TATIANA EMY DE FREITAS

**Análise de processos celulares em linhagens de GBM
tratadas com complexos de Rutênio associados a
AINEs e seu impacto na via de eicosanoides**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

TATIANA EMY DE FREITAS

Análise de processos celulares em linhagens de GBM tratadas com complexos de Rutênio associados a AINEs e seu impacto na via de eicosanoides

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual.

Orientador: Prof(a) Dr(a) Alison Colquhoun

Versão corrigida

A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

FREITAS, TATIANA EMY

Análise de processos celulares em linhagens de
GBM tratadas com complexos de Rutênio associados a
AINEs e seu impacto na via de eicosanoides /

TATIANA EMY FREITAS; orientadora Alison Colquhoun.

-- São Paulo, 2017.

153 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. GBM. 2. Complexos de Rutênio. 3. Fosfolipase
A2. 4. Eicosanoides. 5. Cancer. I. Colquhoun,
Alison, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Tatiana Emy de Freitas
Título da Tese: Análise de processos celulares em linhagens de GBM tratadas com complexos de Rutênio associados a AINEs e seu impacto na via de eicosanoides

Orientador (a): Profa. Dra. Alison Colquhoun

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 557/12 referente ao projeto intitulado: "*Influência da fosfolipase A2 na síntese de eicosanoides em células de glioma humano*" sob a responsabilidade de **Tatiana Emy de Freitas**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 10 de outubro de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Agradecimentos Especiais

Agradeço Especialmente as agências de Fomento CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro ao projeto e custeio para que me dedicasse exclusivamente a este trabalho.

CAPES: 33002010024P6 - (Identificação através do programa de pós graduação – bolsa em demanda social).

FAPESP: Projetos - 2015/08777-0 e 2010/51999-0

Agradecimentos

Agradeço ao Universo por me manter firme, disposta, saudável e motivada para cumprir a jornada da vida. Agradeço especialmente à Prof.^a Dr.^a Alison Colquhoun pela amizade, carinho, dedicação e bom humor com que me orientou desde o início deste desafio, compartilhando despreendidamente seus conhecimentos, apoiando meus pontos de vista, acrescentando sempre nas minhas dificuldades e aperfeiçoando meu aprendizado e desenvolvimento profissional e pessoal também. A Marley Januário pelos ensinamentos, paciência, entrega e disponibilidade. Tio Bauer com sua maravilhosa oratória e atenção que dedicou a mim, pelas muitas vezes que precisei sempre solícito, atencioso e amigo e pelas valiosas contribuições no decorrer deste projeto. A todos os professores do departamento pelo incentivo, disponibilidade, receptividade e acolhimento com que me receberam. Aos companheiros e amigos de laboratório Fabinho, Felipe, Fernanda, Renata, Jana, Luquinhas e Matthew pela amizade, ajuda, companheirismo, conversas e pelos ótimos momentos de descontração. A professora Dra. Denise Oliveira e ao colega de doutorado de seu laboratório, Hanif, por sua colaboração e contribuição disponibilizando os complexos que permitiram avançar os estudos aqui apresentados. Sou eternamente grata aos colegas de departamento, professores, funcionários da limpeza, portaria que cuidam de tudo para que possamos ter uma boa estadia, as meninas da Secretaria por sempre estar à disposição, Regina e agora Tania. Agradeço especialmente a minha família, aos meus pais Luiz e Tereza pelo grande exemplo de honestidade e amor incondicional, meus irmãos Alyne e Marcos pela torcida, incentivo e motivação, Ao mais que companheiro, amigo e amor Alcides. Aos amigos eternos que estão ou passaram pela minha vida acrescentando sempre algo de valioso ao meu aprendizado. Agradeço ao ser mais especial e iluminado que despertou o melhor sentimento em mim, Gaia, companheira que sempre me tira um sorriso nas horas mais inusitadas.

Epígrafe

“Opte por aquilo que faz seu coração vibrar, apesar de todas as
consequências”
Osho

RESUMO

FREITAS, T. E. **Análise de processos celulares em linhagens de GBM tratadas com complexos de Rutênio associados a AINEs e seu impacto na via de eicosanoides** 2017. 151 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Glioblastoma (GBM) é caracterizado por sua agressividade e invasão infiltrativa do tecido cerebral. Mecanismos inflamatórios demonstram associação direta com processos carcinogênicos, especialmente aqueles relacionados à produção de eicosanoides através da ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂). Compostos metálicos como o rutênio associado a drogas anti-inflamatórias não esteroides (AINEs) surgem como tratamentos antitumorais promissores. O objetivo foi avaliar in vitro a ação desses complexos de rutênio em linhagens celulares de GBM. Pudemos observar que todos os complexos de Rutênio utilizados apresentaram diminuição na contagem celular, aumento de apoptose e diminuição da mitose, destaque para a linhagem U87MG para o tratamento RuIBpOTf com diminuição de 65,4% e na linhagem A172 para aumento de apoptose em todos os tratamentos, especialmente RuIBpCl com 106,8% . Em ambas as linhagens celulares verificamos que houve a captação dos complexos, inclusive em suas frações celulares como o núcleo. Alterações nas enzimas PLA₂ e COX 1 e 2 também foram detectadas nos ensaios realizados ELISA e RT-PCR. Através destes resultados, concluímos que os complexos de rutênio foram eficazes na diminuição do número de células de GBM em concentrações e tempos pré-determinados, aumento da apoptose e diminuição das mitoses, características que são fortemente recomendadas para novos fármacos.

Palavras Chave: GBM. Complexo Rutênio. Fosfolipase A2. Câncer. Anti-inflamatórios.

ABSTRACT

FREITAS, T.E. **Analysis of cellular processes in GBM lines treated with Ruthenium complexes and AINEs and their impact in pathway of eicosanoids** 2017. 151 p. Ph.D. Thesis (Cell and Tissue Biology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2017.

Glioblastoma (GBM) is characterized by its aggressiveness and infiltrative invasion of brain tissue. Inflammatory mechanisms demonstrate direct association with carcinogenic processes, especially those related to the production of eicosanoids through the activation of phospholipase A2 (PLA₂). Metal compounds such as ruthenium associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) appear as promising antitumor treatments. The objective was to evaluate in vitro the action of these ruthenium complexes in GBM cell lines. It was observed that all the Ruthenium complexes showed decrease in the cell count, increase of apoptosis and decrease of mitosis, highlight to the U87MG cell line for the treatment RuIBpOTf with reduction of 65.4% and in cell line A172 to increase apoptosis in all the treatments, especially RuIBpCl with 106.8%. In both cell lines we verified that there was the uptake of the complexes, including in their cellular fractions as the nucleus. Changes in PLA₂ and COX 1 and 2 enzymes were also detected in ELISA and RT-PCR assays. Through these results, we conclude that ruthenium complexes were effective in decreasing the number of GBM cells at predetermined concentrations and times, increased apoptosis and decreased mitoses, characteristics that are strongly recommended for new drugs.

Keywords: *Glioma. Ruthenium complex. Phospholipase A2. Cancer. Inflammation.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Ácido Araquidônico

AINEs - Anti-inflamatórios não esteroides

ATP – Adenosina Trifosfato

BK - Bradicinina

cDNA – DNA complementar

COX – Ciclooxygenase

cPLA₂ - Fosfolipase A2 citosólica

CYP – Citocromo P

CYP 450 - Citocromo P 450

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxiribonucleio

DEPC - dimetil pirocarbonato

ELISA – Ensaio Imunoabsorção Enzimática (do inglês *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*).

ERO – (OU ROS) – Espécies reativas ao Oxigênio

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GBM - Glioblastoma

GLA - Ácido gama-Linolênico

HCl – Ácido Clorídrico

IBP – Ibuprofeno

ICP-OES – Espectrômetro Ótico de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado

IL – Interleucina

iPLA₂ – Fosfolipase A₂ independente de Cálcio

LOX – Lipoxigenases

Lp-PLA₂ – Lipoproteína ssociada a Fosfolipase A₂

MCP – Sigla em inglês para Proteína Quimiotática do Monócito

MMPs – Metaloproteinases

MIF – Sigla em inglês para Fator de Inibição de Macrófago

MS – Espectrometria de Massas (Sigla em Inglês)

m/z – razão massa carga (do inglês para MS)

NFκ-B – Fator de Transcrição Nuclear kappa B

NO – Sigla do inglês para Óxido Nítrico

NTC – No Template Control – Branco no experimento em qPCR

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAF- AH – Fator de ativação plaquetária –Acetil hidrolase (Sigla em inglês)

pb – Pares de bases

PBS – Sigla inglês para Tampão salino de Fosfato.

