



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA**  
**PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS (PPGFARMA)**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE COMPLEXOS**  
**INÉDITOS DE RU(II) CONTENDO TIOAMIDAS EM DIFERENTES**  
**LINHAGENS DE CÉLULAS CANCERÍGENAS**

**LUCIANO VASCONCELLOS PACHECO**

**Salvador**

**2022**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE COMPLEXOS  
INÉDITOS DE Ru(II) CONTENDO TIOAMIDAS EM DIFERENTES  
LINHAGENS DE CÉLULAS CANCERÍGENAS**

**LUCIANO VASCONCELLOS PACHECO**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Santana Meira

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Daniel Silva da Silva

Linha de Pesquisa: 001

**Salvador**

**2022**

FICHA CATALOGRÁFICA

Biblioteca Professor **Edivaldo Machado Boaventura** - UNEB – Campus I

**Bibliotecária: Célia Maria da Costa – CRB5/918**

P116a

Pacheco, Luciano Vasconcellos

Avaliação do potencial citotóxico de complexos inéditos de Ru (II) contendo tiomidas em diferentes linhagens de células cancerígenas / Luciano Vasconcellos Pacheco. – Salvador, 2022.

120 f. : il.

Orientador: Cássio Santana Meira.

Coorientador: Carlos Daniel Silva da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado da Bahia. Departamento Ciências da Vida. Campus I. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, 2022.

Contém referências, anexos.

1. Câncer. 2. Rutênio. 3. Fármacos e Medicamentos. I. Meira, Cássio Santana. II. Silva, Daniel Silva da. III. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Campus I. IV. Título.

CDD: 619



## FOLHA DE APROVAÇÃO

### "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE COMPLEXOS INÉDITOS DE RU(III) CONTENDO TIOAMIDAS"

LUCIANO VASCONCELLOS PACHECO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 30 de setembro de 2022, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:

Professor(a) Dr.(a) CASSIO SANTANA MEIRA  
Centro Universitário Maurício de Nassau - UNINASSAU  
Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa  
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

Professor(a) Dr.(a) CARLOS DANIEL SILVA DA SILVA  
Instituto Federal da Bahia - IFBA  
Doutorado em Química Inorgânica  
Universidade Federal do Ceará

Professor(a) Dr.(a) ANIBAL DE FREITAS SANTOS JUNIOR  
Universidade do Estado da Bahia - UNEB  
Doutorado em Química  
Universidade Federal da Bahia

Professor(a) Dr.(a) JAIME RIBEIRO FILHO  
Instituto Gonçalo Moniz - IGM  
Doutorado em Biologia Celular e Molecular  
Fundação Oswaldo Cruz

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a quem colaborou diretamente comigo: minha mãe, meu orientador, a UNEB e a FIOCRUZ sem os quais eu não teria concluído este projeto.

## **Agradecimentos**

Após uma jornada de extrema curiosidade, meu primeiro questionamento relevante aos 20 e muitos anos, a respeito da minha própria concepção epistemológica, foi deflagrado através da comparação de organismos biológicos com a importância do referencial na ciência. Dessa maneira, pude observar que o fato de organismos como os poríferos, a despeito de não possuírem sistema nervoso e não serem aptos a sentir dor, não anula a existência dessa experiência sensorial. Dessa forma, foi possível emular duas conclusões, a primeira de que "disponho de ferramentas limitadas de observação" e a segunda de que "sei que nada sei". Portanto, mesclando as duas conclusões parciais, estou apto a assumir que a honestidade intelectual é o alicerce para compreender tudo a nossa volta, ilustrando da melhor forma possível o meu enquadramento no agnosticismo. Dessa forma, gostaria de agradecer a toda a minha família, em especial a minha mãe, devido todos os ensinamentos e a fé que empregou em mim, por nós dois, mais especificamente. Ademais, nesse momento de eterno autoconhecimento que eu percorro, sou extremamente grato a energia universal indescritível, incompreensível e ilimitada que me faz tentar ser uma pessoa melhor, superar os desafios mais impossíveis e estar sempre fazendo autocríticas pertinentes sobre o meu modo de ser e agir. A essa energia, carinhosamente apelidada de "Numinoso", eu tento me adaptar aos caminhos que busco e que sou "buscado", por mais incompreensíveis e difíceis que podem aparentar em um primeiro momento.

Outro paradigma que sou extremamente fascinado, é o fato de que observar estrelas diz mais sobre o passado do que sobre o presente. A maneira com que a energia eletromagnética se comporta na quarta dimensão do espaço tempo é instigante e ilustra maravilhosamente como o passado interfere no presente. Dessa forma, expresso minha eterna gratidão aos meus mestres da UNEB, amigos da graduação (em especial Ginaldo Filho), amigos do Hospital (em especial Héber Chaves), amigos de vida feitos na escola (em especial Ronald e João Paulo) e todos que de alguma maneira contribuíram para formação do mosaico que sou hoje. Em especial, gostaria de evidenciar meu amor, carinho e gratidão a minha melhor amiga,

companheira, parceira, ouvinte e muito falante, conselheira, consultora em oncologia (risos), Monalisa Chaves. Esse exemplo de ser humano e mulher, me ensinou que “os problemas podem ser resolvidos juntos” assim como “os melhores momentos da vida podem ser aproveitados em parceria”. Cada um de vocês representa uma figura geométrica no Luciano atual. Ademais, agradeço ao próprio Luciano do passado, que mesmo com imensas dificuldades tomou decisões pensando no futuro e teve a sapiência de alternar avanços, paradas e, quando necessário, de recuos. Ainda como forma de gratidão, espero deixar alguma contribuição ao Luciano do futuro, sejam elas conhecimento, maturidade pessoal, maturidade emocional e o embrião da descoberta do que pode ser o sentimento “Amor”.

Como já é bem conhecido, “nada se cria tudo se transforma”, ou no meu caso, é transformado. Portanto, sempre serei grato a minha primeira orientadora, Deborah Fraga, que além de me criar cientificamente ajudou a me transformar como ser humano. Sendo assim, a levarei com eterna gratidão em cada passo que eu der e em cada vida que eu estiver apto a transformar, assim como ela transformou a minha. Sem Deborah, eu não seria quem eu sou hoje! Me sinto honrado por ter sido escolhido por esse exemplo de pesquisadora como seu estudante de iniciação científica Jr., estudante de iniciação científica e que ainda assim, me apoiou quando eu decidi trilhar outros caminhos da minha vida. Todo o amor que eu tenho pela ciência e pelo método científico hoje, foi plantado por ela, ontem.

Seguindo a evoluir e me adaptar, assumindo a idéia Darwinista de que são necessárias adaptações para sobreviver, no âmago da atualidade e da vela da ciência que continua a queimar em mim, eu agradeço imensamente ao PPGFARMA, a FIOCRUZ e, aos colegas do LETI, em especial Ivan, Gabi, Lais e aos colegas do “grupo câncer”, em especial Ana Carolina pelo auxílio nos experimentos e na elucidação das dúvidas. Sou grato imensamente ao meu orientador Cássio Meira, pela oportunidade e confiança que me foi fornecida e pelo sentimento de ter me tornando uma nova pessoa durante e ao término do meu mestrado. Esse sentimento de crescimento é fascinante. Ademais, sou imensamente feliz em ter sido agraciado com meu co-orientador Carlos Daniel, que surgiu ao longo do caminho, mas com certeza deixou uma grande contribuição para mim. Por fim, mesmo sem ter a possibilidade de nomeá-las, fico lisonjeado e feliz por todas as pessoas que

entraram na minha vida pessoal ao longo desse processo e também por todas que puderam sair.

Realizar um programa de mestrado em meio a uma pandemia e estando literalmente no *front* de combate, foi extremamente desafiador. Trabalhar em dois vínculos, totalizando mais de 70h semanais, além de ministrar aulas e afins durante todo esse período, foi mais impactante ainda. Associada a essa rotina extremamente extenuante, foi um desafio estar no laboratório às 5 horas da manhã, finais de semana feriados e pós plantões de madrugada para execução dos experimentos. Conviver e sentir todo o sofrimento direto e indireto desse período foi uma hecatombe. Nesse contexto, saio com o sentimento de que doeí sangue, lágrimas e suor ao longo do processo, e que talvez meu máximo ainda não tenha sido o suficiente (e eu sei que não foi!), necessitando crescer e me desenvolver cada vez mais. E o crescimento... geralmente, forjado sob altíssimas “temperaturas vitais, físicas e psicológicas” vem com a dor da impotência; com a perda sumária de pessoas amadas ao longo do processo; com a dúvida sobre a percepção acerca da realidade e das relações interpessoais; com as oscilantes sensações de medo e abandono; com o receio referente a certeza ou incerteza das decisões tomadas; com sentimento de que, por mais que queiramos controlar as variáveis, nem todas elas são controláveis; com o estado mental de confusão, no qual nos colocamos e permitimos nos colocar, gerando um quadro desesperador de inércia; com a exposição à “inequidade de primeira ordem” de terceiros; e com a perene “síndrome do impostor” castigando o nosso ego. Nesse sentido, o Numinoso vem a queimar o desejo de sair da inércia do sentimento de impotência, de ressignificar processos, eventos, momentos, decisões e pessoas, de cultivar laços engrandecedores, honrar aqueles que dizem “estou aqui para resolver nossos problemas”; contrapor a “inequidade de primeira ordem” com a “inequidade de segunda ordem” e simplesmente olhar a vida sob outra óptica, e dessa forma, seguir em frente. Entretanto sem nunca esquecer das três classes de pessoais, escolhas e variáveis: As que ficam com você nos momentos difíceis, as que te abandonam nos momentos difíceis e as que te colocam nos momentos difíceis. A ascensão vem por meio do Numinoso, quando conseguimos entender que o feito pode ser melhor que o perfeito. Dessa forma, temos que agradecer também a todas as dificuldades,

desafios, intempéries e pessoas que transformaram o processo em algo ainda mais doloroso, desafiador e sofrível. Pois, só depois de morrer, uma Fênix pode renascer.

Como de costume, e abandonando uma espécie de niilismo do parágrafo anterior, gostaria de citar duas frases do cientista (Carl Sagan) que mais me influenciou na minha "filosofia" científica e consequentemente, na minha forma de enxergar e analisar a vida, o universo, as relações interpessoais e sobretudo o pragmatismo das escolhas, o que às vezes é muito indigesto para mim mesmo. Infelizmente, não o conheci de maneira física, mas através da maior invenção humana, que foi a escrita e da segunda maior invenção, a internet. Dessa forma, “Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo é um prazer dividir um planeta e uma época com vocês”. Associado a primeira, por fim, deixo a segunda citação: "Em algum lugar algo incrível está esperando para ser descoberto". Seja lá o que for esse algo, seguirei, junto às pessoas amadas, como água ao longo desse caminho. A forma mais perfeita do estado da matéria, fluida, suave, veloz e extremamente adaptável. Seja água, meu amigo!

## **Epígrafe**

“Um modelo é uma mentira que ajuda a ver a  
verdade”

-Howard Skipper

## Sumário

|                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Introdução.....                                                    | 19  |
| 2. Objetivos.....                                                     | 22  |
| Geral.....                                                            | 22  |
| Específicos .....                                                     | 22  |
| 3. Fundamentação Teórica .....                                        | 23  |
| 3.1 Biologia do câncer .....                                          | 23  |
| 3.2 Epidemiologia.....                                                | 30  |
| 3.3 Leucemias .....                                                   | 34  |
| 3.4 Terapias contra o câncer.....                                     | 38  |
| 3.5 Complexos de rutênio .....                                        | 43  |
| 4. Materiais e métodos .....                                          | 49  |
| 4.1 Obtenção dos complexos estudados .....                            | 49  |
| 4.2 Síntese e caracterização dos análogos de rutênio .....            | 51  |
| 4.3 Obtenção e Manutenção das Células em Cultura .....                | 52  |
| 4.4 Avaliação de atividade hemolítica.....                            | 53  |
| 4.5 Avaliação de citotoxicidade com Alamar Blue .....                 | 54  |
| 4.6 Índice de seletividade.....                                       | 55  |
| 4.7 Ensaio de exclusão com azul de tripam.....                        | 56  |
| 4.8 Ensaio de terapia combinada.....                                  | 56  |
| 4.9 Quantificação de espécies reativas de oxigênio intracelular ..... | 57  |
| 4.10 Análise estatística .....                                        | 58  |
| 5. Resultados e Discussão .....                                       | 59  |
| 6. Conclusões.....                                                    | 76  |
| Referências .....                                                     | 77  |
| Anexos.....                                                           | 86  |
| Anexo A. Comprovante de submissão do artigo.....                      | 86  |
| Anexo B. Cópia do artigo científico .....                             | 87  |
| Anexo C. Informações de apoio.....                                    | 111 |

## Lista de Siglas

|                         |                                                                              |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AINES</b>            | Anti-inflamatórios não esteroidais                                           |
| <b>AKT/PKB</b>          | Via de sinalização da proteína quinase B                                     |
| <b>ANOVA</b>            | <i>Analysis of variance</i>                                                  |
| <b>ATCC</b>             | <i>American Type Culture Collection</i>                                      |
| <b>ATO</b>              | <i>Arsenic trioxide</i>                                                      |
| <b>ATPase</b>           | Adenosinatrifosfatase                                                        |
| <b>ATRA</b>             | <i>All trans retinoic acid</i>                                               |
| <b>Bax</b>              | Bcl-2 proteína X associada. Do inglês: <i>Bcl-2 Associated X Protein</i>     |
| <b>Bcl2</b>             | <i>B-cell CLL/lymphoma</i>                                                   |
| <b>BCRP</b>             | <i>Breast-cancer-resistance protein</i>                                      |
| <b>bFGF</b>             | Fator de crescimento de fibroblasto básico                                   |
| <b>Bim</b>              | <i>Activator subtype of BH3-only proteins</i>                                |
| <b>Bpy</b>              | 2,2'-bipiridina                                                              |
| <b>CAT</b>              | Catalase                                                                     |
| <b>CCNS</b>             | Ciclo celular não específico                                                 |
| <b>CCS</b>              | Ciclo celular específico                                                     |
| <b>CDK4</b>             | Quinase dependente de ciclina 4. Do inglês: <i>Cyclin-dependent kinase 4</i> |
| <b>CC<sub>50</sub></b>  | Concentração citotóxica de 50%                                               |
| <b>CI<sub>50</sub></b>  | Concentração inibitória de 50%                                               |
| <b>DIIHA</b>            | Anemia hemolítica                                                            |
| <b>DMSO</b>             | Dimetilsulfóxido                                                             |
| <b>DNA</b>              | Ácido desoxirribonucléico                                                    |
| <b>DNMT</b>             | DNA metiltransferase                                                         |
| <b>DOX</b>              | Doxorrubicina                                                                |
| <b>E2F</b>              | <i>E2 promoter binding factor</i>                                            |
| <b>ECM</b>              | Matriz extracelular                                                          |
| <b>EMT</b>              | Transição epitelial mesenquimal                                              |
| <b>ERCC1</b>            | <i>Excision Repair 1, Endonuclease Non-Catalytic Subunit</i>                 |
| <b>ERO</b>              | Espécies reativas de oxigênio                                                |
| <b>FAB</b>              | Classificação franco-américo-britânica                                       |
| <b>FIC<sub>50</sub></b> | <i>Fractional inhibitory concentration</i>                                   |
| <b>GST</b>              | Gene supressor de tumor                                                      |

|                             |                                               |
|-----------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>GTPase</b>               | Trifosfato de guanosina hidrolase             |
| <b>H<sub>2</sub>-DCF-DA</b> | Diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína   |
| <b>HCV</b>                  | Vírus da hepatite C                           |
| <b>HDAC</b>                 | Histonas desacetilases                        |
| <b>HIV</b>                  | Vírus da imunodeficiência humana              |
| <b>HPV</b>                  | Papiloma vírus humano                         |
| <b>HTP</b>                  | Derivados de hemato porforínicos              |
| <b>IC</b>                   | Índice de combinatório                        |
| <b>IS</b>                   | Índice de seletividade                        |
| <b>INCA</b>                 | Instituto Nacional do Câncer                  |
| <b>LMA</b>                  | Leucemia mielóide aguda                       |
| <b>LMA-M3</b>               | Leucemia mielóide aguda subtipo M3            |
| <b>LPA</b>                  | Leucemia promielocítica aguda                 |
| <b>MAP Kinase</b>           | <i>Mitogen-activated protein kinase</i>       |
| <b>mg</b>                   | Miligrama                                     |
| <b>ml</b>                   | Mililitro                                     |
| <b>MRP</b>                  | <i>Multidrug-resistance-related protein</i>   |
| <b>mTOR</b>                 | <i>Mamalian target of rapamycin</i>           |
| <b>NAC</b>                  | N-acetil-L-cisteína                           |
| <b>NER</b>                  | Excisão de nucleotídeos                       |
| <b>NIH</b>                  | <i>National institute of health</i>           |
| <b>NRF2</b>                 | <i>Nuclear factor 2</i>                       |
| <b>OMS</b>                  | Organização Mundial de Saúde                  |
| <b>P-gp</b>                 | <i>P-glycoprotein</i>                         |
| <b>Phen</b>                 | 1,10-fenantrolina                             |
| <b>PI</b>                   | Iodeto de propídio                            |
| <b>PI3K</b>                 | Fosfoinositideo-3-quinase                     |
| <b>PML</b>                  | <i>Promyelocytic leukemia</i>                 |
| <b>PUMA</b>                 | <i>P53 upregulated modulator of apoptosis</i> |
| <b>RAF</b>                  | <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>       |
| <b>RAR</b>                  | Receptor do ácido retinóico                   |
| <b>RAS</b>                  | <i>Rat sarcoma vírus</i>                      |
| <b>Rb</b>                   | <i>Retinoblastoma protein</i>                 |
| <b>RNA</b>                  | Ácido ribonucléico                            |

|              |                                                    |
|--------------|----------------------------------------------------|
| <b>RNAse</b> | Ribonuclease                                       |
| <b>Ru</b>    | Rutênio                                            |
| <b>SOD</b>   | Superóxido Dismutase                               |
| <b>TAM</b>   | <i>Macrophages associated with the tumor</i>       |
| <b>TP53</b>  | Proteína de tumor 53                               |
| <b>VEGF</b>  | Fator de crescimento endotelial vascular           |
| <b>XPF</b>   | <i>Endonucleases xeroderma pigmentosum group F</i> |

## **Lista de Figuras**

- Figura 1 –** Fases de formação do câncer (Página 24).
- Figura 2 –** As oito marcas do câncer (Página 25).
- Figura 3 –** Dinâmica da metástase (Página 30).
- Figura 4 –** Clivagem de DNA plasmidial (Página 48).
- Figura 5 –** Estrutura química dos complexos metálicos avaliados (Página 50).
- Figura 6 –** Determinação da viabilidade celular com azul de tripam (Página 64).
- Figura 7 –** Isoblograma demonstrando o efeito sinérgico entre FOR0212A e a doxorrubicina na proliferação de células HL-60 (Página 68).
- Figura 8 –** Determinação da atividade hemolítica (Página 71).
- Figura 9 –** Quantificação da produção de ERO (Página 73).

## Lista de Tabelas

- Tabela 1 –** Incidência e óbitos em decorrência dos principais tipos de câncer
- Tabela 2 –** Principais agentes quimioterápicos e sua atuação no ciclo celular.
- Tabela 3 –** Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade para determinação de  $CI_{50}$ .
- Tabela 4 –**  $CI_{50}$  dos compostos x linhagens celulares estudadas.
- Tabela 5 –** Índice de seletividade dos complexos metálicos estudados.
- Tabela 6 –**  $CI_{50}$  e índice combinatório da doxorrubicina e do FOR0212A em células HL-60.

## Resumo

PACHECO, L. V. **Avaliação do potencial citotóxico de complexos inéditos de Ru(II) contendo tioamidas em diferentes linhagens de células cancerígenas** (dissertação). Salvador: Departamento de Ciências da Vida (DCV), Universidade do Estado da Bahia, 2022; 120p.

**Introdução:** O câncer é definido como uma doença multifatorial sendo iniciada por mutações genéticas que causam um descontrole em vários aspectos celulares, incluindo a proliferação. As leucemias constituem um grupo de tumores malignos caracterizadas pelo acúmulo de leucócitos disfuncionais no tecido sanguíneo e na medula óssea. A quimioterapia apresenta papel fundamental no tratamento dos cânceres, entretanto apresenta limitações associadas à toxicidade e casos emergentes de resistência ao tratamento. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos, e nesse contexto a utilização de complexos de rutênio (Ru) tem demonstrado resultados promissores. **Objetivos:** O trabalho visa avaliar o potencial citotóxico de complexos de rutênio Ru(II) contendo tioamidas inéditos. **Materiais e Métodos:** A citotoxicidade dos quatro complexos de rutênio contendo tioamidas foram testados contra 10 linhagens de células cancerígenas de diferentes tipos histológicos e uma linhagem não cancerígena através do ensaio do Alamar Blue. O ensaio para avaliação do sinergismo foi realizado dispondo da associação do FOR0212A com a doxorrubicina em diferentes proporções (1:1, 2:1 e 1:2) sendo mensurado pelo ensaio de Alamar Blue. Posteriormente, células HL-60 foram incubadas por 24 e 48 horas com diferentes concentrações do FOR0212A e o número de células viáveis foi determinado pelo ensaio de exclusão com o azul de tripam. Para o ensaio de hemólise, os complexos FOR0212A, FOR0012A, FOR020 e FOR000 (12,5; 25 e 50  $\mu\text{M}$ ), foram incubados com suspensão de eritrócitos por 1 hora. A solução de saponina a 1% foi utilizada como controle positivo, e o PBS 1x contendo 0,5% (v/v) de DMSO foi utilizado como controle negativo. O ensaio foi quantificado por espectrofotometria (540nm). Para quantificar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), as células foram tratadas com o FOR0212A dispondo do reagente diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>-DCF-DA) e adquiridas em citometro de fluxo. **Resultados:** Quando avaliada a citotoxicidade, observou-se que o FOR0212A e o FOR0012A apresentaram atividade citotóxica para todas as linhagens cancerígenas testadas. A linhagem HL-60 foi a mais sensível para os dois complexos metálicos, sendo obtidos  $\text{CI}_{50}$  de 1,5  $\mu\text{M}$  ( $\pm 0,3$ ) e 5,7  $\mu\text{M}$  ( $\pm 0,9$ ), respectivamente. Foi demonstrado índice de seletividade relevante da FOR0212A (6,6) quando avaliada a razão de citotoxicidade entre as células normais (MRC-5) e a célula cancerígena (HL-60). Observou-se sinergismo entre a FOR0212A e a doxorrubicina, frente modelo celular com HL-60, apresentando índice combinatório de 0,27 ( $\pm 0,09$ ). Associado a isso, o isoblograma evidenciou pontos abaixo da linha isobolográfica, o que sugere a ocorrência de efeito sinérgico. Ademais, os complexos FOR0212A e FOR0012A, ambas na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , evidenciaram atividade hemolítica de 21% ( $\pm 1,0$ ) e 1% ( $\pm 0,8$ ), respectivamente. Enquanto isso, a doxorrubicina, na concentração de 20  $\mu\text{M}$  apresentou 13% ( $\pm 0,8$ ) de hemólise. Por fim, foi observada elevação da produção de ERO's, induzida pelo tratamento por 1 hora, com o FOR0212A na concentração de 3  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ). **Conclusão:** O presente estudo permitiu observar efeito citotóxico com boa seletividade para o FOR0212A e para o FOR0012A. Ademais, visualizou-se efeito sinérgico do complexo FOR0212A com a doxorrubicina, fármaco já utilizado no tratamento da LPA, baixa atividade hemolítica nas concentrações citotóxicas e aumento da produção de ERO como um dos prováveis mecanismos de morte celular.

**Palavras-chave:** Câncer; *In vitro*; Rutênio; Sinergismo; Desenvolvimento de fármacos; Citotoxicidade.

## Abstract

PACHECO, L. V. **Evaluation of the cytotoxic potential of unpublished Ru(II) complexes containing thioamides in different cancer cell lines** (dissertation). Salvador: Department of Life Sciences, Bahia State University, 2022; 120p.

**Introduction:** Cancer is defined as a multifactorial disease being initiated by genetic mutations that cause a lack of control in several cellular aspects, including proliferation. Leukemias are a group of malignant tumors characterized by the accumulation of dysfunctional leukocytes in blood tissue and bone marrow. Chemotherapy plays a fundamental role in the treatment of cancers, however it has limitations associated with toxicity and emerging cases of resistance to treatment. Thus, it is necessary to develop new drugs, and in this context the use of ruthenium (Ru) complexes has shown promising results. Objectives: The work aims to evaluate the cytotoxic potential of ruthenium Ru(II) complexes containing new thioamides. **Materials and Methods:** The cytotoxicity of four ruthenium complexes containing thioamides were tested against 10 cancer cell lines of different histological types and one non-cancerous cell line using the Alamar Blue assay. The assay to assess synergism was performed using the association of FOR0212A with doxorubicin in different proportions (1:1, 2:1 and 1:2) being measured by the Alamar Blue assay. Subsequently, HL-60 cells were incubated for 24 and 48 hours with different concentrations of FOR0212A and the number of viable cells was determined by the trypan blue exclusion assay. For the hemolysis assay, the FOR0212A, FOR0012A, FOR020 and FOR000 complexes (12.5; 25 and 50  $\mu\text{M}$ ) were incubated with erythrocyte suspension for 1 hour. 1% saponin solution was used as a positive control, and 1x PBS containing 0.5% (v/v) DMSO was used as a negative control. The assay was quantified by spectrophotometry (540nm). To quantify the levels of reactive oxygen species (ROS), the cells were treated with FOR0212A using the reagent 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>-DCF-DA) and acquired in a flow cytometer. **Results:** When cytotoxicity was evaluated, it was observed that FOR0212A and FOR0012A showed cytotoxic activity for all cancer cell lines tested. The HL-60 strain was the most sensitive for the two metal complexes, with IC<sub>50</sub> of 1.5  $\mu\text{M}$  ( $\pm$  0.3) and 5.7  $\mu\text{M}$  ( $\pm$  0.9), respectively. A relevant selectivity index of FOR0212A (6.6) was demonstrated when the cytotoxicity ratio between normal cells (MRC-5) and cancer cells (HL-60) was evaluated. Synergism was observed between FOR0212A and doxorubicin, in front of a cell model with HL-60, with a combinatorial index of 0.27 ( $\pm$  0.09). Associated with this, the isobologram showed points below the isobolographic line, which suggests the occurrence of a synergistic effect. Furthermore, the FOR0212A and FOR0012A complexes, both at a concentration of 50  $\mu\text{M}$ , showed hemolytic activity of 21% ( $\pm$  1.0) and 1% ( $\pm$  0.8), respectively. Meanwhile, doxorubicin, at a concentration of 20  $\mu\text{M}$ , showed 13% ( $\pm$  0.8) of hemolysis. Finally, an increase in ROS production was observed, induced by treatment for 1 hour, with FOR0212A at a concentration of 3  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** The present study allowed us to observe a cytotoxic effect with good selectivity for FOR0212A and FOR0012A. In addition, a synergistic effect of the FOR0212A complex with doxorubicin, a drug already used in the treatment of APL, low hemolytic activity at cytotoxic concentrations and increased ROS production as one of the probable mechanisms of cell death.

**Keywords:** Cancer; *In vitro*; Ruthenium; Synergism; Drug development; Cytotoxicity.

## 1. Introdução

O câncer é definido como uma doença multifatorial sendo iniciada por mutações genéticas que causam um descontrole em vários aspectos celulares, incluindo a proliferação. As células neoplásicas presentes em um câncer apresentam baixo grau de diferenciação, em contrapartida, os tumores benignos por sua vez, apresentam células bem diferenciadas semelhantes ao tecido normal (SANTOS, 2017). A formação das neoplasias acontece de forma lenta e progressiva, podendo ser didaticamente dividida nas fases de iniciação, promoção e progressão (SPANDIDOS, 2007).

O câncer figura entre as principais causas de morte no mundo apresentando mais de 18 milhões de novos casos anuais e quase 10 milhões de óbitos por ano (NIH, 2020). Estima-se que ao final das duas próximas décadas esses números podem aumentar em até 60% (THEODORATOU *et al.*, 2017; BRAY *et al.*, 2018; INCA, 2019; NIH, 2020).

As leucemias constituem um grupo dentre os diversos tipos de cânceres e são caracterizadas pelo acúmulo de leucócitos malignos no tecido sanguíneo e na medula óssea. Dentre os tipos de leucemias, tem-se a leucemia mieloide aguda (LMA) que é a forma mais comum de leucemia aguda em adultos (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2011). Referente a LMA, a Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), apresenta grande relevância clínica e é caracterizada pela translocação t(15;17) em cerca de 90% dos casos, apresentando maior frequência em adultos jovens (DOUER, 2003).

A quimioterapia é utilizada em diferentes situações clínicas, sendo elas: o tratamento de indução primária para a doença avançada, o tratamento neoadjuvante e o tratamento adjuvante, com intuito de destruir as células neoplásicas preservando as normais, dispondo da administração de fármacos com potencial anticâncer (RODRIGUES *et al.*, 2012). Entretanto, os efeitos adversos e casos de resistência à quimioterapia são fatores limitantes do tratamento (WANG; ZHANG; CHEN, 2019; HERRMANN, 2020).

Nesse contexto, a utilização de complexos metálicos que contenham o rutênio (Ru) como átomo central tem sido largamente estudada e apresentam resultados promissores no tratamento do câncer colorretal, câncer de ovário, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer de mama, dentre outros (SAVA *et al.*, 1998; KOSTOVA, 2006; BRABEC e NOVÁKOVÁ, 2006; BERGAMO e SILVA, 2007; MEGGERS, 2007; WEISS *et al.*, 2014; BIANCALANA; PAMPALONI; MARCHETTI, 2017; ALESSIO e MESSORI, 2019). Achados como: diferente espectro de atividade anticancerígena, quando comparado aos complexos da platina; menor toxicidade que os complexos da platina; ausência de resistência cruzada com os complexos da platina; notável atividade antimetastática e anti-angiogênica e aumento da expectativa de vida em indivíduos com câncer, são outras características que alicerçam os complexos de rutênio como um interessante objeto de estudo para terapia anticancerígena.

Corroborando com o parágrafo anterior, parâmetros cinéticos e dinâmicos também estimulam e reforçam a necessidade de pesquisas com os complexos de rutênio. Primeiramente, cabe citar que a similaridade entre o rutênio e o ferro reduz a toxicidade devido ligação com moléculas biológicas, tal como a transferrina. Ademais, a nível extracelular, o rutênio permanece em seu estado de oxidação de Ru(III) relativamente inativo, em ambiente intracelular, em especial das células neoplásicas, que apresentam níveis de oxigênio e pH inferiores ao tecido saudável, ocorre a redução para o estado de oxidação +2, a forma ativa do metal.

Estudos prévios do nosso grupo, dispondo de um dos complexos avaliados no presente trabalho, apontaram potencial antitumoral para complexos de rutênio(II) apresentando clivagem de DNA (SILVA, 2017). Os complexos utilizados nesse estudo tratam-se de compostos inéditos de Rutênio, o que confere caráter inovador para realização de novos estudos de citotoxicidade, segurança e até mesmo de novas formulações considerando os resultados obtidos.

Sendo assim, devido alta a morbimortalidade do câncer, é fundamental a realização de estudos que forneçam alicerce teórico para novos quimioterápicos com melhor perfil de segurança, efetividade, estabilidade e seletividade de maneira que, possam ser utilizados em monoterapia ou em terapia combinada.

## 2. Objetivos

### Geral

Avaliar o potencial citotóxico de complexos de rutênio Ru(II) inéditos contendo tioamidas em diferentes linhagens de células cancerígenas

### Específicos

- Avaliar a seletividade dos complexos de rutênio contendo tioamidas em um painel de células cancerígenas *versus* células não-cancerígenas;
- Mensurar o efeito da associação do complexo mais ativo com a doxorrubicina em linhagem cancerígena mais sensível;
- Investigar a atividade hemolítica associada ao uso dos complexos metálicos de Ru(II) em linhagem cancerígena mais sensível;
- Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio induzida pelo complexo mais ativo em linhagem cancerígena mais sensível.

