quantidade para as células tumorais.

O aumento de potência observado nos compostos ativados neutronicamente se deve a presença do isótopo ^{103}Ru que ao sofrer decaimento β emite fótons γ (E_{γ} : 497 keV) e partículas beta (E_{β} : 226 keV). Tendo em vista a atividade específica dos compostos de rutênio após ativação neutrônica: 1,32 a 1,52 GBq/mol, o valor de IC_{50} dos compostos radioativos apresentados na Tabela 4 e o fator de conversão de dose para o ^{103}Ru (ECKERMAN et al., 2012), a exposição das células aos compostos proporcionou uma dose de radiação para as células, conforme apresentado na Tabela 5:

Tabela 4: Citotoxicidade dos CFRs radioativos em linhagens celulares de GBM, U87 e T98, e MRC5.

Compostos Radioativos	IC ₅₀ (μ M)		
	U87	T98	MRC5
¹⁰³ Rudppb	$2,4 \times 10^{-4} \pm 1,3 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-4} \pm 9,4 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-4} \pm 1,0 \times 10^{-4}$
¹⁰³ Rudppe	$2,3 \times 10^{-4} \pm 1,5 \times 10^{-4}$	$5,2 \times 10^{-4} \pm 9,4 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-4} \pm 5,5 \times 10^{-5}$
¹⁰³ Rudppf	$4,2 \times 10^{-4} \pm 1,7 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-4} \pm 2,3 \times 10^{-5}$	$3,8 \times 10^{-4} \pm 4,1 \times 10^{-5}$
¹⁰³ Rudppp	$3,1 \times 10^{-4} \pm 1,7 \times 10^{-5}$	$6,2 \times 10^{-4} \pm 8,7 \times 10^{-5}$	$4,7 \times 10^{-4} \pm 0$

Tabela 5: Dose absorvida pelas células expostas ao radioisótopo ¹⁰³Ru (Gy).

Compostos Radioativos	Dose absorvida (Gy)
¹⁰³ Rudppb	$3,55 \times 10^{-14}$
¹⁰³ Rudppe	$3,14 \times 10^{-14}$
¹⁰³ Rudppf	$5,69 \times 10^{-14}$
¹⁰³ Rudppp	$4,02 \times 10^{-14}$

Como observado, o tratamento com os compostos radioativos gerou deposição de uma dose de radioatividade pequena nas células, mas em adição ao efeito farmacológico dos compostos, apresentou um efeito supra-aditivo resultando no aumento da potência em mais de 100x se considerarmos os valores de IC₅₀ dos compostos não radioativos. Este estudo é o primeiro a demonstrar o efeito de compostos contendo ¹⁰³Ru em células de GBM *in vitro*. Embora preliminar, os dados obtidos já se mostram promissores e podem ser comparados a outros radioisótopos que estão sendo analisados com uso potencial em terapia por radionuclídeo como, por exemplo, ¹⁷⁷Lu (REBER et al., 2013) e ²¹²Bi (VAIDYANATHAM & ZALUTSKY, 1996).

O cálculo do índice de seletividade (IS) dos CFRs não radioativos e radioativos foi realizado a partir da razão entre o valor de IC₅₀ das células MRC5 (fibroblastos) e o IC₅₀ obtido nas linhagens celulares de GBM (Tabela 5). Através desta análise, observou-se que no tratamento não radioativo, os compostos Rudppb, Rudppe e Rudppf mostraram-se mais seletivos para células tumorais U87 e T98 do que as células utilizadas como controle, uma vez que a relação obtida foi maior que 2. O composto Rudppp, por outro lado, apresentou IS < 2 em ambas as linhagens, podendo ser considerado menos seletivo que os demais. E quando comparados à cisplatina, os

valores de IS dos compostos Rudppb, Rudppe e Rudppf, exceto o composto Rudppp, foram semelhantes em células U87. Porém, nas células T98 todos os compostos apresentaram maior IS que a cisplatina. No tratamento radioativo, verificou-se que o IS foi menor que 2 para todos os compostos, sugerindo um grande potencial da ativação neutrônica para aumentar a toxicidade destes compostos. Logicamente, continuação destes estudos merece ser desenvolvida para obtenção de uma maior seletividade para os mesmos.

Tabela 6: Índice de seletividade dos CFRs radioativos e não radioativos sobre linhagens celulares de GBM.

Compostos	Índice de Seletividade			
	Trat. não radioativo		Trat. Radioativo	
	U87	T98	U87	T98
Rudppb	2,55	3,45	1,63	1,14
Rudppe	2,95	4,32	0,87	0,39
Rudppf	2,23	2,91	0,90	0,70
Rudppp	0,29	0,98	1,52	0,76
Cisplatina ¹	2,87	0,95	*ND	ND

¹Dados obtidos pelo grupo de pesquisa do laboratório de radioablogia – CDTN.

*Não determinado

5.2.3. Análise das alterações do DNA cromossomal induzidas pelos CFRs através da coloração DAPI

Para determinar o efeito dos compostos a nível nuclear foi utilizado o corante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), que possui afinidade para o DNA e é capaz de detectar fragmentação de DNA, condensação de cromatina e formação de corpos apoptóticos, características da morte induzida por apoptose.

As células foram tratadas com uma concentração de 10 μ M dos CFRs, valor próximo do IC₅₀ dos compostos. Após 24h de tratamento, foi possível visualizar nas células de GBM alterações como condensação da cromatina (células com coloração azul brilhante), fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos (blebs), tanto no tratamento com CFRs não radioativos (Figura 21) quanto no tratamento com os compostos radioativos (Figura 22). As células MRC5 não apresentaram alterações significativas.

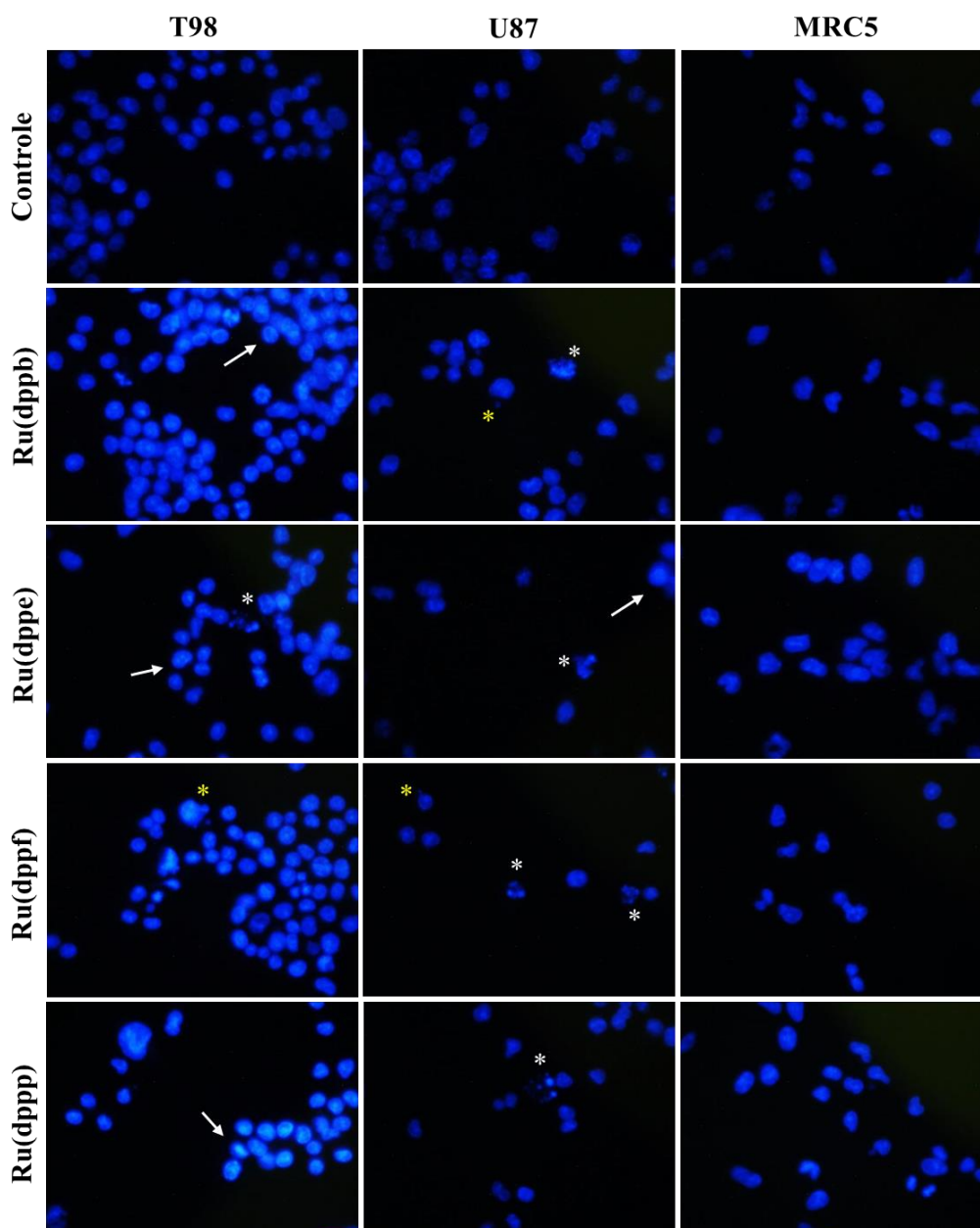


Figura 21: Análise do DNA cromossomal das células T98, U87 e MRC5 tratadas com CFRs (Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp) não radioativo, por 24 h. As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao microscópio óptico de fluorescência (Aumento: 400x). Células controle apresentam uma coloração azul opaca. Nas células de GBM tratadas foram observadas: condensação da cromatina (células de cor azul brilhante - setas), fragmentação nuclear (asteriscos brancos) e corpos apoptóticos (asteriscos amarelos) (Concentração: $10\mu\text{mol.L}^{-1}$).