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

PG – Prostaglandina

PGD₂ - Prostaglandina do tipo D2

PGE₁ - Prostaglandina do tipo E1

PGE₂ - Propstaglandina E2

PGI₂- Propstaciclina

PLA₂ - Fosfolipase A₂

PLA₂G1A - Fosfolipase A₂ Grupo 1A

PLA₂G4A - Fosfolipase A₂ Grupo 4A

q- PCR – PCR quantitativo – ensaio

RNA - Ácido Ribonucleico

RNA_m– RNA mensageiro

rt-PCR – Reação da cadeia em polimerase através de Transcriptase Reversa

Ru – Rutênio

RuIb_pCl – Complexo Rutênio – Ibuprofeno, axial cloreto

RuIb_pOTf - Complexo Rutênio – Ibuprofeno, axial triflato

RuIb_pPF₆ - Complexo Rutênio – Ibuprofeno, axial anion PF₆

RuCetoCl - Complexo Rutênio – Cetoprofeno, axial cloreto

SNC – Sistema Nervoso Central

sPLA₂ - Fosfolipase A2 secretada

SFB - Soro fetal bovino

TAM – Sigla inglês para Macrófagos Associados a Tumores

TCGA - Atlas Genômico do Câncer

TNF α – Fator de Necrose Tumoral alfa (sigla do inglês)

TXA₂ – Tromboxano A₂

UV – Ultra Violeta

VEGF – Sigla em inglês para Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Capacidades Biológicas para o desenvolvimento do câncer.....	22
Figura 2 – Atualização dos fatores para o desenvolvimento do câncer	23
Figura 3 – O papel dos macrófagos na tumorigênese.....	26
Figura 4 – Via inflamatória das cicloxigenases.....	29
Figura 5 – Representação da classificação de tumores gliais.....	44
Figura 6 – Imagens histopatológicas de GBM – Microscopia HE.....	48
Figura 7 – Microscopia HE mitoses e necrose em GBM	49
Figura 8 – Imagem de Ressonância Magnética de localização de GBM	49
Figura 9 – Estrutura química NAMI-A e KP-1019	53
Figura 10 – Estrutura geral dos complexos de Rutênio.....	54
Figura 11 – Estrutura química dos AINEs Cetoprofeno e Ibuprofeno.....	55
Figura 12 – Eletroforese em gel agarose expressão de RNAm.....	59
Figura 13 - Eletroforese em gel agarose expressão de cDNA.....	60
Figura 14 – Esquema representativo da metodologia de tratamento das células	65
Figura 15 – Imagens das linhagens celulares A172 e U87MG em cultura com os tratamentos, observadas ao microscópio	65
Figura 16 – Etapa de secagem do <i>pellet</i> para análise em ICP ou RAMAN	68
Figura 17 – Curva de calibração ICP-OES para quantificação de Ru.....	69
Figura 18 – Curva de concentração Kit Elisa para cPLA ₂	73
Figura 19 – Placa ELISA para aplicação das amostras	74
Figura 20 até Figura 24 – Eletroforese em gel de agarose dos testes de temperatura das diferentes enzimas PLA ₂ nas 5 linhagens.....	77
Figura 25 até Figura 32 – Eletroforese em gel de agarose dos testes de temperatura das diferentes enzimas PLA ₂ nas 5 linhagens.....	78
Figura 33 – Diversas curvas obtidas em qPCR, curva padrão de cDNA, curva de dissociação PLA ₂ G4A e PLA ₂ G4B e controle interno 18s	79
Figura 34 – Gráficos tempo e concentração dos tratamentos em U87MG.....	81
Figura 35 – Gráficos comparando tempo e concentração dos tratamentos em A172	82
Figura 36 - Gráfico de índice apoptótico/ mitótico linhagem de U87MG tratadas com RuIBpCl e imagens de campos aleatórios das células expostas a luz UV	83
Figura 37 - Gráfico de índice apoptótico/ mitótico linhagem de U87MG tratadas com RuIBpPF ₆ e imagens de campos aleatórios das células expostas a luz UV	84

Figura 38 – Gráfico de índice apoptótico/ mitótico linhagem de U87MG tratadas com RuIBpOTf e imagens de campos aleatórios das células expostas a luz UV.....	85
Figura 39 – Gráfico de índice apoptótico/ mitótico linhagem de U87MG tratadas com RuCetoCl e imagens de campos aleatórios das células expostas a luz UV.....	86
Figura 40 - Gráfico de índice apoptótico/ mitótico linhagem de A172 tratadas com RuIBpCl e imagens de campos aleatórios das células expostas a luz UV	87
Figura 41 - Gráfico de índice apoptótico/ mitótico linhagem de A172 tratadas com RuIBpPF ₆ e imagens de campos aleatórios das células expostas a luz UV	88
Figura 42 – Gráfico de índice apoptótico/ mitótico linhagem de A172 tratadas com RuIBpOTf e imagens de campos aleatórios das células expostas a luz UV.....	89
Figura 43 – Gráfico de índice apoptótico/ mitótico linhagem de A172 tratadas com RuCetoCl e imagens de campos aleatórios das células expostas a luz UV.....	90
Figura 44 – Espectro Raman do complexo RuIBpCl em material sólido.	92
Figura 45 – Espectro Raman das células tratadas com RuIBpCl com controle Etanol e HIBp – ou droga não complexada a Ru.....	93
Figura 46 – Imagem ótica das células U87MG analisadas em Raman, sinal em 330 cm ⁻¹	94
Figura 47 – Espectro de massas para detecção de Ru em U87MG.....	95
Figura 48 – Espectro Raman Fração Nuclear das células U87MG.	96
Figura 49 – Espectro Raman Fração Citosólica das células U87MG..	96
Figura 50 – Expressão gênica das enzimas PLA ₂ G4A e G4B realizados em qPCR.....	97
Figura 51 – Expressão gênica COX-1 RT-PCR convencional.	97
Figura 52 – Expressão gênica COX-2 RT-PCR convencional.	98
Figura 53 - Expressão gênica PLA ₂ G4A RT-PCR convencional.....	98
Figura 54 - Expressão gênica PLA ₂ G4B RT-PCR convencional.....	99
Figura 55 - Gráfico representando quantificação de cPLA ₂ por ELISA em A172	100
Figura 56 - Gráfico representando quantificação de cPLA ₂ por ELISA em U87.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações de parâmetros de leitura do equipamento ICP-OES.....	69
Tabela 2 – Quantificação e pureza RNAm.	76
Tabela 3 – Sequência de Primers e temperaturas de anelamento obtidas.....	77
Tabela 4 – Resultado das concentrações obtidas por primer qRT-PCR.....	79
Tabela 5 – Quadro resumo representativo das alterações em apoptose e mitose.	91
Tabela 6 – Leitura e quantificação de Ru em ICP-OES U87MG.....	91
Tabela 7 - Leitura e quantificação de Ru em ICP-OES A172.....	92
Tabela 8 - Leitura e quantificação de Ru em ICP-OES das frações celulares.....	95

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Câncer – Um breve Histórico.....	18
1.2 A Relação Câncer Inflamação.....	23
<u>1.2.1 FosfolipasesA2(PLA2).....</u>	<u>30</u>
<i>1.2.1.1 PLA2 secretada (sPLA2).....</i>	<i>34</i>
<i>1.2.1.2 PLA₂ citosólica.....</i>	<i>37</i>
<i>1.2.1.3 PLA₂ independente de Ca²⁺.....</i>	<i>39</i>
<i>1.2.1.4 Lp-PLA₂.....</i>	<i>41</i>
1.3 Gliomas.....	42
<u>1.3.1 GBM.....</u>	<u>45</u>
<i>1.3.1.1 Sintomas, Diagnóstico e Tratamento do GBM.....</i>	<i>50</i>
1.4 Uso de Compostos Metálicos e Câncer.....	51
<u>1.4.1 Compostos de Rutênio.....</u>	<u>52</u>
2 OBJETIVOS.....	57
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
3.1 Cultura celular.....	58
3.2 Técnica RT-PCR.....	58
<u>3.2.1 Extração e quantificação do RNAm.....</u>	<u>58</u>
<u>3.2.2 Síntese do DNA complementar (cDNA).....</u>	<u>59</u>
<u>3.2.3 Determinação de temperatura dos primers.....</u>	<u>60</u>
<u>3.2.4 Análises em RT-PCR</u>	<u>61</u>
<u>3.2.5 Análise de dados qRT-PCR.....</u>	<u>62</u>
3.3 Tratamento complexos de Rutênio em cultivo celular.....	63
<u>3.3.1 Tratamento de células com Ru para análise em PCR.....</u>	<u>66</u>
3.4 Ensaio Apoptose – Mitose.....	66
3.5 Análises em ICP/OES – Padronização e ensaio biológico.....	67
3.6 Análises em Microscopia Raman.....	70
3.7 Análise em ICP/OES e Microscopia Raman das Frações Celulares.....	71
3.8 Espectrometria de Massas (ESI- MS).....	71
3.9 Ensaio de imunoabsorção enzimática– ELISA.....	72
3.10 Análises Estatísticas.....	75
4 RESULTADOS.....	76
4.1 Padronizações.....	76
<u>4.1.1 RT-PCR.....</u>	<u>76</u>
<i>4.1.1.1 Extração e Quantificação de RNAm presentes nas linhagens.....</i>	<i>76</i>
<i>4.1.1.2 Teste de Temperatura.....</i>	<i>76</i>