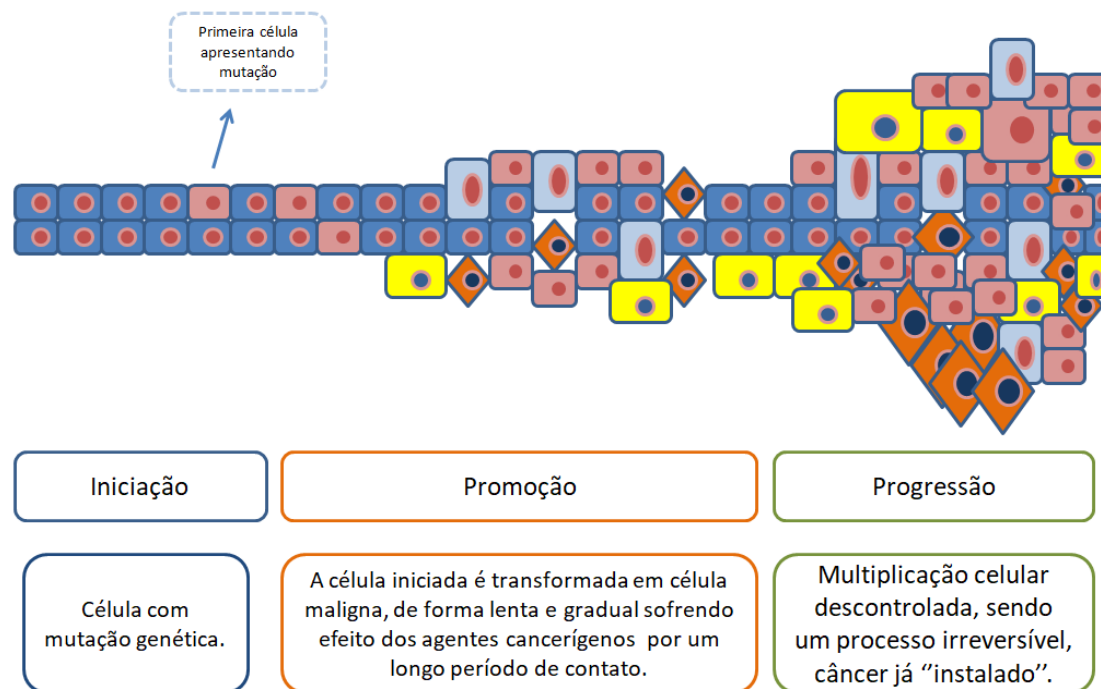
### 3. Fundamentação Teórica

#### 3.1 Biologia do câncer

O câncer é uma doença correlacionada com o descontrole na proliferação celular. As células cancerígenas são células transformadas que detêm uma série de alterações genéticas adquiridas e/ou herdadas, permitindo a formação de neoplasias. Acrescido a isso, devido sua complexidade, os cânceres apresentam associação com os fatores do hospedeiro e a forma como qual interage com o ambiente externo (CREE, 2011; INCA, 2019). Sendo assim, o consumo de substâncias encontradas em carnes processadas, produtos em conserva, alimentos industrializados em geral, bem como agrotóxicos, poluição do ar, excesso de exposição ao sol, sedentarismo, stress, tabagismo podem ser elencados como fatores de risco (CREE, 2011; AVGERINOS *et al.*, 2019; INCA, 2019).

O processo de formação do câncer, chamado carcinogênese acontece de forma lenta e progressiva, e pode ser dividido em três fases antes de chegar ao câncer detectável, sendo elas iniciação, promoção e progressão (SPANDIDOS, 2007). Na fase de iniciação, as células sofrem o efeito de um agente carcinogênico que modifica a estrutura e/ou expressão de alguns de seus genes. Na fase de promoção, as células alteradas geneticamente sofrem o efeito dos agentes carcinogênicos classificados como oncopromotores sendo transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual, dispondo de contato contínuo com o agente carcinogênico promotor.

Por fim, a fase de progressão caracteriza-se pela multiplicação celular descontrolada, sendo um processo irreversível, na qual o câncer já está instaurado e culminará no surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (SANTOS, 2017). O processo da formação do câncer é demonstrado na **Figura 1**.



**Figura 1.** Fases da formação do câncer. Fonte: Autoria própria (2021).

Ao longo do processo de transformação das células normais para um estado neoplásico, uma inter-relação de pelo menos seis características marcantes é elencada, de maneira que, o processo de várias etapas da patogênese do câncer pode ser racionalizado pela necessidade das células cancerígenas incipientes em adquirir as características que permitem que eles se tornem tumores clinicamente relevantes (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011).

Dentre as seis capacidades distintas e complementares que permitem o crescimento do câncer e a disseminação metastática podem-se citar: a sustentação da sinalização proliferativa, a resistência à morte celular programada (apoptose), a indução a angiogênese, a insensibilidade aos supressores do crescimento, a invasibilidade tecidual/ocorrência de metástases, e a imortalidade replicativa (CREE, 2011; HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). Associado a isso, duas novas características emergentes também podem ser citadas, sendo elas a desregulação do

metabolismo celular energético e a resistência a destruição pelo sistema imunológico (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011), As oito marcas do câncer são ilustradas na **Figura 2**.



**Figura 2.** As oito marcas do câncer. Fonte: Autoria própria (2021).

Antagonizando o mecanismo de controle de produção e liberação de sinais de promoção de crescimento, exercido pelos tecidos normais, as células cancerígenas são capazes de sustentar a proliferação de forma crônica (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). Estratégias como a autoprodução de fatores de crescimento; o aumento da expressão de receptores aos fatores de crescimento; a desregulação de mecanismos negativos de feedback; e a sinalização para células normais produzirem fatores de

crescimento são adotadas pelas células cancerígenas para o seu crescimento e multiplicação (CHENG *et al.*, 2008).

Em contraponto, o câncer tem seu tamanho restrito na ausência de suprimento sanguíneo adequado. Dessa forma, devido à constante multiplicação celular, há a necessidade de que vasos sanguíneos sejam formados para que haja a nutrição destas células, em um processo denominado angiogênese (ALMEIDA *et al.*, 2005). Sendo assim, a produção e liberação de citocinas pró-angiogênicas, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) é um achado característico em neoplasias. Tais mediadores químicos estimulam a formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares existentes e de precursores de células endoteliais circulantes, o que auxilia no processo de proliferação (JAIN *et al.*, 2009).

A oncoproteína RAS é um achado comum que propicia a proliferação crônica das células malignas, de maneira que sofre perda da atividade de sua GTPase intrínseca e consequente transdução de sinal desregulado para várias vias mitogênicas, como as vias MAP *kinase* e PI3K anulando o seu papel no feedback negativo referente a proliferação celular (RELÓGIO *et al.*, 2014; STOUT *et al.*, 2014). Em contraponto, sob elevado estímulo da oncoproteína RAS, MYC ou RAF, a célula cancerígena pode ser induzida a um estado de senescência, mantendo a viabilidade, mas não sendo proliferativa, o que pode se configurar como um aspecto de resistência das células cancerígenas (EVAN; D'ADDA DI FAGAGNA, 2009; COLLADO e SERRANO, 2010; HANAHAN e WEINBERG, 2011). Outro exemplo envolve a proteína quinase mTOR, responsável pelo crescimento celular regulando a via PI3K. A perda do feedback negativo resulta no aumento da atividade de PI3K e seu efetor Akt/PKB, atenuando assim os efeitos antiproliferativos da inibição de mTOR (SUDARSANAM e JOHNSON, 2010).

A insensibilidade aos supressores do crescimento, apresentada pelas células cancerígenas, contrasta com a necessidade fisiológica das células normais em realizar esse controle dispondo de mecanismos transitórios ou

permanentes (CREE, 2011). Muitos dos programas de controle de crescimento celular dependem das ações de genes supressores de tumor (GST), de maneira que, existem dezenas de supressores de tumor que operam de várias formas distintas para limitar o crescimento e a proliferação celular (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). Exemplos de GST são os genes RB e TP53 que codificam as proteínas Rb e a p53, respectivamente. Essas proteínas atuam como controladores centrais e complementares nos programas de regulação do crescimento celular, o que pode culminar na senescência ou ativação de programas apoptóticos (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011).

A proteína Rb integra sinais de diversas fontes extracelulares e intracelulares, de maneira que, inibe a função do fator de transcrição E2F, que é essencial para a proliferação. Ademais, os anti-oncogenes p15 e p16 operam por meio dessa via, assim como a ciclina quinase cdk4, e existe uma ligação importante com o p53 (SHERR e MCCORMICK, 2002; BURKHART e SAGE, 2008; CREE, 2011; HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). O TP53 é considerado o principal “guardião do genoma” e atua como um sensor de stress e anormalidades dos sistemas intracelulares, de maneira que pode interromper a progressão do ciclo celular (VOUSDEN e LANE, 2007; HANAHAHAN e WEINBERG, 2011). A expressão de p53 é desencadeada por estímulos, tais como: dano ao DNA, estresse oxidativo, depleção de proteínas de choque térmico e por oncogenes ativados, culminando na interrupção do crescimento celular, geralmente via p21 ou até mesmo na indução a apoptose (CREE, 2011).

A apoptose é um processo fisiológico, que também pode ocorrer em situações patológicas, em geral, dependente de proteínas conhecidas como caspases (NORBURY e HICKSON, 2001). Dentre as vias dependentes das caspases, o mecanismo pode ser hegemonicamente segregado em duas vias, a intrínseca e a extrínseca (IGNEY e KRAMMER, 2002). Quando ativadas, a via intrínseca (respondendo a sinais de origem intracelular) e a extrínseca (atuando nos sinais extracelulares de morte extracelular)

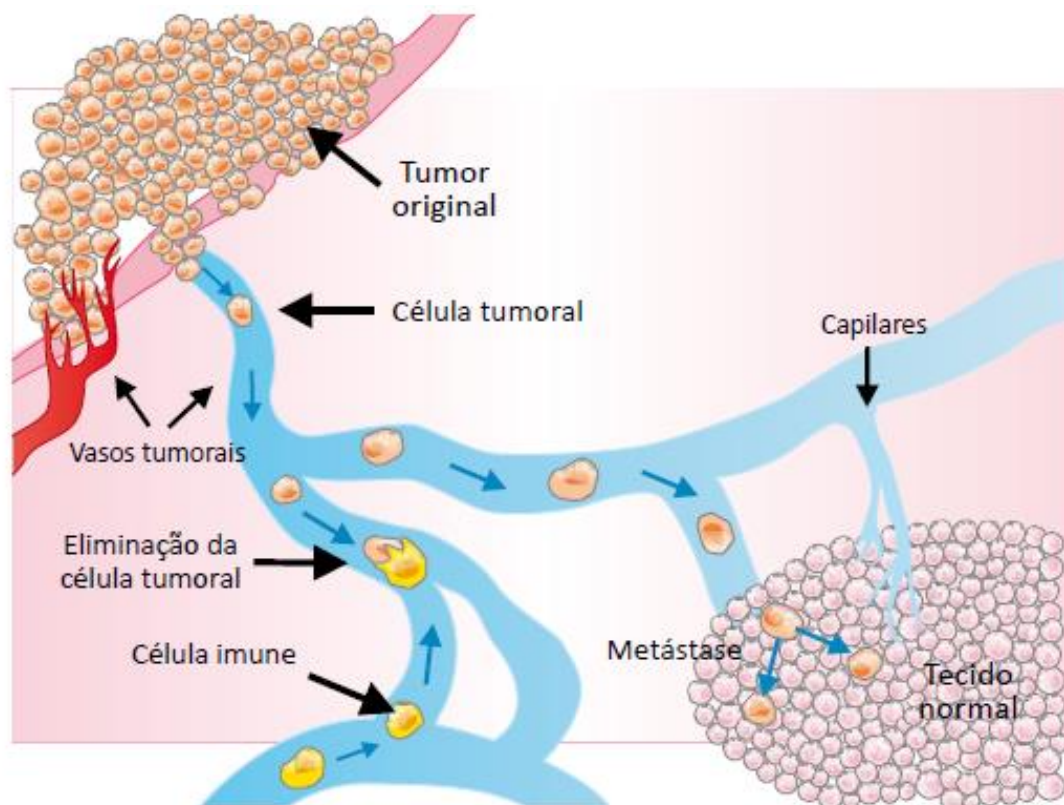
culminam na ativação das caspases iniciadoras 8 e 9, respectivamente, iniciando uma cascata proteolítica envolvendo as caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7) responsáveis pela fase de execução da via apoptótica (ELMORE, 2007).

É sabido que via intrínseca está mais bem definida como uma barreira para a patogênese do câncer, entretanto nas células cancerígenas, tanto a via intrínseca quanto a via extrínseca quase sempre estão afetadas (ADAMS e CORY, 2007). Referente à via intrínseca, além da TP53 que induz a apoptose por regulação positiva da expressão das proteínas Noxa e Puma (dois membros da família Bcl2 que são pró-apoptóticos) condições como a hiper-sinalização induzida por algumas oncoproteínas, como MYC, podem desencadear a apoptose (ELMORE, 2007; JUNTILA e EVAN, 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Entretanto, é possível observar nas células cancerígenas diversas estratégias que permitem evadir o mecanismo apoptótico, tais como: a perda da função supressora do TP53; aumento da expressão de reguladores anti- apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>) ou de sinais de sobrevivência (Igf1/2); regulação negativa dos fatores pró-apoptóticos (Bax, Bim, Puma); e em alguns casos até mesmo pela indução à autofagia, apesar de não se conhecer completamente o papel da autofagia no câncer (WHITE e DIPAOLA, 2009; HANAHAN e WEINBERG, 2011; ANTUNES *et al.*, 2018).

As células malignas provocam lesões nos tecidos adjacentes, gerando processos inflamatórios e dor, podendo se espalhar por todo o corpo dispondo de vasos sanguíneos e dos vasos linfáticos (em menor proporção), por um processo chamado de metástase (ROSAS *et al.*, 2013). Apesar do processo de metástase não ser totalmente elucidado, alguns mecanismos são associados com a sua ocorrência (HANAHAN e WEINBERG, 2011). A metástase proveniente dos carcinomas de tecidos epiteliais tem relação com a alteração na forma das células cancerígenas, ligação a outras células e a matriz extracelular (ECM), por meio da perda da caderina-E, uma molécula chave de adesão célula a célula, pelas células do

carcinoma (BERX e VAN ROY, 2009; HANAHAN e WEINBERG, 2011). eEssa alteração é encontrada no padrão histológico típico de cânceres conhecido como processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT). Esta mudança na arquitetura tecidual do câncer possibilita a produção de células mesenquimais aptas à migração, a partir do rompimento das ligações e adesões de células epiteliais (PIACENTINI e MENEZES, 2012). Ademais, genes associados com a migração celular, tais como o da caderina-N estão superexpressos em carcinomas invasivos (CAVALLARO e CHRISTOFORI, 2004). Alterações nos micro-RNAs também podem ser citadas, de forma que, a perda de expressão da família miR-34 foi associada à metástase (ROKAVEC *et al.*, 2014).

Por fim, a metástase e consequente colonização de um novo sítio não é um processo totalmente eficiente, visto que, muitas das células cancerígenas que conseguem se deslocar de um sítio primário para um secundário sofrem apoptose dentro de 24 horas (KIM *et al.*, 2004). A expansão de macrometástases é a consequência de um processo metastático bem-sucedido. Os novos focos servem de sítios para a dispersão de metástases secundárias, de maneira que, essas novas macrometástases podem agora tornar-se capacitadas para colonizar diferentes tecidos (PIACENTINI e MENEZES, 2012). A dinâmica do processo de metástase é demonstrada na **Figura 3**.



**Figura 3.** Dinâmica da metástase. Fonte: Retirado de INCA (2012).

No de 2022, em nova publicação, Hanahan elevou dois marcadores emergentes como marcadores clássicos, sendo eles: a “inflamação promovida pelo tumor” e a “instabilidade genômica e mutação”. Ademais, o mesmo trabalho incorpora mais 2 marcadores emergentes: “desbloqueio de plasticidade fenotípica” e “reprogramação epigenética não mutacional”, além de duas “características de habilitação”, sendo elas: “microbiomas polimórficos” e “células senescentes” (HANAHAN, 2022).

### 3.2 Epidemiologia

O câncer configura-se como um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, de maneira que se encontra dentre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países (INCA, 2019). Associado a isso, é observado aumento gradativo da incidência e da mortalidade, o que pode ser explicado por diversos fatores,

tais como o envelhecimento, o crescimento populacional e a mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco do câncer, especialmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico (INCA, 2019).

No que diz respeito ao envelhecimento existe correlação direta com o diagnóstico para diferentes tipos de câncer e varia ao longo da vida de um indivíduo. O risco acumulado para todos os cânceres combinados aumenta com a idade até 70 anos, em seguida diminui ligeiramente e para a população total dos EUA, o risco ao longo da vida de ser diagnosticado com câncer é de aproximadamente 41% (HOWLADER *et al.*, 2012). Ao longo do processo de envelhecimento o acúmulo de danos ao DNA e mutações, juntamente com interrupções no reparo do DNA e no sistema de regulação do crescimento celular predispõe a transformação de células normais em células cancerígenas (WHITE *et al.*, 2014).

Além da idade, outros fatores e condições estão relacionados ao câncer. Em uma revisão sistemática com metanálise, o tabagismo, incluindo a exposição passiva ao tabaco e a ingestão de grãos inteiros apresentaram elevada associação com o câncer de pulmão e o câncer colorretal, respectivamente (THEODORATOU *et al.*, 2017). Referente ao consumo de álcool, apesar de ainda ser uma discussão em aberto, e diversas variáveis como a periodicidade e o nível de ingestão alterar os desfechos de associação com o câncer, níveis crescentes de ingestão de álcool foram associados ao risco aumentado de câncer do trato aerodigestivo superior, boca, faringe, esôfago, colorretal, cólon, fígado e mama (SARICH *et al.*, 2020). Infecções virais, também apresentam associação com aumento do risco para diversos tipos de cânceres de forma que, o vírus da hepatite C (HCV) tem associação com acometimentos hepáticos; o vírus do papiloma humano (HPV) aumenta o risco de câncer anal, cervical, vaginal, vulvar e peninano; e o vírus da imunodeficiência humana (HIV), talvez devido à disfunção do sistema imune, apresenta associação com câncer hepático, Linfoma de Hodgkin e câncer anal (DEEKS, 2011; CDC, 2012; SMITH *et al.*, 2012).

Doenças e condições crônicas, como obesidade e diabetes têm sido associadas ao aumento do risco de câncer e redução da sobrevida (WHITE *et al.*, 2014). O diabetes tipo 2 está associado a um risco aumentado de desenvolver câncer de cólon, mama (pós-menopausa) e pâncreas (CANNATA *et al.*, 2010; LA *et al.*, 2011). Há evidências de que o excesso de peso corporal, por meio de inúmeros mecanismos biológicos diretos e indiretos, está associado a um risco aumentado de câncer, em diversos grupos etários e gêneros, incluindo adenocarcinomas endometrial, esofágico, renal e pancreático; carcinoma hepatocelular; câncer cardíaco gástrico; meningioma; mieloma múltiplo; câncer colorretal, de mama pós-menopausa, de ovário, de vesícula biliar e de tireóide (AVGERINOS *et al.*, 2019). Associado a isso, a obesidade e o excesso de peso corporal influem na ocorrência de síndrome metabólica, que também tem sido associada ao aumento do risco de câncer (CASPERSEN *et al.*, 2012; TRINCHIERI *et al.*, 2012; WHITE *et al.*, 2014; AVGERINOS *et al.*, 2019).

No mundo, no ano de 2018, o câncer figurou dentre as principais causas de morte apresentando 18,1 milhões de novos casos e 9,5 milhões de óbitos (NIH, 2020). Estima-se que o número de casos de câncer diagnosticados no mundo pode aumentar para 24 milhões até 2035, e em 2040 espera-se que o número de novos casos de câncer por ano aumente para 29,5 milhões e o número de mortes relacionadas ao câncer para 16,4 milhões (THEODORATOU *et al.*, 2017; BRAY *et al.*, 2018; NIH, 2020). Nos Estados Unidos, no ano de 2020, o câncer de mama, o câncer de pulmão e brônquio, o câncer de próstata, o câncer de cólon e reto, o melanoma de pele, o câncer de bexiga, o linfoma não-Hodgkin, o câncer de pelve, o câncer de endométrio, a leucemia, o câncer de pâncreas, o câncer de tireóide e o câncer de fígado, foram os que apresentaram maiores incidências, em ordem decrescente (NIH, 2020).

Considerando as mulheres, os três cânceres mais comuns, que representaram 50% dos diagnósticos, foram os cânceres de mama, pulmão e colorretal, enquanto para os homens os cânceres de próstata, pulmão e

colorretal foram responsáveis por cerca de 43% de todos os cânceres diagnosticados em 2020 (NIH, 2020). A taxa de mortalidade por câncer foi maior entre os homens do que entre as mulheres (189,5 por 100.000 homens e 135,7 por 100.000 mulheres). E ao se comparar os grupos com base em raça/etnia e sexo, a mortalidade por câncer foi mais alta em homens afro-americanos (227,3 por 100.000) e menor em mulheres das Ilhas da Ásia/Pacífico (85,6 por 100.000). Por fim, os gastos estimados para tratamento do câncer nos Estados Unidos em 2018 foram de US \$ 150,8 bilhões (NIH, 2020).

No Brasil, a distribuição da incidência por região geográfica mostra que a região Sudeste concentra mais de 60% da incidência seguidas pelas Regiões Nordeste (27,8%) e Sul (23,4%) (INCA, 2019). Existe, entretanto, grande variação na magnitude e nos tipos de câncer entre as diferentes regiões do Brasil. Nas regiões Sul e Sudeste, o padrão da incidência mostra que predominam os cânceres de próstata e mama feminina, bem como o de pulmão e de intestino. Em contraponto, nas regiões Norte e Nordeste, a incidência do câncer do colo do útero e de estômago tem impacto importante, apesar de também apresentarem os cânceres de próstata e mama feminina como principais nessa população. Ademais, estima-se que no Brasil, ocorrerão 625 mil casos novos de câncer no triênio 2020-2022 por ano, de maneira que, o câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2019).

Dados recentes de Sung *et al.* (2021), no ano de 2020 elencam a incidência e mortalidade dos principais tipos de cânceres no mundo. Os dados são evidenciados na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Incidência e óbitos em decorrência dos principais tipos de câncer.

| Local do câncer           | Número de novos casos (%) | Número de novos óbitos (%) |
|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Câncer de mama (mulheres) | 2.261.419 (11,7)          | 684.996 (6,9)              |
| Pulmão                    | 2.206.771 (11,4)          | 1.796.144 (18,0)           |
| Próstata                  | 1.414.259 (7,3)           | 375.304 (3,8)              |
| Pele (não melanoma)       | 1.198.073 (6,2)           | 63.731 (0,6)               |
| Cólon                     | 1.148.515 (6,0)           | 576.858 (5,8)              |
| Estômago                  | 1.089.103 (5,6)           | 768.793 (7,7)              |
| Fígado                    | 905.677 (4,7)             | 830.180 (8,3)              |
| Reto                      | 732.210 (3,8)             | 339.022 (3,4)              |
| Colo do útero             | 604.127 (3,1)             | 341.831 (3,4)              |
| Esôfago                   | 604.100 (3,1)             | 544.076 (5,5)              |
| Tireóide                  | 586.202 (3,0)             | 43.646 (0,4)               |
| Bexiga                    | 573.278 (3,0)             | 212.536 (2,1)              |
| Linfoma não Hodgkin       | 544.352 (2,8)             | 259.793 (2,6)              |
| Pâncreas                  | 495.773 (2,6)             | 466.003 (4,7)              |
| Leucemias                 | 474.519 (2,5)             | 311.594 (3,1)              |

Fonte: Adaptado de Sung *et al.*, (2021).

### 3.3 Leucemias

#### 3.3.1 Leucemia Mielóide Aguda (LMA)

As leucemias correspondem a um grupo de doenças neoplásicas, caracterizadas pelo acúmulo de leucócitos malignos no tecido sanguíneo e na medula óssea (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2011). Dessa forma, tais células hematopoiéticas progenitoras imaturas atuam bloqueando a diferenciação celular, promovendo sua expansão e evadindo mecanismos de apoptose (SAGRILLO *et al.*, 2005; JÁCOMO; FIGUEIREDO-PONTES; REGO, 2008; HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2011; HELMAN *et al.*, 2011). Referente à velocidade de evolução da doença, as leucemias podem ser classificadas em agudas ou crônicas. Quando considerada a linhagem celular acometida, podem ser agrupadas como mielóides, quando atingem precursores mielóides; ou linfóides, quando atingem os precursores linfóides (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2011).

As leucemias agudas são diagnosticadas quando visualizado 20% ou mais de blastos no sangue ou na medula óssea. Entretanto, na presença de anormalidades genético-moleculares específicas, o diagnóstico pode ser emitido com valores inferiores de blastos (HELMAN *et al.*, 2011; HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2011). No caso da leucemia mieloide aguda (LMA), a classificação é realizada de acordo com a Organização Mundial de Saúde (2008), sendo conhecidos seis grupos principais de LMA de acordo com alterações citogenéticas e moleculares (SWERDLOW *et al.*, 2008; HELMAN *et al.*, 2011). Os achados clínicos e parâmetros laboratoriais também têm papel importante no diagnóstico e estadiamento clínico da doença (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2011).

Referente à LMA, a doença é a forma mais comum de leucemia aguda em adultos, a incidência aumenta com a idade (principalmente adultos >65 anos) e representa de 10-15% das leucemias na infância (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2011). Sendo que, a terapia para LMA consiste no suporte para insuficiência da medula óssea associado ao tratamento quimioterápico anti-neoplásico dispondo de protocolo que incluem fármacos como a idarrubicina e outros antracíclicos, mitoxantrona e etoposide (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2011).

### 3.3.2 Leucemias Promielocítica Aguda (LPA)

A leucemia promielocítica aguda (LPA), por sua vez, é uma variante da LMA que ocorre com maior frequência em adultos jovens e tem incidência praticamente estável entre os 20 e 59 anos de idade (DOUER, 2003). Nesse sentido, de acordo com a classificação franco-americano-britânica (FAB), a LPA ou LMA-M3, corresponde entre 10% e 15% das leucemias mieloides agudas e sua real incidência mundial não é totalmente conhecida, por ser calculada com base em registros hospitalares (CHAUFFAILLE *et al.*, 2001; SAGRILLO *et al.*, 2005).

A LPA apresenta a translocação t(15;17) em cerca de 90% dos casos. Dessa forma, o gene leucemia promielocítico (PML), no cromossomo 15 funde-se com o gene do receptor  $\alpha$  do ácido retinóico (RAR) (GARSON *et al.*, 1984; HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2011). Entretanto, outras alterações moleculares, tais como a presença do rearranjo FLT3-ITD ou uma desregulação da via do CEBP $\alpha$ , contribuem para o processo de leucemogênese (TRUONG *et al.*, 2003; YOO *et al.*, 2006).

Referente à translocação t(15;17), os híbridos resultantes PML-RAR $\alpha$  atuam como produtos oncogênicos, apresentando sensibilidade reduzida aos retinóides e assim interferindo nas funções dessa via e da via do PML, levando à interrupção da maturação mielóide no estágio de promielócito (JÁCOMO; FIGUEIREDO-PONTES; REGO, 2008). Os retinóides por sua vez, em condições normais, exerceriam papel fundamental na diferenciação mielóide por meio de diversas sinalizações e vias que culminariam na ligação aos co-repressores nucleares Sin3a e Sin3b (NCor), às histonas desacetilases (HDAC), e a DNA metiltransferase (DNMT) (JÁCOMO; FIGUEIREDO-PONTES; REGO, 2008).

Morfologicamente, a LPA apresenta promielócitos anormais, evidenciando núcleo excêntrico, acrescido de abundantes grânulações no citoplasma e presença de múltiplos bastonetes de Auer, dando origem as chamadas *Faggot cells* (BENNET *et al.*, 1976). O hemograma geralmente demonstra pancitopenia, o mielograma apresenta infiltração maciça por promielócitos neoplásicos e a imunofenotipagem indentifica blastos com elevada auto-fluorescência, expressando marcadores mielóides precoces como o CD117, CD13 e CD33 (JÁCOMO; FIGUEIREDO-PONTES; REGO, 2008; HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2011).

Clinicamente, assim como nas outras LMAs, sintomas constitucionais como febre, astenia, hiporexia e perda ponderal predominam, entretanto a doença difere das outras LMAs por estar associada à coagulopatia em cerca de 60% a 90% dos pacientes, configurando-se como a principal responsável pelas altas taxas de mortalidade precoce durante as fases

iniciais do tratamento (JÁCOMO; FIGUEIREDO-PONTES; REGO, 2008; HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2011) .

O tratamento dos casos da LPA difere do tratamento usual da LMA. Sendo assim, o advento do ATRA (ácido *all-trans*-retinóico), uma terapia específica, permite a progressão da diferenciação celular culminando na maturação mielóide, podendo ser usada em monoterapia em alguns casos, entretanto devido aos casos de recidivas serem comuns, faz-se necessária a associação com uma antraciclina, alcançando a remissão em até 99% dos pacientes e sobrevida livre de doença de 90% aos cinco anos do diagnóstico (CASTAIGNE *et al.*, 1990; SANZ *et al.*, 2004; HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2011). Outro ponto importante é a ocorrência da síndrome ATRA em 5% a 20% dos pacientes tratados com o ácido *all-trans*-retinóico, o que provavelmente está associada à neutrofilia causada durante o tratamento. O manejo farmacológico pode ser feito com o uso de dexametasona. Outros tratamentos de suporte, no caso da LPA, incluem o controle das coagulopatias (JÁCOMO; FIGUEIREDO-PONTES; REGO, 2008; HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2011; KATZUNG, 2014).

Como supracitado, as recidivas consistem em uma limitação ao tratamento atual. Dessa forma, é possível a indução de células-tronco leucêmicas, em modelo de LPA, que possuem forte resistência a diversos quimioterápicos, dentre eles algumas antraciclinas (CHEN *et al.*, 2018). Provavelmente, a resistência está associada à superexpressão dos principais membros do transportador cassete de ligação de trifosfato de adenosina (P-gp, MRP1 e BCRP) (FIGUEIREDO-PONTES *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2018) . Atualmente, a alternativa mais utilizada para os casos de recidivas aos tratamentos supracitados é a adição do trióxido de arsênio (ATO) ao tratamento (JÁCOMO; FIGUEIREDO-PONTES; REGO, 2008). Entretanto, modelos resistentes a doxorubicina demonstraram aumento da resistência cruzada ao ATO (CHEN *et al.*, 2018). Nesse sentido, existem diversos protocolos estabelecidos para o tratamento da LPA, dispondo de diferentes esquemas farmacológicos.

### 3.4 Terapias contra o câncer

Existem ao menos cinco opções de tratamento para o câncer, sendo elas a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia, a terapia de fotorradiação com derivados hematoporfirínicos (HTP) e a imunoterapia, as quais geralmente são utilizadas em associação, visto que, é observado aumento significativo da taxa de cura (ALMEIDA *et al.*, 2005; KATZUNG, 2014).

Acerca das modalidades de tratamento, a técnica cirúrgica, na ausência de metástases, tem capacidade de remoção de cânceres com eficácia, principalmente quando o diagnóstico é realizado em fase precoce da doença (ALMEIDA *et al.*, 2005). A radioterapia (raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios-X e até prótons e mésons pi negativos), por sua vez, mesmo podendo ser utilizada isoladamente, é comumente empregada em conjunto com a cirurgia, apresentando incremento da eficiência do tratamento (SANTOS, 2017). No entanto, a radioterapia está sujeita a diversas limitações principalmente associadas aos efeitos adversos e aos cânceres sistêmicos (ALMEIDA *et al.*, 2005). Na verdade, embora a cirurgia e/ou radioterapia possam curar com sucesso as lesões primárias, muitos cânceres humanos desenvolvem metástases distantes que levam quase invariavelmente à morte (KOSTOVA, 2006).

A técnica antineoplásica de fotorradiação, ou terapia fotodinâmica parte do princípio de que a interação de comprimentos específicos de onda eletromagnética com um composto não tóxico (fotosensibilizador) e oxigênio resulta em espécies reativas capazes de induzir morte celular (MACHADO, 2000). A terapia permite a localização e a destruição de cânceres com maior seletividade dispondo de radiação específica com fluorescência ( $\lambda$  de 620-640 nm) (MACHADO, 2000). É necessária a administração intravenosa do fotosensibilizador associado ao uso radiação dirigida ao local dispondo de fibra ótica (NSEYO, 1992). Entretanto, a terapia tem se mostrado curativa apenas para cânceres cujo diâmetro não exceda cerca de 2 centímetros e com limitações frente a doença disseminada (MACHADO, 2000).