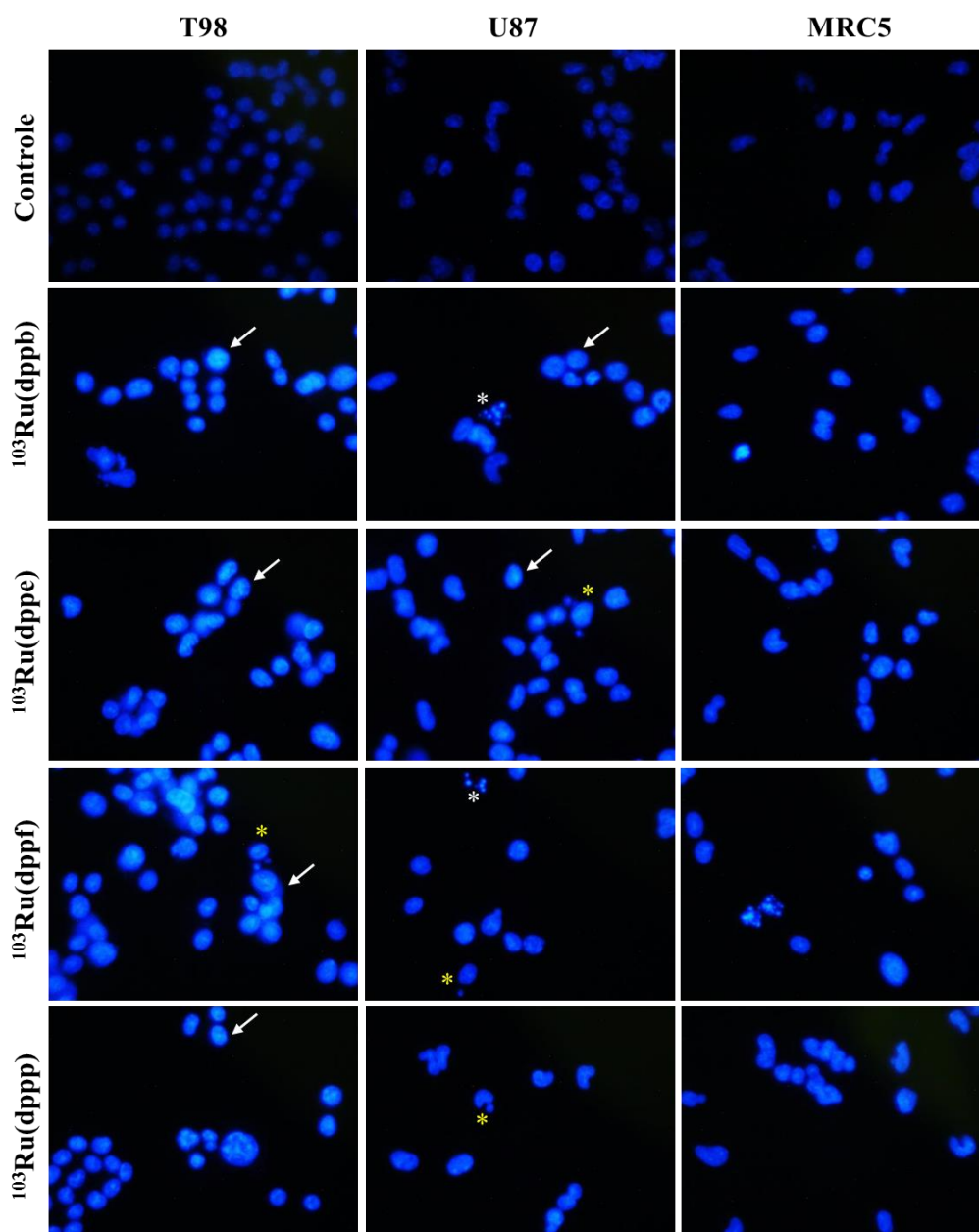


Figura 22: Análise do DNA cromossomal das células T98, U87 e MRC5 tratadas com CFRs ($^{103}\text{Ru(dppb)}$, $^{103}\text{Ru(dppe)}$, $^{103}\text{Ru(dppf)}$ e $^{103}\text{Ru(dppp)}$) radioativo, por 24h. As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao microscópio óptico de fluorescência (Aumento: 400x). Nas células de GBM tratadas foram observadas alterações como: condensação da cromatina (células de cor azul brilhante - setas), fragmentação nuclear (asteriscos brancos) e corpos apoptóticos (asteriscos amarelos) (Concentração: $10\mu\text{mol.L}^{-1}$).

5.2.4. Determinação do tipo de morte induzida pela coloração Laranja de Acridina/ Brometo de etídeo

Vários estudos mostram que a morte celular por apoptose está entre os diferentes mecanismos de ação das drogas antitumorais, como por exemplo, a cisplatina (GONZALEZ et al., 2001). A apoptose é uma resposta normal do processo fisiológico das células e atua como um importante mecanismo de defesa que promove seletivamente a remoção de células danificadas, que são indesejáveis ao organismo (WANG et al., 2014). Por este motivo, drogas que tenham como mecanismo de ação a indução de apoptose são desejáveis.

Através da coloração Laranja de Acridina/ Brometo de Etídeo foi possível identificar os padrões de morte celulares induzidos, diferenciando células viáveis, apoptóticas, necróticas e autofágicas, pois a coloração de acridina também é muito útil para mostrar vacúolos ácidos que são específicos de autofagia (SOARES et al., 2012).

Nas células de GBM não tratadas (controle), o núcleo e o citoplasma aparecem com coloração verde homogênea, indicativo de células saudáveis. Na figura 23, observou-se que as células T98 tratadas com os compostos Rudppb e Rudppe não radioativos apresentaram cromatina condensada, com o núcleo verde brilhante e ausência de coloração alaranjada, mostrando que a membrana continuou íntegra, sinais característicos de apoptose em fase inicial. Já no tratamento com compostos Rudppf e Rudppp, observou-se a coloração avermelhada em grande parte das células, sugestivo de células necróticas, demonstrando que houve entrada do corante brometo de etídeo através da membrana lesada. Também, algumas células T98, tratadas com o composto Rudppp, apresentaram vacúolos ácidos, sugerindo autofagia.

Em células U87 tratadas com os compostos Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp foram observadas alterações características de autofagia, que são os vacúolos ácidos (alaranjados) indicando a presença de autofagolisossomos, organelas encontradas no citoplasma celular durante o processo de morte autofágica.

Por outro lado, no tratamento radioativo (Figura 24), tanto nas células T98 quanto nas U87 observou-se em sua maioria a presença de células com membrana íntegra, cromatina condensada e núcleo verde brilhante, sugerindo apoptose em fase inicial.