4.1.1.3 RT-PCR.....	78
4.1.2 Padronizações das concentrações qPCR.....	79
4.2 Ensaio de Contagem Celular.....	80
4.2.1 Contagem celular da linhagem U87MG	81
4.2.2 Contagem celular da linhagem A172.....	82
4.3. Ensaio Apoptose / Mitose.....	82
4.3.1 Apoptose/ Mitose Linhagem U87MG – RuIBPCI.....	83
4.3.2 Apoptose/ Mitose Linhagem U87MG – RuIBpPF₆.....	84
4.3.3 Apoptose/ Mitose Linhagem U87MG – RuIBPOTf.....	85
4.3.4 Apoptose/ Mitose Linhagem U87MG – RuIBPCeto.....	86
4.3.5 Apoptose/ Mitose Linhagem A172 – RuIBPCI.....	87
4.3.6 Apoptose/ Mitose Linhagem A172 – RuIBpPF₆.....	88
4.3.7 Apoptose/ Mitose Linhagem A172 – RuIBPOTf.....	89
4.3.8 Apoptose/ Mitose Linhagem A172 – RuIBPCeto.....	90
4.3.9 Resumo dos Resultados do ensaio Apoptose-Mitose.....	91
4.4 ICP-OES.....	91
4.4.1 Linhagem U87MG – quantificações.....	91
4.4.2 Linhagem A172 – quantificações.....	92
4.5 Análises em Microscopia Espectroscópica Raman.....	92
4.6 Espectrometria de Massas.....	94
4.7 Análises das frações celulares em ICP-OES e Microscopia Raman.....	95
4.7.1 Resultados em ICP-OES frações celulares.....	95
4.7.2 Resultado em Microscopia Raman frações celulares.....	95
4.8 Análise em RT-PCR e qRT-PCR para as PLA₂ G4A, G4B.....	96
4.8.1 qRT-PCR – primeiras análises PLA₂ após tratamento.....	97
4.8.2 RT-PCR finalização das análises PLA₂ e COX.....	97
4.8.2.1 RT- PCR COX-1.....	97
4.8.2.2 RT-PCR COX-2.....	98
4.8.2.3 RT-PCR PLA ₂ G4A.....	98
4.8.2.4 RT-PCR PLA ₂ G4B.....	99
4.9 Ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA.....	99
4.9.1 Linhagem A172.....	100
4.9.2 Linhagem U87MG.....	100
5 DISCUSSÃO.....	101
5.1 Contagem de células.....	103
5.1.1 Tratamentos e avaliação das concentrações utilizadas.....	103

5.1.2 Contagem Apoptose – Mitose.....	<u>104</u>
5.2 Avaliação de captação celular dos complexos de Rutênio.....	107
5.3 Análise da atividade de PLA₂.....	108
6 CONCLUSÃO.....	111
REFERÊNCIAS.....	113
Artigo publicado	143

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer – Um breve histórico.

O relato mais antigo sobre câncer data de cerca de 3.000 anos A.C e foi descoberto no Egito através de um papiro que descreve cerca de oito casos de tumores e úlceras de mama que foram removidas por cauterização, onde os escritos diziam: “Não há tratamento” (HADJU, 2011).

Após a década de 40, pesquisadores buscavam as causas do câncer, onde foi introduzida a teoria de três etapas da carcinogênese: Iniciação, promoção e latência. Várias substâncias químicas foram testadas, como as benzidinas, petróleo, derivados de borracha entre outros, onde concluiu-se a carcinogenicidade em experimentação animal (DOBRINE, 1950; FRIEDENWALD; ROUS, 1944; SPITZ; MAGUIGAN; SUNDERLAND; SMITH; SUGIURA, 1951). Em 1951, 322 de 1329 compostos que foram testados no “National Cancer Institute” dos Estados Unidos eram carcinogênicos (HARTWELL, 1951).

Em ensaio utilizando diferentes dietas, animais de laboratório desenvolveram tumores hepáticos provenientes de alimentação com amendoim advindo do Brasil, contendo Aflatoxinas produzidas pelo fungo *Aspergillus flavus* (LANCASTER; JENKINS; PHILIP, 1961).

O Tabaco foi introduzido na Europa aproximadamente em 1500, porém seus efeitos carcinogênicos foram definitivamente estabelecidos apenas em 1928 (GOODMAN, 1993). Em 1941, 95% dos cânceres de pulmão tiveram ocorrência em fumantes (ROFFO, 1941).

A influência de hormônios como estrogênio exógeno em câncer de mama (CUTTS; NOBLE, 1969; LACASSAGNE, 1932) e em câncer de próstata já eram conhecidos (HUGGINS et al., 1939), conferindo ao autor um Nobel em 1966 pelo tratamento hormonal proposto (HUGGINS; HODGES, 1941).

Diversos vírus foram identificados como causadores de tumores em diferentes partes do corpo (CLAUDE; PORTER; PICKLES, 1947; GROSS, 1951; HOLLAND; FREI, 1973; STEWART, 1953). A interação desses vírus e o material genético das células foram observados pelo estudo do RNA (sigla em inglês para Ácido Ribonucleico), que sugeriu que o material genético desses

vírus “tumerais” seria responsável pela transformação de células normais em células cancerígenas, e este gene viral foi denominado “oncogene” (HUEBNER; TODARO, 1969; VOGT; DULBECCO, 1960).

A significância da hereditariedade do câncer nas famílias não foi considerada até 1966, quando pela primeira vez foi anunciada uma síndrome de câncer familiar nomeada só 20 anos depois como síndrome de Lynch (ANDERSON et al., 1967; LYNCH et al., 1966). Depois desta síndrome, outras surgiram relacionadas a diversos tipos de tumores como neoplasias endócrinas, câncer de ovário, melanoma e câncer de mama (LEWIS; DAVISON, 1969; LYNCH; ANDERSON; KRUSH, 1968; SCHIMKE et al., 1968).

Então pela primeira vez, a oncogênese de vários tumores foi associada com mudanças celulares, regulação de ciclo, divisão celular e controle genético hereditário (HAJDU, 2013). Observamos a multifatorialidade relacionada ao surgimento e desenvolvimento tumoral (HAJDU, 2013).

Na década de 70 cientistas definiram duas principais famílias de genes particularmente importantes relacionados ao câncer: oncogenes e genes supressores de tumor, que resumidamente promove e impede o crescimento tumoral respectivamente. Nessa época também se deu a melhoria nos diagnósticos, assim como a descoberta de drogas anticâncer, uso concomitante de quimioterapia e radiação na cura e diminuição das recidivas (HAJDU, 2013).

Os diferentes danos ocorridos no DNA passam por um controle de reparos que existe intracelularmente e através de cascatas de sinalizações promovem o envolvimento de diversas proteínas e reações para que todo o maquinário celular funcione integralmente e sem anormalidades (POLO; JACKSON, 2011). Porém, erros nesses mecanismos podem levar o aparato celular a prosseguir com aquele DNA danificado, gerando células filhas com a informação genética defeituosa, perpetuando-a dali em diante (FRIEDBERG et al., 2005; TRUGLIO et al., 2006; WOODGATE, 1999).

O estudo e entendimento dos mecanismos do comportamento celular e reparo aos danos ao DNA são de suma importância para que esses mecanismos regulatórios sejam manipulados e usados em tratamentos para melhor qualidade de vida dos pacientes.

Nos últimos 60 anos, a literatura propõe alguns modelos de carcinogênese, considerando cinco principais paradigmas dominantes na pesquisa sobre o câncer. Mutações genéticas são tidas como modelo um; instabilidade genômica, das quais relacionadas diretamente aos oncogenes como modelo dois, mudanças epigenéticas, três; seleção natural de células transformadas, o quarto e organização tecidual através do microambiente na posição cinco (VINES; SCHATZKIN; POTTER, 2010).

De acordo com Hanahan e Weinberg, 2000 existe uma lista de marcadores que juntos constituem a organização principal para entendimento das diversidades nas doenças neoplásicas. Nessa ocasião, os autores propuseram seis capacidades biológicas adquiridas durante as múltiplas etapas do desenvolvimento de tumores humanos (Figura 1).

Em 2011, em atualização ao seu último trabalho, discutiram-se como células normais participariam ativamente do processo de tumorigênese e progressivamente iam adquirindo uma sucessão dessas capacidades, habilitando nelas a característica tumorigênica e posteriormente a malignidade tumoral. Novas descobertas em torno de uma década desde a primeira publicação sugeriram novas capacidades biológicas aos “hallmarks” propostos anteriormente (Figura 2). (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

É importante observar cada fator individualmente, porém o câncer é uma doença multifatorial em que vários riscos externos associados podem levar ao desenvolvimento de câncer, o que inclui hábitos, alimentação, ambiente, inatividade física, entre outros (PARKIN; BRAY; DEVESA, 2000).

O câncer é caracterizado pelo crescimento inadequado e desorganizado das células nos tecidos. Em alguns casos, o risco de câncer pode ser transmitido através da linhagem germinativa como mutações no DNA e possivelmente através da hereditariedade, influências ambientais e marcadores bioquímicos no DNA (SUTER; MARTIN; WARD, 2004; VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

No entanto, as mutações germinativas por si só não causam câncer e a maioria parece surgir esporadicamente, muitas vezes associada a acúmulo de mutações somáticas em vários genes e com instabilidade genômica que persistem até a formação do tumor (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

As células cancerosas malignas subvertem os mecanismos bioquímicos homeostáticos normais que controlam o crescimento, localização e função do tecido em detrimento do hospedeiro, entre essas mudanças podemos destacar a resistência a apoptose, crescimento autossustentado, imortalidade da célula e a habilidade de escapar dos mecanismos de controle do ciclo celular, desenvolvimento da angiogênese, invasão e metástase (GORDON et al., 2011; SAMUELS; BARDELLI; LÓPEZ, 2011; VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

As alterações epigenéticas não produzem danos diretos na sequência de nucleotídeos do DNA, mas modula a expressão gênica através de modificações pós-traducionais como metilação do DNA e modificação de histonas, influenciando na organização da cromatina e inibindo a expressão de alguns genes. A expansão de clones celulares que adquirem características vantajosas favorece a proliferação e reorganização tecidual, proporcionando um ambiente favorável para a transformação e surgimento de um tecido neoplásico (VINES; SCHATZKIN; POTTER, 2010).