A imunoterapia por sua vez, fundamenta-se em auxiliar o próprio sistema imunológico do paciente a identificar e combater o câncer. A técnica significou um grande avanço científico no tratamento do câncer nos últimos anos, culminando no Prêmio Nobel de Medicina em 2018. Porém, em alguns tipos de câncer, apenas uma fração dos pacientes atinge a remissão, associado a isso, o não conhecimento se da durabilidade da resposta imunológica representa uma limitação da técnica (VASQUEZ *et al.*, 2020).

Por fim, tem-se a quimioterapia, cujo objetivo principal é destruir as células neoplásicas, preservando as normais, dispondo da administração de fármacos com potencial anticâncer, buscando a regressão e destruição das células neoplásicas, entretanto os efeitos adversos, em geral, são bastante temidos (RODRIGUES *et al.*, 2012). Esses efeitos podem ser explicados pela alta citotoxicidade demonstrada pelos quimioterápicos frente às células com altas taxas de replicação, dentre elas as células gastrointestinais, capilares e as células do sistema imunológico, convergindo em inúmeros efeitos adversos, tais como náusea, vômito, queda de cabelo, imunossupressão, dentre outros (KATZUNG *et al.*, 2014; WANG; ZHANG; CHEN, 2019).

Na atualidade, a quimioterapia é utilizada em três situações clínicas principais, sendo elas: o tratamento de indução primária para a doença avançada ou para cânceres que não existe outra abordagem efetiva, podendo ou não ser curativa; tratamento neoadjuvante para pacientes que apresentam doença localizada, as quais as formas locais de terapia não se mostraram totalmente adequadas, dessa forma, a quimioterapia auxilia na diminuição do câncer para realização da terapia local; e tratamento adjuvante para os métodos locais, que apresenta papel fundamental na redução da recidiva local e/ou sistêmica após a ressecção cirúrgica do câncer primário (KATZUNG, 2014). Um fator importante para o êxito da quimioterapia é a precocidade no diagnóstico do câncer (entre  $10^9$  e  $10^{12}$ )

células neoplásicas, ou seja, com tamanho inferior a 1 cm (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A associação de dois ou mais tratamentos é fundamental na terapia do câncer, embora a monoterapia ainda seja uma modalidade de tratamento muito comum para algumas formas diferentes de câncer, este método convencional é geralmente considerado menos eficaz do que a abordagem de terapia combinada (MOKHTARI *et al.*, 2017). Apesar da associação de fármacos ainda apresentar toxicidade, a terapia combinada pode ser capaz de reduzir os efeitos tóxicos em células normais ao mesmo tempo em que produz efeitos citotóxicos em células cancerosas tanto pela atuação em diferentes vias das células cancerígenas quanto por um efeito sinérgico ou aditivo entre as drogas, sendo necessárias menores dosagens (ALBAIN *et al.*, 2008; MOKHTARI *et al.*, 2013). Por fim, o trabalho de Khdair *et al.* (2010), dispendo de adenocarcinoma em modelo murino, demonstrou que a monoterapia é mais suscetível à resistência devido as células cancerosas serem aptas a ativar vias alternativas de manutenção do crescimento, replicação e sobrevivência celular.

Com o objetivo de entender o racional da utilização dos diferentes agentes quimioterápicos é de fundamental importância compreender o ciclo celular. Primeiramente, quando a célula não está replicando ela encontra-se na fase G<sub>0</sub> (ALBERTS *et al.*, 2017). Fase caracterizada por apresentar o DNA bastante enovelado e baixa atividade transcricional. A fase G<sub>1</sub> caracteriza-se pela preparação da célula para a multiplicação, aumentando a produção de constituintes celulares essenciais para divisão em uma nova célula, e da preparação para a síntese de DNA (ALBERTS *et al.*, 2017). Na fase S, por sua vez, ocorre a replicação do genoma, de maneira que, a fase G<sub>2</sub>, que precede a mitose, tem como principal característica a síntese de componentes para a divisão celular, tais como os microtúbulos (ALBERTS *et al.*, 2017). Os fármacos quimioterápicos podem ser segregados, de maneira considerada arbitrária por alguns autores, em dois grupos: os que exercem ação sobre as células que se encontram no ciclo celular,

denominados fármacos ciclo-celular específica (CCS) e os fármacos ciclo-celular não específicos (CCNS), que atuam nas células neoplásicas independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G<sub>0</sub> (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Existem várias classes farmacológicas e estruturais de quimioterápicos antineoplásicos, dentre os CCS, podem-se citar os agentes alquilantes, os antibióticos antitumorais, as camptotecinas (inibidores da topoisomerase I), os complexos da platina e as antraciclinas (KATZUNG, 2014). No grupo dos CCNS podem-se citar os antimetabólitos (fase S), as epipodofilotoxinas (inibidor da topoisomerase II) (fase G<sub>1</sub>-S), os taxanos (fase M), alcalóides da vinca (fase M), inibidor antimicrotúbulo (fase M) e alguns antibióticos antitumorais (fase G<sub>2</sub>-M). Além disso, outras classes que também são empregadas no tratamento das neoplasias, que não se enquadram nas classes citadas, tais como os agentes hormonais, inibidores específicos das quinases, inibidores dos receptores dos fatores de crescimento, asparaginase, dentre outros (KATZUNG, 2014). Alguns representantes das classes de agentes quimioterápicos supracitados são exemplificados na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Principais agentes quimioterápicos e sua atuação no ciclo celular.

| <b>Fármacos específicos do ciclo celular (CCS)</b> | <b>Fármacos inespecíficos do ciclo celular (CCNS)</b> |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>Antimetabólitos (fase S)</b>                    | <b>Fármacos alquilantes</b>                           |
| Capecitabina                                       | Altretamina                                           |
| Cladribina                                         | Bendamustina                                          |
| Clofarabina                                        | Bussulfano                                            |
| Citarabina (ara-C)                                 | Carmustina                                            |
| Fludarabina                                        | Clorambucila                                          |
| 5-Fluoruracila (5-FU)                              | Ciclofosfamida                                        |
| Gencitabina                                        | Dacarbazina                                           |
| 6-Mercaptopurina (6-MP)                            | Lomustina                                             |
| Metotrexato (MTX)                                  | Mecloretamina                                         |
| Nelarabina                                         | Melfalano                                             |
| Pralatrexato                                       | Temozolamida                                          |

|                                                                        |                                                                                |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 6-Tioguanina (6-TG)                                                    | Tiotepa                                                                        |
| <b>Epipodofilotoxinas (inibidor da topoisomerase II) (fase G1 - S)</b> | <b>Antibióticos antitumorais</b>                                               |
| Etopósido                                                              | Dactinomicina<br>Mitomicina                                                    |
| <b>Taxanos (fase M)</b>                                                | <b>Camptotecinas (inibidores da topoisomerase I)</b>                           |
| Cabazitaxel<br>Paclitaxel<br>Paclitaxel ligado à albumina              | Irinotecana<br>Topotecana                                                      |
| <b>Alcalóides da vinca (fase M)</b>                                    | <b>Complexos de platina</b>                                                    |
| Vimblastina<br>Vincristina<br>Vinorelbina                              | Carboplatina<br>Cisplatina<br>Oxaliplatina                                     |
| <b>Inibidor antimicrotúbulo (fase M)</b>                               | <b>Antraciclinas</b>                                                           |
| Ixabepilona                                                            | Daunorrubicina<br>Doxorrubicina<br>Epirubicina<br>Idarrubicina<br>Mitoxantrona |
| <b>Antibióticos antitumorais (fase G2-M)</b>                           |                                                                                |
| Bleomicina                                                             |                                                                                |

---

Fonte: Adaptado de Katzung, (2014).

A combinação de estratégias que visam à avaliação das propriedades físicas do câncer; uma análise profunda dos “drivers” de drogabilidade, dependências e vulnerabilidades; a detecção precoce e monitoramento preciso; combinação terapêutica e quimioterápica; e análises baseadas em bancos de dados de pacientes se configuram como uma abordagem para combate a resistência farmacoterapêutica das células cancerosas e consequente otimização quimioterapêutica (ALBAIN *et al.*, 2008; KHDAIR *et al.*, 2010; MOKHTARI *et al.*, 2013; VASAN; BASELGA; HYMAN, 2019). Ademais, o descobrimento e/ou desenvolvimento de eventuais novos fármacos anticancerígenos é de extrema importância no tratamento de cânceres resistentes aos fármacos atuais, redução de efeitos adversos, aumento de seletividade, dentre outros aspectos.

### 3.5 Complexos de rutênio

Dentre os fármacos anticancerígenos, os complexos de coordenação de platina, identificados como agentes citotóxicos na década de 60, podem ser utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer, tais como câncer de próstata, ovário, esôfago, colorretal, pulmão, linfoma, melanoma, dentre outros (NEVES e VARGAS, 2011; CHEN e CHANG, 2019). Referente ao mecanismo de ação, o fragmento  $\{Pt(NH_3)_2\}$ , presente nos complexos da platina, podem se ligar ao DNA de diferentes maneiras, sendo que os átomos de N7 das bases purina (G ou A), localizadas no sulco maior, são os sítios preferenciais de coordenação com a platina. Entretanto, além dos efeitos adversos, a resistência adquirida ao fármaco representa limitações quanto à sua utilização (NEVES e VARGAS, 2011).

A resistência à terapia medicamentosa é um desafio no tratamento do câncer (ZUGAZAGOITIA *et al.*, 2016). Devido à alta particularidade de cada célula cancerígena, em decorrência da grande quantidade de mutações e diversidade genética, existem importantes diferenças nos mecanismos que influenciam na progressão da doença. Características como as propriedades físicas do câncer (carga celular, taxa de crescimento e localização); pressão terapêutica seletiva; e a presença de “drivers genômicos” que não podem ser corrigidos, incluindo MYC, RAS e TP53, são fatores importantes na ocorrência de resistência à quimioterapia (VASAN; BASELGA; HYMAN, 2019).

Além disso, características associadas ao microambiente do câncer, tais como hipóxia, macrófagos associados ao tumor (TAM), alterações na rigidez e elasticidade da matriz extracelular, alterações no fluxo sanguíneo local, dentre outras, também aparentam ter papel importante na ocorrência da resistência farmacoterapêutica (CHEN e CHANG, 2019). No que tange a resistência das células cancerígenas, especificamente ao tratamento com complexos da platina, três mecanismos de adaptação intracelular foram propostos, sendo eles: alterações no acúmulo celular do fármaco,

desintoxicação intracelular do fármaco e reparo de danos ao DNA (AMABLE, 2016; CHEN e CHANG, 2019; GHOSH, 2019).

A expressão de alguns receptores de membrana, que regulam a captação e exportação dos complexos de platina, está relacionada às alterações no acúmulo do fármaco (ZUGAZAGOITIA *et al.*, 2017). O trabalho de Yang *et al.* (2015) demonstrou que a quantidade aumentada de receptores CTR1, um transportador de cobre presente membrana celular, apresenta correlação com desfechos favoráveis em pacientes com câncer de pulmão recebendo terapias à base de platina. Em contraponto, Chen *et al.* (2015) observaram que a ATP7A, uma ATPase exportadora de íons de cobre, apresenta expressão significativamente maior em células de câncer cervical resistentes aos complexos de platina do que em células parenterais. Ademais, proteínas como a ERCC1 e a XPF, associadas à via de reparo às lesões ao DNA, por excisão de nucleotídeos (NER), geralmente estão superexpressas em células cancerígenas que expressam resistência aos complexos da platina (CHEN e CHANG, 2019).

Nesse sentido, no trabalho de Cescon *et al.* (2015), foi observado que pacientes com câncer de pulmão, que usaram quimioterapia adjuvante com complexos de platina e apresentavam alterações somáticas de ativação do fator de transcrição NRF2, um regulador da resposta antioxidante, aparentaram aparente não benefício à quimioterapia.

Os estudos para desenvolvimento de fármacos antitumorais baseados em metais ainda demonstram papel relevante na quimioterapia antineoplásica (BIANCALANA; PAMPALONI; MARCHETTI, 2017). Dessa forma, outra estratégia para a busca de novos agentes anticâncer baseados em metais, é a utilização de complexos que contenham outro metal de transição, tal qual o rutênio (Ru), que aparenta ser o mais promissor dos metais de transição estudados (LEE; KIM; NAM, 2020).

O rutênio é um metal de transição adstrito no grupo 8, o mesmo grupo químico do ferro. Devido a se tratar de um ácido de Lewis, de menor

natureza oxofílica, o elemento exibe um conjunto distinto de propriedades utilizadas em muitos campos industriais e científicos, como células solares, eletrônicos, ligas, catalisadores, e agentes diagnósticos e terapêuticos (LEE; KIM; NAM, 2020). Os complexos de coordenação onde o rutênio é o átomo central, se apresentam sob os estados de oxidação (II e III), que devido à estabilização do campo ligante, são normalmente octaédricos e frequentemente inertes à substituição dos substituintes (FERREIRA, 2004). Outra importante característica dos compostos de rutênio é que suas propriedades podem ser moduladas em função do ligante utilizado, conferindo ao complexo, potencialidades múltiplas de aplicação (CEZAR, 2015).

Referente à aplicação no campo da terapia antitumoral, existem estudos, que apontaram atividade biológica dos complexos de rutênio contra células cancerígenas (MEGGERS, 2007; BERGAMO e SILVA, 2007); menor toxicidade que os complexos da platina (KOSTOVA, 2006; SAVA *et al.*, 1998); notável atividade antimetastática e antiangiogênica (BIANCALANA; PAMPALONI; MARCHETTI, 2017); diferente espectro de atividade anticancerígena, quando comparado aos complexos da platina (ALESSIO *et al.*, 2004; CLARKE, 2003); ausência de resistência cruzada com os complexos da platina (BRABEC e NOVÁKOVÁ, 2006); e aumento da expectativa de vida em indivíduos com câncer (KOSTOVA, 2006).

Associado ao parágrafo anterior, também são observados estudos dispondo de complexos de rutênio no tratamento de: câncer colorretal, câncer de ovário, câncer de cólon, câncer de pulmão e câncer de mama (WEISS *et al.*, 2014). Ademais, já existem complexos de rutênio em diferentes fases de estudo clínico em humanos (completos ou em andamento), avaliando o tratamento de tumores sólidos, tais como o ((ImH)[trans-RuCl<sub>4</sub>(dmsO-S)(Im)]), Im = imidazole) (NAMI-A), que apresentara bom perfil de segurança, entretanto não apresentara bom desempenho utilizados em monoterapia (ALESSIO e MESSORI, 2019).

No que se refere à farmacocinética, a maior fração das espécies de rutênio(III) (80–90%) está ligada à albumina e uma quantidade muito menor à transferrina (KLAUSNER; VAN RENSWOUDE; ASHWELL, 1983). Aparentemente, a transferrina tem papel fundamental no transporte dos complexos de rutênio para as células neoplásicas, interagindo com os receptores de transferrina da superfície célula e posterior endocitose do complexo (KLAUSNER; VAN RENSWOUDE; ASHWELL, 1983; KOSTOVA, 2006; ZENG *et al.*, 2017). Ademais, algumas propriedades químicas, como a taxa de troca de ligante, a faixa de estados de oxidação acessíveis e a capacidade do rutênio de “imitar” o ferro (reduzindo a toxicidade) ao se ligar a certas moléculas biológicas (tais como a transferrina) os tornam adequados para aplicações medicinais como uma alternativa antitumoral aos complexos da platina (BRABEC e NOVÁKOVÁ, 2006; KOSTOVA, 2006). Associado a isso, foi observado em estudo farmacocinético, que a eliminação de um composto de rutênio(II) foi predominantemente renal (SCOLARO *et al.*, 2005). Entretanto, dispondo de conhecimento farmacológico, sabe-se que esse parâmetro farmacocinético é modificável a depender da estrutura do análogo.

Os complexos de rutênio(III) provavelmente permanecem em seu estado de oxidação de Ru(III) relativamente inativo, sendo considerados como pró-fármacos até atingirem o local da neoplasia (BIANCALANA; PAMPALONI; MARCHETTI, 2017). Nesse ambiente, com seu conteúdo de oxigênio e pH inferiores ao tecido saudável, ocorre a redução para o estado de oxidação +2. Portanto, os complexos de rutênio poderiam interagir com as células neoplásicas de maneira mais seletiva do que com os tecidos normais, indicando uma possível seletividade, o que pode ser uma vantagem na prática terapêutica (KOSTOVA, 2006; BIANCALANA; PAMPALONI; MARCHETTI, 2017).

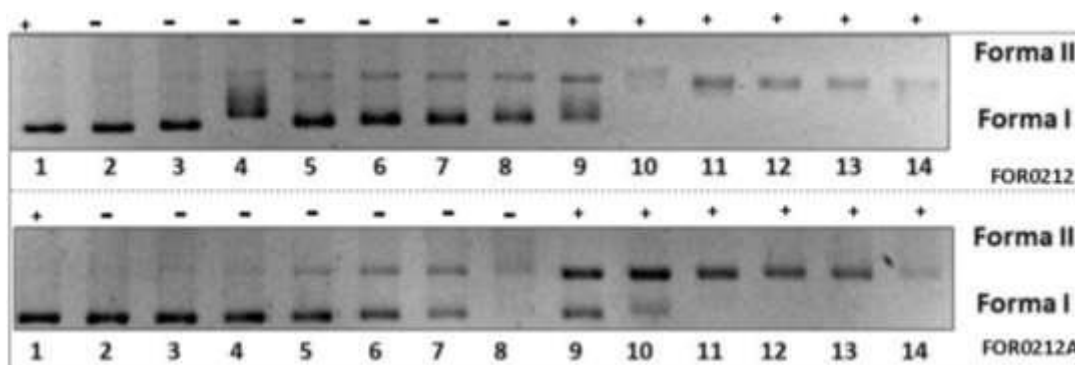
No que tange à farmacodinâmica, em contraponto aos complexos de coordenação de platina, que apresentam estrutura tridimensional planar, capazes de danificar o DNA, por meio da formação de adutos, dispondo de

vários tipos de ligações cruzadas (COHEN; LIPPARD, 2001; BRABEC, 2002), alguns complexos de rutênio(II) e rutênio(III) por sua vez, apresentam disposição tridimensional octaédrica e provavelmente interagem com o DNA de maneira diferente da cisplatina (BRABEC e NOVÁKOVÁ, 2006). A tese de interação com o ácido nucléico é reforçada pelos efeitos consistentes com a ligação desses compostos ao DNA *in vivo*, tais como: inibição da replicação do DNA, atividade mutagênica, redução da síntese de RNA, dentre outros (BRABEC e NOVÁKOVÁ, 2006). Acredita-se que os complexos de Ru(II) podem se ligar ao DNA via interação com ligantes aromáticos de maneira covalente (irreversível com formação de adutos) e não covalente (reversível com formação principalmente de intercalações) (ZENG *et al.*, 2017).

Como supracitado, o núcleo é apresentado como o principal alvo de ação dos complexos de rutênio, entretanto é demonstrado que o acúmulo de alguns complexos de rutênio é superior em outras regiões subcelulares, de maneira que as mitocôndrias, organela que desempenha papel significativo no metabolismo celular e sob estímulos específicos está relacionada com as vias apoptóticas, foram relatadas como alvos para a atividade anticâncer de alguns complexos de Ru(II), (GREEN e REED, 1998; ZENG *et al.*, 2017). Portanto, uma possível indução à morte celular programada pela ativação da via intrínseca pode ser hipotetizada. Em adição, mecanismos de ação complementares podem ser atribuídos aos complexos de rutênio, tais como a ligação preferencial à cromatina e proteínas relacionadas ao câncer que podem ser responsáveis pelas atividades antiangiogênicas e antimetastáticas observadas (BIANCALANA; PAMPALONI; MARCHETTI, 2017)

No trabalho de Silva (2017), dispondo de clorocomplexos de rutênio associados à tioamidas, observou-se clivagem do DNA pelos compostos testados, como demonstrado na **Figura 4**. Associado a isso, o autor supõe que a interação de bases nitrogenadas com o metal (cloro) pode ser um mecanismo adicional para propiciar maior eficiência na clivagem do DNA e

que a molécula pode ser doadora de oxigênio singlete e superóxido. Ainda nesse trabalho, o autor observou atividade citotóxica de nitrosilocomplexos de rutênio associados à tioamidas frente células de glioblastoma humano.



**Figura 4.** Clivagem de DNA plasmidial. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos clorocomplexos FOR0212 e FOR0212A em diferentes concentrações, frente ao DNA plasmídico pBR322, na ausência de luz (faixas 3 a 8) e após irradiação por 30 min com LED azul (faixas 9 a 14). DNA controles positivo (com luz) e negativo (sem luz) nas faixas 1 e 2, respectivamente. Concentração em  $\mu\text{molL}^{-1}$  (faixas): 5 (3 e 9), 10 (4 e 10), 20 (5 e 11), 40 (6 e 12), 60 (7 e 13) e 100 (8 e 14). 300 ng de DNA, 20  $\mu\text{molL}^{-1}$  em pares de base. Fonte: Silva, (2017).

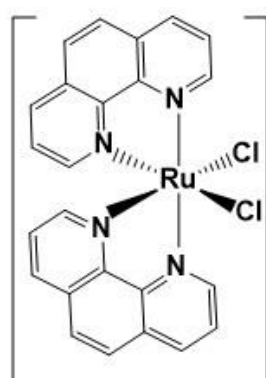
Portanto, dispondo desses dados promissores e das evidências encontradas na literatura, acredita-se que os clorocomplexos de rutênio associados à tioamidas apresentam efeito citotóxico em células cancerígenas (de diversas linhagens), com segurança em células normais, e induzindo morte celular pelo mecanismo de apoptose.

## 4. Materiais e métodos

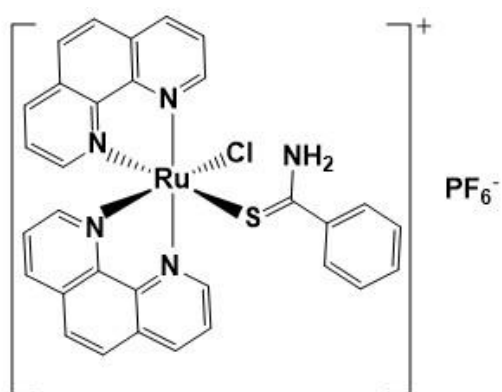
### 4.1 Obtenção dos complexos estudados

Os complexos metálicos *cis*-[RuCl(tbz)(phen)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>PF<sub>6</sub><sup>-</sup> (FOR0212A); *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>] (FOR000); *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(phen)<sub>2</sub>] (FOR020); *cis*-[RuCl(tbz)(bpy)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>PF<sub>6</sub><sup>-</sup> (FOR0012A) e a FORLTB (tiobenzamida) foram obtidos, caracterizados para realização dos experimentos, pelo colaborador Prof. Dr. Carlos Daniel Silva da Silva, professor de química do Instituto Federal da Bahia. No caso da tiobenzamida (TBZ), a mesma foi codificada como FORLTB para evitar que a natureza do composto fosse conhecida durante os experimentos. O cloridrato de doxorrubicina foi obtido a partir do Laboratório IMA S.A.I.C. (Buenos Aires, Argentina). Em todos os ensaios de atividade biológica realizados, os compostos foram solubilizados primeiramente em dimetilsulfóxido (DMSO; PanReac, Barcelona, Espanha) e posteriormente em meio de cultura RPMI, não excedendo a concentração final de 0,1% de DMSO nos testes.

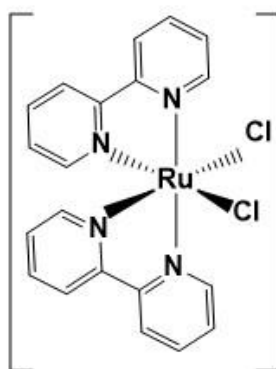
Na **Figura 5** é possível observar as estruturas dos complexos avaliados. Os complexos FOR0212A e FOR0012A derivam diretamente do FOR020 e FOR000, respectivamente. É possível notar que os complexos possuem a substituição de um dos átomos de cloro ligados ao rutênio pelo grupo tiobenzamida. Ademais, observa-se que os complexos se encontram ionizados, associados um ânion inorgânico de baixa nucleofilia, o hexafluorofosfato. Portanto, os compostos químicos referidos se tratam de sais inorgânicos. Observa-se que em todas as moléculas estudadas a 2,2'-bipiridina ou a 1,10-fenantrolina configuram-se como ligantes nas moléculas. As estruturas químicas só foram conhecidas ao final da execução dos experimentos de citotoxicidade.



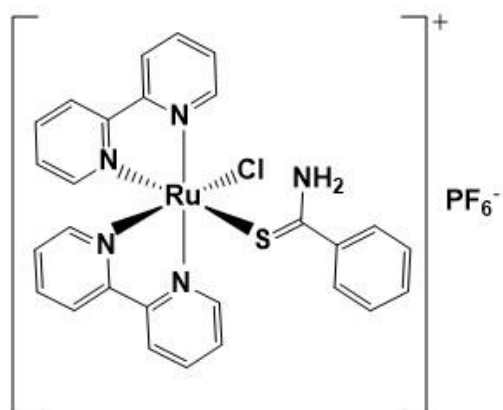
FOR020

*cis*-[RuCl<sub>2</sub>(phen)<sub>2</sub>]

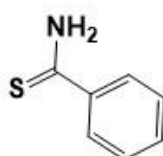
FOR0212A

*cis*-[RuCl(tbz)(phen)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>PF<sub>6</sub><sup>-</sup>

FOR000

*cis*-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>]

FOR0012A

*cis*-[RuCl(tbz)(bpy)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>PF<sub>6</sub><sup>-</sup>

FORLTB

tbz

**Figura 5.** Estrutura química dos complexos avaliados. Fonte: Imagem cedida pelo colaborador Carlos Daniel Silva da Silva.

## 4.2 Síntese e caracterização dos análogos de rutênio

### **cis-[RuCl(tiobenzamida)(bpy)2]PF6 (FOR0012A):**

Em um frasco com 15 mL da solução de etanol:água 2:1, foram adicionados 150 mg (0,310 mmol) de cis-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>] (FOR000). A reação foi agitada sob refluxo por 15 min. Subsequentemente, adicionaram-se 47 mg (0,336 mmol) de tiobenzamida dissolvida num volume mínimo de etanol:água 2:1 e aqueceu-se a solução a refluxo durante 3 h. Após isso, a mistura foi aquecida apenas por 1 hora. Em seguida, adicionaram-se 221 mg (1,19 mmol) de KPF<sub>6</sub> dissolvido em água. A mistura foi resfriada e filtrada sob vácuo. O sólido obtido foi lavado com 10 mL de água gelada e 15 mL de éter dietílico e seco sob vácuo. Foi obtido rendimento de 81%.

### **cis-[RuCl(tiobenzamida)(fen)2]PF6 (FOR0212A)**

Em um frasco com 20 mL da solução de etanol:água 2:1, foram adicionados 200 mg (0,310 mmol) de cis-[RuCl<sub>2</sub>(phen)<sub>2</sub>] (FOR020). A reação foi agitada sob refluxo por 15 min. Subsequentemente, adicionaram-se 55 mg (0,393 mmol) de tiobenzamida dissolvida num volume mínimo de etanol:água 2:1 e a solução foi refluxada durante 3 hora. Após isso, a mistura foi aquecida apenas por 1 hora. Em seguida, adicionaram-se 280 mg (1,51 mmol) de KPF<sub>6</sub> dissolvido em água. A mistura foi resfriada e filtrada sob vácuo. O sólido obtido foi lavado com 10 mL de água gelada e 15 mL de éter dietílico e seco sob vácuo. Foi obtido rendimento de 94%.

Os complexos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas (UV-Vis, IR, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) e voltametria cíclica. Além disso, foram realizadas análises elementares e estudos computacionais usando DFT e TD-DFT. O ligante tiobenzamida foi caracterizado por RMN de <sup>13</sup>C e DEPT-135.

### 4.3 Obtenção e Manutenção das Células em Cultura

Para os ensaios de citotoxicidade, as linhagens de células cancerígenas KG-1a (leucemia mielóide aguda), B16-F10 (melanoma murino), Jurkat (leucemia humana aguda de células T), NB4 (Leucemia mieloblastica aguda humana), THP-1 (leucemia monocitica aguda humana), HL-60 (leucemia promielocítica aguda humana), K-562 (leucemia mielocítica crônica humana), CAL 27 (carcinoma escamoso humano), HSC-3 (carcinoma escamocelular oral humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), obtidas da *American Type Culture Collection* - ATCC (Rockville, Maryland, U.S.A.), foram utilizadas. Para avaliar a seletividade dos complexos metálicos sobre a proliferação de células não cancerígenas, a linhagem MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano), também obtida da ATCC, foi utilizada. As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (Gibco™) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco™) e 50 µg/mL de gentamicina (Gibco™). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e acompanhadas diariamente. Todas as linhagens celulares foram testadas para micoplasma usando um kit de detecção de micoplasma por coloração com Hoechst (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), e todas as células estavam isentas de qualquer contaminação. As células utilizadas no estudo estão descritas na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade para determinação de  $CI_{50}$ .

| <b>Células</b>                | <b>Linhagem celular</b>             |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Células cancerosas</b>     |                                     |
| KG-1 <sup>a</sup>             | Leucemia mieloide aguda             |
| HL-60                         | Leucemia promielocítica humana      |
| Jurkat                        | Leucemia humana aguda de células T  |
| NB4                           | Leucemia promielocítica humana      |
| K-562                         | Leucemia mielocítica crônica humana |
| THP-1                         | Leucemia monocítica aguda humana    |
| CAL 27                        | Carcinoma escamoso humano           |
| B16-F10                       | Melanoma murinho                    |
| HSC3                          | Carcinoma escamocelular oral humano |
| HepG2                         | Carcinoma hepatocelular humano      |
| <b>Células não cancerosas</b> |                                     |
| MRC-5                         | Fibroblasto de pulmão humano        |

#### 4.4 Avaliação de atividade hemolítica

Para realização do teste de hemólise, utilizaram-se amostras sanguíneas humanas (doadas pelo LACEN), sendo o sangue posteriormente centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos na temperatura de 4° C. Após isso, o sobrenadante foi retirado e realizou-se a lavagem das hemácias com solução de PBS 1x sendo centrifugados até obtenção de sobrenadante límpido. Dessa maneira, 100 µL dos compostos FOR0212A, FOR0012A, FOR020 e FOR000 diluídos em PBS 1x, em concentrações seriadas (12,5; 25 e 50 µM), foram incubados com 100 µL da suspensão de eritrócitos não infectados (hematócrito de 1%) a 37°C mais 5% de CO<sub>2</sub> por 1

hora. A solução de saponina a 1% (0,2 g em 10 mL para 1% na placa) foi utilizada como controle positivo, por gerar 100% de hemólise e o PBS 1x contendo 0,5% (v/v) de DMSO foi utilizado como controle negativo. Ademais, após incubação por 1 hora, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e transferiram-se 100 µL do sobrenadante para outra microplaca com fundo em “U”. Por fim foi realizada leitura da placa no comprimento de onda de 540nm em espectrofotômetro. A taxa de hemólise das amostras foi calculada seguindo a fórmula descrita abaixo:

$$\% \text{Hemólise} = \frac{\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco}}{\text{Absorbância do controle com saponina}} \times 100$$

Dois experimentos independentes foram realizados, sendo cada amostra avaliada em sextuplicata. O protocolo utilizado foi previamente descrito no trabalho de Macedo *et al.* (2013).

#### 4.5 Avaliação de citotoxicidade com Alamar Blue

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos testados e determinar o valor da concentração inibitória para 50% das células (CI<sub>50</sub>), foi utilizado o método colorimétrico do Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA). O Alamar Blue (resazurina) é um indicador que produz uma mudança colorimétrica e um sinal fluorescente em resposta à atividade metabólica. A resazurina é reduzida em resorufina por células metabolicamente ativas. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). A redução do resazurina em resorufina reflete a viabilidade celular (AHMED *et al.*, 1994).