Através destes resultados, sugere-se que CFRs são capazes de induzir morte por apoptose e autofagia em células tumorais, da mesma forma que outros quimioterápicos já utilizados na prática clínica. Porém, testes mais específicos devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

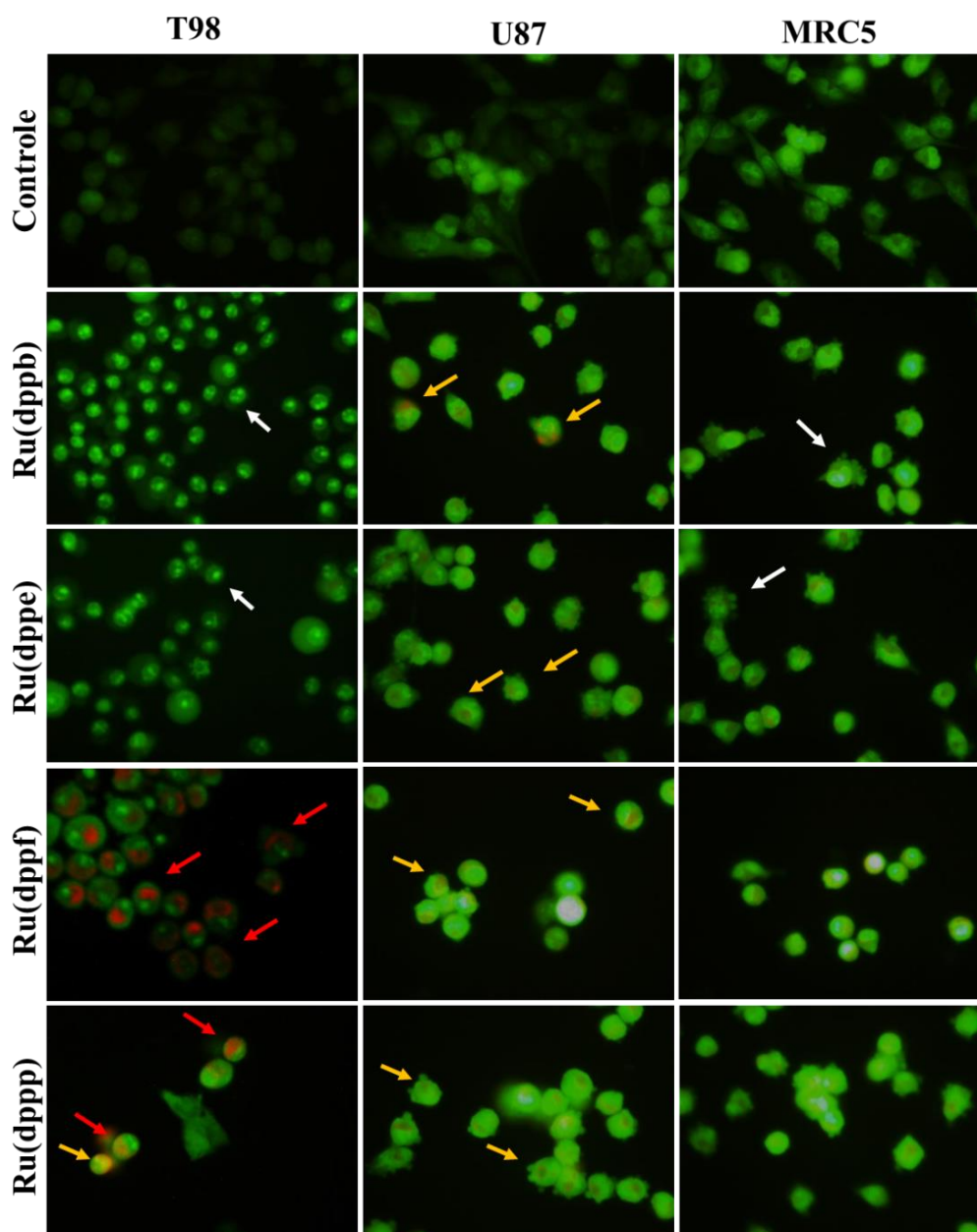


Figura 23: Análise do tipo de morte induzido nas células T98, U87 e MRC5 tratadas com CFRs (Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp) não radioativo. As células foram coradas com Laranja de Acridina/Brometo de etídeo, após 24h de tratamento com CFRs ($10\mu\text{mol.L}^{-1}$). As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao microscópio óptico de fluorescência (Aumento: 400x). Células viáveis (apresentam

núcleo uniformemente verde brilhante), células em fase inicial de apoptose (setas brancas - indicam corpos apoptóticos e condensação de cromatina), células autofágicas (setas amarelas – indicam autofagolisossomos) e presença de algumas células necróticas (setas vermelhas – indicam células avermelhadas) puderam ser observadas.

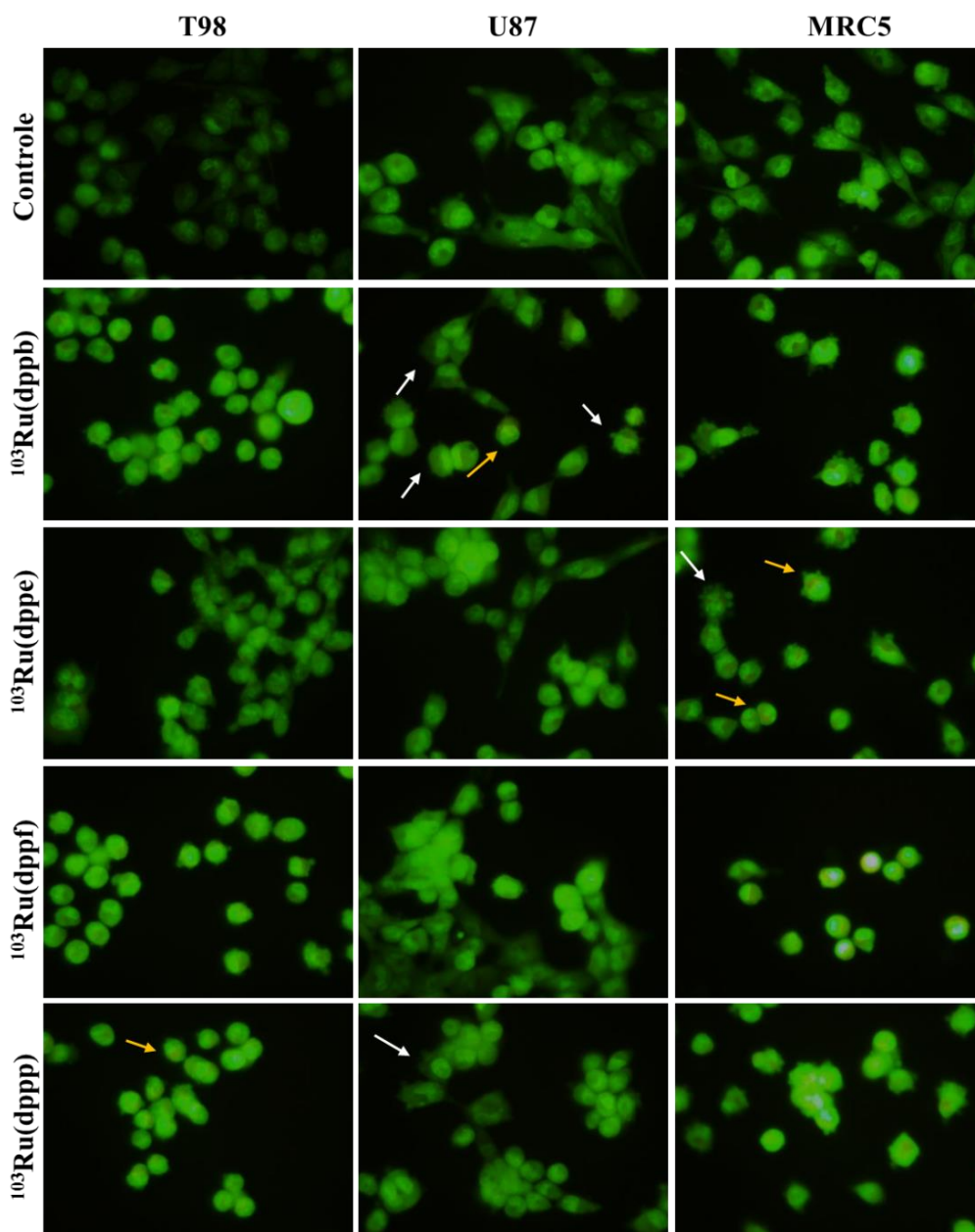


Figura 24: Análise do tipo de morte induzido nas células T98, U87 e MRC5 tratadas com CFRs ($^{103}\text{Ru}(\text{dppb})$, $^{103}\text{Ru}(\text{dppe})$, $^{103}\text{Ru}(\text{dppf})$ e $^{103}\text{Ru}(\text{dppp})$) Radioativo. As células foram coradas com Laranja de Acridina/Brometo de etídeo, após 24h de tratamento com CFRs Radioativo ($10\mu\text{mol.L}^{-1}$). As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao microscópio óptico de fluorescência (Aumento: 400x). Células viáveis (apresentam núcleo uniformemente verde brilhante), células em fase inicial de

apoptose (setas brancas) e células autofágicas (setas amarelas – indicam vacúolos ácidos) foram observadas.

A hipótese de que indução de apoptose pode ser um dos mecanismos de ação de complexos de rutênio (II) é compartilhada por vários autores. Por exemplo, no estudo realizado por Qian, et al. (2013), foram testados 4 diferentes compostos ($[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PAIDH})]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{PAIDH})]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{dmp})_2(\text{PAIDH})]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{dip})_2(\text{PAIDH})]^{2+}$) em células tumorais cervicais, hepáticas e de pulmão e os autores concluíram que estes compostos apresentaram atividade citotóxica e foram capazes de induzir apoptose nestas linhagens celulares através de avaliação pela coloração Laranja de acridina/Brometo de etídeo e por citometria de fluxo. Por outro lado, Zhang, et al. (2015) demonstraram que o complexo de rutênio $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{adpa})](\text{PF}_6)_2$ foi capaz de induzir apoptose em células de carcinoma gástrico humano.