Os tumores são estruturas complexas e heterogêneas similares à órgãos, inseridas em uma matriz e uma rede vascular, rodeadas por estroma que contém em sua estrutura células não malignas como fibroblastos, células mielóides, células inflamatórias e células endoteliais (GORDON et al., 2011; KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010; TRÉDAN et al., 2007; ALBERTS et al., 2008; EGEGLAD; NAKASONE; WERB, 2010).

A heterogeneidade dos tumores sugere que a instabilidade genética é um processo contínuo e que as vias de reparo do DNA e as verificações dos ciclos são drasticamente alteradas, desestabilizando o genoma, acelerando então a evolução do câncer com células naturalmente selecionadas por sua capacidade de proliferação e evasão das defesas do hospedeiro (COLOTTA et al., 2009; NOWELL, 1976).

A carcinogênese – processo de transformação de uma célula normal para uma célula tumoral – pode ser dividida em três fases: Iniciação, promoção e progressão tumoral (KARIN; GRETEN, 2005).

A iniciação tumoral envolve mudanças irreversíveis no DNA através de carcinógenos físicos ou químicos, promovendo a ativação de oncogenes e/ou inativação dos genes supressores de tumor. No estágio de promoção tumoral

há um estímulo por alguns agentes conhecidos como promotores que levam essas células mutadas à expansão por aumento da proliferação celular e/ou redução no processo de morte celular (COUSSENS; WERB, 2002; KARIN; GRETEN, 2005).

Exemplos de promotores de tumor são estrogênio, progesterona, agentes infecciosos como alguns vírus, agentes químicos e inflamação crônica (WEINBERG, 2008).

Por fim, o aumento em tamanho, invasão do tecido adjacente e metástase caracterizam o estágio de progressão, quando o tumor pode acumular outras mutações exacerbando seu fenótipo (KARIN; GRETEN, 2005).

O primeiro a reconhecer a transformação de tumores benignos e sua progressão aos carcinomas malignos, associados principalmente por carcinógenos virais e químicos e que induziam mudanças somáticas foi Peyton Rous em 1941. Esses estados, agora conhecidos como “iniciação”, envolvem alterações no DNA e são irreversíveis, persistindo através de um segundo tipo de estímulo chamado de promotor (COUSSENS; WERB, 2002).

De acordo com Hanahan e Weinberg (2000) a resposta a nível celular, ocorreria através de seis principais marcadores - “Hallmarks” descritos na figura 1.

Figura 1 – *The Hallmarks of Cancer* – O Esquema apresenta as capacidades biológicas propostas originalmente no ano de 2000 para desenvolvimento do câncer por Hanahan e Weinberg – Figura original do artigo citado

Em sua última revisão, Hanahan e Weinberg (2011) incluíram mais quatro características que conferem capacidades biológicas específicas as células tumorais: 1 – Desregulação energética celular; 2 – Evitar resposta e destruição imunológica; 3 – Instabilidade genômica e mutação; 4- Inflamação, promovendo tumor (Figura 2).

Figura 2 – Atualização dos fatores associados ao câncer - por Hanahan e Weinberg (2011).

O quarto item, inflamação, vem de encontro aos trabalhos realizados por nosso grupo de estudos onde avaliamos as vias do ácido araquidônico relacionadas intrinsecamente à resposta inflamatória e suas cascatas sinalizadoras, como também as influências no metabolismo das células tumorais (COLQUHOUN, MIYAKE E BENADIBA, 2009; GOMES E COLQUHOUN, 2012; MIYAKE et al., 2014;).

1.2 A Relação Câncer – Inflamação

O Papel das Fosfolipases A₂

A relação câncer e inflamação já eram conhecidas no século 19, porém com o surgimento de diversos outros fatores essa teoria tinha sido deixada de lado, e só nos últimos anos observou-se um ressurgimento desta relação decorrentes de diversos resultados que conduziram novamente para o assunto (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; BALKWILL; CHARLES; MANTOVANI, 2005; COUSSENS; WERB, 2002; MANTOVANI et al., 2008).

Durante o século 20 foi introduzido o conceito de iniciação e promoção tumoral através de observações onde inflamação e infecção estavam associadas ao câncer (BEN-NERIAH; KARIN, 2011).

Para entender o papel da inflamação na evolução do câncer é importante saber o que é a inflamação e como ela contribui para os processos fisiológicos e patológicos (COUSSENS; WERB, 2002).

Inflamação é uma resposta natural do corpo diante de um estímulo interno ou externo (VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012) diante de uma injúria tecidual, através de uma série de sinais químicos, alguns processos são iniciados a fim de manter uma resposta destinada a curar o tecido, essa resposta pode também ativar e direcionar a ação de leucócitos que seguirão pelo sistema venoso até o local do dano (COUSSENS; WERB, 2002).

Quando a homeostase tecidual é perturbada, macrófagos e mastócitos liberam imediatamente mediadores como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ERO), além de mediadores bioativos como histamina, que induz a mobilização e infiltração de leucócitos no local lesionado, caracterizando então, o processo inflamatório (VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006).

Quando a resposta inflamatória dura um curto período de tempo, suas consequências são apenas fisiológicas para atender um estado ou injúria pontual, porém quando se torna crônica considera-se doença (AGGARWAL et al., 2006; MEDZHITOV, 2010).

A inflamação crônica está envolvida em diversas patologias como doenças cardiovasculares, diabetes, artrite reumatoide, Alzheimer, desordens autoimunes e câncer (AGGARWAL et al., 2006). Este estado crônico é responsável pelo excesso de tecido de remodelamento, perda da arquitetura tecidual, modificação de proteínas e DNA e consequência do stress oxidativo, o que também contribui para o desenvolvimento do câncer (VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006).

Macrófagos associados a tumores são um componente de infiltrados inflamatórios em tecidos neoplásicos e são derivados de monócitos que foram recrutados pelas proteínas quimiotáticas de monócito (MCP – sigla inglês).

Esses macrófagos associados a tumores (TAM – sigla em inglês) tem duplo papel em neoplasias – Eles podem destruir as células neoplásicas, através de mediadores imunológicos, como Interleucina L2 (IL2), interferon e IL12 (BRIGATTI et al., 2002; TSUNG et al., 2002), como também produzir um alto número de fatores de crescimento para angiogênese e linfangiogênese. (SCHOPPMANN, 2002). Esses macrófagos secretam metaloproteinases – MMPs que contribuem para a progressão do câncer (AGGARWAL, 2009; MANTOVANI et al., 2008; WEINBERG, 2008).

A morte de células necróticas libera sinais pró-inflamatórios no microambiente ao redor do tecido e como consequência recrutam células inflamatórias do sistema imune (GALLUZZI; KROEMER, 2008; GRIVENNIKOV et al., 2010; WHITE et al., 2010).

As associações mais frequentes de câncer com doenças inflamatórias crônicas são: Câncer de cólon que ocorre em indivíduos que apresentam quadros de colite ulcerativa crônica, doença de Crohn; Infecção por Hepatite C, que predispõe o câncer hepático, além de aumentar o risco de câncer na bexiga; Infecção por *Helicobacter pylori* na inflamação crônica do estômago (ERNEST; GOLD, 2000).

A presença de células inflamatórias geram alguns danos aos aparatos celulares influenciando na expressão da citocina MIF (Fator de Inibição de Migração) de macrófagos, o que vai levar a um impacto na presença da proteína p53 (HUDSON et al., 1999), o que pode acarretar em aumento da proliferação e aumento de vida útil dessa célula, além de um ambiente com resposta ineficiente aos danos ao DNA, amplificando assim, potenciais mutações oncogênicas (COUSSENS; WERB, 2002).

Resumidamente duas vias do processo inflamatório podem atuar no desenvolvimento e progressão do câncer, uma intrínseca e outra extrínseca, onde no primeiro caso ocorre a ativação de diferentes classes de oncogenes que guiam e orientam a construção de um ambiente inflamatório e, na segunda via extrínseca observam-se condições inflamatórias que promovem o desenvolvimento do câncer, orquestrando a progressão do tumor através de fatores de transcrição, quimiocinas, citocinas.

Entre as citocinas pró-inflamatórias, destaca-se o TNF α (Sigla em inglês para Fator de Necrose Tumoral alfa). Originalmente, identificada como uma citocina indutora de necrose hemorrágica de tumores, logo mostrou ter também função pró-tumoral, onde em estudo com ratos deficientes em TNF α eram resistentes à câncer de pele (BALKWILL, 2009; MOORE, 1999).

A promoção tumoral por esta citocina pode acontecer por diferentes vias: Aumento da invasão e crescimento tumoral; recrutamento de leucócitos; angiogênese e indução da transição epitélio-mesênquima (BALKWILL, 2009; KULBE et al., 2007; POPIVANOVA et al., 2008).

Vários estímulos patológicos conduzem a produção de TNF α , que quando secretada localmente pelas células do sistema imune tem papel terapêutico, mas quando está desregulada e chega à circulação sanguínea pode levar a várias doenças incluindo câncer, através da liberação de mediadores inflamatórios e proteases que orquestram a resposta inflamatória (AGGARWAL et al., 2006; MEDZHITOV, 2010).