No ensaio em questão, as células foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade pré-definida de  $0,3 \times 10^6$  células/mL para células não aderentes e  $0,7 \times 10^5$  células/mL para células aderentes. Os complexos metálicos FOR0212A, FOR0000, FOR0020, FOR0012A,

FORLTB (ligante) e o controle positivo (DOX; doxorubicina) foram adicionados em uma série de 8 concentrações (50 a 0,39  $\mu\text{M}$ ), com exceção da doxorubicina, que foi utilizada em concentrações variando de 0,003 a 5  $\mu\text{M}$ . O controle negativo recebeu a mesma quantidade do DMSO (0,025%). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após esse período, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$ /poço de Alamar Blue e as placas foram incubadas por mais 4 h. A leitura das placas foi feita no espectrofotômetro (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O ensaio realizado seguiu o método descrito no trabalho de Silva *et al.*, (2018).

Após execução dos experimentos foram calculados os valores de concentração inibitória para 50% das células cancerígenas ( $\text{CI}_{50}$ ) e concentração inibitória para 50% das células normais ( $\text{CC}_{50}$ ) utilizando dados obtidos de três experimentos independentes.

#### 4.6 Índice de seletividade

Após a determinação da  $\text{CI}_{50}$  e da  $\text{CC}_{50}$  dos complexos isolados, o índice de seletividade (IS) foi determinado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Seletividade} = \frac{\text{CC}_{50}}{\text{CI}_{50}}$$

O cálculo do IS é importante para uma avaliação inicial da segurança do tratamento. A partir da fórmula descrita acima, é possível estipular quantas vezes a substância é mais ou menos seletiva às células cancerígenas do que às células não cancerígenas. Ademais, é factível inferir que quanto maior o valor de IS obtido, melhor seria o desempenho do tratamento. Pois, teoricamente o resultado apresentaria maior segurança quando considerado toxicidade frente às células normais. O

cálculo realizado seguiu o método descrito no trabalho de Silva *et al.*, (2018).

#### **4.7 Ensaio de exclusão com azul de tripam**

Com a finalidade de corroborar com os dados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, foi realizado o ensaio de exclusão com azul de tripam. Dessa forma, as células da linhagem HL-60 foram plaqueadas, na densidade de  $3 \times 10^5$  células/mL em placas de 24 poços, e tratadas pelo período de 24 e 48 horas com o complexo FOR0212A (3,0; 1,5 e 0,75  $\mu$ M) ou doxorrubicina (0,2  $\mu$ M). Após o tratamento, foi realizada uma alíquota de 10  $\mu$ L das células e foi acrescida a 10  $\mu$ L do corante azul de tripam. O respectivo corante só é capaz de corar células que apresentam permeabilidade por conta de lesões na membrana plasmática classificada como não viáveis. Baseia-se no fato que as células mortas absorvem o azul de tripam para seu citoplasma por perda de seletividade da membrana, enquanto as células vivas permanecem não coradas. Desse modo, a contagem foi realizada levando em consideração a exclusão do corante por células viáveis, em câmara de Neubauer, por meio de microscópio óptico. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata para determinação da viabilidade celular nos tempos de 24 e 48 horas de tratamento. O ensaio realizado seguiu o método descrito no trabalho de Silva *et al.*, (2018).

#### **4.8 Ensaio de terapia combinada**

Com intuito de avaliar um possível sinergismo citotóxico entre a combinação de um fármaco já utilizado para LPA e o complexo teste, *in vitro*, foram realizadas diluições proporcionais do complexo mais ativo obtido nos ensaios de citotoxicidade e a doxorrubicina (1:1; 1:2 e 2:1) e usadas isoladamente, partindo das concentrações iniciais de 1  $\mu$ M para a doxorrubicina e 1  $\mu$ M para o complexo mais ativo, ambas correspondendo a

proporção “1”, sendo incubadas com células da linhagem mais sensível. Dessa forma, o *range* de concentrações avaliadas foi: 1,0 µM; 0,5 µM; 0,25 µM; 0,125 µM; 0,062 µM; 0,031 µM; 0,015 µM e 0,008 µM. A análise do efeito combinatório foi realizada por meio da determinação da (FIC<sub>50</sub>), utilizado como ponto de corte para determinar o sinergismo, pelo método de Chou-Talalay CI (CHOU e TALALAY, 2005) e pela construção de isoblograma pelo método da razão fixa (FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004). Dessa forma, após a determinação das concentrações inibitórias, a concentração inibitória fracionada para um determinado efeito foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração Inibitória Fracionada (y)} = \frac{\text{CI (y) da droga na combinação}}{\text{CI (y) da droga isolada}}$$

Em que o (y) foi o efeito de 50% de inibição, resultando na FIC<sub>50</sub>. A linha de referência para a aditividade liga o número 1 nos dois eixos. Pontos que se encontrarem abaixo desta linha tendem a expressar resultados sinérgicos da combinação e pontos acima da linha sugerem antagonismo (TALLARIDA, 2012; SILVA, 2016).

#### 4.9 Quantificação de espécies reativas de oxigênio intracelular

Para quantificar os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ERO), as células foram tratadas por 1 hora com a FOR0212A e o controle negativo (meio + diluente). Após esse período, as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI completo contendo 5 µM de diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>-DCF-DA) (Sigma-Aldrich Co.), que é convertido num produto fluorescente na presença de ERO

intracelular. Após 30 minutos de incubação a 37° C na ausência de luminosidade, as células foram centrifugadas, ressuspensas em salina e adquiridas imediatamente em citômetro de fluxo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra, utilizando o software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). O ensaio realizado seguiu o método descrito no trabalho de Silva et al., (2018).

#### **4.10 Análise estatística**

Com intuito de determinar a concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>), foi usada regressão não linear. A ANOVA (análise de variância) de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de *Newman-Keuls* foi usada para determinar a significância estatística das comparações de grupo no ensaios realizados. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas usando Graph Pad Prism versão 5.01 (Graph Pad Software, San Diego, CA).

## 5. Resultados e Discussão

### Citotoxicidade e Índice de seletividade dos complexos de Rutênio(II).

Para avaliação da citotoxicidade dos complexos metálicos, foram utilizadas dez linhagens de células cancerígenas e uma linhagem celular não cancerígena (MRC-5), dispondo do método colorimétrico de Alamar Blue para avaliação. O FOR0212A apresentou maior citotoxicidade entre os complexos testados, com valores de  $CI_{50}$  variando de 1,5 a 6,5  $\mu M$  para as linhagens de células cancerosas HL-60 e B16-F10, respectivamente. O FOR0012A também mostrou atividade contra todas as linhagens de células cancerígenas testadas com valores de  $CI_{50}$  variando de 5,7 a 20,1  $\mu M$  para as linhagens de células cancerígenas HL-60 e B16-F10, respectivamente. Em contraste, os complexos FOR000 e FOR020 não apresentaram atividade citotóxica contra nenhuma das linhagens celulares testadas. O composto químico FORLTB apresentou atividade apenas contra as linhagens celulares KG-1a e HL-60 com valores de  $CI_{50}$  de 43,6 e 25  $\mu M$  respectivamente. Nas mesmas condições, a doxorrubicina apresentou valores de  $CI_{50}$  variando de 0,1 (para CAL 27 e THP-1) a 0,8  $\mu M$  (para HSC-3). Os resultados de citotoxicidade obtidos são evidenciados na **Tabela 4**.

**Tabela 4.**  $CI_{50}$  dos compostos x linhagens celulares estudadas.

|                               | Compostos testados |        |        |                   |                  |                  |
|-------------------------------|--------------------|--------|--------|-------------------|------------------|------------------|
|                               | FORLTB             | FOR000 | FOR020 | FOR0012A          | FOR0212A         | Doxorrubicina    |
| <b>Células cancerígenas</b>   |                    |        |        |                   |                  |                  |
| B16-F10                       | >50                | >50    | >50    | 20,1 ( $\pm$ 2,1) | 6,5 ( $\pm$ 0,9) | 0,6 ( $\pm$ 0,1) |
| CAL 27                        | >50                | >50    | >50    | 7,7 ( $\pm$ 1,2)  | 4,5 ( $\pm$ 0,8) | 0,1 ( $\pm$ 0,0) |
| HL-60                         | 25,0 ( $\pm$ 0,6)  | >50    | >50    | 5,7 ( $\pm$ 0,9)  | 1,5 ( $\pm$ 0,3) | 0,2 ( $\pm$ 0,0) |
| HSC-3                         | >50                | >50    | >50    | 9,7 ( $\pm$ 0,9)  | 4,9 ( $\pm$ 0,7) | 0,8 ( $\pm$ 0,0) |
| Jurkat                        | >50                | >50    | >50    | 9,9 ( $\pm$ 1,0)  | 3,8 ( $\pm$ 1,2) | 0,2 ( $\pm$ 0,0) |
| KG-1 <sup>a</sup>             | 43,6 ( $\pm$ 1,3)  | >50    | >50    | 8,6 ( $\pm$ 0,2)  | 3,0 ( $\pm$ 0,6) | 0,2 ( $\pm$ 0,0) |
| K-562                         | >50                | >50    | >50    | 10,2 ( $\pm$ 0,3) | 3,8 ( $\pm$ 1,2) | 0,9 ( $\pm$ 0,4) |
| NB4                           | >50                | >50    | >50    | 14,6 ( $\pm$ 2,1) | 4,9 ( $\pm$ 1,1) | 0,1 ( $\pm$ 0,0) |
| THP-1                         | >50                | >50    | >50    | 8,1 ( $\pm$ 0,8)  | 3,5 ( $\pm$ 0,6) | 0,1 ( $\pm$ 0,0) |
| HepG2                         | >50                | >50    | >50    | 31,2( $\pm$ 2,1)  | 3,9 ( $\pm$ 0,1) | 0,1 ( $\pm$ 0,0) |
| <b>Célula não cancerígena</b> |                    |        |        |                   |                  |                  |
| MRC-5                         | >50                | >50    | >50    | 41,7( $\pm$ 2,2)  | 9,9 ( $\pm$ 0,6) | 1,0 ( $\pm$ 0,0) |

Os resultados são descritos em  $\mu$ M e os valores são representados dispondo de média  $\pm$  desvio padrão calculados a partir de três experimentos independentes.

Os achados da **Tabela 4** evidenciam interessante atividade citotóxica para os dois análogos (FOR0212A e FOR0012A). Dessa forma, os dois análogos apresentam potencial para seguimento dos estudos. Vale ressaltar que os valores obtidos, em ambos os casos, ainda estão distantes da citotoxicidade da doxorrubicina em todas as linhagens cancerígenas avaliadas. Ademais, apesar do FOR0212A apresentar maior potencial citotóxico que o FOR0012A, estratégias de modificação de liberação podem ser adotadas para otimizar o efeito citotóxico do FOR0012A, a exemplo do que foi realizado por Michlewska *et al.* (2019), em outros complexos de rutênio. A mesma estratégia também pode ser adotada para o FOR0212A, quando comparando-o com a doxorrubicina.

Com a finalidade de calcular o índice de seletividade (IS), os complexos FOR0012A e FOR0212A, que apresentaram maior citotoxicidade frente às células cancerígenas foram avaliados. Associado a isso, os

mesmos demonstraram baixa citotoxicidade frente células não cancerígenas (MRC-5) quando comparados com as células cancerígenas, evidenciando valores de  $CI_{50}$  de 41,7 e 9,9  $\mu M$ , respectivamente.

A literatura não descreve um valor universal ideal para o índice de seletividade. Os valores variam de acordo com vários fatores, tais como a natureza do fármaco ou composto utilizado (se é um extrato ou substância pura, por exemplo), comparação entre análogos do mesmo grupo, e até mesmo para a finalidade do tratamento (SILVA, 2016; BASTOS, 2017; OLIVEIRA, 2019). Entretanto, aproximando-se da realidade do presente estudo, que se utilizou de células neoplásicas, os trabalhos de Oliveira (2019) e o de Bastos (2017) adotaram como significativos valores de IS maiores ou iguais a 2,0. Dessa forma, no presente estudo, foi considerado o referido valor ou resultados superiores como relevantes.

Os complexos metálicos supracitados apresentaram índice de seletividade superior a 2 para todas as células cancerígenas testadas, sendo as células HL-60 a linhagem mais sensível para ambos os complexos, sendo o FOR0212A o mais ativo deles. Os dados são apresentados na **Tabela 5**. Vale ressaltar que o FOR0212A também apresentou IS relevante para todas as outras linhagens avaliadas, exceto a B16-F10. Ademais, o FOR0012A também evidenciou valores relevantes para a maioria das linhagens cancerígenas avaliadas, exceto a HepG2. Mais especificamente, o FOR0012A apresentou IS mais elevado que o FOR0212A em todas as linhagens cancerígenas testadas, exceto a HepG2. O dado referido anteriormente pode ser explicado pela baixa citotoxicidade do complexo nas células normais (MRC-5). Quando comparados com os IS da doxorrubicina, os análogos FOR0212A e FOR0012A, apresentaram valores similares. Apesar de menor atividade citotóxica, os complexos evidenciaram menor toxicidade em célula não cancerígena, o que explica tal resultado.

Tais achados evidenciam um bom desempenho geral dos análogos estudados, o que associado com os resultados de citotoxicidade

previamente obtidos, poderia credenciar a tanto o FOR0212A quanto o FOR0012A como promissores. Outros estudos, tais como: associação com um fármaco já validado, mecanismo de morte celular, estratégias de liberação do complexo, dentre outros estudos, poderiam ser empregados para ambos, dispondo das linhagens celulares avaliadas. Nesse sentido, tanto a atividade citotóxica quanto a segurança da utilização dos dois complexos apresentam amplo potencial para otimização.

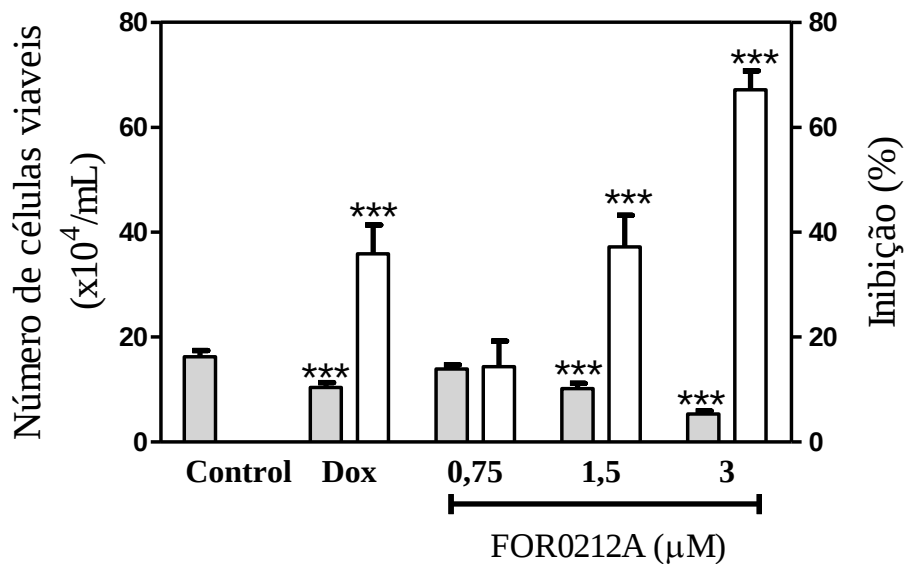
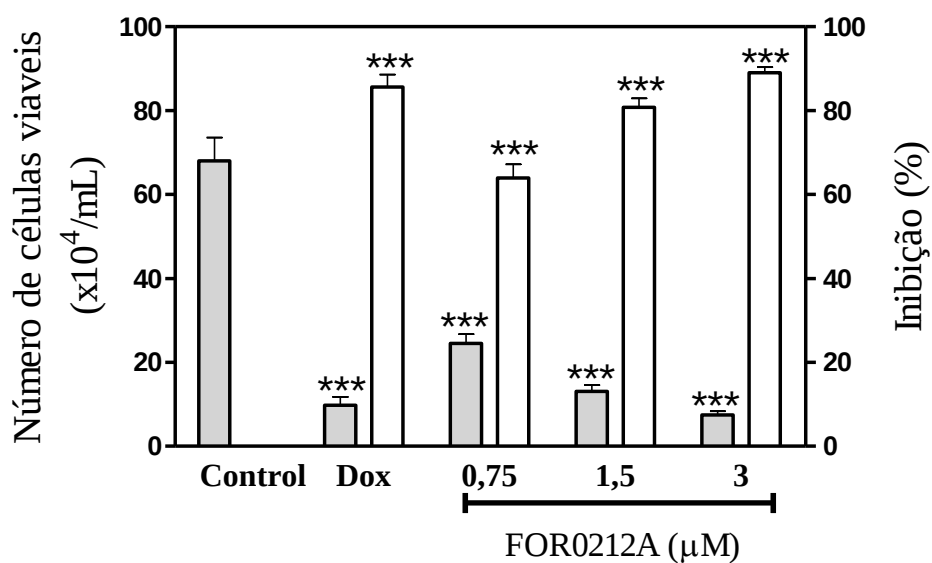
**Tabela 5.** Índice de seletividade dos complexos metálicos estudados.

| Células cancerígenas    | Índice de seletividade (IS) |          |               |
|-------------------------|-----------------------------|----------|---------------|
|                         | FOR0012A                    | FOR0212A | Doxorrubicina |
| <b>B16-F10</b>          | 2,1                         | 1,5      | 1,6           |
| <b>CAL 27</b>           | 5,4                         | 2,2      | 9,6           |
| <b>HL-60</b>            | 7,3                         | 6,6      | 5,6           |
| <b>JURKAT</b>           | 4,2                         | 2,6      | 5,6           |
| <b>HSC-3</b>            | 4,3                         | 2,0      | 2,0           |
| <b>KG-1<sup>a</sup></b> | 4,8                         | 3,3      | 4,8           |
| <b>K-562</b>            | 4,1                         | 2,6      | 1,1           |
| <b>NB4</b>              | 2,9                         | 2,0      | 8,7           |
| <b>THP-1</b>            | 5,1                         | 2,8      | 13,7          |
| <b>HepG2</b>            | 1,3                         | 2,5      | 10,0          |

Os dados são apresentados pelo índice de seletividade (IS), dispondo das células MRC-5 como célula não cancerígena. A doxorrubicina foi usada como controle positivo.

Diante dos resultados de citotoxicidade e índice de seletividade, evidenciados pelas **Tabelas 4 e 5**, prosseguiu-se o estudo com o composto mais potente (FOR0212A), utilizando a linhagem mais sensível (HL-60). Nesse contexto foi empregado o ensaio de exclusão utilizando azul de tripam, avaliando o efeito de FOR0212A na viabilidade celular, após 24 ou 48 horas de tratamento utilizando as concentrações 0,75, 1,5 e 3  $\mu$ M (baseadas no CI<sub>50</sub>). Associado a isso, foi realizada comparação com culturas não tratadas (controle negativo) e culturas tratadas com Doxorrubicina (DOX), utilizadas como controle positivo. O tratamento com FOR0212A, nas três concentrações levou a diminuição estatisticamente significativa do número de células viáveis com valores de 14,4%; 37,2% e

67,2% respectivamente, após 24h, e em 64,0%; 80,8% e 59,0% respectivamente após 48h de tratamento. Nas mesmas condições, o tratamento com a DOX (0,2  $\mu$ M) promoveu uma redução de 35,9% e 85,7% após 24 e 48h, respectivamente, que também foi considerada estatisticamente significativa. Os dados são descritos na **Figura 6**.

**A****B**

**Figura 6.** Determinação da viabilidade celular com azul de tripam. Tratamento por 24 horas (A) e 48 horas (B). As barras em cinza representam o número de células viáveis ( $\times 10^4$  células/mL) e as barras brancas representam a inibição da proliferação celular (%). Control representa as células não tratadas. Dox representa o grupo de células tratadas com a doxorrubicina (0,2  $\mu$ M). Os valores representam as médias  $\pm$  DP. \*\*\*  $p < 0,001$  em comparação com células não tratadas.

A descoberta e o desenvolvimento de ativos citotóxicos configuram-se como uma importante estratégia no tratamento do câncer. Neste estudo, os complexos de rutênio FOR000, FOR020, FOR0212A e FOR0012A, foram avaliados quanto à sua citotoxicidade e seletividade, em diversas linhagens de células cancerígenas e não cancerígenas. Foi possível observar que os clorocomplexos inéditos de rutênio (FOR0212A e FOR0012A), contendo a tiobenzamida (FORLTB) como ligante, apresentaram atividade citotóxica frente todas as linhagens de células neoplásicas testadas quando comparados com o FOR000 e FOR020.

Com intuito de propor uma hipótese para explicar a melhor atividade dos complexos utilizados no estudo, no tocante ao uso das tioamidas como ligante a átomos metálicos, o trabalho de Anastasiadou *et al.* (2020) demonstrou que a ligação de diferentes substituintes tioamidas com o átomo de prata foram capazes de gerar moléculas com atividade citotóxica/citostática frente linhagens de câncer de ovário (SKOV-3), adenocarcinoma de mama (MCF7), adenocarcinoma de próstata (PC-3) e adenocarcinoma pancreático (HuP-T3). Ademais, com intuito de especular uma hipótese para mecanismo citotóxico, observa-se como resultado prévio no trabalho do colaborador Silva (2017) que o *cis*-[RuCl(tbz)(phen)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>PF<sub>6</sub><sup>-</sup> (FOR0212A), um complexo de rutênio contendo tiobenzamida (um tipo de tioamida) como um dos substituintes moleculares, foi capaz de interagir e clivar DNA plasmidial na presença ou não de fotoativação. Entretanto, esse dado não tem poder de inferir o real papel molecular da tiobenzamida na interação com o material nuclear. Outro dado interessante, foi a fraca atividade citotóxica do FORLTB observada frente a linhagem cancerosa HL-60, visto que se trata apenas do ligante tiobenzamida. Em concordância com esse dado que foi obtido, trabalhos anteriores demonstraram atividade citotóxica do ligante (HANZLIK; VYAS; TRAIGER, 1978; HANZLIK; CASHMAN; TRAIGER, 1980; CASHMAN; TRAIGER; HANZLIK, 1982; TRAIGER *et al.*, 1989).

No presente estudo, dois dos complexos avaliados apresentavam a 2,2'-bipiridina (Bpy) e outros dois apresentavam 1,10-fenantrolina (Phen) como ligantes, ou seja, ligados ao átomo central de rutênio(II). Tanto a Bpy quanto a Phen são compostos orgânicos historicamente utilizados como agentes quelantes para íons metálicos, dispondo de diferentes atividades biológicas quando ligados aos metais de transição, tal qual o rutênio (WARE *et al.*, 1986; DWYER *et al.*, 1965; DWYER *et al.*, 1952). Ademais, ambos ligantes ainda são utilizados nos dias atuais, acrescidos de outros grupos substituintes, apresentando variados resultados citotóxicos a depender dos demais ligantes empregados conjuntamente (LI *et al.*, 2016; ZENG *et al.*, 2017).

Associado a isso, em estudos anteriores, diferentes complexos de rutênio apresentaram potente atividade citotóxica *in vitro* frente linhagens de carcinoma hepatocelular humano (HepG2, Bel7402 e SMMC7721) (LU *et al.*, 2016; SALES *et al.*, 2021), linhagens leucêmicas (K-562 e HL-60) e de carcinoma oral (SCC-4 e HSC-3) (BOMFIM *et al.* 2019; MICHLEWSKA *et al.*, 2019) e câncer de cólon humano (HCT116 e SW480) (SAVIC *et al.*, 2020). Demonstrando assim, amplo espectro de atuação contra células neoplásicas, como reportado no presente trabalho.

Devido maior potencial citotóxico e bom índice de seletividade (IS) obtidos, o potencial citotóxico do FOR0212A foi corroborado através do ensaio de viabilidade celular dispondo de modelo com HL-60 (leucemia promielocítica aguda). No trabalho de Bomfim *et al.* (2019) foi observado resultado concordante para um dos complexos de rutênio utilizados, de maneira que foram demonstrados bons índices de seletividade, dispondo das células não cancerígenas: MRC-5 (fibroblasto pulmonar humano) e PBMC (células mononucleares de sangue periférico humano) quando comparadas à HL-60. Em consonância, o trabalho de Michlewska *et al.* (2019) também demonstrou que os complexos de rutênio apresentaram melhores IS e citotoxicidade, frente a linhagem HL-60, quando veiculados

sob a tecnologia de dendrímero quando comparados aos complexos isolados.

### **O composto FOR0212A demonstrou efeito sinérgico quando associado à Doxorrubicina.**

O uso de combinação de substâncias que apresentem efeito sinérgico ou aditivo é considerado uma estratégia promissora no tratamento de diversos tipos de doença, tanto por permitir o uso de dosagens inferiores dos compostos quanto reduzir a ocorrência de efeitos adversos e até mesmo retardar a ocorrência de casos de resistência ao tratamento (SILVA, 2017). A avaliação do sinergismo entre o FOR0212A associado a um fármaco já utilizado na terapia da LPA, a doxorrubicina, foi realizada dispondo de modelo *in vitro* com HL-60.

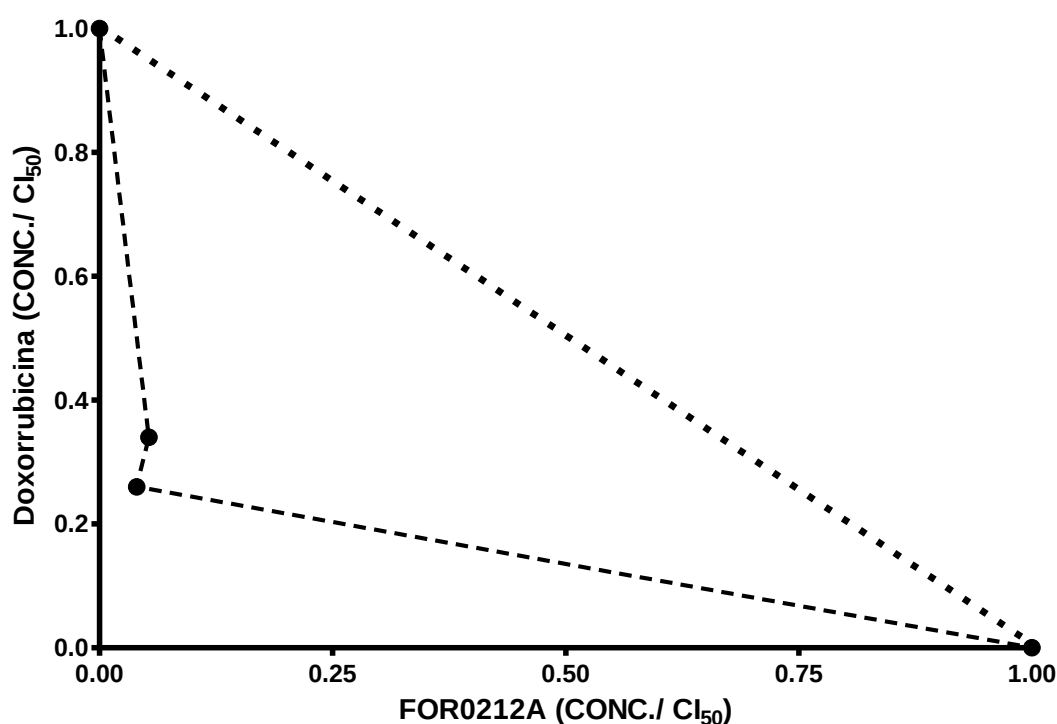
De acordo com Chou (2007), o valor do índice de combinação (IC) é o padrão utilizado para determinar o sinergismo entre dos compostos. De acordo com o autor, os valores são estratificados em: sinergismo: 0,1-0,7; sinergismo moderado: 0,7-0,85; leve sinergismo: 0,85-0,9; aditividade: 0,9-1,1; e diferentes intensidades de antagonismo >1,1. Quando comparado ao efeito individual de cada ativo com a combinação de FOR0212A e doxorrubicina, foi evidenciado que a combinação reduziu ambos os valores de  $CI_{50}$  em pelo menos quatro vezes e o valor do índice de combinação foi de 0,27, indicando sinergismo entre os compostos utilizados. Os dados são descritos na **Tabela 6**.

**Tabela 6.**  $CI_{50}$  e índice combinatório da Doxorrubicina e do FOR0212A em células HL-60.

|                      | Compostos isolados            | Compostos combinados          | IC              |
|----------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|
|                      | $CI_{50} \pm D.P$ ( $\mu M$ ) | $CI_{50} \pm D.P$ ( $\mu M$ ) |                 |
| <b>FOR0212A</b>      | 1,36 $\pm$ 0,08               | 0,062 $\pm$ 0,006             | 0,27 $\pm$ 0,09 |
| <b>Doxorrubicina</b> | 0,19 $\pm$ 0,01               | 0,04 $\pm$ 0,01               |                 |

Os valores da concentração inibitória para 50% das células ( $CI_{50}$ ) foram calculados usando concentrações em triplicata dispondo de dois experimentos independentes. Fonte: Autoria própria (2021).

Para a construção do isobolograma foi necessária a determinação da FIC, que foi calculada dispondo da razão entre as concentrações inibitórias das substâncias em combinação e isoladas. A FIC tem como objetivo quantificar a magnitude da variação da concentração das substâncias na combinação em relação a elas isoladas para obtenção do mesmo efeito (CHOU, 2007). A linha isobolográfica (tracejada) conecta o número 1 nos dois eixos, de forma que os pontos encontraram-se abaixo desta linha. Dessa forma, foi obtido um isobolograma côncavo, o que, em conjunto com o índice de combinação supracitado, revelaram que FOR0212A associado à doxorrubicina apresentaram efeito sinérgico nas proporções utilizadas. Os dados são ilustrados na **Figura 7**.



**Figura 7.** Isobolograma demonstrando o efeito sinérgico entre FOR0212A e a doxorrubicina na proliferação de células HL-60. A linha tracejada é utilizada como referência para representação do efeito de aditividade. Os pontos observados abaixo dessa linha são obtidos por modelo matemático, e representam o CI<sub>50</sub> das drogas quando utilizadas em conjunto nas diferentes proporções testadas. A presença dos pontos abaixo da linha tracejada de referência, sem tocá-la, apontam efeito sinérgico entre os compostos utilizados. Fonte: Autoria própria (2021).

A combinação de fármacos para a terapia vem sendo uma estratégia utilizada para o tratamento de doenças graves, tais como o câncer. O sinergismo entre substâncias pode ser definido como um maior efeito terapêutico da combinação quando comparada a simples somas dos efeitos das drogas isoladas, evidenciando assim, grande benefício terapêutico (KITANO, 2007). Segundo Tallarida (2000), dentre as vantagens terapêuticas do advento da terapia combinada, tem-se o aumento da eficácia; a possibilidade de redução das dosagens da substância com manutenção ou aumento do efeito terapêutico; redução da toxicidade (aumento da seletividade); e a redução da possibilidade ou atraso do aparecimento de resistência. Alguns trabalhos evidenciam tais vantagens em modelos de leucemia promielocítica aguda (WANG *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2017; AMANZADEH *et al.*, 2018).