5.2.5. Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

O ensaio com 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) foi realizado para analisar a capacidade dos compostos 1, 2, 3 e 4 de gerarem espécies reativas de oxigênio. Após 24 h de tratamento com os CFRs não radioativos (Figura 25) e radioativos (Figura 27) observou-se que as células de GBM apresentaram níveis significativamente aumentados de ROS em relação ao controle. Vale ressaltar também que, o aumento dos níveis de ROS nas células de GBM, sugere que o estresse oxidativo induzido pelo tratamento com os CFRs não radioativos e radioativos pode, parcialmente, ser responsável pela morte celular por apoptose.

Sabe-se que a radiação ionizante, *per si*, é capaz de induzir a produção de ROS, através da disfunção mitocondrial, porém por mecanismos que ainda não foram esclarecidos (KOBASHIGAWA et al., 2011). Este fato sugere que, pode ter havido um efeito aditivo, de geração de ROS, no tratamento com os CFRs radioativos, pois o efeito indutor de ROS da radiação ionizante somou-se ao efeito dos CFRs que também foram capazes de gerar ROS.

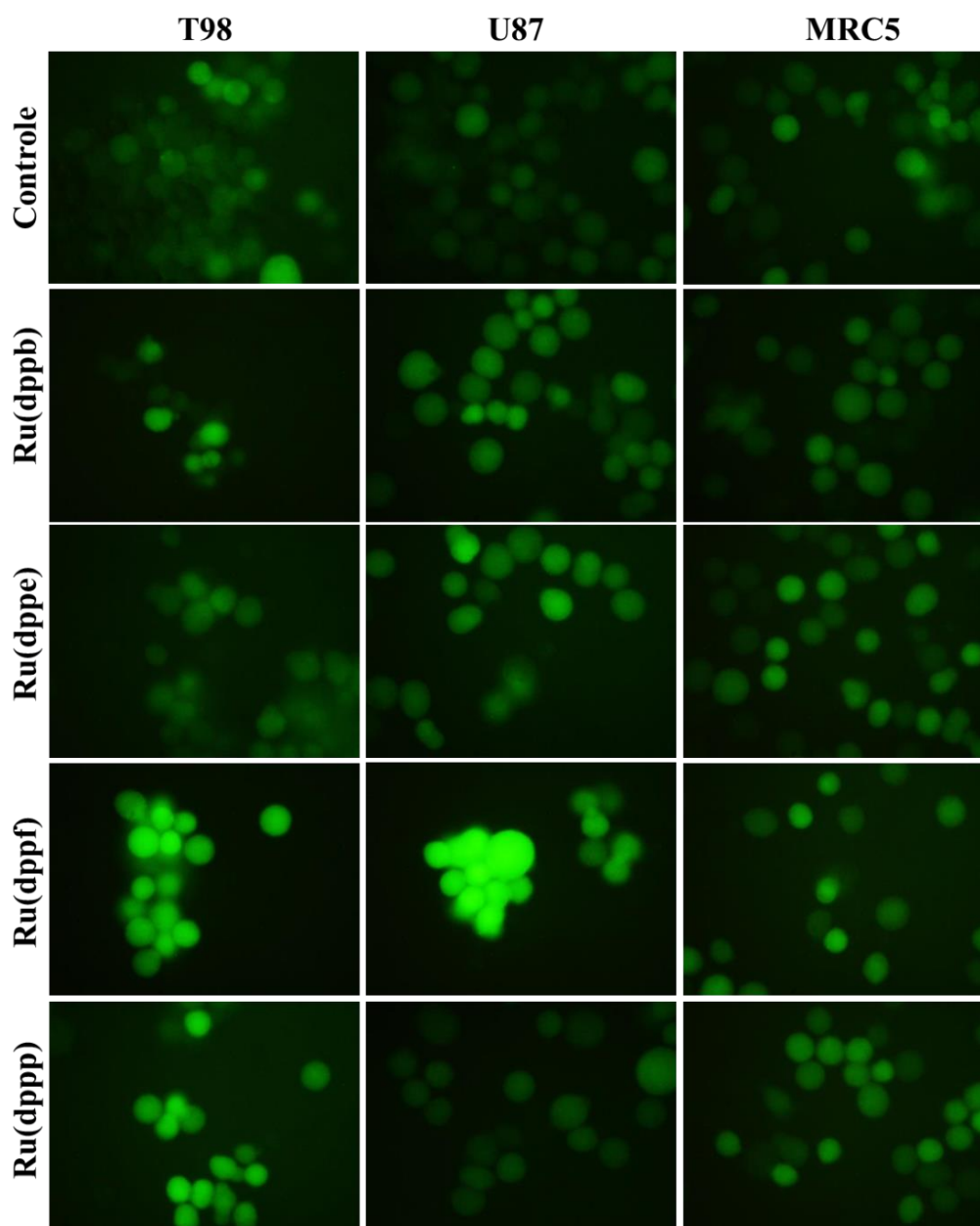


Figura 25: Geração de espécies reativas de oxigênio nas células T98, U87 e MRC5 tratadas com CFRs (Rudppb, Rudppe, Rudppf e Rudppp) não radioativo. As células foram coradas com DCF, após 24h de tratamento com CFRs não Radioativo ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$). As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao microscópio óptico de fluorescência (Aumento: 400x). Células tratadas apresentaram aumento da intensidade de fluorescência.

Através da quantificação do ROS pelo *software* Imaje J, observou-se que todos os compostos, na concentração de $10 \mu\text{M}$, induziram maiores níveis de ROS nas células U87 que nas células T98 (Figura 26). Apenas o composto Rudppe mostrou que os efeitos não foram significativamente diferentes em ambas as células. Os compostos

Rudppb e Rudppe também induziram níveis de ROS semelhantes, quando foram comparados com as células de fibroblastos MRC5, pois apesar de maiores em células de GBM, não foram significativamente diferentes. No entanto, os compostos Rudppf e Rudppp induziram menores níveis de ROS em células MRC5 que em células T98 ($p < 0,05$) e U87 ($p < 0,05$).

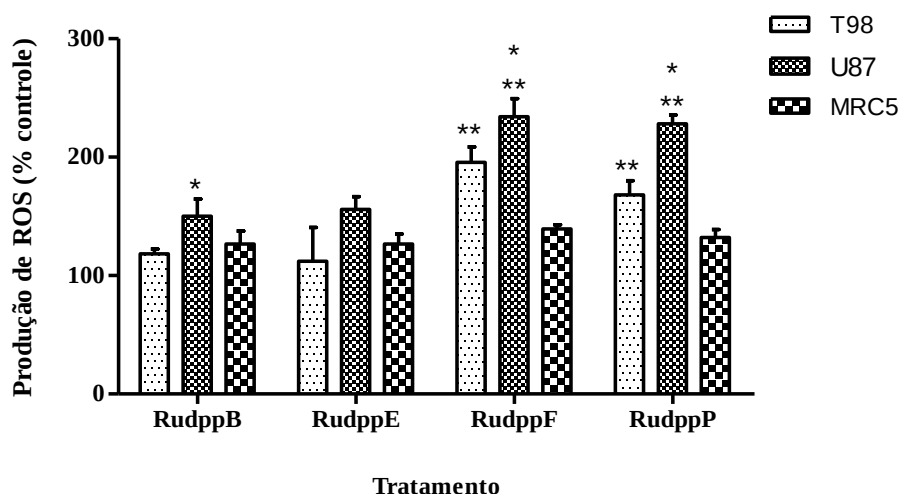


Figura 26: Produção de ROS em linhagens celulares de GBM e células de fibroblastos (MRC5) tratadas com $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dos CFRs não radioativos, por 24h. Os valores são expressos como médias $\pm$ desvio padrão (em porcentagem). * Diferença em relação a T98, ** Diferença em relação a MRC5; ($p < 0,05$).