Figura 3 – Papel dos macrófagos na tumorigênese. Os macrófagos desempenham grande papel na liberação de fatores mitóticos em células cancerígenas, reorganização do estroma, facilitação da angiogênese e a invasão celular – esquema baseado em Vendramini-Costa e Carvalho, 2012.

As características adquiridas pelas células tumorais que permitem seu sucesso no processo de progressão e sobrevivência dependem da regulação de genes de transcrição pró-tumorais e da inibição da transcrição de genes supressores de tumor (DARNELL, 2002).

Os fatores de transcrição são proteínas cruciais que se ligam a RNA polimerase, agindo como coativadores, correpressores e remodeladores de cromatina. Essas proteínas estão presentes em todas as células eucarióticas e contribuem para a iniciação do transcrito primário catalisado pela RNA polimerase II. Eles devem conter um sítio de ligação de DNA no local regulador do gene e um domínio que tem um potencial de ativação transcricional. Às vezes esses sítios não estão presentes nas mesmas proteínas, sendo compartilhados por proteínas acessórias (BRIVANLOU; DARNELL, 2006).

O Fator de transcrição nuclear Kappa B(NF-kB) é o regulador da relação imunidade inata/ inflamação e a regulação aberrante deste fator é observada em vários tipos de câncer (KARIN, 2006), induzindo a expressão de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, enzimas chave na síntese de prostaglandinas, via da Ciclooxygenase 2 (COX-2) e Oxido Nítrico (NO), angiogênese, além de induzir genes anti-apoptóticos como Bcl₂ que promove a sobrevivência das células tumorais (COLOTTA et al., 2009; KARIN 2006; PIKARSKY et al., 2004).

Componentes inflamatórios estão presentes no microambiente da maioria dos tecidos neoplásicos, mesmo tecidos que não apresentam um processo inflamatório óbvio (COLOTTA et al., 2009). Em certos casos, a inflamação já é evidente em estágios mais precoces da progressão neoplásica e contribuem para o desenvolvimento do câncer, acelerando a evolução genética das células cancerígenas assim como células inflamatórias podem liberar substâncias químicas que são mutagênicas (VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012).

Essa inflamação relacionada ao câncer pode promover uma maior agressividade desse tumor, seguida de evasão imunológica (WALCZAK, 2011).

Estudos epidemiológicos têm indicado que o uso regular de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) está associado com a redução do risco de câncer gastrointestinal, sugerindo que a inflamação desempenha um papel no

desenvolvimento de câncer (THUN; NAMBOODIRI; HEATH, 1999; THUN; JACOBS; PATRONO, 2012).

Alguns estudos clínicos randomizados mostraram o efeito profilático dos AINEs em câncer de cólon, mama, próstata e pulmão (SANDLER et al., 2003; SCHETTER; HEEGAARD; HARRIS, 2010; WANG; DUBOIS, 2010).

O alvo de ação dos AINEs são, principalmente, as enzimas ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2). A partir dessas enzimas inicia-se a uma cascata sinalizadora que levará à biosíntese de prostaglandinas (PGs) – Figura 4. Estudos indicam que a via inflamatória que segue a partir da COX-2, e chegando até a prostaglandina E_2 (PGE_2) desempenham papel importante na tumorigênese gastrointestinal (CHULADA et al., 2000; OSHIMA et al., 1996; OSHIMA et al., 2006).

A COX-1 é considerada constitutiva em muitos tecidos, desempenhando papel chave na agregação plaquetária e na citoproteção gástrica. A COX-2 é induzida principalmente na inflamação, cicatrização e neoplasia, mas também constitutiva em alguns tecidos como rim e cérebro. Quando a COX age sobre o ácido araquidônico (AA) inicia-se a síntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos (THUN; HENLEY; PATRONO, 2002).

Em tecidos cancerosos, infiltrados de macrófagos são ativados pela indução da via de COX-2/ PGE_2 , levando a maior sinalização de citocinas (KITAMURA; QIAN; POLLARD, 2015; POLLARD, 2004).

Os eicosanoides são produtos derivados de fofolipídeos de membrana e estão envolvidos no controle de diversos processos fisiológicos, além disso, tem papel chave nas reações inflamatórias (MORROW; ROBERTS – In Goodman & Gilman, 2001).

A fonte principal dos eicosanoides é o ácido Araquidônico, uma estrutura de ácido graxo composta por 20 átomos de carbono e que contém 4 duplas ligações em sua estrutura, e que são esterificados em fofolipídeos. Durante a resposta inflamatória, o ácido araquidônico é liberado através da PLA_2 (Fosfolipase A_2). Depois de ser liberado, o ácido araquidônico pode ser metabolizado pelas enzimas COX-1 e COX-2 e componentes do citocromo P (CYP – sigla em inglês) (MORROW; ROBERTS – In Goodman & Gilman, 2001).

A atividade de COX dá origem a prostaglandina H₂ (PGH₂) que é muito instável e, nos vários tecidos, são transformadas por isomerases em várias formas de prostanoides conhecidos (THUN, HENLEY; PATRONO, 2002). Uma vez liberados, os eicosanoides atuam localmente por ligação rápida ao seu receptor com uma meia vida relativamente curta de segundos a minutos. Normalmente, o início da atividade envolve a ligação a receptores acoplados à proteína G (WYMAN; SCHNEITER, 2008).

Figura 4 – Esquema simples do processo inflamatório pela via das ciclooxygenases que originam os prostanoides, começando pela enzima PLA₂ ativada por fatores da membrana plasmática, gerando o ácido araquidônico e, posteriormente sofrendo a ação de COX, principal alvo dos AINES usados na clínica.

Nas respostas inflamatórias e imunológicas os eicosanoides desempenham um papel importante e que pode ser observado através do amplo uso de AINEs. Nessas respostas, o prostanóide predominante é a PGE₂, embora PGI₂ também possa ser encontrada produzida por tecidos locais e nos vasos sanguíneos, enquanto os mastócitos liberam PGD₂ (MORROW; ROBERTS – In Goodman & Gilman, 2001).

Em casos crônicos, os monócitos / macrófagos também liberam PGE₂ e tromboxano A₂. A PGE₂, PGI₂ e PGD₂ são vasodilatadores potentes que agem em sinergia com histamina e bradicinina (BK sigla em inglês). Este efeito

vasodilatador contribui para o eritema e aumento do fluxo sanguíneo na região através de arteríolas pré-capilares, aumentando a atividade da histamina e BK nas vênulas pós-capilares, o que confere maior permeabilidade e subsequente formação de edema (MORROW; ROBERTS – In Goodman & Gilmans, 2001).

Da mesma forma esses prostanoídes não produzem dor, mas diminuem o limiar para estímulos dolorosos, aumentando os efeitos da bradicinina. A PGE_2 é encontrada em altas concentrações no líquido cefalorraquidiano durante processos infecciosos, sendo diretamente relacionada ao aumento da temperatura corporal através da indução de citocinas endógenas que produzem febre (MORROW; ROBERTS – In Goodman & Gilmans, 2001).

A super expressão de COX-2 presente em muitos tipos de câncer, está associada com mau prognóstico (AGGARWAL et al., 2006). Esta atividade enzimática participa da angiogênese, um estágio essencial no desenvolvimento e invasão do tumor (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003). No entanto, pouco se sabe sobre a forma como o nível de prostanoídes (PGD_2 , PGE_2 , PGF_{2a} , PGI_2) e TXA_2 muda e como a expressão e atividade das sintases envolvidas na sua produção são reguladas (IÑIGUEZ, 2003).

Os efeitos dos prostanoídes produzidos pela COX-2 durante a angiogênese são provavelmente amplificados pelo feedback positivo mediado pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, sigla em inglês) que estimula a liberação de PLA_2 e a expressão de COX-2, aumentando assim a produção de PGI_2 e PGE_2 (IÑIGUEZ, 2003).

A organização das vias bioquímicas pode ser descrita em termos de redes constituídas por nós e centros e se assemelham a estruturas organizadas aleatoriamente, estáveis e que se auto referenciam (BARABASI; OLTAVAI, 2004; BARABASI, 2009). Muitos oncogenes e genes supressores de tumor agem de forma crítica nessas várias vias bioquímicas (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

1.2.1 Fosfolipases A_2 (PLA_2)

Estudos voltados para organização bioquímica das vias da inflamação trazem um novo foco que define mais claramente o papel das enzimas e seus

produtos e como eles se apresentam desregulados em células cancerígenas (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

Avanços tecnológicos em genômica, proteômica e metabolômica trazem uma maior possibilidade de examinar essas vias por inteiro e sua regulação em detalhes suficientes para permitir a avaliação de sua significância na tumorigênese (BUCYZYNSKI; DUMLAO; DENNIS, 2009).

Muitas classes de mediadores lipídicos são derivadas da ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) em fofolipideos liberando ácidos graxos e lisofolipideos, ambos com função relevante na progressão do câncer, podendo ainda, ser novamente metabolizados pelas COXs, LOXs (Lipooxigenases) e CYP450 em outros ácidos graxos, essas vias produzem mais de 100 reguladores autócrinos e paracrinis, quimicamente diversos e importantes que regulam funções normais de células e órgãos (BUCYZYNSKI; DUMLAO; DENNIS, 2009; FUNK, 2001).

Esses reguladores podem modular a diferenciação e proliferação celular, apoptose e senescência, contribuindo dessa forma com o controle homeostático de crescimento tecidual e vascularização, vigília imune e remodelamento tecidual, particularmente na resposta ao estresse. Essas funções celulares são aquelas subvertidas pelas células tumorais e que as permite crescer localmente e também influenciam as metástases em locais mais distantes do tumor original (HANAHA; WEINBERG, 2000).