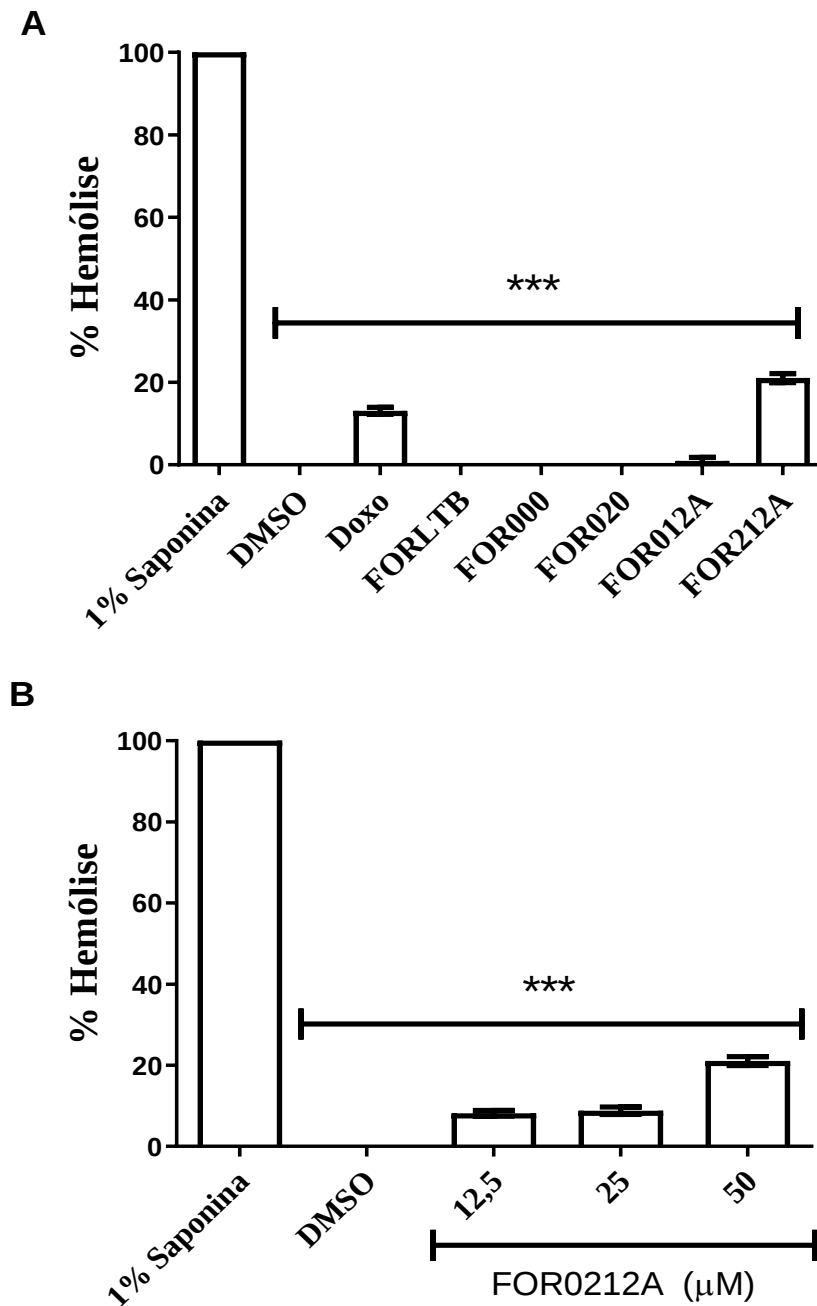
No presente trabalho foi proposto avaliar a atividade citotóxica, dispondo de modelo com células HL-60 da combinação do complexo FOR0212A com a doxorrubicina, obtendo redução do  $CI_{50}$  em pelo menos quatro vezes. Reforçando o resultado citado e corroborando o parágrafo anterior, no trabalho de Zheng *et al.* (2017) foi possível observar que o efeito sinérgico da combinação da baicalina, um flavonóide com diversas propriedades bioativas, com a doxorrubicina foi capaz de causar redução significativa no  $CI_{50}$  em células HL-60 resistentes ao tratamento prévio com a antraciclina. Além disso, a combinação foi apta a induzir *down-regulation* de alguns genes associados com a resistência. Prospectando tais dados para nossos achados, é possível aventar a possibilidade de desenho experimental similar para avaliar tal propriedade em nossa combinação empregada.

**Os complexos de Rutênio(II) FOR0212A e FOR0012A apresentaram baixa atividade hemolítica *in vitro*.**

O ensaio de hemólise *in vitro* consiste na quantificação de hemoglobina plasmática, após a exposição a uma substância avaliada, como um indicador de lise dos eritrócitos. O grau de hemólise pode ser quantificado segregando o plasma das hemácias e analisando a quantidade de hemoglobina plasmática livre dispondo de espectrofotômetro (HAN; SERRANO; DEVINE, 2010). No presente estudo, tanto os complexos precursores, FOR020 e FOR000 quanto os seus respectivos derivados acrescidos da tiobenzamida (FOR0212A e FOR0012A), assim como a própria tiobenzamida isolada (FORLTB) foram avaliados.

Referente aos complexos precursores, não foi observada atividade hemolítica, assim como para a tiobenzamida e a solução contendo 0,5% v/v de DMSO (controle negativo). No entanto, seguindo os achados de citotoxicidade anteriormente descritos, foi quantificado que os complexos FOR0212A e FOR0012A evidenciaram atividade hemolítica na concentração máxima avaliada (50  $\mu\text{M}$ ), sendo respectivamente 21% ( $\pm 1,0$ ) e 1% ( $\pm 0,8$ ). Quando testadas outras concentrações do FOR0212A, observou-se que as concentrações de 12,5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  também apresentaram atividade hemolítica de 8% ( $\pm 0,7$ ) e 8,1% ( $\pm 0,9$ ), respectivamente. Devido ao curto tempo de contato entre os complexos metálicos e as hemácias, as concentrações utilizadas foram superiores aos valores de  $\text{CI}_{50}$  obtidos previamente.

A doxorubicina, na concentração de 20  $\mu\text{M}$  apresentou 13% ( $\pm 0,8$ ) de hemólise. A solução contendo 1% de saponina (controle positivo) foi considerada como 100% de atividade hemolítica. Vale ressaltar que apesar do dado obtido, a hemólise não é um evento adverso relatado na bula do medicamento (doxorubicina). Os dados supracitados são evidenciados na **Figura 8**.



**Figura 8.** Determinação da atividade hemolítica. Foi realizada a incubação por 1 hora dos complexos FORLTB, FOR000, FOR020, FOR0012A e FOR0212A nas concentrações de 50μM, do controle positivo (1% saponina), do controle negativo (DMSO 0,5% v/v) e do fármaco referência Doxorubicina (Doxo 20 μM) com hemácias lavadas (A) e incubação por 1 hora do complexo FOR0212A nas concentrações de 12,5; 25 e 50μM, do controle positivo (1% saponina), do controle negativo (DMSO 0,5% v/v) com hemácias lavadas (B). As barras representam o percentual de hemólise atingido. DMSO representa as células incubadas com DMSO 0,5% v/v. Dox representa o grupo incubado com a doxorubicina (20 μM). Os valores representam as médias ± DP. \*\*\* p < 0,001 em comparação com incubadas com 1% de saponina. Fonte: Autoria própria (2022).

A hemólise induzida por fármacos é um evento relativamente raro, entretanto de elevada gravidade, podendo ocorrer tanto por toxicidade direta do eventual fármaco, metabólito ou excipiente; quanto por reação imunológica em pacientes previamente sensibilizados a um medicamento (DAUSSE e CONTU, 1967). A avaliação, em paralelo, da atividade hemolítica já é bem descrita como um ensaio de toxicidade em estudos de atividade anticâncer (TENG *et al.*, 2016; LAZCANO-PÉREZ *et al.*, 2018), antiparasitária (LAZCANO-PÉREZ *et al.*, 2018), antibacteriana (OGUIURA *et al.*, 2011) e na proposição de utilização de novos excipientes (AMIN e DANNENFELSER, 2006).

Devido a característica do ensaio em questão, vale ressaltar que o mesmo não consegue avaliar um possível caso de hemólise indireta, o que é um fator limitante para o ensaio. Ademais, eventos que podem ocorrer *in vivo*, tais como bioacumulação do fármaco devido realização de inúmeros ciclos de quimioterapia, dentre outros, também podem limitar a extrapolação dos resultados *in vitro* para o *in vivo*.

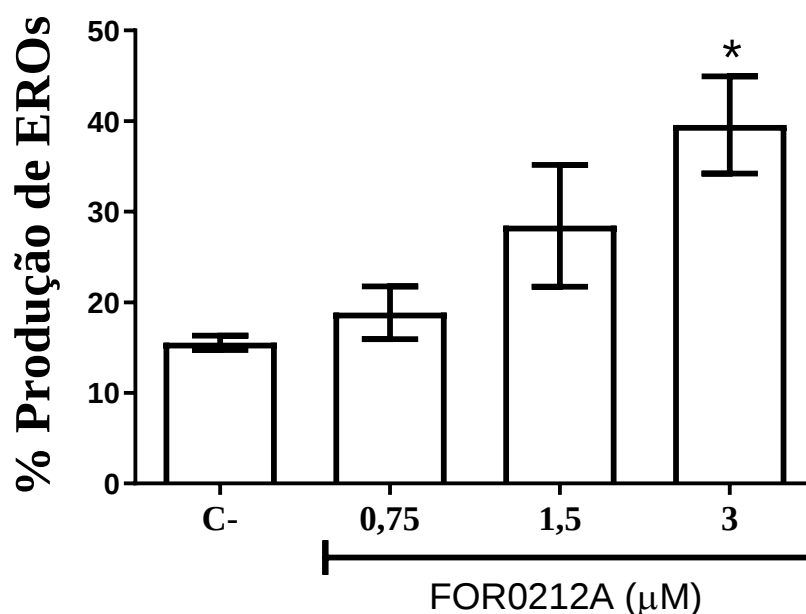
A atividade hemolítica pode ser utilizada como uma ferramenta para avaliar a segurança e a utilidade de uma formulação parenteral (AMIN e DANNENFELSER, 2006). Entretanto, apesar da importância dos testes de potencial hemolítico *in vitro*, os resultados obtidos podem ser discrepantes dos achados clínicos devido a enumeras variáveis, tais como volume avaliado, tempo de contato e método empregado, dentre outras (KRZYZABUJ *et al.*, 1997a).

Para Amin e Dannesfeler (2006), uma das repercussões clínicas e *in vivo* que pode ser atribuída à hemólise, causada por administração intravenosa de medicamentos, é a dor na região infusional. Ademais, a hemoglobina liberada, devido a reação hemolítica, pode convergir em irritação vascular, flebite, anemia, icterícia, insuficiência renal aguda e, em alguns casos, morte (KRZYZABUJ *et al.*, 1997b). No contexto da anemia hemolítica autoimune induzida por fármacos (ADIIHA), os antibióticos, destacando-se os beta-lactâmicos e fluoroquinolonas; seguidos dos anti-

inflamatórios não esteroidais (AINES), com cerca de 15% dos casos, e dos antineoplásicos (como exemplo de ipilimumabe e o nivolumabe), são os fármacos mais associados com tal evento (RIOS *et al.*, 2020).

### O tratamento com complexo FOR0212A culminou com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Os níveis intracelulares de ERO foram investigados por citometria de fluxo usando o fluorógeno H<sub>2</sub>-DCF-DA, após o tratamento de células HL-60 com o complexo FOR0212A (0,75  $\mu$ M; 1,5  $\mu$ M e 3,0  $\mu$ M) e com 0,5% (v/v) de DMSO (controle negativo). O tratamento após 1 hora de incubação induziu um aumento significativo nos níveis de ERO na concentração de 3,0  $\mu$ M ( $P < 0,05$ ) do complexo FOR0212A, entretanto não se observou significância com as outras concentrações utilizadas (0,75  $\mu$ M e 1,5  $\mu$ M). Os dados supracitados são evidenciados na **Figura 9**.



**Figura 9.** Quantificação da produção de ERO. Foi realizada a incubação por 1 hora das células HL-60 com o complexo FOR0212A nas concentrações de 0,75  $\mu$ M, 1,5  $\mu$ M, 3,0  $\mu$ M e do controle negativo (DMSO 0,5% v/v); As barras representam o percentual da produção de ERO nas concentrações de 0,75  $\mu$ M, 1,5  $\mu$ M, 3,0  $\mu$ M. C- representa as células

incubadas com DMSO 0,5% v/v. Os valores representam as médias  $\pm$  DP. \*  $p < 0,05$  em comparação com incubadas com DMSO. Fonte: Autoria própria (2022).

Apesar das concentrações de 0,75  $\mu$ M e 1,5  $\mu$ M não evidenciarem produção de ERO, no tempo de 1 hora, o estudo teve como limitação a avaliação apenas desse tempo de tratamento. A utilização de outros tempos, a exemplo de 3 horas de tratamento, como já realizado em outro trabalho (SILVA *et al.*, 2018), poderia evidenciar resultados diferentes.

No presente estudo, a avaliação da produção de ERO foi bastante importante devido aos dados prévios visualizados acerca do acúmulo mitocondrial do rutênio, o que poderia culminar em uma desestabilização da cadeia mitocondrial e produção de ERO.

Nesse sentido, as espécies reativas de oxigênio possuem papel fundamental em sistemas fisiológicos, incluindo regulação da imunidade, regulação da autofagia, adaptação à hipóxia, regulação da diferenciação e regulação da longevidade celular (KASHYAP *et al.*, 2019). Paradoxalmente, as espécies reativas de oxigênio atuam tanto no desenvolvimento e progressão do câncer (devido a danos ao DNA, modificações de bases nitrogenadas, quebra de fita, estímulo à angiogênese e metástase, dentre outros), assim como podem induzir morte celular apoptótica, o que configura-se como um importante abordagem na terapêutica do câncer (MATES; SANCHEZ-JIMENEZ, 2000; AGGARWAL *et al.*, 2019). Ademais, a própria doxorubicina, largamente empregada no tratamento da LLA, também induz a produção intracelular de ERO como um dos mecanismos de morte celular (PILCO-FERRETO; CALAF, 2016).

Os achados do estudo apontaram que a concentração com maior citotoxicidade em células HL-60, também foi a concentração que apresentou maior indução à produção de ERO. Nesse contexto, alguns autores destacaram que o acúmulo mitocondrial de espécies reativas, tais como o  $H_2O_2$ , induziram à apoptose células de linhagens tumorais, tais como: PC-3

(câncer de próstata), HepG2 (câncer hepático) e MCF-7 (câncer de mama) (KHAN *et al.*, 2013). Associado a isso, a interrupção ou inibição de enzimas antioxidantes celulares, tais como catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD), é outro mecanismo que culmina no aumento da produção de ERO e desencadeia a apoptose em células malignas (LI *et al.*, 2019).

Apesar dos achados supracitados, não foram realizados ensaios para avaliação do mecanismo de morte celular, portanto não é possível inferir diretamente o papel da produção de ERO na morte celular induzida pelo FOR0212A. A realização de estudos, tais como avaliação do ciclo celular; avaliação da morte celular por apoptose/necrose (Anexina V/iodeto dipropídio); a avaliação da via autofágica; e avaliação da cadeia mitocondrial (Rodamina 123), poderiam ser empregados com essa finalidade. Associado a isso, estudos de expressão gênica e dispondo de antagonistas também seriam úteis para compreensão do mecanismo de morte celular.

## 6. Conclusões

Os dois análogos de rutênio avaliados apresentaram atividade citotóxica, em especial o FOR0212A. Ambos os análogos apresentaram índice de seletividade relevante, em especial o FOR0012A, o que é uma premissa inicial para a segurança do tratamento. Foi possível identificar um efeito sinérgico do FOR0212A com um fármaco já validado no tratamento da leucemia promielocítica aguda, a doxorrubicina. Esse dado, mesmo que preliminar, expande e reforça o prosseguimento dos estudos com FOR0212A. Referente à propriedade hemolítica dos complexos, observou-se que a concentração capaz de induzir hemólise é aproximadamente 10 vezes superior que a concentração responsável pelo  $CI_{50}$  para a linhagem mais sensível (HL60), ainda assim sendo inferior aos resultados obtidos com a doxorrubicina. Associado a isso, experimentos iniciais, acerca da produção de ERO, evidenciaram aumento significativo da produção de radicais livres de oxigênio na maior concentração utilizada do complexo metálico FOR0212A (3,0  $\mu$ M).

O presente estudo elencou dois complexos inéditos que apresentaram resultados promissores como potenciais agentes anticâncer. Sendo assim, um vasto campo de pesquisas pode ser desbravado com os mesmos. Dessa forma, fazem-se necessários estudos futuros para descrever e propor o mecanismo de morte celular, perfil de modulação gênica, o desempenho do complexo em modelo antitumoral *in vivo*, dentre outros ensaios.

## Referências

- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1324–1337, 2007.
- AGGARWAL, V.; TULI, H. S.; VAROL, A. THAKRAL, F.; YERER, M. B.; SAK, K.; VAROL, M.; JAIN, A.; KHAN, M. A.; SETHI, G. Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 1-26, 2019.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v.170, p.211-224, 1994.
- ALBAIN, K. S.; NAG, S. M.; CALDERILLO-RUIZ, G.; JORDAAN, J. P.; LLOMBART, A. C.; PLUZANSKA, A.; ROLSKI, J.; MELEMED, A. S.; REYES-VIDAL, J. M.; SEKHON, J. S.; SIMMS, L.; O'SHAUGHNESSY, J. Gemcitabine plus Paclitaxel versus Paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment. **Journal of Clinical Oncology**. v. 26, p. 3950-3957, 2008.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 6ª Edição. Porto Alegre: **Artmed**, p.963-1020, 2017.
- ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; BERGAMO, A.; SAVA, G. Ruthenium anti- cancer drugs. In: Sigel, A., Sigel, H. (Eds.), Metal Ions in Biological Systems. **Metal Complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents**, v. 42, p. 323–351, 2004.
- ALESSIO, E.; MESSORI, L. Anticancer drug candidates face-to-face: a case story in medicinal inorganic chemistry. **Molecules**, v. 24, p. 1–20, 2019.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. 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.
- AMABLE, L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. **Pharmacological Research**, v. 106, p. 27–36, 2016.
- AMANZADEH, A.; MOLLA-KAZEMIHA, V.; SAMANI, S.; HABIBI-ANBOUHI, M.; AZADMANESH, K.; ABOLHASSANI, M.; SHOKRGOZAR, M. A. New synergistic combinations of differentiation-inducing agents in the treatment of acute promyelocytic leukemia cells. **Leukemia Research**, v. 68, p. 98–104, 2018.
- AMIN, K.; DANNENFELSER, R. M. In vitro hemolysis: Guidance for the pharmaceutical scientist. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.95, n.6, p.1173–1176, 2006.
- ANASTASIADOU, D.; GEROMICHALOU, E.; TSAVEA, E.; PSOMAS, G.; HATZIDIMITRIOU, A. G.; KALOGIANNIS, S.; ASLANIDIS, P. Silver complexes with heterocyclic thioamide and tertiary arylphosphane ligands: Synthesis, crystal structures, in vitro and in silico antibacterial and cytotoxic activity, and interaction with DNA. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 210 p. 1 - 42, 2020.
- ANTUNES, F.; ERUSTES, A. G.; COSTA, A. J.; NASCIMENTO, A. C.; BINCOLETTI, C.; URESHINO, R. P.; PEREIRA, G. S. P.; SMAILI, S. S. Autophagy and intermittent fasting: the connection for cancer therapy? **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 73, n. 16, 2018.
- AVGERINOS, K. I.; SPYROU, N.; MANTZOROS, C. S.; DALAMAGA, M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 92, p. 121–135, 2019.
- BASTOS, M. L. C. **Avaliação da citotoxicidade e seletividade do extrato, frações e alcaloide de *Geissospermum sericeum* (Apocynaceae) em linhagens celulares ACP02, HepG2 e VERO**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências

Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará – Universidade Federal do Pará. Belém, p.108. 2017.

BENNET, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of the acute leukemia. French-American-British (FAB) Cooperative Group. **British Journal of Haematology** v. 33, p.451-458, 1976.

BERGAMO, A.; SAVA, G., Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy. **Dalton Transactions**, n. 13, p. 1267-1272, 2007.

BERX, G.; VAN ROY, F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, 2009.

BIANCALANA, L.; PAMPALONI, G.; MARCHETTI, F. Arene ruthenium (II) complexes with phosphorous ligands as possible anticancer agents. **Chimia**, v. 71, n. 9, p. 573–579, 2017.

BOMFIM, L. M.; ARAUJO, F. A.; DIAS, R. B.; SALES, C. B. S.; ROCHA, C. A. G.; CORREA, R. S.; BEZERRA, D. P. Ruthenium(II) complexes with 6-methyl-2-thiouracil selectively reduce cell proliferation, cause DNA double-strand break and trigger caspase-mediated apoptosis through JNK/p38 pathways in human acute promyelocytic leukemia cells. **Scientific Reports**, v.9, n. 1, p. 1-17, 2019.

BRABEC, V. DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v.71, p.1 - 68, 2002.

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

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BURKHART, D. L.; SAGE, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Physiology & behavior**, v. 9, n. 8, p. 671–687, 2008.

Cancer Statistics. **Nacional Cancer Institute (NIH)**, 2020. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>>. Acesso em: 29 de dez. de 2020)

CANNATA, D.; FIERZ, Y.; VIJAYAKUMAR, A. Type 2 diabetes and cancer: what is the connection? **Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 77, p. 197–213, 2010.

CASHMAN, J. R.; TRAIGER, G. J.; HANZLIK, R. P. Pneumotoxic effects of thiobenzamide derivatives. **Toxicology**, v. 23, n. 1, p. 85–93, 1982.

CASPERSEN C. J; THOMAS G. D.; BOSEMAN L. A. Aging, diabetes, and the public health system in the U. S **Am J Public Health**, v. 102, p. 1482–1497, 2012.

CASTAIGNE, S.; CHOMIENNE, C.; DANIEL, M. T.; BALLERINI, P.; BERGER, R.; FENAUX, P.; DEGOS, L. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. **Blood**. v.76, n.9, p.1704-1709, 1990.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 2, p. 118–132, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Measles - United States, 2011. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 61, n. 15, p. 253–280, 2012.

CEZAR, J. G. **Síntese, caracterização e reatividade de nitrosilo complexos de Rutênio com ligante diflunisal**. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação e Pesquisa do Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA). Salvador, p.117. 2015

CHAUFFAILLE, M. L.; FIGUEIREDO, M. S.; BELTRANI, R.; ANTUNES, S. V.; YAMAMOTO, M.; KERBAUY, J. Acute promyelocytic leukemia: the study of t(15;17) translocation by fluorescent in situ hybridization, reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytogenetic techniques. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.34, n.6 p.735-43, 2001.

CHEN, S. H.; CHANG, J. Y. New insights into mechanisms of cisplatin resistance: From tumor cell to microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, p. 2–21, 2019.

CHEN, J. WEI, H.; CHENG, J.; XIE, B.; WANG, B.; YI, J.; TIAN, B.; LIU, Z.; WANG, F.; ZHANG, Z. Characteristics of doxorubicin-selected multidrug-resistant human leukemia HL-60 cells with tolerance to arsenic trioxide and contribution of leukemia stem cells. **Oncology Letters**, v. 15, n. 1, p. 1255–1262, 2018.

CHENG, N.; CHYTIL, A.; SHYR, Y.; JOLY, A.; MOSES, H. L. TGF- $\beta$  signaling deficient fibroblasts enhance Hepatocyte Growth Factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Molecular Cancer**, v. 6, n. 10, p. 1521–1533, 2008.

CHOU, T.C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Adv Enzyme Regul**. v. 22, p. 27-55, 2005.

CHOU, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 621-81, 2007.

CIBAS, E. S. Applications of flow cytometric DNA analysis to diagnostic cytology. **Diagnostic Cytopathology**, v.13, p.166 – 171, 1995.

CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews** v. 236, p.209–233, 2003.

COHEN, S. M.; LIPPARD, S. J. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog. Nucleic Acid Molecular biology* v. 67 p. 93–130, 2001.

COLLADO, M.; SERRANO, M. Europe PMC Funders Group Senescence in tumours : evidence from mice and humans. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 1, p. 51–57, 2010.

CREE, I. A. Cancer Cell Culture, MTT assay. **Methods Mol Biol**, v. 731, n. 1, p. 79–91, 2011.

DAUSSET, J.; CONTU, L. Drug-Induced Hemolysis. **Annual Review of Medicine**, v.18, n. 1, p.55–70, 1967.

DEEKS, S. G. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. **Annual Review of Medicine**, v. 62, n. 5, p. 141–155, 2011.

DOUER, D. The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. **Best Pract Res Clin Haematol**. V.16, n.3, p.357-67, 2003.

DWYER, F. P.; GYARFAS, E. C.; ROGERS, W. P.; KOCH, J. H. Biological Activity of Complex Ions. **Nature**, v.170, n.4318, 190–191, 1952.

DWYER, F. P.; MAYHEW, E.; ROE, E. M. F.; SHULMAN, A. Inhibition of Landschütz Ascites Tumour Growth by Metal Chelates Derived from 3,4,7,8-Tetramethyl-1,10-phenanthroline. **British Journal of Cancer**, v. 19, n.1, p.195–199, 1965.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

EVAN, G. I.; DI FAGAGNA, F. D. Cellular senescence: hot or what? **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 19, n. 1, p. 25–31, 2009.

FERREIRA, K. Q.; SANTOS, F. G.; ROOCHA, Z. N.; GUARATINI, T.; SILVA, R. S.; TFOUNI, E. Conformational isomers of cis-[RuIICl(imcyclen)(NO<sup>+</sup>)]<sub>2</sub><sup>2+</sup>. Oxidation of the coordinated 1,4,7,10-tetraazacyclodecane (cyclen) ligand. **Inorganic Chemistry Communications**, v.7, p.204-208, 2004.

FIGUEIREDO-PONTES, L. L. PINTÃO, M. C. T.; OLIVEIRA, L. C. O.; DALMAZZO, L. F. F.; JÁCOMO, R. H.; GARCIA, A. B.; FALCÃO, R. P.; REGO, E. M. Determination of P-glycoprotein, MDR-related protein 1, breast cancer resistance protein, and lung-resistance protein expression in leukemic stem cells of acute myeloid leukemia. **Cytometry Part B - Clinical Cytometry**, v. 74, n. 3, p. 163–168, 2008.

FIVELMAN, Q. L.; ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C. Modified fixed-ratio isobolograma method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 48: p. 4097-4102. 2004.

GARSON, O. M.; HAGEMEIJER, A.; KONDO, K.; ROWLEY, J. D. Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982: Chromosomes in acute promyelocytic leukemia. **Cancer Genet Cytogenet.** v.11 p.288-293, 1984.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p.1-20, 2019.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science.** v. 281, n. 5381, p. 1309-1312, 1998.

HAN, V.; SERRANO, K.; DEVINE, D. V. A comparative study of common techniques used to measure haemolysis in stored red cell concentrates. **Vox Sanguinis.** v.98, p.116–123, 2010.

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

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.

HANZLIK, R. P.; VYAS, K. P.; TRAIGER, G. J. Substituent effects on the hepatotoxicity of thiobenzamide derivatives in the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 685–694, 1978.

HANZLIK, R. P.; CASHMAN, J. R.; TRAIGER, G. J. Relative hepatotoxicity of substituted thiobenzamides and thiobenzamide-S-oxides in the rat. **Topics in Catalysis**, v. 55, n. 2, p. 260–272, 1980.

HELMAN, R. S. SIMÕES, F. P. S.; ATTA, B.; CALLERA, E. H.; Dobbin, F.; Mattos, J. A.; ATALLA, E. R.; MAIOLINO, A.; ZANICHELLI, A.; DIEFENBACH, M. A.; DELAMAIN, C. F.; HAMERSCHLAK, M. T. Leucemia mieloide aguda: atualidade brasileira de diagnóstico e tratamento. **Einstein (São Paulo)**, v. 9, n. 11, p. 179–183, 2011.

HERRMANN, J. Adverse cardiac effects of cancer therapies: cardiotoxicity and arrhythmia. **Nature Reviews Cardiology**, v. 17, n. 8, p. 474–502, 2020.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H.; PETTIT, J. E. **Essential haematology. 6th. Oxford: Wiley-Blackwell.** p.179-190, 2011.

HOWLADER, N.; NOONE, AM.; KRAPCHO, M. SEER cancer statistics review, 1975–2009 (Vintage 2009 Populations). **Bethesda MD: National Cancer Institute**; 2012.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nat Rev Cancer.** v.2, p.277– 288, 2002.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. **ABC do câncer, abordagens básicas para controle do câncer.** 2ª edição, 2012. Disponível em: < [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/abc\\_do\\_cancer\\_2ed.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/abc_do_cancer_2ed.pdf) > acessado em 18/06/2021.

INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer José

Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2020: Incidência de Câncer no Brasil.**, Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf> > acessado em 21/12/2020.

JÁCOMO, R. H.; FIGUEIREDO-PONTES, L. L. DE; REGO, E. M. Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 1, p. 82–89, 2008.

JAIN, K. R.; DUDA, D. G.; WILLETT, C. G.; SAHANI, D. V.; ZHU, A. X.; LOEFFLER, J. S.; BATCHELOR, T. T. Biomarkers of Response Currently Used in Cancer Therapy Biomarker Cancer type. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 6, n. 6, p. 327–338, 2009.

JUNTTILA, M. R.; EVAN, G. I. P53 a Jack of all trades but master of none. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 11, p. 821–829, 2009.

KASHYAP, D.; TULI, H. S.; SAK, K.; GARG, V. K.; GOEL, N.; PUNIA, S.; CHAUDHARY, A. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression. **Current Pharmacology Reports**, V. 5, n. 2, p. 79–86, 2019.

KATZUNG, G. B. **Basic and Clinical Pharmacology**, 12<sup>th</sup> edn., McGraw-Hill Medical, United States of America, p.949-975, 2014.

KHAN, M. A.; CHEN, H. C.; WAN, X. X.; TANIA, M.; XU, A. H.; CHEN, F. Z.; ZHANG, D. Z. Regulatory effects of resveratrol on antioxidant enzymes: A mechanism of growth inhibition and apoptosis induction in cancer cells. **Molecules and Cells**, v. 35, p. 219–225, 2013.

KHDAIR, A.; CHEN, D.; PATIL, Y.; MA, L.; DOU, Q. P.; SHEKHAR, M. P.; PANYAM, J. Nanoparticle-mediated combination chemotherapy and photodynamic therapy overcomes tumor drug resistance. **J Control Release**. v. 141, p.137-144, 2010.

KIM, J. W. WONG, C. W.; J GOLDSMITH, J. D.; SONG, C.; FU, W.; ALLION M.; HERLYN, M.; AL-MEHDI, A. B.; RUTH, MUSCHEL, R. J. M. Rapid apoptosis in the pulmonary vasculature distinguishes non-metastatic from metastatic melanoma cells. **Cancer Letters**, v. 213, n. 2, p. 203–212, 2004.

KITANO, H. A. robustness-based approach to systems-oriented drug design. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 6, n. 3, p. 202–210, 2007.

KLAUSNER, R. D.; VAN RENSWOUDE, J.; ASHWELL, G. J. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 4715, 1983.

KOSTOVA, I. Ruthenium Complexes as Anticancer Agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1085–1107, 2006.

KOSTOVA, I. Platinum Complexes as Anticancer Agentes. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, p. 1-22, 2006.

KRZYNZANIAK, J. F.; RAYMOND, D. M.; YALKOWSKY, S. H. Lysis of human red blood cells 2: Effect of contact time on cosolvent induced hemolysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 152, p.193–200, 1997a.

KRZYNZANIAK, J. F.; ALVAREZ NUNEZ F. A.; RAYMOND, D. M.; YALKOWSKY, S. H. Lysis of human red blood cells 4: Comparison of in vitro and in vivo hemolysis data. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.86: p.1215–1217, 1997b.

LA V.C; GIORDANO S.H.; HORTOBAGYI G.N. Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle. **Oncologist**, v. 16, p. 726–729, 2011.

LAZCANO-PÉREZ, F.; ZAVALA-MORENO, A.; RUFINO-GONZÁLEZ, Y.; PONCE-MACOTELA, M.; GARCÍA-ARREDONDO, A.; CUEVAS-CRUZ, M.; ARREGUÍN-ESPINOSA, R. Hemolytic, anticancer and antiangiogenic activity of Palythoa caribaeorum venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 24, n.1, p.1-7, 2018.

LEE, S. Y.; KIM, C. Y.; NAM, T. G. Ruthenium complexes as anticancer agents: A brief history and perspectives. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 5375–5392, 2020.

LI, G.; SUN, L.; JI, L.; CHAO, H. Ruthenium(II) complexes with dppz: from molecular photoswitch to biological applications. **Dalton Transactions**, v. 45, n.34, p.13261–13276, 2016.

LI, X.; CHEN, Y.; ZHAO, J.; SHI, J.; WANG, M.; QIU, S.; HU, Y.; XU, Y.; CUI, Y.; LIU, C. The specific inhibition of SOD1 selectively promotes apoptosis of cancer cells via regulation of the ROS signaling network. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-21, 2019.

LU, Y.; SHEN, T.; YANG, H.; GU, W. Ruthenium Complexes Induce HepG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cell Apoptosis and Inhibit Cell Migration and Invasion through Regulation of the Nrf2 Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 775, 2016.

MACEDO, T. S.; VILLARREAL, W.; COUTO, C. C.; MOREIRA, D. R. M. ; NAVARRO, M.; MACHADO, M.; PRUDÊNCIO, M.; BATISTA, A. A.; SOARES, MILENA B. P. Platinum(II)-chloroquine complexes are antimalarial agents against blood and liver stages by impairing mitochondrial function. **Metallomics**, v. 9, p. 1548-1561, 2017.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.