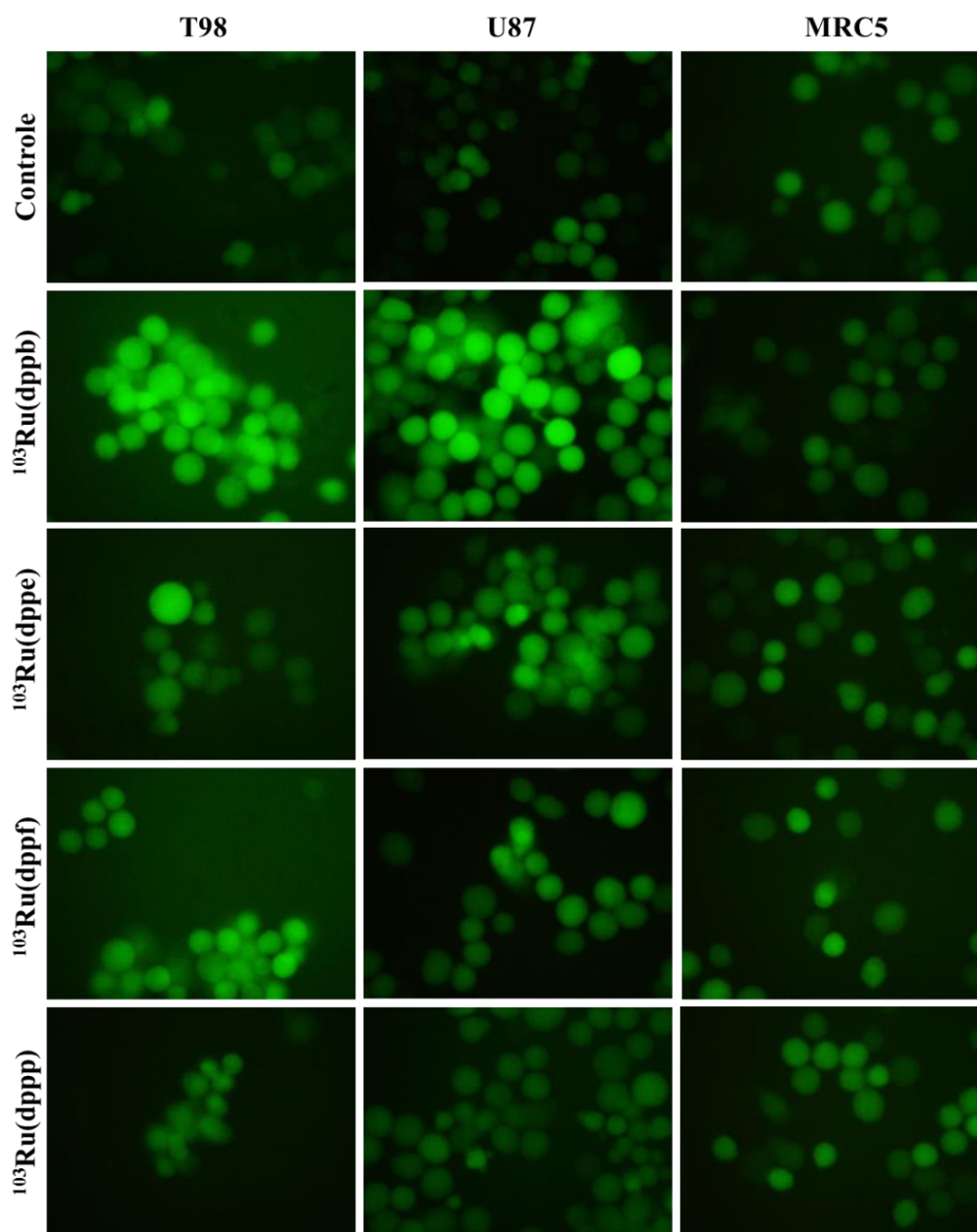


Figura 27: Análise de produção de espécies reativas de oxigênio nas células T98, U87 e MRC5 tratadas com CFRs ($^{103}\text{Ru}(\text{dppb})$, $^{103}\text{Ru}(\text{dppe})$, $^{103}\text{Ru}(\text{dppf})$ e $^{103}\text{Ru}(\text{dppp})$) Radioativo. As células foram coradas com DCF, após 24h de tratamento com CFRs Radioativo ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$). As imagens foram obtidas pela câmera fotográfica (Nikon) acoplada ao microscópio óptico de fluorescência (Aumento: 400x). Células tratadas apresentaram aumento da intensidade de fluorescência.

Em relação aos níveis de ROS gerados no tratamento radioativo (Figura 28), verificou-se que todos os compostos produziram maiores níveis de ROS em células de GBM. Porém, o aumento de ROS nas células tratadas com o composto Rudppe não foi estatisticamente diferente. Geração de espécies reativas de oxigênio pode ativar morte

celular via proteína p53 e, interessante todos os compostos não radioativos e radioativos induziram níveis de ROS mais elevados em células U87 que em células T98. Importante ressaltar também que, a geração de ROS é também um dos efeitos indiretos causados pela radiação ionizante, produto da radiólise da água presente nas células e outras moléculas oxidáveis. A figura 28 mostra que os compostos $^{103}\text{Rudppb}$ e $^{103}\text{Rudppf}$ induziram maiores níveis de ROS.

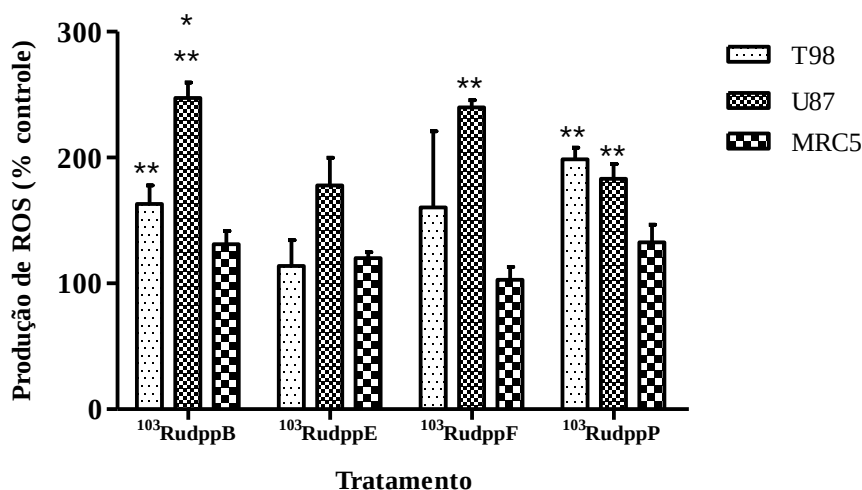


Figura 28: Produção de ROS em linhagens celulares de GBM e células de fibroblastos (MRC5) tratadas com $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dos CFRs radioativos, por 24h. Os valores são expressos como médias $\pm$ desvio padrão (em porcentagem). * Diferença em relação a T98, ** Diferença em relação a MRC5; ($p < 0,05$).

Para avaliar se os compostos radioativos provocaram maior produção de ROS, comparou-se a geração de ROS nas linhagens celulares tratadas com os CFRs não radioativos e radioativos (Figuras 29, 30 e 31). Constatou-se que apenas o tratamento com o composto Rudppb radioativo produziu significativamente níveis mais elevados de ROS em células de GBM, enquanto os outros compostos induziram efeitos similares. E ainda sobre este composto, observou-se que os níveis de ROS foram ainda maiores em células U87, que apresentam p53 nativa.

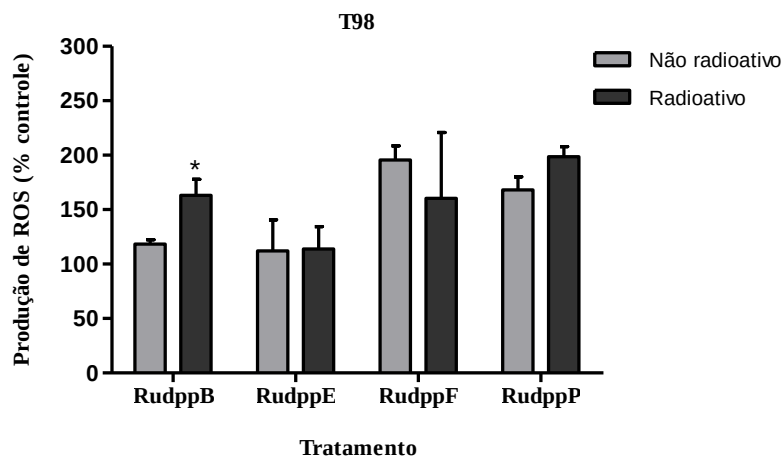


Figura 29: Produção de ROS em células T98 tratadas ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) dos CFRs não radioativos e radioativos, por 24h. Os valores são expressos como médias $\pm$ desvio padrão (em porcentagem). * Diferença entre os tratamentos não-radioativos e radioativos $p < 0,05$.

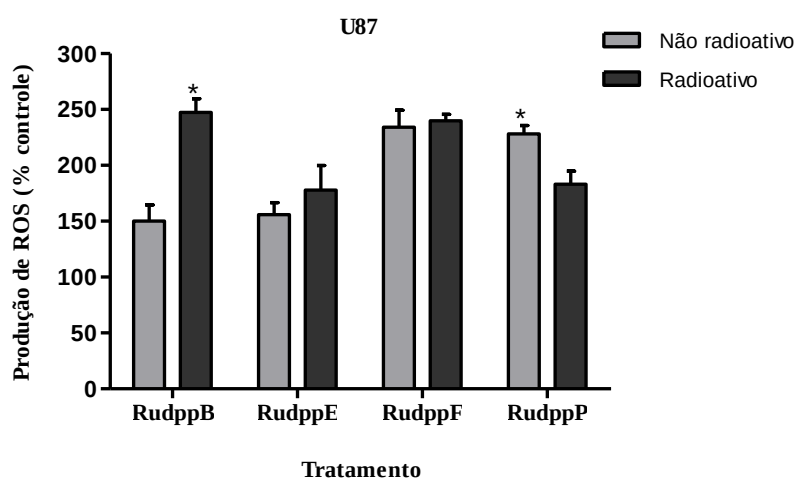


Figura 30: Produção de ROS em células U87 tratadas ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) dos CFRs não radioativos e radioativos, por 24h. Os valores são expressos como médias $\pm$ desvio padrão (em porcentagem). * Diferença entre os tratamentos não-radioativos e radioativos $p < 0,05$.