As vias que controlam a síntese, degradação e função destes lipídios são de interesse já que sua regulação alterada pode contribuir para várias fases criticamente importantes na progressão tumoral. Os dados atuais mostram que os produtos eicosanoides e as enzimas biosintéticas COX e LOX estão desregulados em vários cânceres, o que sugere a alteração destas duas vias na tumorigênese (MORENO, 2009; FÜRSTENBERGER et al., 2006; WANG; DUBOIS, 2006;).

As PLA₂ são uma classe de enzimas que hidrolisam a ligação éster na posição sn-2 dos glicerofosfolipideos, liberando ácido graxo livre e lisofolipideo. Esses ácidos graxos produzidos pela atividade da PLA₂ podem ser metabolizados em produtos bioativos (WEI-YI ONG, 2015).

Os ácidos graxos liberados pela PLA₂, como o ácido araquidônico e o ácido oleico podem ser importantes como reservas de energia (BERK; STUMP, 1999; GIJON; LESLIE, 1999), já os lisofosfolípidos tem papel importante na sinalização celular, remodelamento dos fosfolípidos em perturbações da membrana (BALSINDE; BALBOA; DENNIS, 1997; MOOLENAAR et al., 1997).

Em condições fisiológicas, PLA₂ ajuda na manutenção da estrutura e função da membrana celular através da remoção de fosfolípidos oxidados e danificados. Já sob condições patológicas existe uma atividade aumentada da enzima, o que conduz a uma maior produção de ácidos graxos e lisofosfolípidos, que por sua vez podem sofrer a ação de segundos mensageiros gerando metabolitos que contribuem para os processos de inflamação. Pela ação da PLA₂, o lisofosfolípido é um metabolito que sofrendo acetilação forma um mediador bioativo conhecido como fator de ativação plaquetária (PAF), que também contribui para a neuroinflamação (WEI-YI ONG, 2015).

Experiências com membros da superfamília PLA₂ de enzimas têm sido realizadas durante mais de 100 anos. O trabalho cinético e estrutural precoce estabeleceu a PLA₂ como um importante modelo de enzimologia lipídica. Com a descoberta de múltiplos membros da família de PLA₂ e sua caracterização estrutural, bem como a descoberta de suas funções celulares, a família PLA₂ tornou-se um grande alvo de drogas para muitas doenças diferentes (BURKE; DENNIS, 2009).

Entre o final do século 19 e século 20, PLA₂ era conhecida por ser componente principal dos venenos de cobras, subdividindo-se em dois grupos: Grupo I, encontrados em serpentes do velho mundo (designação para serpentes oriundas do continente Africano, principalmente) e possuíam uma diferença em uma ponte dissulfeto para o Grupo II que foram designadas para as serpentes do mundo atual (ou novos continentes como América) (STEPHENS; WALKER; MYER, 1998).

Depois, a PLA₂ pancreática foi descoberta como a maior enzima digestiva em mamíferos e era muito similar àquela encontrada nas serpentes do dito velho mundo (grupo IA) e foi nomeada como grupo IB. Com o isolamento, sequenciamento e clonagem da PLA₂ a partir do líquido sinovial

humano em 1988 (KRAMER et al, 1989; SEILHAMER et al., 1989), onde o padrão de ligação dissulfeto mais semelhante ao das novas serpentes de cascavel do mundo atual, o grupo II A foi caracterizado e iniciou-se a pesquisa das diferentes isoformas de PLA₂, que até então eram apenas enzimas com atribuições químicas diferentes.

A PLA₂ mais complicada de se identificar foi a proveniente de veneno de abelha (grupo III) (KUCHLER et al., 1989), e em 1991 com a descoberta da PLA₂ citosólica dependente de cálcio humana proveniente de macrófagos (grupo IVA) (CLARK et al., 1991; KRAMER et al., 1991), tornou-se óbvia a necessidade de um "sistema de numeração de grupos" mais elaborado (DENNIS, 1994).

À medida que a descoberta de PLA₂ adicionais continuou, tal como o grupo V secretado de macrófagos (BALBOA et al., 1996; CHEN et al., 1994) e o grupo PLA₂ grupo VI independente de cálcio (ACKERMANN; KEMPNER; DENNIS, 1994) esse sistema foi ampliado com 14 grupos distintos e muitos subgrupos aparecendo até 2000 (SIX; DENNIS, 2000). Em revisão de 2006 (SCHALOSKE; DENNIS, 2006) a lista chega em 15 grupos distintos de PLA₂.

Quando a PLA₂ citosólica foi sequenciada e clonada acreditava-se que essas enzimas eram sempre compostas por uma histidina catalítica e ligações dissulfeto (ALONSO; HENSON; LESLIE, 1986), porém a sequência revelou um padrão completamente não relacionado, uma enzima de 89 kDa, contendo uma serina catalítica e sem ligações dissulfeto (CLARK; LIN, 1991; SHARP et al., 1991). Desde a sua clonagem essa fosfolipase ficou nomeada como cPLA₂ por ser originada do isolamento do citosol das células e foi classificada como Grupo IV. Além dela, mais 3 grupos vieram na sequência, os grupos VI, VII e VIII (SIX; DENNIS, 2000).

Das 22 enzimas PLA₂ humanas (SCHALOSKE; DENNIS, 2006) definidas primariamente por sua atividade enzimática e secundariamente em subgrupos por similaridade na estrutura proteica, mecanismo catalítico, exigência de cálcio e se são intracelulares ou secretadas, apenas dez foram estudadas no contexto do desenvolvimento de câncer humano. Embora limitados no presente, estes estudos levaram a sugestões de que as enzimas

PLA₂ podem ser alvos úteis para a terapia em câncer (CUMMINGS, 2007; LAYE; GILL, 2003).

Essas enzimas foram então separadas em conjuntos que tinham características semelhantes e então quatro categorias principais ou tipos foram criados: sPLA₂s secretada, cPLA₂ citosólica, iPLA₂ independente de Cálcio, PAF-PLA₂ fator de ativação plaquetária, e por último, LpPLA₂ – Lipoproteína e cada uma dessas categorias está associada a um tipo de metabolismo lipídico e a progressão da doença (BURKE; DENNIS, 2009).

1.2.1.1 *PLA₂ secretada (sPLA₂)*

sPLA₂ foi o primeiro tipo de enzima PLA₂ descoberta. Encontrada principalmente em venenos de serpentes, escorpiões e etc.; componente do suco pancreático; fluído sinovial; diferentes tecidos de mamíferos (SIX; DENNIS, 2000).

Caracterizada por seu baixo peso molecular de 13 a 15 kDa, presença de histidina no sítio catalítico, ligação com cálcio no sítio ativo assim como seis ligações dissulfeto conservadas com uma ou duas das mesmas ligações dissulfeto variáveis. Todas essas enzimas catalisam a hidrólise através do mesmo mecanismo de abstração de um próton através de uma molécula de água, seguido por um ataque nucleofílico na posição da ligação sn-2. A molécula de água é ativada pela presença de histidina/ ácido aspártico (SCOTT et al., 1990; YU; DENNIS, 1991).

O papel primário da sPLA₂ em mamíferos na síntese de eicosanoides ainda não é conhecido, por isso mais estudos são necessários (LAMBEAU; GELB, 2008). A sPLA₂ que tem sua função melhor entendida é a do grupo IIA, o qual se mostrou um potente antimicrobiano (LAMBEAU; GELB, 2008).

As enzimas secretadas mostram atividade similares junto aos fofolipídeos, com diferentes ácidos graxos na posição sn-2, no entanto, apresentam diferentes preferências em sua ação na superfície lipídica. sPLA₂ que contêm um triptofano na superfície de ligação dos lipídios exibem a atividade mais elevada em relação aos substratos de lipídios neutros, por exemplo (SINGER et al., 2002).

Saegusa e colaboradores (2008) mostraram que a PLA₂ do grupo IIA se ligaria às integrinas, o que levanta a interessante possibilidade de que os contatos integrina-PLA₂ possam mediar a atividade pró-inflamatória.

Estudos em que as concentrações séricas da sPLA₂ GIB estão alteradas em aproximadamente 40 e 70% dos casos em pacientes com câncer de pâncreas (KITAGAWA et al., 1991; OKA et al., 1990) enquanto níveis menores são observados em amostras derivadas de pacientes com câncer de cólon ou gástrico. Os dados sugerem que a expressão desse grupo é significativamente reduzida em células tumorais pancreáticas e onde os níveis elevados são observados no sangue, causado provavelmente pela destruição de tecido pancreático não neoplásico, mas justificado pelos danos do processo carcinogênico (NEVALAINEN, 1993).

Enzimas do grupo IID e Grupo V foram observadas em carcinoma de cólon onde apresentaram expressão diminuída em relação ao RNAm e o grupo III estava super expresso em até 40 vezes, o que sugere esta enzima como biomarcador para esta doença (MOUNIER et al., 2008; OSTERSTROM et al., 2002).

Em ensaios com RT-PCR realizados em câncer de ovário, testando a expressão dos dez grupos sPLA₂ observou-se que os grupos V, IID, IIF e X foram fracamente expressos, enquanto que o grupo IIE não foi detectado. O Grupo IIA foi altamente expresso seguido por GXIII, GXII, GIII E GIB. Níveis mais elevados do GV correlacionaram-se com uma maior sobrevida do paciente e menor progressão da doença, enquanto que níveis mais elevados do GXII se correlacionaram com um pior resultado na sobrevida (GOROVETZ et al., 2006).