MACKLIS, J. D.; MADISON, R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 31, p. 43-46, 1990.

MATES, J. M.; SANCHEZ-JIMENEZ, F. M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.32, p. 157-170, 2000.

MEGGERS, E. Exploring biologically relevant chemical space with metal complexes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n.3, p. 287-292, 2007.

MICHLEWSKA, S.; IONOV, M.; MAROTO-DÍAZ, M.; SZWED, A.; IHNATSYEU-KACHAN, A.; ABASHKIN, V.; BRYSEWSKA, M. Ruthenium dendrimers against acute promyelocytic leukemia: in vitro studies on HL-60 cells. **Future Medicinal Chemistry**, v.11, n.14. p. 1741-1756, 2019.

MOKHTARI, R. B.; KUMAR, S.; ISLAM, S. S.; YAZDANPANAH, M.; ADELI, K.; CUTZ, E.; YEGER, H. Combination of carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide, and sulforaphane, reduces the viability and growth of bronchial carcinoid cell lines. **BMC Cancer**, v.13, n.378, p. 1-18, 2013.

MOKHTARI, R. B.; HOMAYOUNI, T. S.; BALUCH, N.; MORGATSKAYA, E.; KUMAR, S.; DAS, B.; YEGER, H. Combination therapy in combating cancer systematic review: Combination therapy in combating cancer background. **Oncotarget**, v. 8, n. 23, p. 38022–38043, 2017.

NSEYO, U. O. Photodynamic therapy. **Urologic Clinics of North America**, v.19, n.3, p.591-599, 1992.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Platinum(II) complexes in cancer therapy. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p. 196–209, 2011.

NORBURY, C. J.; HICKSON, I. D.; Cellular responses to DNA damage. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.41, p.367–401, 2001.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; AFFONSO, R.; ZHANG, G. In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. **The Journal of Antibiotics**, v.64, n.4, p.327–331, 2011.

OLIVEIRA, M. A. B. R. **Avaliação da atividade antitumoral in vitro do derivado de dibenzoilmetano, 1-[(4'-iso-propil)fenil]-2-propano-3-fenil-1,3- propanodiona (ip2-dbm), em**

**linhagens de melanoma, glioma e adenocarcinoma do colorretal.** Dissertação (Mestrado em em Biologia Celular e Estrutural) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa p.65. 2019.

PIACENTINI, A. B.; MENEZES, H. Recentes Aspectos Sobre a Biologia Do Latest Aspects on the Biology of Cancer and Metastases. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 3, p. 593–604, 2012.

PILCO-FERRETO, N.; CALAF, G. M. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. **International Journal of Oncology**, v.49, p.753–762, 2016.

RELÓGIO, A; THOMAS, P; MEDINA-PÉREZ, P. Ras-mediated deregulation of the circadian clock in cancer. **PLoS Genet**, v.10, n.5, p.1-18, 2014.

RIOS, J. O.; LIMA, F. L. O.; ALMEIDA, F. C.; ALMEIDA, P. C.; AMORIM, C. F.; GÓES, F. S. R.; GOMES, L. N. L.; OLIVEIRA, G. A. L. Anemia hemolítica autoimune induzida por fármacos, **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 42, n. 2, p. 516, 2020.

RODRIGUES, F. S. S.; POLIDORI, M. M. Confront and resiliency of the patients in the chemotherapeutic treatment and their families. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 4, p. 619-627, 2012.

ROKAVEC, M; LI, H; JIANG, L. The p53/miR-34 axis in development and disease. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 214–230, 2014.

ROSAS, M. S. L.; SILVA, B. N. M.; PINTO, R. G. M. P.; SILVA, B. V.; SILVA, R. A.; GUERRA, L. R.; SOARES G. C. M. T.; CASTRO, H. C; LIONE, V. O. F. Incidence of cancer in Brazil and the potential use of isatin derivatives in experimental oncology. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, p. 243–265, 2013.

SAGRILLO, M. R.; CARDOSO, S. H.; SILVA, L. R. J.; GRAÇA, C. H. N.; NELSON, E. F.; GUERRA, H. J. C.C; BACAL, N. S.; ANDRADE, J. A. D.; BOROVNIK, C. L. Leucemia promielocítica aguda: caracterização de alterações cromossômicas por citogenética tradicional e molecular (FISH). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 2, p. 94–101, 2005.

SALES, D. K. S.; SIMPLÍCIO, L. M. T.; SILVA, C. D. S.; ENJU, C. M. B.; SILVA, V. B.; PAULO, T. F.; SANTOS, I. P.; QUADROS, H. C.; MEIRA, C. S.; SOARES, M. B.P.; LOPES, L. G. F.; SOUSA, E. H. S.; SÁ, D. S. A bis-indazolic ruthenium(II) complex: Reactivity and biological studies on cancer cells. **Inorganica Chimica Acta**, v. 516, N 1- 36, 2021.

SANTOS, L.S. **Estudo do potencial citotóxico do alcaloide aporfnico xilopina.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Gonçalo Moniz. Salvador, p.90. 2017.

SANZ, M. A.; MARTIN, G.; GONZALEZ, M.; LEON, A.; RAYON, C.; RIVAS, C. Risk- adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. **Blood**, v.03, n.4, p.1237-1243, 2004.

SARICH, P.; CANFELL, K.; EGGER, S.; BANKS, E.; JOSH, G.; GROGAN, P.; WEBER, M. F. Alcohol consumption, drinking patterns and cancer incidence in an Australian cohort of 226,162 participants aged 45 years and over. **British Journal of Cancer**, p. 1–11, 2020.

SAVA, G. I.; CAPOZZI, K.; CLERICI, G.; GAGLIARDI, E.; MESTRONI, A. Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex. **Clinical & Experimental Metastasis**, v.16, p. 371-379, 1998.

SCOLARO, C. ; BERGAMO, A.; BRESCACÍN, L. ; DELFINO, R.; COCCHIETTO, M.; LAURENCZY, G.; GELDBACH, T. J.; SAVA, G.; DYSON, P. In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 4161–4171, 2005.

SHERR, C. J.; MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell**, v. 2, p. 103–112, 2002.

SILVA, J. J. **Avaliação da atividade leishmanicida da combinação de Curcumina e DETC**. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador, p.89. 2016

SILVA, C. D. S. **Síntese, caracterização, reatividade e aplicações biológicas de complexos de Ru(II) contendo tioamidas**. Tese (Doutorado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química Universidade Federal do Ceará – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica. Ceará. p.182. 2017.

SILVA, V. R.; CORRÊA, R. S.; SANTOS, L. S.; SOARES, M. B. P.; BATISTA, A. A.; BEZERRA, D. PEREIRA. A ruthenium-based 5-fluorouracil complex with enhanced cytotoxicity and apoptosis induction action in HCT116 cells. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-13, 2018.

SMITH, B. D.; MORGAN, R. L.; BECKETT, A. G.; FALCK-YTTER, Y.; HOLTZMAN, D.; TEO, C.; JEWETT, A.; BAACK, B.; REIN, D. B.; PATEL, N.; ALTER, M.; YARTEL, A.; WARD, J. W. Recommendations for the identification of chronic hepatitis C virus infection among persons born during 1945-1965. **MMWR. Recommendations and Reports**, v. 61, n. 4, p. 1–32, 2012.

SPANDIDOS, D.A. Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis. **Journal of Buon**, v.12, n.1, p. 9 – 12, 2007.

STOUT, M.C; ASIIMWE, E; BIRKENSTAMM, J.R. Analyzing ras-associated cell proliferation signaling. **Methods, Molecular Biology** v.1170, p. 393–409, 2014.

SUDARSANAM, S.; JOHNSON, D. E. Functional consequences of mTOR inhibition. **Current Opinion in Drug Discovery and Development**, v. 13, n. 1, p. 31–40, 2010.

SUNG, H. FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; PILERI, S.; STEIN, H.; JAFFE, H. S. **World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon, France: IARC; 2008.

TALLARIDA, R. J. **Drug synergism and dose-effect analysis**. Boca Raton, Florida: Chapman & Hall/CRC, 2000.

TALLARIDA, R. J. Revisiting the isobole and related quantitative methods for assessing drug synergism. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 342, n. 1, p. 2–8, 2012.

TENG, L.; LEE, R.; SUN, Y.; CAI, G.; WANG, J.; WANG, M.; QU, N. Cabazitaxel-loaded human serum albumin nanoparticles as a therapeutic agent against prostate cancer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 3451–3459, 2016.

TRAIGER, G. J.; GAMMAL, L. M.; COX, D. N.; HASCHEK, W. M. Nephrotoxicity of para-substituted thiobenzamide derivatives in the rat. **Toxicology**, v.58, n.1, 43–56, 1989.

TRINCHIERI, G. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 677–706, 2012.

TRUONG, B. T.; LEE, Y. J.; LODIE, T. A.; PARK, D. J.; PERROTTI, D.; WATANABE, N. KOEFFLER, F. H.; NAKAJIMA, H.; TENEN, D. G.; KOGAN, S. C. CCAAT/Enhancer binding proteins repress the leukemic phenotype of acute myeloid leukemia. **Blood**. v.101, n.3, p.1141-1148, 2003.

THEODORATOU, E.; TIMOFEEVA, M.. LI, X.; MENG, X.; IOANNIDIS, J. P. A. Nature, Nurture, and Cancer Risks: Genetic and Nutritional Contributions to Cancer. **Annual Review of Nutrition**, v. 37, p. 293–320, 2017.

VASAN, N.; BASELGA, J.; HYMAN, D. M. A view on drug resistance in cancer. **Nature**, v. 575, n. 7782, p. 299–309, 2019.

VASQUEZ, L.; CASTRO, D.; LEÓN, J.; BELTRÁN, B. inmunoterapia en cáncer: de los inicios al premio Nobel. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 37, n. 1, p. 115–21, 2020.

SAVIC, M.; ARSENIJEVIC, A.; MILOVANOVIC, J.; STOJANOVIC, B. STANKOVIC, V.; SIMOVIC, A. R.; DEJAN LAZIC, ARSENIJEVIC, N.; MILOVANOVIC, M. Complexes towards Colon Cancer Cells In Vitro and in vivo. **Molecules**, v. 25 n. 4699, p. 2–20, 2020.

VOUSDEN, K. H.; LANE, D. P. P53 in Health and Disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 4, p. 275–283, 2007.

WANG, S.; ZHOU, M.; OUYANG, J.; GENG, Z.; WANG, Z. Tetraarsenictetrasulfide and arsenic trioxide exert synergistic effects on induction of apoptosis and differentiation in acute promyelocytic leukemia cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–15, 2015.

WANG, X.; ZHANG, H.; CHEN, X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. **Cancer Drug Resistance**, v. 2, n. 2, p. 141–160, 2019.

WARE, D. C., LAY, P. A., TAUBE, H., CHOU, M. H., & CREUTZ, C. (2,2'-Bipyridine-N,N') (2,2':6',2"-Terpyridine-N,N',N ") Complexes of Ruthenium(III)/(II) and Osmium(III)/(II). **Inorganic Syntheses**, p. 299–306, 1986.

WEISS, A.; BERNDSEN, R. H.; DUBOIS, M.; MÜLLER, C.; SCHIBLI, R.; GRIFFIOEN, A. W.; DYSON, J. P.; NOWAK-SLIWINSKA, P. In vivo anti-tumor activity of the organometallic ruthenium(II)-arene complex [Ru( $\eta^6$ -p-cymene)Cl<sub>2</sub>(pta)] (RAPTA-C) in human ovarian and colorectal carcinomas. **Chemical Science**, v. 5, n. 12, p. 4742–4748, 2014.

WHITE, E.; DIPOLA, R. S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 17, p. 5308–5316, 2009.

WHITE, M. C. HOLMAN, D. M.; BOEHM, J. E.; PEIPINS, L. A.; GROSSMAN, M.; HENLEY, S. J. Age and cancer risk: A potentially modifiable relationship. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 46, n. 3, p. 7–15, 2014.

YOO, S. J.; PARK, C. J.; JANG, S.; SEO, E. J.; LEE, K. H.; CHI, H. S. Inferior prognostic outcome in acute promyelocytic leukemia with alterations of FLT3 gene. **Leukemia & Lymphoma**, v.47, n.9, p.1788-1793, 2006.

ZENG, L.; GUPTA, P.; CHEN, Y.; WANG, E.; JI, L.; CHAO, H.; CHEN, Z. The development of anticancer ruthenium(II) complexes: From single molecule compounds to nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 19, p. 5771–5804, 2017.

ZHANG, P.; SADLER, P. J. Advances in the design of organometallic anticancer complexes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 839, p. 5–14, 2017.

ZHENG, J.; ASAKAWA, T.; CHEN, Y.; ZHENG, Z.; CHEN, B.; LIN, M.; LIU, T.; HU, J. Synergistic Effect of Baicalin and Adriamycin in Resistant HL-60/ADM Leukaemia Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 419–430, 2017.

ZUGAZAGOITIA, J.; GUEDES, C.; PONCE, S.; FERRER, I.; MOLINA-PINELO, S.; PAZ-ARES, L. Current Challenges in Cancer Treatment. **Clinical Therapeutics**, v. 38, n. 7, p. 1551–1566, 2016.

## Anexos

### Anexo A. Comprovante de submissão do artigo

Journal: Inorganica Chimica Acta

Title: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF THE RUTHENIUM COMPLEXES CONTAINING THIOBENZAMIDE

Corresponding Author: Dr. Carlos D. S. da Silva

Co-Authors: Paulo G.F. Azevedo; Luciano V. Pacheco; Felipe E. M. Carneiro; Denise S. de Sá; Ivanilson P. Santos; Cássio S. Meira; Milena B. P. Soares; Tércio F. Paulo; Eduardo H. S. de Sousa; Luiz G. de F. Lopes

Manuscript Number:

Dear Luciano V. Pacheco,

The corresponding author Dr. Carlos D. S. da Silva has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Inorganica Chimica Acta.

Submission Title: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF THE RUTHENIUM COMPLEXES CONTAINING THIOBENZAMIDE

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link: <https://www.editorialmanager.com/ica/l.asp?i=236185&l=PMTQIR5K>

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at [www.elsevier.com/copyright](http://www.elsevier.com/copyright) ; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights (or for CC BY articles a non-exclusive license of rights) to Elsevier as part of that publishing agreement , effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at [silvadasilva.1985@gmail.com](mailto:silvadasilva.1985@gmail.com).

Thank you,  
Inorganica Chimica Acta

## Anexo B. Cópia do artigo científico

### SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF THE RUTHENIUM COMPLEXES CONTAINING THIOBENZAMIDE

Paulo G.F. Azevedo<sup>a</sup>; Luciano V. Pacheco<sup>b,c</sup>; Felipe E. M. Carneiro<sup>a</sup>; Denise S. de Sá<sup>a</sup>;  
Ivanilson P. Santos<sup>c</sup>; Cássio S. Meira<sup>b,c,d</sup>; Milena B. P. Soares<sup>c,d</sup>; Tércio F. Paulo<sup>e</sup>; Eduardo H.  
S. de Sousa<sup>e</sup>; Luiz G. de F. Lopes<sup>e</sup>; Carlos D. S. da Silva<sup>a</sup> \*.

<sup>a</sup> Instituto Federal da Bahia (IFBA – Federal Institute of Bahia State), Emídio dos Santos, s/n,  
Barbalho, 40301-015, Salvador, BA, Brazil.

<sup>b</sup> Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia (UNEB – State  
University of Bahia), Salvador 41150-000, BA, Brazil.

<sup>c</sup> Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ/BA),  
40296-710 Salvador, Bahia, Brazil.

<sup>d</sup> Instituto de Inovação em Sistemas Avançados de Saúde (CIMATEC ISI SAS – University  
Center SENAI/CIMATEC), Salvador 41650-010, BA, Brazil.

<sup>e</sup> Grupo de Bioinorgânica, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade  
Federal do Ceará (UFC, Federal University of Ceará), Fortaleza 60440-900, CE, Brazil.

\* Corresponding author.

*E-mail address:* carlosdaniel@ifba.edu.br

*Abbreviations:*

bpy: 2,2'-bipyridine

phen: *o*-phenanthroline

TBz: thiobenzamide

FOR000: *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>]

FOR020: *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(phen)<sub>2</sub>]

FOR0012A: *cis*-[RuCl(TBz)(bpy)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>

FOR0212A: *cis*-[RuCl(TBz)(phen)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>

**ABSTRACT**

Two novel complexes containing the thiobenzamide (TBz) ligand, with the formula *cis*-[RuCl(TBz)(L)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>, where L = bipyridine (bpy) or *o*-phenanthroline (phen), were synthesized and characterized using elemental analysis, voltammetry and spectroscopy techniques (UV-Vis, IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR). Computational studies using DFT and TD-DFT were carried out to reinforce the transitions assignments. Both compounds showed cytotoxic activity for all cancer cell lines tested. The HL-60 strain was the most sensitive for the two metal complexes, with IC<sub>50</sub> of 1.5 μM and 5.7 μM, respectively. A relevant selectivity index of FOR0212A (6.6) was demonstrated when the cytotoxicity ratio between normal cells (MRC-5) and cancer cells (HL-60) was evaluated. Synergism was observed between FOR0212A and doxorubicin, in front of a cell model with HL-60, with a combinatorial index of 0.27. Associated with this,

the isobologram showed points below the isobolographic line, which suggests the occurrence of a synergistic effect. These findings show the great pharmacological potential of the new compounds.

Keywords: complexes, ruthenium(II), thiobenzamide, anticancer, leukemia.

## INTRODUCTION

Cancer is a serious public health problem worldwide and corresponds to one of the main causes of premature death in several countries, with a gradual increase in incidence and mortality over the years [1]. In 2018, there were 18 million new cases worldwide and 9.5 million deaths associated with this disease.[2] Leukemias are a type of cancer characterized by the accumulation of malignant leukocytes in blood tissue and bone marrow, disrupting cell differentiation, inducing cell expansion and blocking apoptosis mechanisms. [3, 4] Furthermore, they are classified according to the evolution of the disease (acute or chronic) and referring to the affected cell line (myeloids or lymphoids). [4]

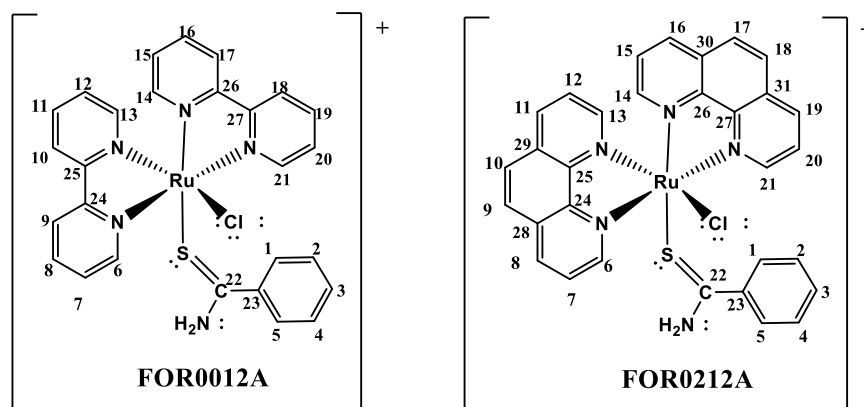
Acute promyelocytic leukemia (APL) is a variant of acute myeloid leukemia (AML) that occurs more frequently in young adults and has an almost stable incidence between 20 and 59 years of age [5], being characterized by translocation of t(15; 17) in about 90% of cases.[4] Clinically, as in other AML's, fever, asthenia, hyporexia and weight loss are common symptoms. However, the disease differs from other AMLs due to the occurrence of coagulopathy in about 60% to 90% of patients, which is responsible for high early mortality during the initial stages of treatment.[4, 6]

The treatment of APL consists of the use of all-trans-retinoic acid (ATRA), a specific therapy that allows the progression of cell differentiation culminating in myeloid maturation, associated with antineoplastic therapy, having an anthracycline, such as idarubicin or doxorubicin [4, 7, 8]. However, the presence of leukemic stem cells in LPA, showing high resistance to anthracyclines, can be a challenge to treatment.[9, 10]

Metal complexes yet have shown anticancer activity, like cisplatin and their derivated. These complexes are used in treatment of ovarian, lung, brain and breast cancer [11, 12], but they showed a lot of side effects.[11] Due to this, others complexes have been studied, for example based-ruthenium compound. These complexes have shown lower cytotoxicity[13] and some of them are even in clinical phase. [14-17]

Ruthenium complexes containing polypyridine ligands have shown cytotoxic activity,[18-22] presenting potential as agents for photodynamic therapy [23] and antiangiogenic activity.[24] Furthermore, the compound  $cis-[Ru(phen)_2(addppn)_2]^{2+}$ , where add ppn is a phenanthroline derivative, presented higher cytotoxicity than cisplatin on hepatocellular and human breast cancer.[25] The complex  $cis-[Ru(bpy)_2(1H-indazole)_2]^{2+}$  showed activity and selectivity against some cancer cell lines.[26]

S-bound ruthenium(II) complexes have shown and cytotoxic activities.[27, 28] For example, the compounds  $cis-[Ru(phen)_2(NO)(L)]^{3+}$  (where L = thiobenzamide or thiourea) were actives against to human glioblastoma cell lines [28]. Based on this, we synthesized Ru(II) compounds containing thiobenzamide (TBz) and polypyridinic ligands 2,2-bipyridine or o-phenanthroline (Figure 1).



**Figure 1. Structure of the ion complexes  $cis\text{-}[\text{RuCl}(\text{TBz})(\text{bpy})_2]^+$  (FOR0012A) and  $cis\text{-}[\text{RuCl}(\text{TBz})(\text{phen})_2]^+$  (FOR0212A).**

## EXPERIMENTAL SECTION

The precursor complexes  $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]$  and  $cis\text{-}[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$  were prepared according to the literature with few modifications.[29, 30] All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Merck, J. T. Baker or Synth as analytical grade and used without further purification. Water used in all experiments was purified using a Direct-Q-3/UV (Millipore) system ( $>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ).

Doxorubicin (doxorubicin hydrochloride, Laboratory IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) was used as a reference anticancer drug. All compounds were dissolved in DMSO (PanReac, Barcelona, Spain) and diluted in cell culture medium for use in the assays. The final concentration of DMSO was less than 0.5% in all experiments.

B16-F10 (mouse melanoma), CAL-27 (human squamous cell carcinoma), HL-60 (human acute promyelocytic leukemia), HSC-3 (human tongue squamous cell carcinoma), Jurkat (human acute T cell leukemia), KG1A (human acute myelogenous leukemia), K562 (human chronic myelogenous leukemia), NB4 (human acute promyelocytic leukemia), THP-1 (human acute monocytic leukemia), HepG2 (human hepatocellular carcinoma) and MRC-5 (human lung fibroblast) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC,

Manassas, VA). Cells, with the exception of KG1A lineage, were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO) and 50 µg/mL of gentamicin (Life, Carlsbad, CA). KG1A were cultured in RPMI medium supplemented with 20% FBS. All cell lines were tested for mycoplasma using the Mycoplasma Stain Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to validate the use of cells free from contamination.

### Synthesis of Complexes

*cis-[RuCl(thiobenzamide)(bpy)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>* (FOR0012A):

In a flask with 15 mL of the 2:1 ethanol:water solution, 150 mg (0.310 mmol) of *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>] (FOR000) were added. The reaction was stirred under reflux for 15 min. Subsequently, 47 mg (0.336 mmol) of thiobenzamide dissolved in a minimum volume of 2:1 ethanol:water were added, and the solution was refluxed for 3 h. After that, the mixture was heating only for 1 h. Then, 221 mg (1.19 mmol) of KPF<sub>6</sub> dissolved in water was added. The mixture was cooled and filtered under vacuum. The solid obtained was washed with 10 mL of ice water and 15 mL of diethyl ether, and dried under vacuum. Yield: 81%.

**Elemental analysis:** Calc. for FOR0012A . H<sub>2</sub>O (C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>F<sub>6</sub>N<sub>5</sub>OPRuSCL): C, 43.29; H, 3.36; N: 9.35. Found: C, 43.99; H 3.49; N, 9.61. MW = 749.08 g mol<sup>-1</sup>. **NMR:** δ<sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>) 9.81 (1H, d, H-14), 9.51 (1H, d, H-21), 8.75 (2H, dd, H-17 and H-18), 8.67 (1H, d, H-6), 8.61 (1H, d, H-13), 8.20 (2H, dd, H-16 and H-19), 7.98 (1H, dd, H-7), 7.88 (2H, m, H-12 and H-15), 7.82 (1H, dd, H-20), 7.74 (3H, m, H-1, H-5 and H-9), 7.54 (2H, dd, H-3 and H-10), 7.43 (2H, dd, H-2 and H-4), 7.37 (1H, dd, H-8), 7.30 (1H, d, H-11). δ<sup>13</sup>C (500 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>) 201.74 (1C, C-22), 159.47 (1C, C-27), 158.55 (1C, C-26), 158.12 (1C, C-16), 158.07 (1C, C-19), 154.35 (1C, C-14), 153.55 (1C, C-21), 152.91 (1C, C-18), 150.87 (1C, C-

17), 137.35 (1C, C-6), 137.10 (1C, C-7), 137.03 (2C, C-1 and C-5), 136.32 (1C, C-23), 132.81 (1C, C-3), 128.93 (3C, C-2, C-4 and C-9), 127.33 (1C, C-15), 127.19 (3C, C-8, C-11 and C-20), 127.11 (1C, C-10), 126.92 (1C, C-12), 124.21 (1C, C-24), 124.13 (1C, C-25), 123.75 (1C, C-13). **UV-vis:**  $\lambda_{\text{max}}$  (acetonitrile)/nm 245, 295, 350 and 475 ( $\log \epsilon (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ ) 4.45, 4.64, 3.81 and 4.05. **FTIR:** wavenumber / $\text{cm}^{-1}$  1602 (CN), 1484 (CC), 1445 (CC), 1420 (CN), 846 (PF), 729 (CS), 558 (PF).

*cis-[RuCl(thiobenzamide)(phen)<sub>2</sub>]*PF<sub>6</sub> (FOR0212A)

In a flask with 20 mL of the 2:1 ethanol:water solution, 200 mg (0.310 mmol) of *cis*-[RuCl<sub>2</sub>(phen)<sub>2</sub>] (FOR020) were added. The reaction was stirred under reflux for 15 min. Subsequently, 55 mg (0.393 mmol) of thiobenzamide dissolved in a minimum volume of 2:1 ethanol:water were added, and the solution was refluxed for 3 h. After that, the mixture was heating only for 1 h. Then, 280 mg (1.51 mmol) of KPF<sub>6</sub> dissolved in water was added. The mixture was cooled and filtered under vacuum. The solid obtained was washed with 10 mL of ice water and 15 mL of diethyl ether, and dried under vacuum. Yield: 94%.

**Elemental analysis:** Found: C, 46.45; H, 3.18; N, 8.85. Calc. for FOR0212A . H<sub>2</sub>O

(C<sub>31</sub>H<sub>25</sub>F<sub>6</sub>N<sub>5</sub>OPRuSCL): C, 46.71; H, 3.16; N: 8.79. MW = 797.12 g mol<sup>-1</sup>. **NMR data:**  $\delta$  <sup>1</sup>H (500 MHz, acetone) 10.36 (1H, d, H-14), 10.13 (1H, d, H-21), 8.84 (2H, dd, H-16 and H-19), 8.52 (1H, d, H-6), 8.47 (1H, d, H-13), 8.36 (2H, dd, H-9 and H-17), 8.28 (1H, dd, H-15), 8.23 (4H, br m, H-10, H-8, H-18 and H-20), 7.95 (1H, d, H-6), 7.79 (2H, d, H-1 and H-5), 7.55 (3H, dd, H-12, H-7 and H-3), 7.40 (2H, dd, H-2 and H-4).  $\delta$  <sup>13</sup>C (500 MHz, acetone) 202.93 (1C, C-22), 155.06 (1C, C-14), 154.58 (1C, C-21), 153.77 (1C, C-8), 151.66 (1C, C-11), 150.13 (1C, C-30), 149.67 (1C, C-31), 148.83 (1C, C-26), 148.32 (1C, C-27), 137.46 (1C, C-23), 135.71 (1C, C-6), 135.62 (1C, C-16), 135.57 (1C, C-19), 134.72 (1C, C-13), 132.30 (1C, C-3), 130.80 (1C, C-28), 130.79 (1C, C-29), 130.59 (1C, C-25), 130.34 (1C, C-24), 128.49

(2C, C-2 and C-4), 127.93 (1C, C-17), 127.81 (1C, C-18), 127.63 (1C, C-10), 127.43 (1C, C-9), 126.56 (2C, C-1 and C-5), 125.74 (1C, C-15), 125.57 (1C, C-20), 125.34 (1C, C-7), 125.01 (1C, C-12). **UV-vis:**  $\lambda_{\text{max}}$  (acetonitrile)/nm 225, 266, 289, 319 and 455 ( $\log \epsilon (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$  5.85, 5.95, 4.61, 3.64 and 4.12. **FTIR:** wavenumber/ $\text{cm}^{-1}$  1630 (CN), 1458(CC), 1430(CC), 1409 (CN), 837(PF), 728 (CS), 555(PF).

## Characterization

The complexes (Figure 1) were characterized by spectroscopic techniques (UV-Vis, IR, NMR  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ) and cyclic voltammetry. In addition, elemental analysis and computational studies using DFT and TD-DFT were carried out. The ligand thiobenzamide was characterized by  $^{13}\text{C}$  and DEPT-135 NMR (Figure S1).

*UV-vis measurements:* The UV-vis spectra were obtained using a Varian spectrophotometer, model Cary 50, using a 1.0 cm quartz cuvet.

*FTIR measurements:* The spectra were collected with a FTIR Spectrometer by PerkinElmer model Spectrum Two, using solid samples dispersed in KBr pellets.

*Cyclic voltammetry measurements:* The voltammograms were obtained using a potentiostat/galvanostat manufactured by DropSens, model  $\mu\text{Stat}400$ , with a cell containing three electrodes connected as vitreous carbon (working electrode), Ag/AgCl (reference electrode) and platinum (auxiliary electrode). For measurements in acetonitrile, tetrabutylammonium perchlorate ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) served as the electrolyte, and ferrocene (Fc) served as the internal standard.

**NMR measurements:** The spectra were obtained in deuterated dimethylsulfoxide and acetone, using an NMR spectrophotometer, Varian Inova 500, 11.7 Tesla, for  $^1\text{H}$  frequency was 500 MHz and  $^{13}\text{C}$  was 125 MHz).

## Anticancer activity

*Cytotoxic activity assay:* Cell viability was evaluated by the AlamarBlue method as previously described.[31] Cells were seeded into 96-well plates for all the experiments ( $7 \times 10^4$  cells/mL for B16-F10, CAL-27, HSC-3, HepG2, and MRC5 cells;  $3 \times 10^5$  cells/mL for HL-60, Jurkat, KG1A, K562, and THP-1 cells) in RPMI medium supplemented with FBS and gentamicin and incubated for 24 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After that time each test inhibitor was added at eight concentrations (50-0.39  $\mu$ M), in triplicate and incubated for 72 h. Then, twenty  $\mu$ L/well of AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added to the plates for 4 h. Absorbance at 570 nm and 600 nm was measured using the SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Doxorubicin (5-0.039  $\mu$ M) was used as positive control. The inhibitory concentration of 50% (IC<sub>50</sub>) values were calculated using data from three independent experiments.

*Cell viability by trypan blue exclusion assay:* HL-60 cells were plated into 24-well plates at a cell density of  $3 \times 10^5$  cells/well in RPMI medium supplemented with 10% FBS in the absence or presence of different concentrations of **FOR0212A** (0.75, 1.5 and 3  $\mu$ M) or doxorubicin (1  $\mu$ M) for 24 or 48 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Then, aliquots of each well were collected and the number of viable cells and non-viable were assessed in a Neubauer chamber using trypan blue (0.4%) exclusion method as previously described.[31] Doxorubicin (1  $\mu$ M) was used as positive control. Three independent experiments were performed.