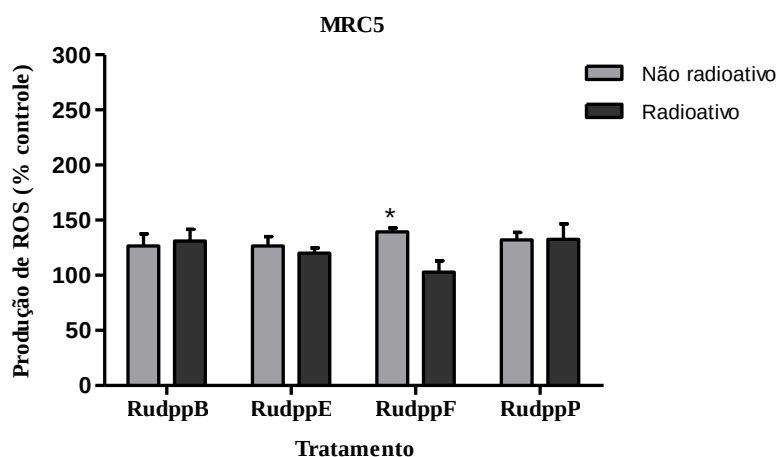


Figura 31: Produção de ROS em células MRC5 tratadas (10 μ M) dos CFRs não radioativos e radioativos, por 24h. Os valores são expressos como médias $\pm$ desvio padrão (em porcentagem). * Diferença entre os tratamentos não-radioativos e radioativos $p < 0,05$.

A geração de ROS e os danos por elas causados, não são diretamente responsáveis por causar a morte celular. ROS desencadeiam uma cascata de sinalização celular que então é capaz de induzir a morte por apoptose ou autofagia (OZBEN, 2007; DEWAELE et al., 2010). Os CFRs foram capazes de induzir geração de ROS em células de GBM, podendo sugerir que a morte por apoptose e autofagia também estão associados ao estresse oxidativo induzido por estes compostos. Nossos resultados corroboram com outros estudos, que demonstraram a correlação entre geração de ROS e atividade antitumoral de complexos de rutênio (QIAN et al., 2013; JIANG et al., 2014)

6. CONCLUSÃO

- ✓ Todos os CFRs testados apresentaram citotoxicidade contra células tumorais de GBM, tanto em U87 quanto em T98, demonstrando eficácia e independência do “status” do gene TP53. Sendo que, os compostos [Ru(pic)(bipy)(dppf)]PF6 (3) e [Ru(pic)(bipy)(dppp)]PF6 (4) apresentaram maior atividade antitumoral dentre todos com compostos testados.
- ✓ Em células T98, todos os CFRs não radioativos apresentaram melhor índice terapêutico (IS) que a cisplatina.
- ✓ Os CFRs induziram alterações típicas de apoptose, sugerindo que este seja um dos mecanismos de ação destes compostos. No entanto, autofagia e necrose não podem ser descartadas.
- ✓ Os compostos radioativos foram mais citotóxicos que os seus análogos não radioativos, pois apresentaram IC₅₀ significativamente menor, demonstrando que a associação de radioisótopo ¹⁰³Ru ao composto de Ru representa um ganho de atividade, ou seja, a ativação neutrônica é capaz de aumentar ainda mais a toxicidade dos CFRs.
- ✓ Todos os compostos, não radioativos e radioativos, foram capazes de induzir altos níveis de ROS em linhagens celulares de GBM, sendo maiores em células U87. Sugerindo que o estresse oxidativo é parcialmente responsável pelas mortes por apoptose e autofagia.

7. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar outros tipos de testes, por citometria de fluxo e medida da expressão de proteínas específicas envolvidas nas vias moleculares, a fim de confirmar o mecanismo de morte por apoptose e/ou autofagia desencadeado pelos CFRs.
- ✓ Realizar novos testes *in vitro*, aplicando outros protocolos variando a dose, tempo e duração de tratamento, e a associação a outros tipos de agentes antitumorais.
- ✓ Testar os CFRs *in vivo* em modelos animais com GBM, variando as formas de tratamento e/ou utilizando-os como neoadjuvantes ou adjuvantes a outras formas de terapia.
- ✓ Avaliar os efeitos *in vivo* em modelos animais com GBM, investigando a nefrotoxicidade e neurotoxicidade dos CFR.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRD, R. E.; CUMMINGS, J.; RITCHIE¹, A. A.; MUIR, M.; MORRIS, R. E.; CHEN, H.; SADLER, P. J.; JODRELL, D. I.; In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian câncer. **British Journal of Cancer**, v. 86, p. 1652 – 1657, 2002.
- ALLAN, L. A.; CLARKE, P. R.; Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by Phosphorylation. **FEBS Journal**, v. 276, p. 6063–6073, 2009.
- ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J.; Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects. **Platinum Metals**, v. 45, n. 2, p. 62-69, 2001.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; BARRETT REINA, L. D. C.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P.; Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: <http://www.cancer.org/treatment/>
Acessado em: 20 de dezembro de 2014.
- ANDREOTTI, V.; CIRIBILLI, Y.; MONTI, P.; BISIO, A.; LION, M.; JORDAN, J.; FRONZA, G.; MENICHINI, P.; RESNICK, M. A.; INGA, A.; p53 Transactivation and the Impact of Mutations , Cofactors and Small Molecules Using a Simplified Yeast-Based Screening System. **PlosOne**, v. 6, n. 6, p. e20643, 2011.
- ANTON, K.; BAEHRING, J. M.; MAYER, T.; Glioblastoma Multiforme: Overview of current treatment and future perspectives. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 26, p. 825-853, 2012.
- ANTONARAKIS, E. S., EMADI, A.; Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.66, n.1, p.1-9, 2010.
- BARBOSA, K. B. R.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J.; Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M., DAVID, J. P.; Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BARTEK, J. Jr; NG, K.; BARTEK, J.; FISCHER, W.; CARTER, B.; CHEN, C. C.; Key concepts in glioblastoma therapy. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 83, p. 753-760, 2012.
- BASKAR, R.; LEE, K. A.; YEO, R.; YEOH, K. W.; Cancer and Radiation Therapy : Current Advances and Future Directions. **International Journal of Medicals**, v. 9, p. 193-199, 2012.
- BERGAMO, A.; GAIDDON, C.; SCHELLENS, J.H.; BEIJNEN, J.H.; SAVA, G. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives

of ruthenium drug candidates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.106, n. 1, p. 90-99, 2012.

BERTRAM, J.S.; The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, p.167-223, 2001.

BLEKER, F. E.; MOLENAAR, R. J.; LEENSTRA, S.; Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 108, p. 11-27, 2012.

BRABEC, V.; NANOVA, O.; DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. **Drug Resistance Updates**, v. 9, n. 3, p. 111-122, 2006.

CASTONGUAY, A.; DOUCET, C.; JUHAS, M.; MAYSINGER, D.; New ruthenium(II)-letrozole complexes as anticancer therapeutics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 20, p.8799-8806, 2012.

CHEN, T.; LIU, Y.; ZHENG, W. J.; LIU, J.; WONG, Y. S.; Ruthenium polypyridyl complexes that induce mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 14, p. 6366-6368, 2010.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y.; Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, n. 6, p.749-762, 2010.

COMMITTEE ON STATE OF THE SCIENCE OF NUCLEAR MEDICINE. Advancing Nuclear Medicine Through Innovation, 176 p, 2007.

CONTE-FETT, A. C.; SALLES, A.B.C.F.; A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, n. 2, p. 85-89, 2002.

De BRUIN, J.; PAUL M.; Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, p. 737-749, 2008.

DESPAIGNE, A. A. R.; SILVA, J. G.; COSTA, P. R.; SANTOS, R. G.; BERALDO, H. ROS-Mediated Cytotoxic Effect of Copper(II) Hydrazone Complexes against human Glioma Cells. **Molecules**, v. 19, p-17202-17220, 2014.

DEWAELE, M.; MAES, H.; AGOSTINIS, P.; ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy. **Autophagy**, v. 6, n. 7, p. 838-854, 2010.

ECKERMAN, K.; HARRISON, J.; MENZEL, H. G.; CLEMENT, C. H.; Compendium of Dose Coefficients based on ICRP Publication 60. **Annals of the ICRP**, v. 41, n.1, 2012.

FALK, S.; Principles of cancer treatment by radiotherapy. Surgery (Oxford), v. 24, n. 2, p. 62-65, 2003.

FAVALORO, B.; ALLOCATI, N.; GRAZIANO, V.; DI ILIO, C.; DE LAURENZI, V.; Role of apoptosis in disease. **Aging**, v. 4, n. 5, p- 330-349, 2012.