Estudos iniciais em câncer de cólon sugeriram que a expressão do GIIA estava amplamente distribuída no tecido peritumoral e que no tumor em si havia baixa expressão (MOUNIER et al., 2008). Porém, em pelo menos outros três estudos provou-se o contrário, afirmando que o tecido tumoral expressava mais da enzima do que o estroma e que de 116 pacientes avaliados, 55% expressavam PLA₂GIIA (BUHMEIDA et al., 2009; EDHEMOVIC et al., 2001; YAMASHITA et al., 1994).

Após longa discussão na literatura acerca do papel supressor ou promotor de tumor da sPLA₂ GIIA (CORMIER et al., 1999; McPHEE et al., 1995; PRAML et al., 1998; RIGGIN et al., 1995), estudos realizados com o procedimento de xenoenxerto subcutâneo apresentaram o crescimento tumoral, diferentemente do observado em células, onde esse grupo enzimático se comportou como supressor de tumor nos ensaios genéticos realizados.

Os tumores derivados de células transfectadas foram mais invasivos que seus controles, concluindo-se que o papel na promoção ou inibição do crescimento tumoral se daria dependendo das condições micro ambientais do tumor (BELINSKY et al., 2007).

Os outros grupos pertencentes à classe das PLA₂ secretadas quando expressos de forma anormal na tumorigênese ainda não foram investigados profundamente, embora haja sugestões de que essas enzimas desempenhem papéis importantes nesse cenário. Apesar do grupo X não estar alterado em câncer de cólon, por exemplo, (MOUNIER et al., 2008; OSTERSTROM et al., 2002), sua adição exógena estimula a proliferação das células (Cólon-26), através de um mecanismo que é dependente de sua atividade enzimática ao invés de ativação através de receptores de PLA₂ (SURREL et al., 2009).

As enzimas secretadas, particularmente a melhor estudada do GIIA, modulam a tumorigênese de um modo dependente do tecido e do contexto, sendo protumorigênicas em alguns tipos de tecidos e anti-tumorigênicas em outros (DONG et al., 2006).

O papel da PLA₂ GIIA em câncer apresenta importante paradigma, geralmente porque as consequências fenotípicas da expressão aberrante das enzimas PLA₂ provavelmente dependem do complemento dos mediadores lipídicos que são produzidos e que variam entre os tecidos. A natureza e as quantidades relativas destes lipídeos determinarão se os sinais proliferativos, antiproliferativos, apoptóticos ou de sobrevivência predominam. Então se o bloqueio das enzimas PLA₂ promove ou suprime o crescimento tumoral, haveria relação com a via de eicosanoides, que por sua vez, é influenciada pelo microambiente tecidual local (SCOTT et al., 2010).

1.2.1.2 *PLA₂ citosólica*

O primeiro grupo da PLA₂ citosólica, grupo IVA, foi identificado através de plaquetas humanas em 1986 (KRAMER, 1986) e foi clonada e sequenciada em 1991 (CLARK et al., 1991; KRAMER et al., 1991) e diferentes subgrupos da família IV tem sido descobertos desde então, assim como suas propriedades, sendo o grupo IVA o mais bem estudado biologicamente (GHOSH et al., 2006).

Este grupo é caracterizado por uma serina no sítio ativo em díade com ácido aspártico, necessita do íon Cálcio (Ca²⁺) para sua atividade e é a única PLA₂ com preferência pelo ácido araquidônico na posição sn-2 dos fofolipideos (CLARK et al., 1991; GHOSH et al., 2006). O grupo IVA da cPLA₂ também possui atividade de lisofosfolipase e também transacilase (REYNOLDS et al., 1993).

O ácido araquidônico é o precursor da síntese de eicosanoides e a cPLA₂ parece desempenhar um papel importante em doenças inflamatórias, é o que um estudo com ratos “*knockout*” para esta enzima confirmou, onde há ausência do gene cPLA₂ GIVA reduziu-se drasticamente os efeitos de muitas doenças inflamatórias (BONVENTRE et al., 1997; UOZUMI et al., 1997; UOZUMI; SHIMIZU, 2002), o que a faz ser considerada uma enzima chave, que medeia a geração de eicosanoides e, portanto, os processos inflamatórios (BURKE; DENNIS, 2009).

O domínio catalítico da enzima é composto por uma região de hidrolase de núcleo a / b conservada ao longo de muitas lipases diferentes, bem como uma nova região de cobertura (tampa) – que cobre o local ativo, encontrada apenas em GIVA PLA₂. Foi proposto que esta enzima deve sofrer uma alteração conformacional na presença de substrato que abre esta região, permitindo a ligação enzima-substrato. Estudo utilizando substrato lipídico e um inibidor covalente ligado no sítio ativo mostrou efetivamente uma alteração conformacional da região de cobertura na presença de substrato (BURKE et al., 2008).

A atividade da GIVA é fortemente regulada por fosforilação através de múltiplas vias de sinalização da proteína quinase. É regulada através do cálcio,

que promove a associação com a membrana e pela ligação a proteínas intracelulares tais como as anexinas (SCOTT et al., 2010).

O papel desta enzima associada ao câncer se deu por ela ser alvo para proteínas oncogênicas RAS (HEASLEY et al., 1997). Essas proteínas regulam positivamente a PLA₂ GIVA e a COX-2, resultando numa produção elevada de PGE₂ em linhagens celulares de câncer de pulmão para células não pequenas em relação a linhagens que não expressam proteínas RAS mutantes (MEYER et al., 2004; SCOTT et al., 2010).

A inibição farmacológica da síntese de eicosanoides nessas células suprime a proliferação ancoragem-independente, além disso, a transfecção de RAS constitutivamente ativa em células epiteliais de pulmão sadias resultou num aumento da expressão do GIVA e de COX-2. Já a supressão genica de GIVA resultou numa menor quantidade de tumores (43% menos) em comparação a linhagem selvagem de câncer de pulmão quimicamente induzido (MEYER et al., 2004).

Aparentemente o grupo IV da PLA₂ realmente desempenha um papel importante na promoção tumoral (SCOTT et al., 2010). Em contrapartida, a deleção deste grupo na carcinogênese de cólon quimicamente induzida, levou a um aumento de mais de cinco vezes no número de tumores (ILSLEY et al., 2005) ressaltando que o GIVA desempenha um papel protetor neste caso (SCOTT, 2010).

Das seis enzimas intracelulares dependentes de cálcio do Grupo IV (GHOSH et al., 2006), o GIVA foi estudado em tumores derivados de apenas alguns tipos de localização e as outras cinco enzimas permanecem sendo investigadas (WILKINS; BARBOUR, 2008).

O reconhecimento da importância da PLA₂GIVA nas doenças inflamatórias, assim como importantes descobertas estruturais, tornou-na um alvo de drogas muito atraente (BURKE; DENNIS, 2009).

Inibidores enzimáticos foram testados em modelo animal de inflamação e mostraram potencial na redução da mesma (MCKEW et al., 2008; YAKSH et al., 2006). Os potenciais efeitos colaterais dos inibidores foram observados num estudo de um paciente com defeitos do GIVA PLA₂, onde havia diminuição da atividade dessa enzima e problemas na biossíntese de eicosanoides, e

neste caso o paciente apresentava diversas úlceras no intestino delgado (ADLER et al., 2008).

Estudos em diferentes modelos tumorais sugerem a regulação tanto positiva quanto negativa desta enzima. Há variações nas expressões da enzima, onde a mesma pode ser bem expressa em câncer de próstata e baixa em câncer de cólon ou nenhuma alteração em câncer de próstata, por exemplo (KASHIWAGI et al., 1999; LAGORCE et al., 2004; MOUNIER et al., 2008; PANEL et al., 2006).

Um importante estudo, onde o silenciamento gênico (siRNA) do GIVA ocorreu, levou a um retardo no crescimento de células de câncer de próstata em cultura, redução da ciclina D1 e diminuição na expressão de Akt. O mesmo foi observado em modelo de xenoenxerto, onde o GIVA inibiu o crescimento tumoral deste mesmo tipo de câncer (PATEL et al., 2008).

1.2.1.3 *PLA₂ independente de Ca²⁺*

As PLA₂ independentes de cálcio são membros da família do Grupo VI de enzimas PLA₂. O primeiro membro desta família, o GVIA PLA₂ foi purificado a partir de macrófagos em 1994 (ACKERMANN; KEMPNER; DENNIS, 1994). Todas as enzimas GVI são caracterizadas por não exigirem Ca²⁺ para atividade catalítica. Muitos novos membros da GVI PLA₂ foram identificados nos últimos anos (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

Esta enzima, semelhante à GIV PLA₂, utiliza uma serina no sítio ativo para catalisar a clivagem da ligação éster sn-2; contudo, não apresenta especificidade para o ácido araquidônico na posição sn-2. A GVIA PLA₂ possui também uma atividade de lisofosfolipase, bem como a atividade da transacilase (BALBOA et al., 1997).

A atividade do GVIA PLA₂ pode ser regulada através de muitos mecanismos diferentes, incluindo ligação a ATP, clivagem de caspase, calmodulina e possível agregação de proteína mediada por repetição de anquirina (sequência repetida de 33 aminoácidos, descoberta na anquirina – família de proteínas associadas à membrana) (BURKE; DENNIS, 2008b).