*Drug combination assay:* For *in vitro* drug combinations, doubling dilutions of each drug (FOR0212A and doxorubicin), used alone or in fixed combinations were incubated with HL-60 cells followed the protocol described above. The analysis of the combined effects was performed by determining the combination index (CI), used as cutoff to determine synergism,

by using Chou-Talalay CI method (Chou and Talalay, 2005) and through the construction of isobologram using the fixed ratio method, as described previously.[32]

### **Statistical analysis**

To determine the inhibitory concentration 50% ( $IC_{50}$ ), we used nonlinear regression. The selectivity index (SI) was defined as the ratio of  $IC_{50}$  (noncancer cell line -MRC-5) by  $IC_{50}$  (cancer cells lines). The one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple-comparison test was used to determine the statistical significance of the group comparisons in trypan blue exclusion assay. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . All analysis was performed using Graph Pad Prism version 5.01 (Graph Pad Software, San Diego, CA).

### **Computational studies**

All calculations were performed with the Gaussian 09 program package, Revision A.02 (Gaussian Inc., Wallingford, CT) using B3LYP functional. The LANL2DZ relativistic effective core potential basis set was used for the Ru atom while the 6-31G(d,p) basis set was used for other atoms. The optimized geometries in a potential energy minimum were confirmed by the absence of any imaginary frequency in vibrational analysis calculations. Based on the ground and excited state equilibrium geometries, the TD-DFT approach was applied to investigate the electronic properties of the complexes. TD-DFT calculations were carried out in acetonitrile solvent fields using the polarizable continuum model (PCM) using the integral equation formalism variant (IEFPCM). The calculated UV–Vis data and natural transition orbitals (NTO) were extracted from output files using GaussSum 3.0[33] and multiwfn programs [34], respectively.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Complexes characterization*

In order to verify the purity of the thiobenzamide ligand, magnetic resonance spectra were recorded. In both  $^{13}\text{C}$  NMR (BB and DEPT-135) spectra of thiobenzamide (Figure S1), there are three signals attributed to hydrogenated carbon atoms. In contrast, only in  $^{13}\text{C}$  BB NMR spectrum, there are signals at 139.93 and 200.32 ppm, which are attributed to non-hydrogenated carbons (C-23 and C-22, respectively, Figure 1).  $^{13}\text{C}$  NMR spectra presented in Figure S1 indicate the high purity of the thiobenzamide, which was used to synthesize the complexes. The complexes FOR0012A and FOR0212A were readily characterized by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. The  $^1\text{H}$  NMR spectra of the complexes are presented in Figures S2 and S3, respectively. These spectra are similar to those found for Ru(II) complexes containing aromatic heterocyclic rings.[23, 24, 26, 28, 35]. In all cases,  $^1\text{H}$  NMR spectra exhibit the signals corresponding to the 21 hydrogen of aromatics rings in the range from 7.0 to 10.5 ppm. Furthermore, the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra (Figures S3 and S5) present the signals at 201.74 and 202.93 ppm for FOR0012A and FOR0212A, respectively, indicating both the presence of the C=S group of TBz and the coordination via sulfur atom.[36, 37] The NMR data are in accordance with the proposed structures illustrated in Figure 1. More detailed NMR data are presented in the Supporting Information (Figures S2-S5).

In infrared spectra (Figure S6 and S7), the bands around 700 e 1400  $\text{cm}^{-1}$  indicate coordination of thiobenzamide. According to these wavenumber values, it can be concluded that the C=S bond is stronger in the free TBz molecule than when coordinated to Ru(II). Opposite effect is observed on C-N binding. This data indicates that sulfur is the donor atom and that thiobenzamide acts as a  $\pi$ -acceptor ligand against Ru(II).

**Table 1. Frequencies of C=S and C-N<sub>amide</sub> bonds in the TBz ligand and in some complexes.**

|           | $\nu\text{C}=\text{S} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ | $\nu\text{C}-\text{N}_{\text{amide}} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ |
|-----------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| TBz       | 736                                             | 1399                                                           |
| FOR0012A  | 729                                             | 1419                                                           |
| FOR0212A  | 721                                             | 1425                                                           |
| FOR0912*  | 716                                             | 1415                                                           |
| FOR0912A* | 713                                             | 1428                                                           |

\*FOR0912 and FOR0912A refer to the *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(NO)(thiourea)]<sup>3+</sup> and *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(NO)(TBz)]<sup>3+</sup>, respectively. Data extracted from ref [28]

Furthermore, the values  $\nu(\text{C}=\text{S})$  and  $\nu(\text{CN})$  for FOR0212A are more distant from the values of free TBz, when compared to the values obtained for FOR0012A. According to the literature, for the complexes *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(NO)(thiourea)]<sup>3+</sup> (FOR0912) and *cis*-[Ru(phen)<sub>2</sub>(NO)(TBz)]<sup>3+</sup> (FOR0912A),  $\nu\text{CS}$  is smaller and  $\nu\text{CN}_{\text{amide}}$  is larger in the compound that contains more bulky ligands (Table 1). The same behavior is observed for the complexes studied in this work. This suggests that the steric effect of the ligands significantly interferes in the vibrational modes of the C=S and C-N<sub>amide</sub> bonds in Ru(II) complexes with *cis* isomerism, containing polypyridine ligands.

The metal compounds have a half-wave potential equivalent to 0.83 and 0.95 V vs Ag/AgCl for *cis*-[RuCl(TBz)(phen)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (FOR0012A) and *cis*-[RuCl(TBz)(bpy)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (FOR0212A), respectively (Figure S8 and S9). In analogy at voltammetric profile of

analogous Ru(II) complexes, [29, 35, 38, 39] these potentials are attributed at metal-centered redox process (Equação 1).

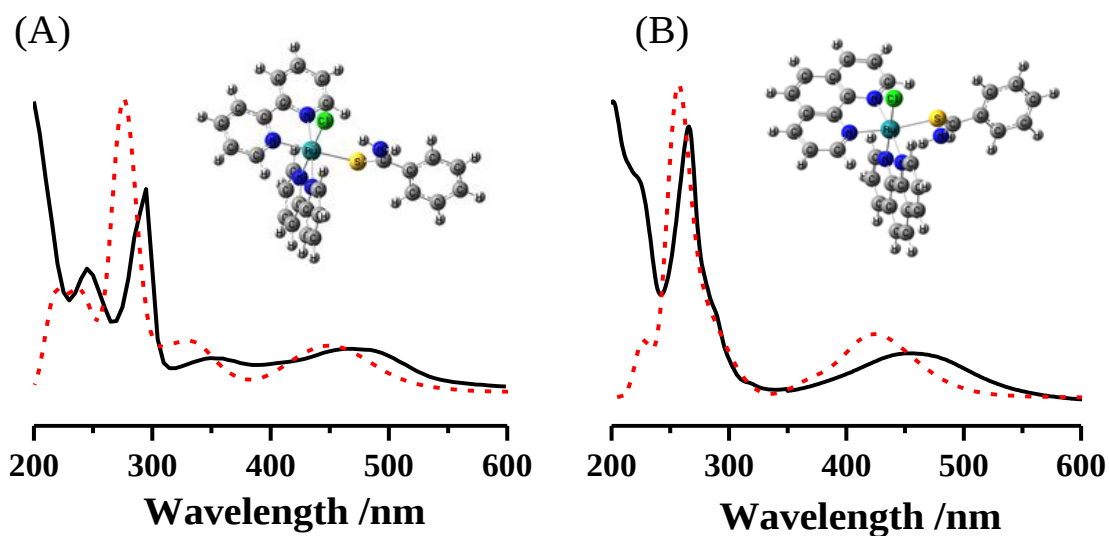


It is noted that the oxidation potential of the Ru(II) in compound with *o*-phenanthroline (FOR0212A) is greater than in that compound with 2,2'-bipyridine (FOR0012A). The literature reports that the Ru<sup>II/III</sup> process has greater potential in complexes containing phenanthroline derivatives than in complexes containing bpy.[23, 40, 41] This potential difference is consistent with the greater  $\pi$ -acceptor capacity of the *o*-phenanthroline ligand compared to 2,2'-bipyridine.

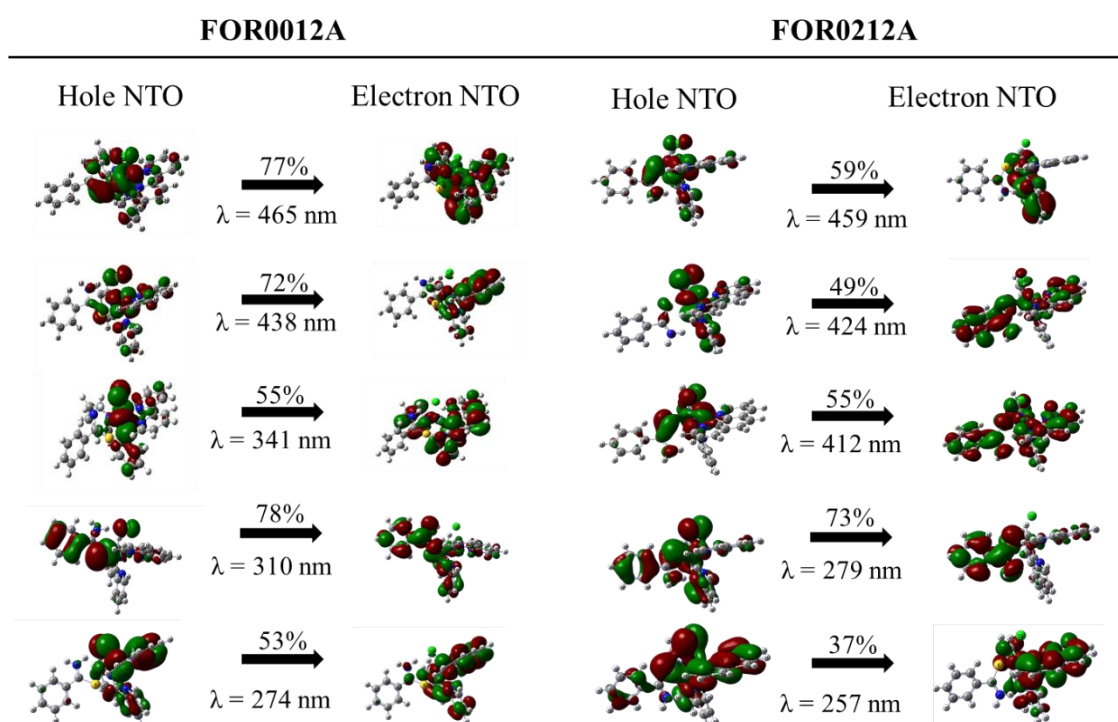
The UV-Vis spectra (Figure 2) of the complexes show bands between 400 and 550 nm; similar profile is reported for chloride complexes based-Ru(II) containing polypyridine ligands.[35, 39, 42]

### Computational studies

The electronic properties of the FOR0012A and FOR0212A complexes were determined using TD-DFT calculations based on optimized DFT structures. As shown in Figure 2, a comparison of the theoretical and experimental electronic spectra reveals a good agreement. The transitions were assigned based on the analysis of the natural transition orbitals (NTOs) presented in Figure 3. The band up to 300 nm were assigned to intraligand transitions, while those at longer wavelengths result from metal-ligand charge transfer transitions (MLCT) as shown in Table 2.



**Figure 2.** Experimental (straight line) and theoretical (dashed line) UV-Vis spectra of the complexes FOR0012A (A) and FOR0212A (B) in acetonitrile. Inset: Optimized structures of the complexes at DFT/B3LYP/6-31G(d,p)/LanL2dz level of theory.



**Figure 3.** Isosurface of the natural transition orbitals (NTO) for selected transitions of the FOR0012A and FOR0212A complexes.

**Table 2. Comparison of experimental and predicted data for the principal UV-Vis transitions.**

| Complex  | $\lambda$ /nm |        | $f$   | Assignment     |
|----------|---------------|--------|-------|----------------|
|          | EXP.          | TD-DFT |       |                |
| FOR0012A |               | 465    | 0.109 | MLCT bpy       |
|          | 475           | 438    | 0.064 |                |
|          |               | 341    | 0.065 | MLCT bpy       |
|          | 350           | 310    | 0.055 | IL TBz         |
|          | 295           | 274    | 0.533 | IL bpy         |
| FOR0212A |               | 459    | 0.046 | MLCT phen      |
|          | 455           | 424    | 0.039 | MLCT Tbz       |
|          |               | 412    | 0.091 | MLCT phen, TBz |
|          |               | 368    | 0.062 | MLCT TBz       |
|          | 289           | 279    | 0.130 | IL TBz         |
|          | 266           | 257    | 0.282 | IL phen        |

Hole refers to the highest occupied natural transition orbital (HONTO), while particle refers to lowest unoccupied natural transition orbital (LUNTO)

## Biological Data

### Anticancer activity

The cytotoxicity of compounds was evaluated in ten different cancer cells line and on a noncancer cell line (MRC-5) using the AlamarBlue colorimetric method. As revealed in Table 3, **FOR0212A** presented the best anticancer profile, with IC<sub>50</sub> values ranging from 1.5

to 6.5  $\mu\text{M}$  for cancer cells lines HL-60 and B16-F10, respectively. FOR0012A also showed activity against all cancer cells line tested with  $\text{IC}_{50}$  values ranging from 5.7 to 31.2  $\mu\text{M}$  for cancer cells lines HL-60 and HepG2, respectively. In contrast, the compounds FOR000 and FOR020 didn't present cytotoxic activity against non-one of the cancer cell lines tested. The compound TBz only showed activity against KG1A and HL-60 cell lines with  $\text{IC}_{50}$  values of 43.6 and 25  $\mu\text{M}$  respectively. Under the same conditions, doxorubicin presented  $\text{IC}_{50}$  values ranging from 0.1 to 0.8  $\mu\text{M}$  for cancer cells lines CAL-27/THP-1 and HSC-3 respectively.

**Table 3. Cytotoxicity activity of compounds.**

| Cells          | TBz               | FOR000 | FOR020 | FOR0012A          | FOR0212A         | Doxorubicin      |
|----------------|-------------------|--------|--------|-------------------|------------------|------------------|
| <b>B16-F10</b> | >50               | >50    | >50    | 20.1 ( $\pm$ 2.1) | 6.5 ( $\pm$ 0.9) | 0.6 ( $\pm$ 0.1) |
| <b>CAL-27</b>  | >50               | >50    | >50    | 7.7 ( $\pm$ 1.2)  | 4.5 ( $\pm$ 0.8) | 0.1 ( $\pm$ 0.0) |
| <b>HL-60</b>   | 25.0 ( $\pm$ 0.6) | >50    | >50    | 5.7 ( $\pm$ 0.9)  | 1.5 ( $\pm$ 0.3) | 0.2 ( $\pm$ 0.0) |
| <b>HSC-3</b>   | >50               | >50    | >50    | 9.7 ( $\pm$ 0.9)  | 4.9 ( $\pm$ 0.7) | 0.8 ( $\pm$ 0.0) |
| <b>JURKAT</b>  | >50               | >50    | >50    | 9.9 ( $\pm$ 1.0)  | 3.8 ( $\pm$ 1.2) | 0.2 ( $\pm$ 0.0) |
| <b>KG1A</b>    | 43.6 ( $\pm$ 1.3) | >50    | >50    | 8.6 ( $\pm$ 0.2)  | 3.0 ( $\pm$ 0.6) | 0.2 ( $\pm$ 0.0) |
| <b>K562</b>    | >50               | >50    | >50    | 10.2 ( $\pm$ 0.3) | 3.8 ( $\pm$ 1.2) | 0.9 ( $\pm$ 0.4) |
| <b>NB4</b>     | >50               | >50    | >50    | 14.6 ( $\pm$ 2.1) | 4.9 ( $\pm$ 1.1) | 0.1 ( $\pm$ 0.0) |

|              |     |     |     |                   |                  |                   |
|--------------|-----|-----|-----|-------------------|------------------|-------------------|
| <b>THP-1</b> | >50 | >50 | >50 | 8.1 ( $\pm$ 0.8)  | 3.5 ( $\pm$ 0.6) | 0.1 ( $\pm$ 0.0)  |
| <b>HepG2</b> | >50 | >50 | >50 | 31.2 ( $\pm$ 2.1) | 3.9 ( $\pm$ 0.1) | 0.1 ( $\pm$ 0.0)  |
| <b>MRC5</b>  | >50 | >50 | >50 | 41.7 ( $\pm$ 2.2) | 9.9 ( $\pm$ 0.6) | 0.96 ( $\pm$ 0.0) |

---

Values represents the mean  $\pm$  S.D. and were calculated from three independent experiments performed. IC<sub>50</sub> = inhibitory concentration at 50%. S.D. = Standard deviation.

In cell lines in which the ligand TBz show cytotoxic activity (HL-60 and KG1A), the complexes containing this ligand show the same behavior at a much lower concentration. In contrast, the complexes without Tbz in chemical composition (FOR000 and FOR020) don't show a cytotoxic effect. This illustrate that the coordination of the thiobenzamide at Ru(II) provided a more relevant biological effect.

Among the complexes containing TBz, for all tumor lines, the FOR0212A complex showed lower IC<sub>50</sub> values than the FOR0012A complex. The greater hydrophobicity, resulting from the aromatic rings of *o*-phenanthroline compared to 2,2'-bipyridine (Figure 1) and the greater oxidation potential of the metallic center in the FOR0212A complex may be relevant chemical aspects for the difference in cytotoxicity of the compounds.

In addition, interestingly, compounds FOR0012A and FOR0212A show a weak activity on nontumor cells (MRC5 cells) when compared with cancer cells line, with IC<sub>50</sub> values of 41.7 and 9.9  $\mu$ M respectively. As revealed in Table 4, both compounds present selectivity index superior to 2 for all tumor cells tested, being HL-60 cells the most sensitive lineage to the compounds.

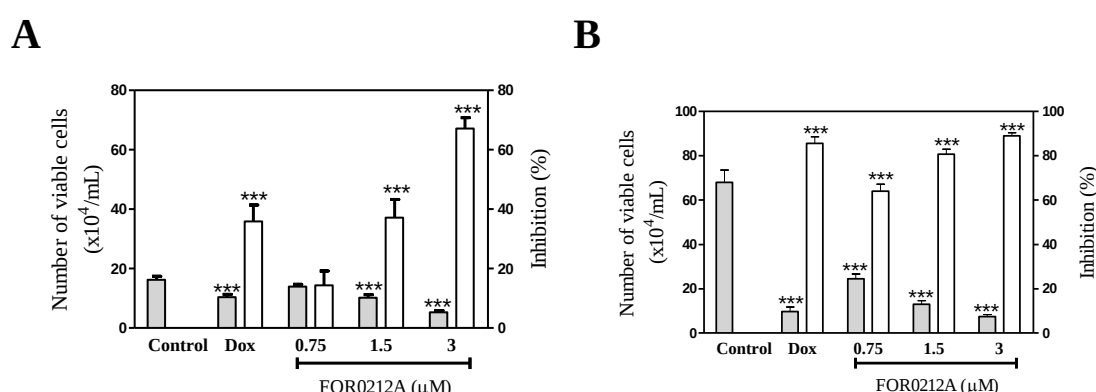
**Table 4. Selectivity index of compounds.**

| Cancer<br>cells | Selectivity index |          |             |
|-----------------|-------------------|----------|-------------|
|                 | FOR0012A          | FOR0212A | Doxorubicin |
| <b>B16-F10</b>  | 2.1               | 1.5      | 1.6         |
| <b>CAL-27</b>   | 5.4               | 2.2      | 9.6         |
| <b>HL-60</b>    | 7.3               | 6.6      | 5.6         |
| <b>JURKAT</b>   | 4.2               | 2.6      | 5.6         |
| <b>HSC-3</b>    | 4.3               | 2        | 2           |
| <b>KG1A</b>     | 4.8               | 3.3      | 4.8         |
| <b>K562</b>     | 4.1               | 2.6      | 1.1         |
| <b>NB4</b>      | 2.9               | 2        | 8.7         |
| <b>THP-1</b>    | 5.1               | 2.8      | 13.7        |
| <b>HepG2</b>    | 31.2              | 3.9      | 0.1         |

Data are presented the selectivity index (SI) calculated using the following formula =  $SI = IC_{50} \text{ MCR5} / IC_{50} \text{ (cancer cells)}$ . Doxorubicin was used as positive control.

Next. We performed a new set of experiment only with the most potent compound (**FOR0212A**) using HL-60 cell line (the most sensitive cell line for this compound). Furthermore, the effect of **FOR0212A** on cell viability was then evaluated by tripan blue exclusion assay after 24 or 48 h of treatment (Figure 4). *In comparison to untreated cultures,*

the treatment with **FOR0212A** decreased the number of viable cells by 14.4 % 37.2 % and 67.2% at 0.75 $\mu$ M, 1.5 $\mu$ M and 3  $\mu$ M respectively after 24 h of treatment and by 64.0%, 80.8% and 59.0% after 48 h of treatment. No significant increase in the number of nonviable cells was observed ( $p < 0.05$ ). Under the same conditions treatment with the standard drug doxorubicin (1  $\mu$ M) promoted a reduction of 35.9 % and 85.7% after 24 and 48h respectively.



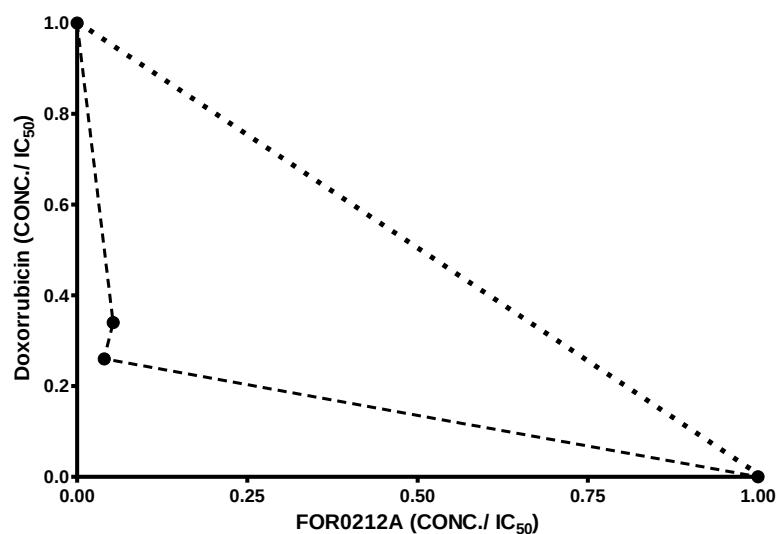
**Figure 4. FOR0212A affects cell viability of HL-60 cells. Effect of FOR212A (0.75. 1.5 and 3  $\mu$ M) or doxorubicin (1  $\mu$ M) on cell viability determined by trypan blue exclusion after 24 h (A) and 48 h (B) of treatment. The gray bars represent the number of viable cells ( $\times 10^4$  cells/mL) and the white bars represent cell inhibition (%). Values represent the means  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate. \* $p < 0.05$  compared to untreated cells; \*\* $p < 0.01$  compared to untreated cells; \*\*\* $p < 0.001$  compared to untreated cells.**

Finally, we investigated the antiproliferative effects of FOR0212A and doxorubicin in combination on HL-60 cell proliferation. Compared to each drug alone, the combination of FOR0212A and doxorubicin reduced both  $EC_{50}$  values at least four times (Table 5). The combination index value (0.27) associated with a concave isobologram revealed that FOR0212A and doxorubicin have synergistic effects (Table 5; Figure 5).

**Table 5. Antitumor activity in H-60 cells of drug alone or in combination.**

| Compounds | Drug alone                               | Combination                              | EC <sub>50</sub> <sup>b</sup> |
|-----------|------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------|
|           | IC <sub>50</sub> ± S.D (μM) <sup>a</sup> | IC <sub>50</sub> ± S.D (μM) <sup>a</sup> |                               |
| FOR0212A  | 1.36 ± 0.08                              | 0.062 ± 0.006                            | 0.27 ±                        |
| Doxo      | 0.19 ± 0.01                              | 0.04 ± 0.01                              | 0.09                          |

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were calculated using concentrations in triplicates and two independent experiments were performed. <sup>b</sup> Combination index (CI). Cutoff: CI value of 0.1-0.7, synergism; 0.7-0.85, moderate synergism; 0.85-0.9, slight synergism; 0.9-1.1, additivity; > 1.1, antagonism. S.D = standard deviation. Doxo - Doxorubicin.



**Figure 5. Isobologram describing the synergistic effects of FOR0212A and doxorubicin on HL-60 cell proliferation. Broken lines correspond to the predicted positions of the experimental points for additive effects.**

## Conclusions

The two complexes containing TBz are cytotoxic against the studied cancer cell lines. The complex containing *o*-phenanthroline (FOR0212A) has lower IC<sub>50</sub> values and lower selectivities than the complex containing 2,2'-bipyridine (FOR0012A) against all strains studied. Both have greater activity against the H-60 cell line. For this cell line, the cytotoxicity of FOR0212A/doxorubicin mixtures is much lower than that of the isolated complexes against HL-60 lines, showing an additive effect of the substances used.

## Acknowledgements

The authors thank Department of Chemistry of Instituto Federal da Bahia (IFBA, Federal Institute of Bahia State) and Group of Bioinorganic, Department of Organic and Inorganic

Chemistry of Universidade Federal do Ceará (UFC, Federal University of Ceará State) for all materials and apparatus support; Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) for anticancer studies.

Furthermore, we are thankful to CAPES and CNPq for financial support, Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho (CENAPAD-UFC) for DFT/DFT-TD facilities and Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN-UFC) for NMR spectra.

## References

- [1] M. da Saúde, INCA, in, Rio de Janeiro, 2019.
- [2] N.C. Insitute, NIH, in, Cancer Statistics. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>, 29 de dezembro de 2020.
- [3] R. Helman, F.P.d.S. Santos, B. Simões, E.H. Atta, F. Callera, J.d.A. Dobbin, É.R. Mattos, A. Atalla, A. Maiolino, M.A. Zanichelli, C.F. Diefenbach, M.T. Delamain, N. Hamerschlak, Einstein, 9 (2011) 179-183.
- [4] A.V. Hoffbrand, P.A.H. Moss, Fundamentos em Hematologia, 6 ed., Porto Alegre, 2013.
- [5] D. Douer, Best Practice & Research Clinical Haematology, 16 (2003) 357–367.
- [6] R.H. Jácomo, L.L.d. Figueiredo-Pontes, E.M. Rego, Rev Assoc Med Bras 54 (2008) 82-89.
- [7] M.A. Sanz, G. Martin, M. Gonzalez, A. Leon, C. Rayon, C. Rivas, D. Colomer, E. Amutio, F.J. Capote, G.A. Milone, J. De La Serna, J. Roman, E. Barragan, J. Bergua, L. Escoda, R. Parody, S. Negri, M.J. Calasanz, P. Bolufer, M. Programa de Estudio y Traitmiento de las Hemopatias, Blood, 103 (2004) 1237-1243.
- [8] S. Castaigne, C. Chomienne, M.T. Daniel, P. Ballerini, R. Berger, P. Fenaux, L. Degos, Blood, 76 (1990) 1704-1709.

- [9] L.L. de Figueiredo-Pontes, M.C. Pintao, L.C. Oliveira, L.F. Dalmazzo, R.H. Jacomo, A.B. Garcia, R.P. Falcao, E.M. Rego, *Cytometry B Clin Cytom*, 74 (2008) 163-168.
- [10] J. Chen, H. Wei, J. Cheng, B. Xie, B. Wang, J. Yi, B. Tian, Z. Liu, F. Wang, Z. Zhang, *Oncol Lett*, 15 (2018) 1255-1262.
- [11] B.J. Pages, D.L. Ang, E.P. Wright, J.R. Aldrich-Wright, *Dalton Trans*, 44 (2015) 3505-3526.
- [12] S. Dasari, P.B. Tchounwou, *Eur J Pharmacol*, 740 (2014) 364-378.
- [13] G. Sava, I. Capozzi, K. Clerici, G. Gagliardi, E. Alessio, G. Mestroni, *Clinical & Experimental Metastasis*, 16 (1998) 371-379.
- [14] L. Zeng, P. Gupta, Y. Chen, E. Wang, L. Ji, H. Chao, Z.S. Chen, *Chem Soc Rev*, 46 (2017) 5771-5804.
- [15] Y. Gothe, T. Marzo, L. Messori, N. Metzler-Nolte, *Chemistry*, 22 (2016) 12487-12494.
- [16] G. Sava, Ruthenium compounds in cancer therapy, in: S.P. Fricker (Ed.) *Metal Compounds in Cancer Therapy*, 1994, pp. 65–91.
- [17] I. Kostova, *Current Medicinal Chemistry*, 13 (2006) 1085-1107.
- [18] W. Li, B.-J. Han, J. Wang, G.-B. Jiang, Y.-Y. Xie, G.-J. Lin, H.-L. Huang, Y.-J. Liu, *Inorganica Chimica Acta*, 423 (2014) 229-234.
- [19] B. Peña, A. David, C. Pavani, M.S. Baptista, J.-P. Pellois, C. Turro, K.R. Dunbar, *Organometallics*, 33 (2014) 1100-1103.
- [20] A. Garza-Ortiz, P. Uma Maheswari, M. Siegler, A.L. Spek, J. Reedijk, *New Journal of Chemistry*, 37 (2013).
- [21] L. Liang, X. Wu, C. Shi, H. Wen, S. Wu, J. Chen, C. Huang, Y. Wang, Y. Liu, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 236 (2022).
- [22] S.S. Bhat, V.K. Revankar, R.V. Pinjari, V. Kumbar, K. Bhat, V.A. Kawade, *Inorganic Chemistry Communications*, 138 (2022).

- [23] F.D. Abreu, T.F. Paulo, M.H. Gehlen, R.A. Ando, L.G.F. Lopes, A.C.S. Gondim, M.A. Vasconcelos, E.H. Teixeira, E.H.S. Sousa, I.M.M. de Carvalho, *Inorg Chem*, 56 (2017) 9084-9096.
- [24] E.H. Silva Sousa, L.A. Ridnour, F.S. Gouveia, Jr., C.D. Silva da Silva, D.A. Wink, L.G. de Franca Lopes, P.J. Sadler, *ACS Chem Biol*, 11 (2016) 2057-2065.
- [25] G.-B. Jiang, J.-H. Yao, J. Wang, W. Li, B.-J. Han, Y.-Y. Xie, G.-J. Lin, H.-L. Huang, Y.-J. Liu, *New J. Chem.*, 38 (2014) 2554-2563.
- [26] D.K.S. Sales, L.M.T. Simplício, C.D.S. da Silva, C.M.B. Enju, V.B. Silva, T.d.F. Paulo, I.P. Santos, H.C. Quadros, C.S. Meira, M.B.P. Soares, L.G.d.F. Lopes, E.H.S. de Sousa, D.S. de Sá, *Inorganica Chimica Acta*, 516 (2021).
- [27] G. Kalaiarasi, S. Dharani, S. Rex Jeya Rajkumar, M. Ranjani, V.M. Lynch, R. Prabhakaran, *Inorganica Chimica Acta*, 515 (2021).
- [28] C.D.S. Silva, I.A. Paz, F.D. Abreu, A.P. de Sousa, C.P. Verissimo, N.R.F. Nascimento, T.F. Paulo, D. Zampieri, M.N. Eberlin, A.C.S. Gondim, L.C. Andrade, I.M.M. Carvalho, E.H.S. Sousa, L.G.F. Lopes, *J Inorg Biochem*, 182 (2018) 83-91.
- [29] J.B. Godwin, T. J. Meyer, , *Inorganic Chemistry*, 10 (1971) 471-474.
- [30] B.P. Sullivan, D.J. Salmon, T.J. Meyer, *Inorganic Chemistry*, 17 (1978) 3334-3341.
- [31] L.S. Santos, V.R. Silva, L.R.A. Menezes, M.B.P. Soares, E.V. Costa, D.P. Bezerra, *Oxid Med Cell Longev*, 2017 (2017) 7126872.
- [32] Q.L. Fivelman, I.S. Adagu, D.C. Warhurst, *Antimicrob Agents Chemother*, 48 (2004) 4097-4102.
- [33] N.M. O'Boyle, A.L. Tenderholt, K.M. Langner, *Journal of Computational Chemistry*, 29 (2008) 839-845.
- [34] T. Lu, F. Chen, *Journal of Computational Chemistry*, 33 (2012) 580-592.
- [35] D.S. Sa, A.F. Fernandes, C.D. Silva, P.P. Costa, M.C. Fonteles, N.R. Nascimento, L.G. Lopes, E.H. Sousa, *Dalton Trans*, 44 (2015) 13633-13640.