FERREIRA, S.; DORMEHL, I.; BOTELHO, M.F. Radiopharmaceuticals for bone Metastasis Therapy and Beyond: A Voyage from the past. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 27, n. 9, 2012.

FERRETTI, M.; FABBIANO, C.; BARI, M. D.; CONTE, C.; CASTIGLI, E.; SCIACCALUGA, M.; PONTI, D.; RUGGIERI, P.; RACO, A.; RICORDY, R.; CALOGERO, A.; TATA, A. M.; M2 receptor activation inhibits cell cycle progression and survival in human glioblastoma cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 17, n. 4, p. 552-566, 2013.

FILIPPIN, L. I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N. P.; XAVIER, R. M.; Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 1, p. 17-24, 2008.

FINGER, P. T.; Radioactive Plaque Therapy with Iodine-125 and Palladium-103. In: Radiotherapy of Intraocular and Orbital Tumors, **Medical Radiology**, p.45-55, 2003.

FIRESTONE, R. B.; Exploring the table of isotopes. The Berkeley laboratory isotopes project's, 2000. Disponível em: <http://ie.lbl.gov/education/isotopes.htm>. Acessado em: 06 de abril de 2015.

FLEMING, A.; TAKESHI, N.; TAMOTSU, Y.; RUBINSZTEIN, D.; Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. **Nature Chemical Biology**, v. 7, p. 9-17, 2011.

FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E. T.; BERALDO, H.; A química inorgânica da terapia do câncer. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 13-18, 2005.

GALLUZZI, L.; ABRAMS, J.M.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L.; EL-DEIRY, W.S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.O.; KEPP, O.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUN, G.; PETER, M.E.; PIACENTINI, M.; RUNBINSZTEINS, D.C.; SHI, Y.; SIMON, H.U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, p.107-120, 2012.

GONZALEZ, V. M.; FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; PEREZ, J. M. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced By Apoptosis? **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 4, p. 657-663, 2001.

GRAF, F.; FAHRER, J.; MAUS, S.; MORGENSTERN, A.; BRUCHERTSEIFER, F.; VENKATACHALAM, S.; FOTTNER, C.; WEBER, M. M.; HUELSENBECK, J.; KAINA, B.; MIEDERER, M. DNA Double Strand Breaks as Predictor of Efficacy of the Alpha-Particle Emitter Ac-225 and the Electron Emitter Lu-177 for Somatostatin Receptor Targeted Radiotherapy. **Plos One**, v. 9, n. 2, p. e88239, 2014.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B.; Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p-335-343, 2007.

HALL, E.J; GIACCIA, A.J.; **Radiobiology for the radiologist**. Lippincott Williams & Wilkins, Sixth edition, 546p, 2006.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A.; Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, p.646-674, 2011.

HE, X.; JIN, L.; TAN, L.; Dna-binding, topoisomerases I and II inhibition and in vitro cytotoxicity of ruthenium(II) polypyridyl complexes: [ru(dppz)2l](2+) (l=dppz-11-co2me and dppz). **Dalton Transactions**, v. 42, n. 24, p. 8907-8917, 2013.

HEFFETER, P.; JUNGWIRTH, U.; JAKUPEC, M.; HARTINGER, C.; GALANSKI, M.; ELBLING, L.; MICKSCHE, M.; KEPPLER, B.; BERGER, W.; Resistance against novel anticancer metal compounds differences and similarities. **Drug Resistance Updates**, v, 11, n. 1, p. 1-16, 2008.

_____, PONGRATZ, M.; STEINER, E.; CHIBA, P.; JAKUPEC, M. A.; ELBLING, L.; MARIAN, B.; KÖRNER, W.; SEVELDA, F.; MICKSCHE, M.; KEPPLER, K.; BERGER, W.; Intrinsic and acquired forms of resistance against the anticancer ruthenium compound KP1019 [Indazolium*trans*-tetrachlorobis(1H-indazole) ruthenate (III)] (FFC14A). **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic**, v. 312, p. 281-289, 2005.

HEINRICH, T.; VON POELHSITZ, G.; REIS, R. I.; CASTELLANO, E. E.; NEVES, A.; LANZMASTER, M.; MACHADO, S. P.; BATISTA, A. A.; COSTA-NETO, C. M.; A new nitrosyl ruthenium complex: synthesis, chemical characterization, in vitro and in vivo antitumor activities and probable mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3616-3622, 2011.

HORMIGO, A.; GUTIN, P. H.; RAFII, S.; Tracking normalization of brain tumor vasculature by magnetic imaging and proangiogenic biomarkers. **Cancer Cell**, v. 11, n. 1, p.6-8, 2007.

HUNTER, N.; MUIRHEAD, C. R.; Review of relative biological effectiveness dependence on linear energy transfer for low-LET radiations. **Journal of Radiological Protection**, v. 29, p.5-21, 2009.

INSTITUTO DE TRATAMENTO DO CÂNCER – ITC. Disponível em: <http://www.itcancer.com.br/tratamentos/>. Acessado em: 20 de dezembro de 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2014. **Estimativas 2014. Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: www.inca.com.br. Acesso em 01 de dezembro de 2014.

JIANG, A. G. B.; ZHENG, X.; YAO, J. H.; HANA, B. J.; LIA, W.; WANG, J.; HUANG, H. L.; LIU, Y. J.; Ruthenium(II) polypyridyl complexes induce BEL-7402 cell apoptosis by ROS-mediated mitochondrial pathway. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.141, p.170–179, 2014.

JOHNSTONE, R. W.; RUEFLI, A. A.; LOWE, S. W.; Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**, v. 108, p.153-154, 2002.

KASIBHATLA, S.; AMARANTE-MENDES, G. P.; FINNUCANE, D.; BRUNNER, T.; BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D. R.; Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. **CSH Protocols**, v. 2006, n. 3, 2006.

KALUDEROVIC, G. N.; PASCHKE, R.; Anticancer metallothrapeutics in preclinical development. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 4738-4752, 2011.

KOBASHIGAWA, S.; SUZUKI, K.; YAMASHITA, S.; Ionizing radiation accelerates Drp1-dependent mitochondrial fission, which involves delayed mitochondrial reactive oxygen species production in normal human fibroblast-like cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.4, n. 414, p.795-800, 2011.

KOSTOVA, I.; Ruthenium complexes as anticancer agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1085-1107, 2006.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; Classification of cell death recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death & Differentiation**, n.16, v.1, p. 3–11, 2009.

KRYSKO, D. V.; BERGHE, T. V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P.; Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 205-221, 2008.

LIMA, A. P.; PEREIRA, F. C., ALMEIDA, M. A. P., MELLO, F. M. S., PIRES, W. C., PINTO, T. M., DELELLA, F. K., FELISBINO, S. L., MORENO, V., BATISTA, A. A., SILVEIRA-LACERDA, E. P.; Cytotoxicity and Apoptotic Mechanism of Ruthenium(II) Amino Acid Complexes in Sarcoma-180 Tumor Cells. **PlosOne**, v. 9, n. 10, p. e105865, 2014.

LIMA, B. A. V. Avaliação das atividades citotóxicas de alguns complexos fosfínicos de Rutênio (Células tumorais MDA-MB231), 2010. **Dissertação de mestrado** – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP.

LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z. Apoptosis, autophagy and more. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p.2405-2419, 2004.

LOPEZ-MEJIA, I. C.; FAJAS, L.; Cell Cycle regulation function. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 33, p.19–25, 2015.

MANGIOLA, A.; SAULNIER, N.; DE BONIS, P.; ORTESCHI, D.; SICA, G.; LAMA, G.; PETTORINI, B. L.; SABATINO, G.; ZOLLINO, M.; LAURIOLA, L.; COLABIANCHI, A.; PROIETTI, G.; KOVACS, G.; MAIRA, G.; ANILE, C.; Gene expression profile of glioblastoma peritumoral tissue: an ex vivo study. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e57145, 2013.

MCINNES, R. R.; NUSSBAUM, R. L.; WILLARD, H. F.; **Thompson & Thompson Genética Médica**. Editora Guanabara e Koogan; 6ª ed., Rio de Janeiro, 2001

MENG, X.; LEVYA, M. L.; JENNY, M.; GROSS, I.; BENOSMAN, S.; FRICKER, B.; HARLEPP, S.; HÉBRAUD, P.; BOOS, A.; WLOSIK, P.; BISCHOFF, P.; SIRLIN, C.; PFEFFER, M.; LOEFFLER, J. P.; GAIDDON, C.; A ruthenium-containing organometallic compound reduces tumor growth through induction of the endoplasmic reticulum. **American Association for Cancer Research Journal**, v. 69, n. 13, p. 5458-5466, 2009.

MIZOGUCHI, M.; GUAN, Y.; YOSHIMOTO, K.; HATA, N.; AMANO, T.; NAKAMIZO, A.; SASAKI, T.; Clinical implications of microRNAs in human glioblastoma. **Frontiers in oncology**, v. 19, n. 3, 2013.

NATIONAL BRAIN TUMOR SOCIETY. **Understanding glioblastoma: a guide for patients and families**, 2012.

NEVES, M.; KLING, A.; OLIVEIRA, A.; Radionuclides used for therapy and suggestion for new candidates. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 266, n. 3, p. 377-384, 2005.

NORTH DAKOTA DEPARTMENT OF HEALTH (NDHEALTH). **What Is ionizing radiation?** Disponível em: <http://www.ndhealth.gov/> Acesso em 25 de janeiro de 2015

NOUAILHETAS, Y.; DE ALMEIDA, C. E. B.; PESTANA.; Apostila educativa: Radiações ionizantes e a vida. **Comissão Nacional de Energia Nuclear**. Rio de Janeiro. Disponível em: http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas/rad_ion.pdf. Acesso em: 21 de dezembro de 2014.

NÚCLEO DE AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIA EM SAÚDE - NATS, **Tratamento de glioma de alto grau: temozolomida ou nitrosuréias**. Hospital das Clínicas – Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

NUTT, C. L.; MANI, D. R.; BETENSKY, R. A.; TAMAYO, P.; CAIRNCROSS, J. G.; LADD, C.; POHL, U.; HARTMANN, C.; MCLAUGHLIN, M. E.; BATCHELOR, T. T.; BLACK, P. M.; DEIMLING, A. V.; POMEROY, S. L.; GOLUB, T. R.; LOUIS, D. N.; Gene Expression-based Classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. **Cancer Research**, v. 63, p. 1602-1607, 2003.

OKUNO, E.; Efeitos biológicos das radiações ionizantes. Acidente radiológico de Goiânia. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 185-199, 2013.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F.; Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 151-165, 2006.

ORVIG, C.; ABRAMS, M. J.; Medicinal inorganic chemistry: introduction. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2201-2204, 1999.

OZBEN, T.; Oxidative Stress and Apoptosis: Impact on Cancer Therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 9, p. 2181-2196, 2007.

PAPAGEORGIOU, K. I.; COHEN, V. M. L.; BRUNCE, M.; HUNGERFORD, J. L. Predicting local control of choroidal melanomas following ^{106}Ru plaque brachytherapy. **British Journal of Ophthalmology**, v. 95, n. 2, p. 166-170, 2011.

- PAVAN, F. R.; POELHSITZ, G. V.; DA CUNHA, L. V. P.; BARBOSA, M. I. F.; LEITE, S. R. A.; BATISTA, A. A.; CHO, S. H.; FRANZBLAU, S. G.; DE CAMARGO, M. S.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; LEITE, C. Q. F.; In vitro and in vivo activities of ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes (SCAR) against *Mycobacterium tuberculosis*. **PlosOne**, v. 8, n. 5, p. e64242, 2013.
- PE'ER, J.; Ruthenium-106 Brachytherapy. In: JAGER, M. J.; DESJARDINS, L.; KIVELÄ, T.; DAMATO, B. E. (eds): Current Concepts in Uveal Melanoma. **Dev Ophthalmol. Basel, Karger**, v. 49, p. 27–40, 2012.
- PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2005.
- POILLET-PEREZ, L.; DESPOUY, G.; DELAGE-MOURROUX, R.; BOYER-GUITTAUT, M.; Redox Biology Interplay between ROS and autophagy in cancer cells , from tumor in- itiation to cancer therapy. **Redox Biology**, v. 4, p-184-192, 2015.
- POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E.; Oxidative Stress and Cell Signalling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1163-1182, 2004.
- QIAN, C.; WANG, J. Q.; SNG, C. L.; WANG, L. L., JI, L. N., CHAO, H.; The induction of mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells by ruthenium(II) asymmetric complexes. **Metallomics**, v. 5, p. 844-854, 2013.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P K.; **Farmacologia**. 5ª ed. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2004.
- REBER, J.; HALLER, S.; LEAMON, C. P.; MEULLER, C.; ¹⁷⁷Lu-EC0800 Combined with the Antifolate Pemetrexed: Preclinical Pilot Study of Folate Receptor Targeted Radionuclide Tumor Therapy. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, n. 11, p. 2436-2445, 2013.
- REIS, J. S.; VELOSO, C. A.; MATTOS, R. T.; PURISH, S.; MACHADO, J. A. N.; Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia** , v. 52, n.7, p.1096-1105, 2008.
- RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; BENINK, H. L.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L.; Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual**, 2013.
- SILVA D. O.; Perspectives for novel mixed diruthenium-organic drugs as metallopharmaceuticals in câncer therapy. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 312-323, 2010.
- SOARES, M. A.; LESSA, J. A.; MENDES, I. C.; DA SILVA, J. G.; DOS SANTOS, R. G.; SALUM, L. B.; DAGHESTANI, H.; ANDRICOPULO, A. D.; DAY, B. W.; VOGT, A.; PESQUERO, J. L.; ROCHA, W. R.; BERALDO, H.; N⁴-Phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxicity against human tumor cells, structure-activity relationship studies and investigation on the mechanism of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3396–409, 1 jun. 2012.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE RADIOTERAPIA - SBRT. **Radioterapia**, p. 1-16, 2006

- STOJNEV, S.; RISTIÜ-PETROVIÜ, A.; JANKOVIÜ-VELIÜKOVIÜ, L.; Reactive oxygen species, apoptosis and câncer. **Vojnosanit Pregl**, v. 70, n. 7, p. 675-678, 2013.
- STRANO, S.; DELL'ORSO, S.; DIAGOSTINO, S.; FONTEMAGGI, G.; SACCHI, A.; BLANDINO, G. Mutant p53: na oncogenic transcription factor. **Oncogene**, v. 26, p.2212-2219, 2007.
- STUPP, R.; MASON, W. P.; BENT, M. J. V. D.; WELLER, M.; FISHER, B.; TAPHOORN, M. J. B.; BELANGER, K.; BRANDES, A. A.; MAROSI, C.; BOGDAHN, U.; CURSCHMANN, J.; JANZER, R. C.; LUDWIN, S. K.; GORLIA, T.; ALLGEIER, A.; LACOMBE, D.; CAIRNCROSS, G.; EISENHAEUER, E.; MIRIMANOFF, R. O.; Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p.987-996, 2005.
- TANAKA, S.; LOUIS, D. N.; CURRY, W. T.; BARCHELOR, T. T.; DIETRICH, J.; Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: no larger a dead end? **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, p. 14-26, 2013.
- THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology**, v. 279, p.1005–1028, 2000.
- VAIDYANATHAN, G.; ZALUTSKY, M. R.; Targeted therapy using alpha emitters. **Physics in Medicine and Biology**, .v. 41, p. 1915–1931, 1996.
- VOUSDEN, K.; RYAN, K. M.; p53 and metabolism. **Nature Reviews – Cancer**, v. 9, p. 691-700, 2009.
- ZANGIROLAMI, D. M.; Fluxo Neutrônico a 100kW nos terminais de irradiação do reator TRIGA IPR1, 2009. **Dissertação de mestrado** – Centro Nacional de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte - MG.
- ZHANG, C.X.; LIPPARD, S.J.; New metal complexes as potential therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 4, p. 481-489, 2003.
- ZHANG, P.; WANG, J.; HUANG, H.; QIAO, L.; JI, L.; CHAO, H.; Chiral ruthenium(ii) complexes with phenolic hydroxyl groups as dual poisons of topoisomerases I and IIα. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 135, p. 101-109, 2015.
- ZHANG, Y.; HU, P. C.; CAI, P.; YANG, F.; CHENG, G. Z.; Synthesis, characterization, crystal structure, cytotoxicity, apoptosis and cell cycle arrest of ruthenium(II) complex [Ru(bpy)2(adpa)](PF6)2 (bpy ¼ 2,20 -bipyridine, adpa ¼ 4-(4-aminophenyl)diazenylN-(pyridin-2-ylmethylene)aniline). **Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 11591-11598, 2015.
- ZHAO, J.; LU, Y.; SHEN, H.; Targeting p53 as a therapeutic strategy in sensitizing TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. **Cancer Letters**, v. 314, n. 1, p. 8-23, 2012.
- ZHOU, J., ATSINA, K. B.; HIMES B. T.; STROHBEHN, G. W.; Novel delivery strategies for glioblastoma. **Cancer Journal**, v. 18, n. 1, p, 89-99, 2012.
- WANG, X.; FENG, Y.; WANG, N.; CHEUNG, F.; TAN, H. Y.; ZHOANG, S.; LI, C.; KOBAYASHI, S.; Chinese Medicines Induce Cell Death: The Molecular and Cellular

Mechanisms for Cancer Therapy. **BioMed Research International**, v. 2014, p.1-14, 2014.

WARD, L. S.; Entendendo o processo molecular da tumorigênese. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.46, n.4, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2014. Disponível em World Health Organization, Cancer; n. 297: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em 01 de dezembro de 2014