- [36] S. Nadeem, M. Bolte, S. Ahmad, T. Fazeelat, S.A. Tirmizi, M.K. Rauf, S.A. Sattar, S. Siddiq, A. Hameed, S.Z. Haider, *Inorganica Chimica Acta*, 363 (2010) 3261-3269.
- [37] S. Nadeem, M. Sirajuddin, S. Ahmad, S.A. Tirmizi, M.I. Ali, A. Hameed, *Alexandria Journal of Medicine*, 52 (2016) 279-288.
- [38] M.I.G. Sauaia, F.d.S. Oliveira, R.G.d. Lima, A.d.L. Cacciari, E. Tfouni, R.S.d. Silva, *Inorganic Chemistry Communications*, 8 (2005) 347-349.
- [39] C. Chen, L.-S. Zhang, Z. Qian, A.-Q. Jia, Q.-F. Zhang, *Journal of Molecular Structure*, 1233 (2021).
- [40] L.J. Boudreau, T.L. Clarke, A.H. Murray, K.N. Robertson, T.S. Cameron, M.A.S. Aquino, *Inorganica Chimica Acta*, 394 (2013) 152-158.
- [41] A.A. Bhuiyan, S. Kudo, J. Bartlett, *Journal of the Arkansas Academy of Science*, 64 (2010) 33-40.
- [42] E.C. Johnson, B.P. Sullivan, D.J. Salon, S.A. Adeyemi, T.J. Meyer, *Inorganic Chemistry*, 17 (1978) 2211-2215.

## **Anexo C. Informações de apoio**

### **Supporting Information**

#### **SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF THE RUTHENIUM COMPLEXES CONTAINING THIOBENZAMIDE**

Paulo G.F. Azevedo<sup>a</sup>; Luciano V. Pacheco<sup>b,c</sup>; Felipe E. M. Carneiro<sup>a</sup>; Denise S. de Sá<sup>a</sup>;  
Ivanilson P. Santos<sup>c</sup>; Cássio S. Meira<sup>b,c,d</sup>; Milena B. P. Soares<sup>c,d</sup>; Tércio F. Paulo<sup>e</sup>; Eduardo H.  
S. de Sousa<sup>e</sup>; Luiz G. de F. Lopes<sup>e</sup>; Carlos D. S. da Silva<sup>a \*</sup>.

<sup>a</sup> Instituto Federal da Bahia (IFBA – Federal Institute of Bahia State), Emídio dos Santos, s/n, Barbalho, 40301-015, Salvador, BA, Brazil.

<sup>b</sup> Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia (UNEB – State University of Bahia), Salvador 41150-000, BA, Brazil.

<sup>c</sup>Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ/BA), 40296-710 Salvador, Bahia, Brazil.

<sup>d</sup> Instituto de Inovação em Sistemas Avançados de Saúde (CIMATEC ISI SAS – University Center SENAI/CIMATEC), Salvador 41650-010, BA, Brazil.

<sup>e</sup> Grupo de Bioinorgânica, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará (UFC, Federal University of Ceará), Fortaleza 60440-900, CE, Brazil.

\* Corresponding author.

*E-mail address:* carlosdaniel@ifba.edu.br

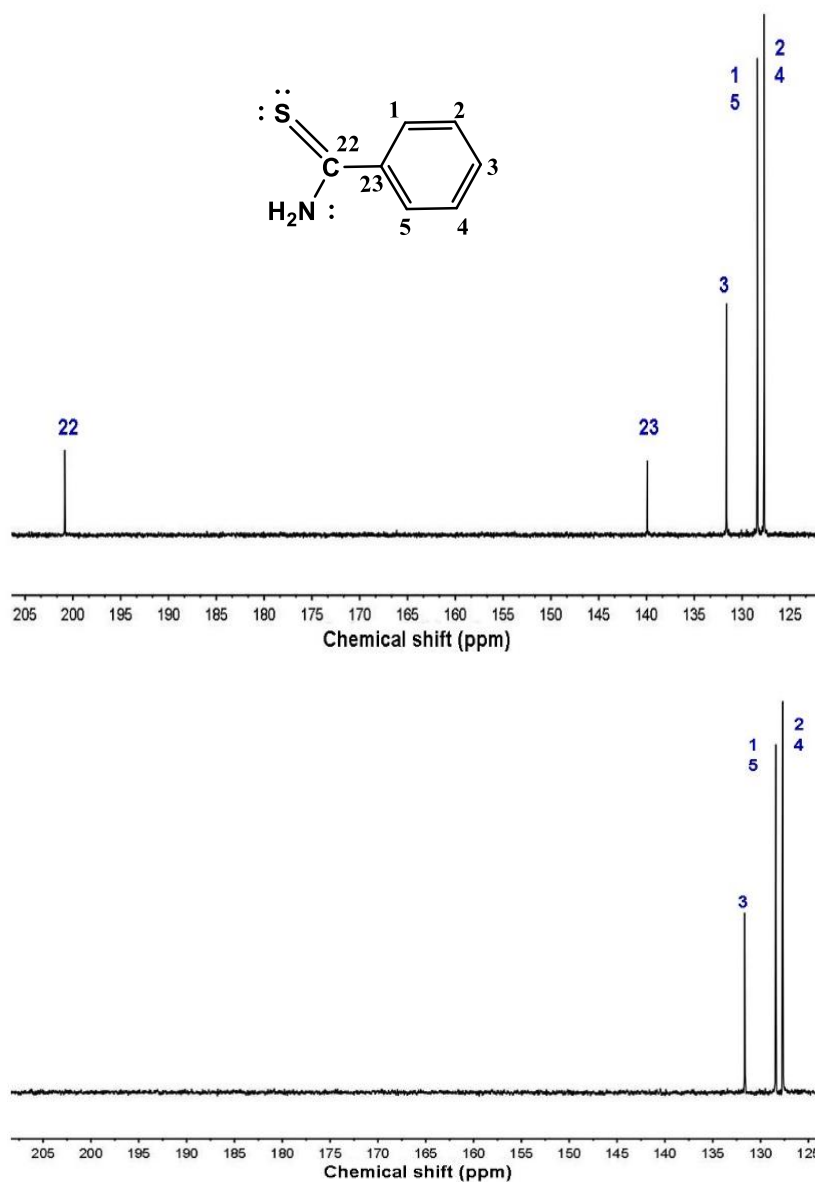


Figure S1. (A) <sup>13</sup>C and (B) DEPT-135 NMR (500 MHz) spectra of thiobenzamide in DMSO-d<sub>6</sub>.

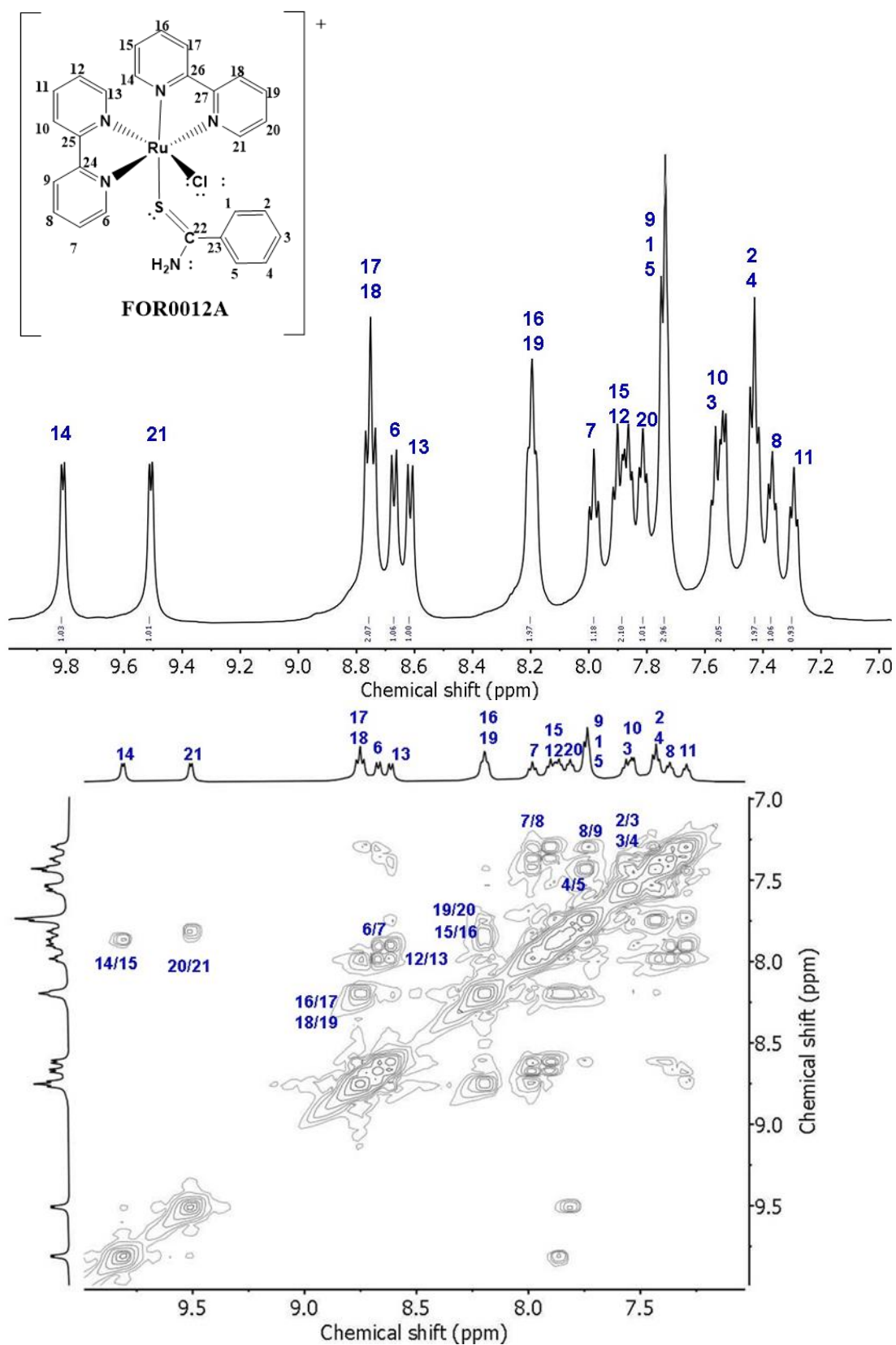
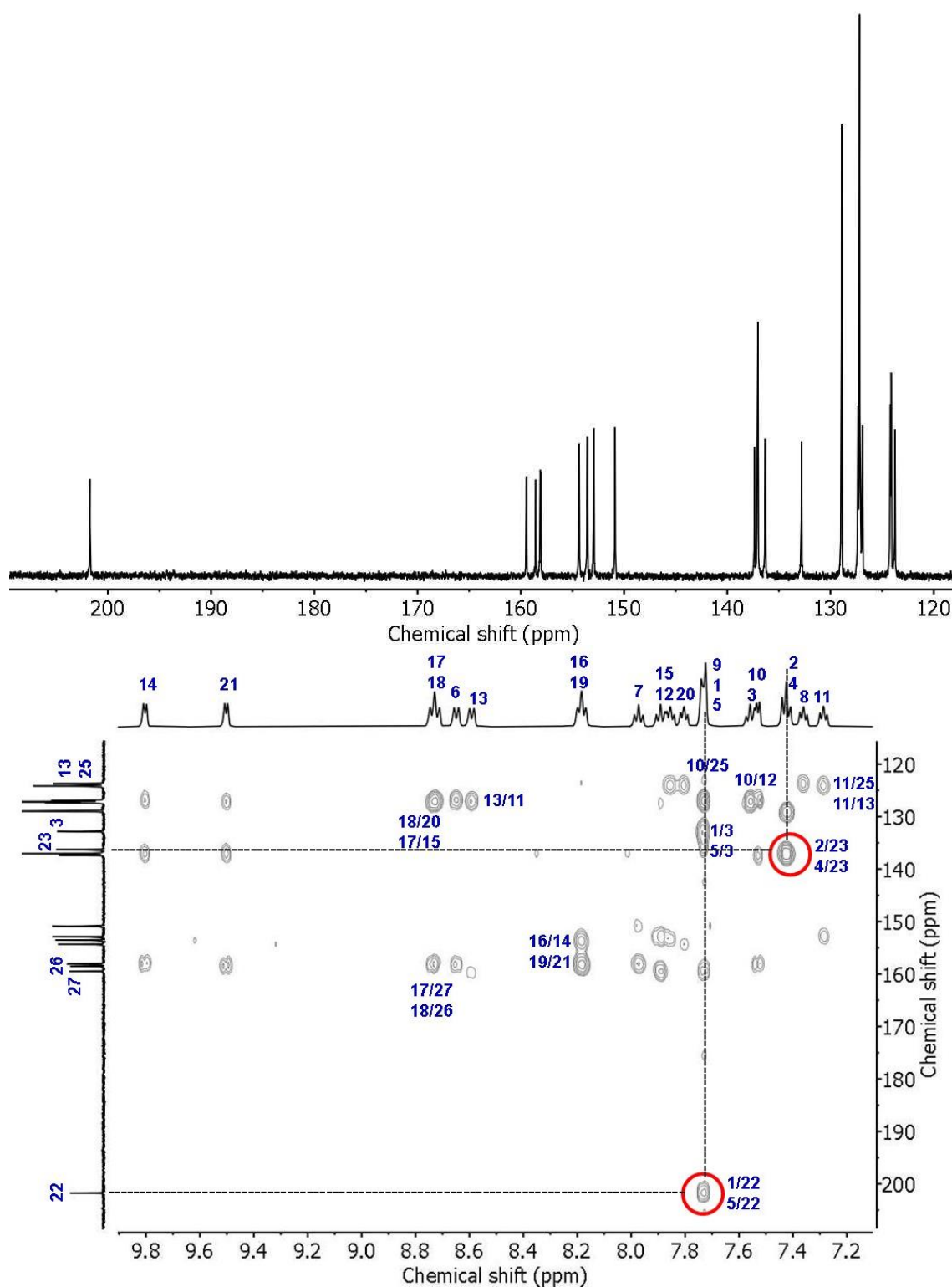


Figure S2. <sup>1</sup>H (A) and COSY (B) NMR (500 MHz) spectra of complex FOR0012A in DMSO-d<sub>6</sub>.



e S3. <sup>13</sup>C (A) and HMBC (B) NMR (500 MHz) spectrum of complex FOR0012A in DMSO-d<sub>6</sub>.

Figur

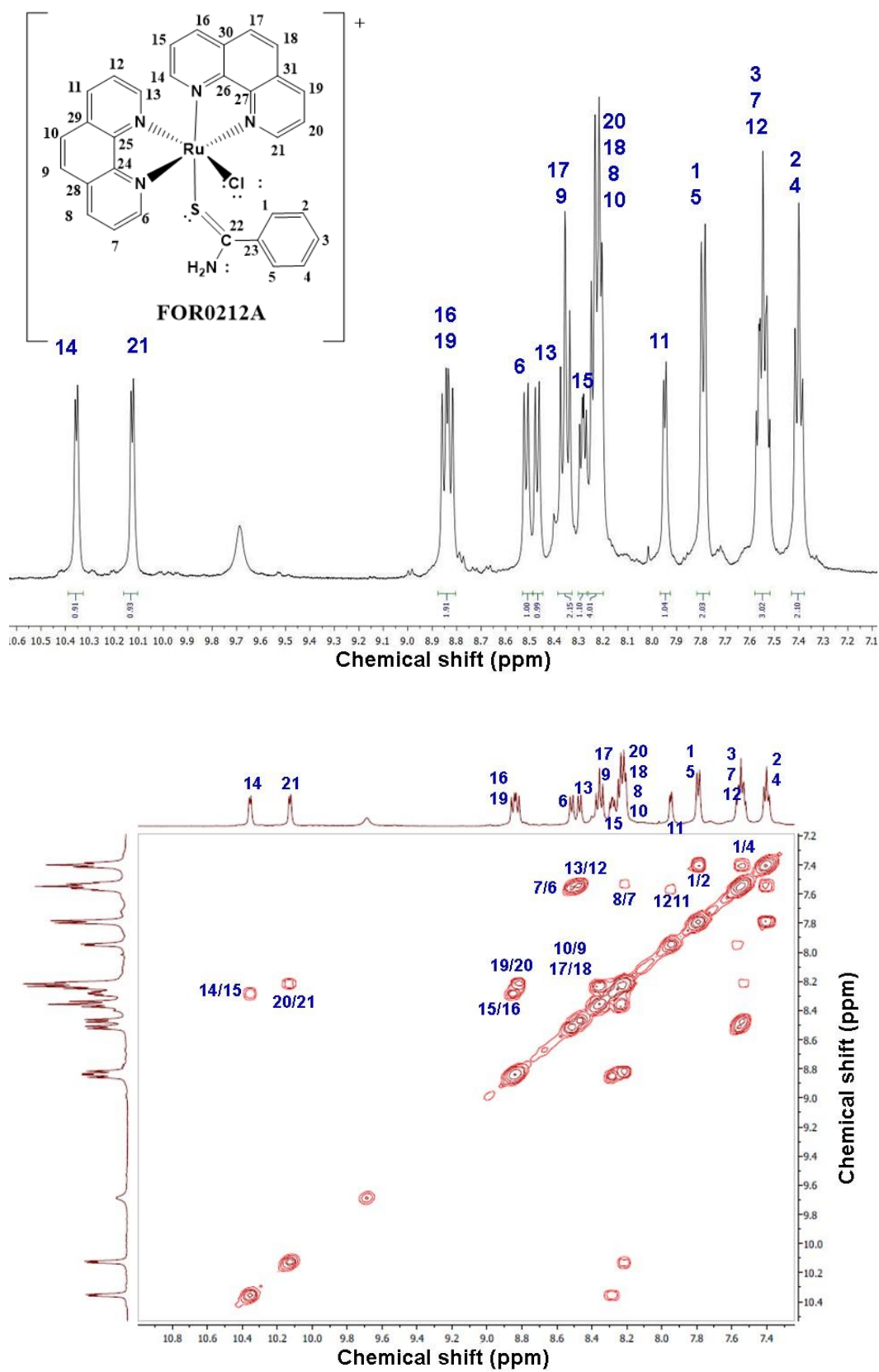


Figure S4.  $^1\text{H}$  NMR (A) and COSY (B) spectra (500MHz) of the complex FOR0212A in  $\text{acetone-d}_6$ .

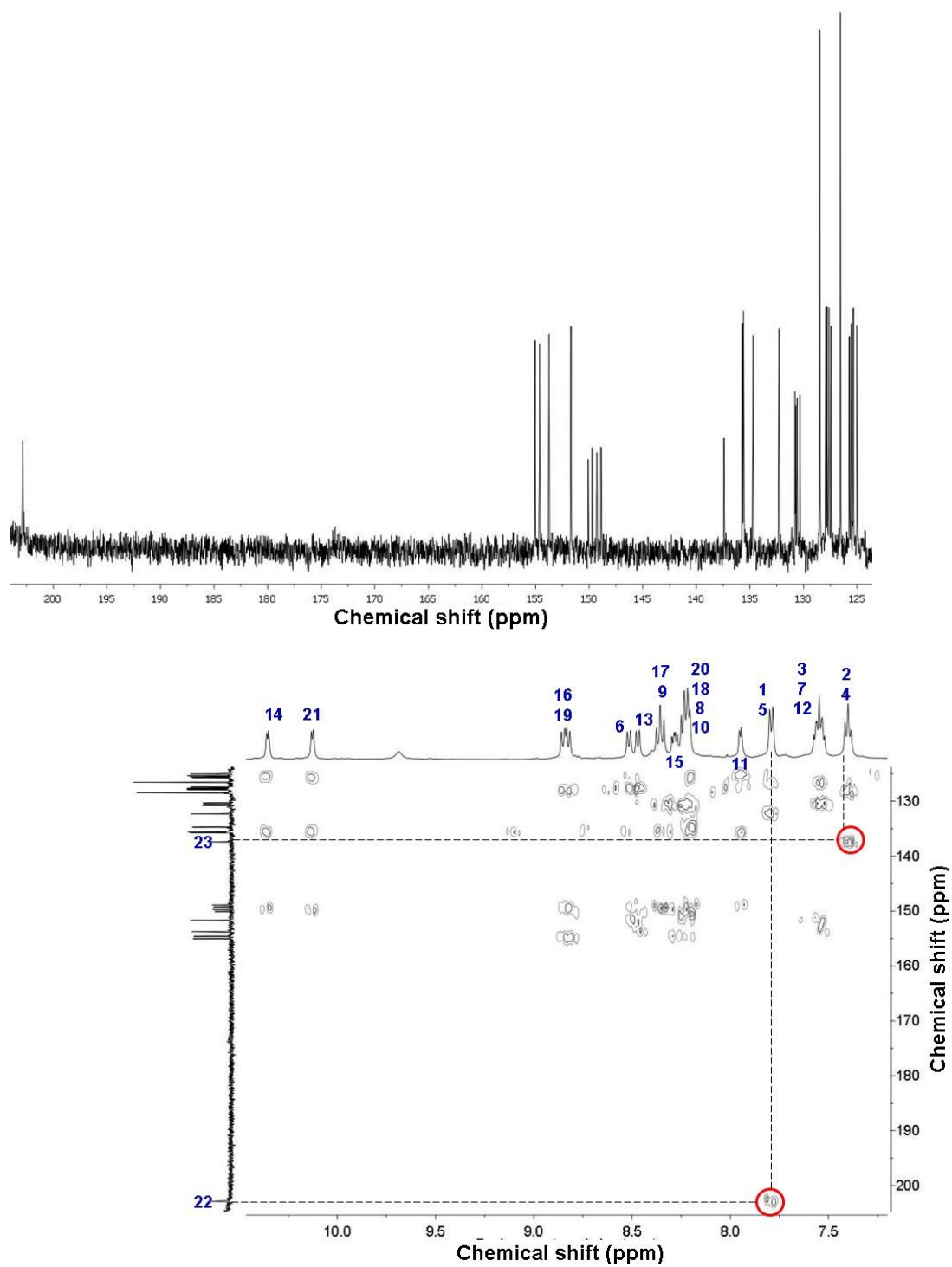


Figure S5. <sup>13</sup>C (A) and HMBC (B) NMR spectra (500 MHz) of complex FOR0212A in acetone-d<sub>6</sub>.

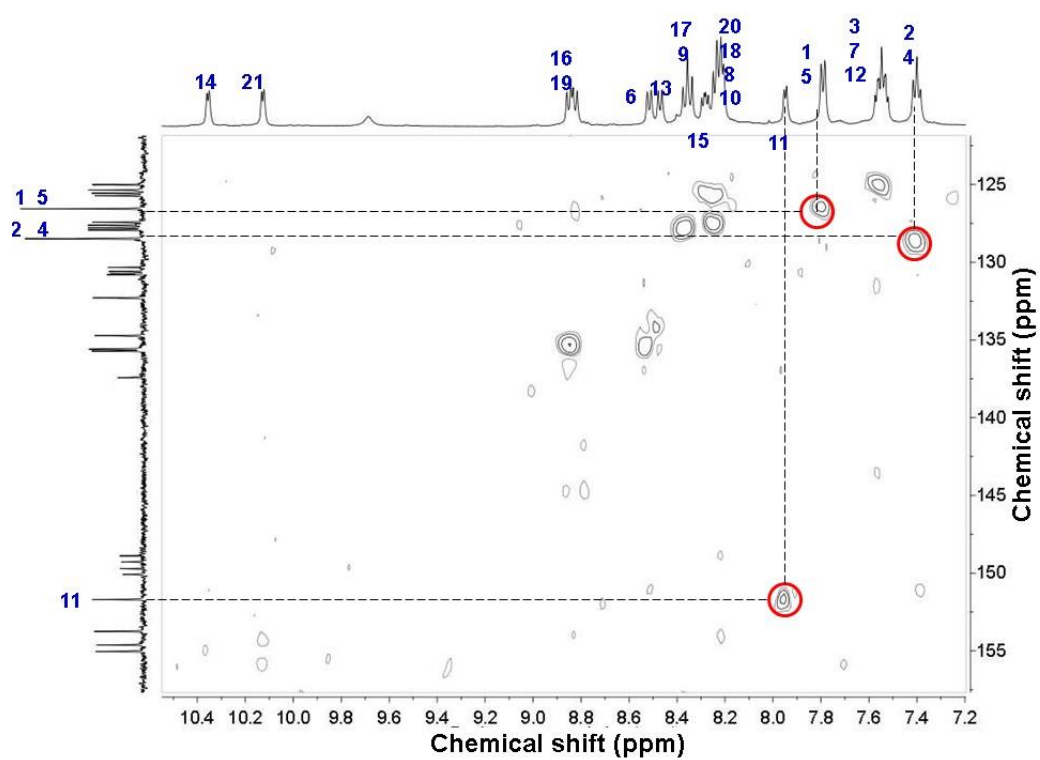


Figure S6. HMQC spectrum of complex FOR0212A in acetone-d<sub>6</sub>.

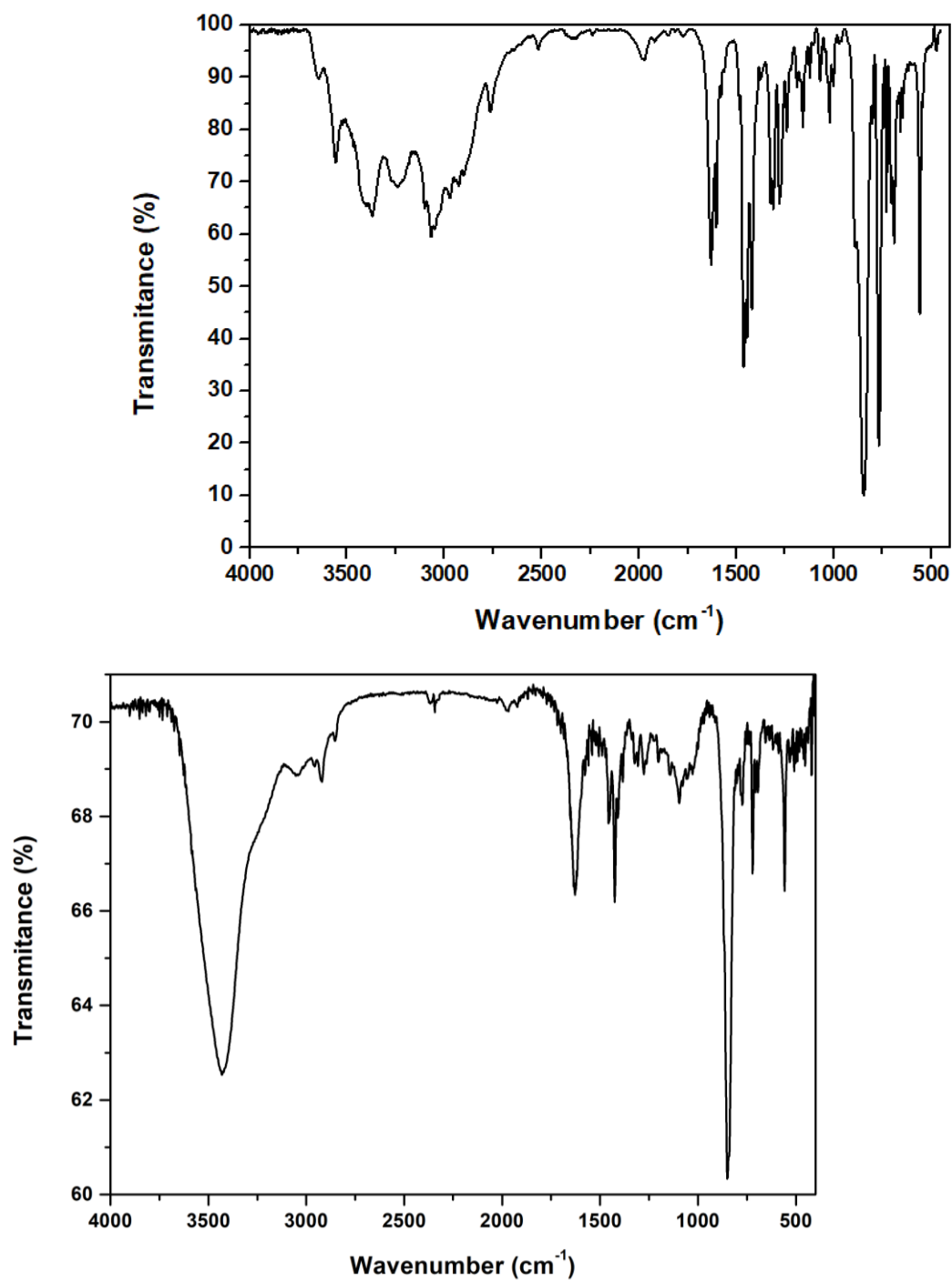


Figure S7. Infrared spectra of the complexes FOR0012A (A) and FOR0212A (B) dispersed in KBr pellets.

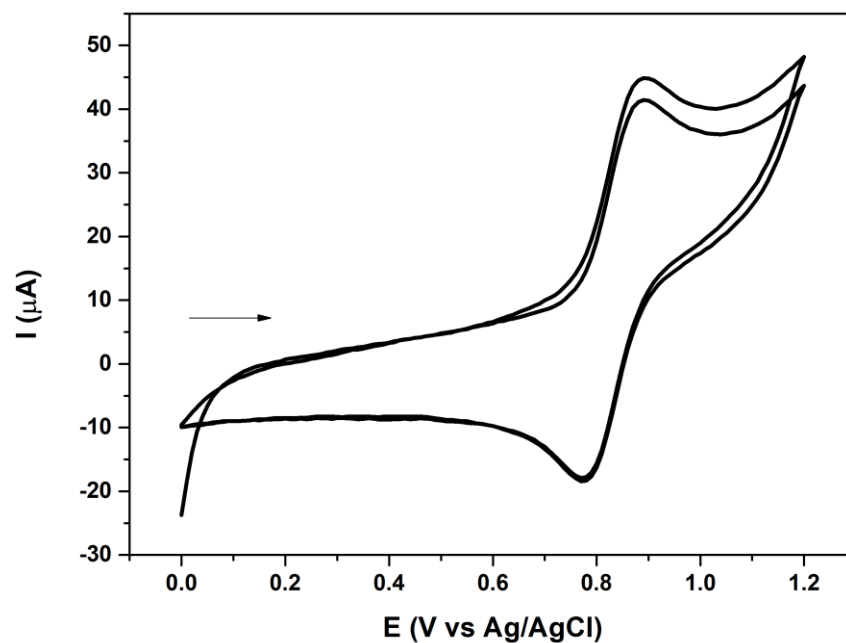


Figure S8. Cyclic voltammogram of glassy carbon electrode at  $100 \text{ mV s}^{-1}$  in presence of FOR0012A in acetonitrile and  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  tetrabutylammonium perchlorate (PTBA).

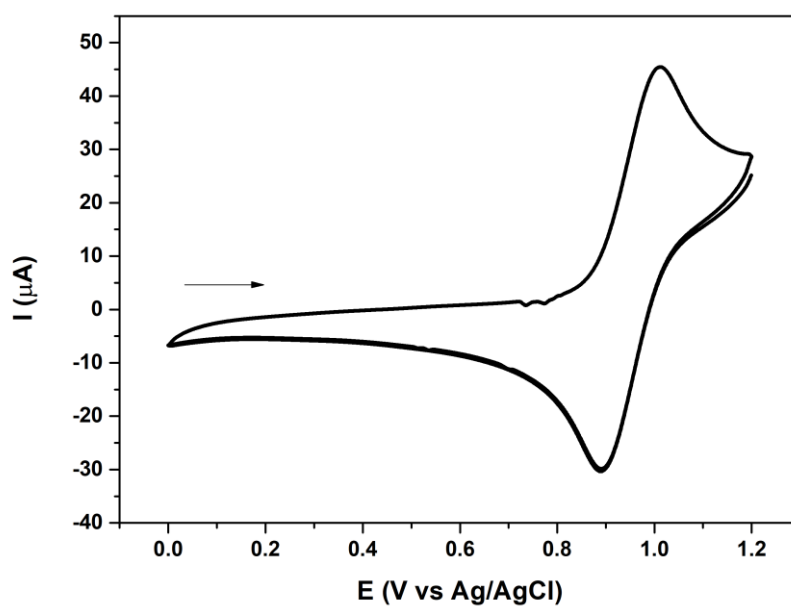


Figure S9. Cyclic voltammogram of glassy carbon electrode at  $100 \text{ mV s}^{-1}$  in presence of FOR0212A in acetonitrile and  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  tetrabutylammonium perchlorate (PTBA).