Dois fatores principais permitiram a determinação das funções celulares do GVI PLA₂. Estudos com uma geração de ratos deficientes em GVIA PLA₂ demonstrou a importância desta enzima na formação óssea, apoptose, secreção de insulina e desenvolvimento de espermatozoides (BAO et al., 2004; BAO et al., 2006; BAO et al., 2007; RAMANADHAM et al., 2008).

A partir do desenvolvimento recente de inibidores específicos a base de fluorocetona, para GVIA PLA₂ (BASKAKIS et al., 2008) observou-se em modelos de camundongos que em combinação com GIVA PLA₂ desempenhava papel importante na degeneração Walleriana e na regeneração axonal em lesões nervosas. Trabalho utilizando oligodesoxirribonucleótido “anti-sense” para GVIA PLA₂ com monócitos mostrou diminuição no recrutamento de monócitos e em sua direcionalidade (MISHRA; CARNEVALE; CATHCART, 2008).

No contexto de análises de expressão em tecidos cancerígenos ou modelos “in vivo”, essa foi a classe menos estudada até então, porém em termos biológicos foi bem caracterizada e analisada (BALSINDE; BALBOA, 2005; WILKINS; BARBOUR, 2008).

Estas enzimas, especialmente o GVIA, devem ser consideradas especialmente por estarem envolvidas no desempenho de algumas funções celulares que são importantes no crescimento e progressão do câncer, como sinais antiproliferativos, apoptóticos e de sobrevivência da célula (SCOTT et al., 2010). Além disso, o GVIA PLA₂ é regulado por clivagem proteolítica mediada por caspase, resultando na ativação enzimática. Esta enzima está localizada em uma variedade de compartimentos celulares, particularmente na região perinuclear, membrana plasmática e no metabolismo da célula tumoral nas mitocôndrias (SCOTT et al., 2010).

Alguns dados sugerem que o GVI tem um papel na regulação do crescimento celular por modular vias de sinalização mitogênicas, sempre alteradas em caso de câncer, e que a inibição dessa enzima pode ser estratégia efetiva neste mecanismo frequente em populações de células cancerígenas (HOOKS; CUMMINGS, 2008; SUN et al., 2008).

Em contraste com o seu papel na proliferação, enzimas GVI também têm sido associadas em processos apoptóticos de células cancerosas, onde os

inibidores farmacológicos podem atuar, já que também afetam o funcionamento normal da célula (RAMANADHAM et al., 2004). Tanto que, estudos “in vitro” sugerem múltiplas vias envolvidas na regulação dos papéis do GVIA como pro-apoptótico e pro-sobrevivência (SCOTT et al., 2010).

Apesar de existirem 6 grupos descobertos da classe das enzimas independentes de cálcio, as formas de PLA_2 independentes de cálcio que foram investigadas em um pouco mais de profundidade foram o Grupo VIA, GVIB (i PLA_2 -b), enquanto as outras quatro enzimas (GVIC - GVIF) ainda não foram estudadas (WILKINS; BARBOUR, 2008).

O importante a destacar é que, embora existam crescentes evidências a partir de estudos de culturas de células “in vitro” que as enzimas do grupo VI são importantes em funções celulares que estão desreguladas em processos tumorais, justifica-se como promissora a continuidade de estudos em tecidos humanos onde se conheça melhor sua participação em vias metabólicas inflamatórias, e vista como alvo interessante na modulação dessas vias (SCOTT et al., 2010).

1.2.1.4 *Lp - PLA_2 ou PAF-AH*

Esta classe de PLA_2 é membro da família do grupo VII das enzimas fosfolipases. Foi nomeada dessa forma devido a capacidade de clivar grupos acetil na posição sn-2 de PAF, bem como, sua associação com as lipoproteínas (SIX; DENNIS, 2000).

Seu sítio ativo é composto da tríade, serina, histidina e ácido aspártico (TJOELKER et al., 1995) o que a difere das outras PLA_2 que tem díades em seu sítio catalítico. Esta enzima foi isolada e clonada, a partir de plasma humano em 1995, e demonstrou atividade anti-inflamatória in vivo (TJOELKER et al., 1995b).

Estudos originais levaram à hipótese de que esta enzima poderia desempenhar um papel protetor, interrompendo os papéis pró-inflamatórios do PAF; contudo, vários estudos clínicos dos níveis de GVIIA PLA_2 em doentes já estabeleceram esta enzima como um marcador definitivo de doença coronária (LAVI et al., 2008; LERMAN; MCCONNELL, 2008).

Um inibidor específico desta enzima foi desenvolvido em 2003 pela GlaxoSmithKline (BLACKIE et al., 2003), ensaios clínicos com este inibidor mostraram uma diminuição nas lesões ateroscleróticas complexas que levam a lesões instáveis, bem como outros marcadores de doença cardiovascular (MOHLER et al., 2008; SERRUYS et al., 2008; WILENSKY et al., 2008).

Enzimas GVII – PAF-AH estão super expressas em extratos de tecido tumoral em câncer de colón e pulmão em relação ao tecido normal, enquanto em câncer de tireoide, cérebro e fígado se encontram inalteradas (DENIZOT et al., 2005; DENIZOT et al., 2006; MATHONNET et al., 2006).

Num estudo de microarrays de cDNA de pacientes com carcinoma hepatocelular associado à hepatite C (n = 20), PLA₂G13 e PLA₂G7 foram regulados positivamente em 60 e 70% dos tumores em relação aos principais achados em fígados normais, sugerindo que PLA₂G13 pode ser um marcador sorológico potencial para este câncer (SMITH et al., 2003).

As possibilidades de novas descobertas com essas enzimas são muito motivadoras, o uso de modelos de cobaias *knockout*, juntamente com inibidores específicos dessas enzimas levaram a uma maior elucidação dos papéis das PLA₂s em processos celulares, juntamente com novas terapias potenciais (BURKE; DENNIS, 2009).

1.3 Gliomas

De acordo com projeções do INCA entre 2016 e 2017 para o Brasil espera-se pelo menos 600 mil novos casos de câncer, dentre esses 10.000 serão de Sistema Nervoso Central, apresentando-se entre os 10 mais frequentes.

Mundialmente representa cerca de 2% de todos os tumores malignos, sua maior incidência atualmente se encontra na Europa, porém importante crescimento tem sido observado em países em desenvolvimento. Grande parte dos tumores do SNC origina-se no cérebro, nervos cranianos e meninges. Os gliomas são o tipo histológico mais frequente e representam cerca de 40% a 60% de todos os tumores primários do SNC, sendo mais comum na faixa etária adulta.

Os meningiomas representam entre 20% e 35% dos casos; os schwannomas de 5% a 10%. Existem ainda tipos histológicos mais raros, como os adenomas pituitários, meduloblastomas e tumores da medula espinhal e nervos periféricos (INCA, 2017).

As diferentes células envolvidas nos tumores do SNC são células gliais, células neuronais e não neuronais e células de Schwann. As células da glia são responsáveis pela manutenção do Sistema Nervoso Central (SNC). Os tumores do SNC são conhecidos por seu alto poder devastador entre todos os outros cânceres, onde afetam as células cerebrais e medula espinhal, responsáveis pelo equilíbrio neurológico (CHEN et al., 2013).

Alguns fatores de risco são sugeridos na tumorigênese glial como exposição à radiação ionizante, infecção viral e interferências genéticas (TP53, PTEN, CDKN2A, EGFR, TSC, IDH e FGFR-TACC, etc.), alguns produtos químicos podem ser potencialmente perigosos: pesticidas, compostos policíclicos aromáticos e solventes. Campos eletromagnéticos e certos metais também são considerados como um fator de risco (SPINELLI et al., 2010).

Observou-se que a mutação de TP53 ocorre em astrocitoma, enquanto a amplificação de EGFR e a mutação de PTEN são as características distintivas de gliomas de alto grau (DUCRAY; MARIE; SANSON, 2009). O glioma é caracterizado por alto potencial proliferativo, crescimento infiltrativo, heterogeneidade intratumoral e recorrência tumoral (NUTT et al., 2001).

A localização e o tamanho dos tumores gliais contribuem para o monitoramento e implementação de um regime de tratamento adequado. A principal modalidade de tratamento para o glioma é cirúrgica, seguida por radiação e quimioterapia (RAJESH et al., 2017).

Estas estratégias são ineficientes em comparação as diversas vias de progressão do glioma. A ressecção cirúrgica é pouco eficaz, devido a característica infiltrativa dos tumores e morbidade aguda. A radioterapia é paliativa devido à toxicidade e resistência normais dos tecidos. Os oncologistas hesitam em retratar recidivas locais com radiação, assumindo perda no potencial de neuroregeneração. A quimioterapia é o padrão ouro de cuidados após a cirurgia, juntamente com a radioterapia (RAJESH et al., 2017).

De acordo com as características histopatológicas, três grupos principais definem a classificação de gliomas, onde o tipo de célula glial originaria o tumor; astrocitomas, proveniente de astrócitos; oligodendrogliomas, dos oligodendrócitos e ependimomas das células ependimais (GLADSON; PRAYSON; LIU, 2010).

Dentre estes, os astrocitomas tem papel de destaque entre os tumores primários do SNC, representando cerca de 70% dos tumores cerebrais e um quinto dos de medula espinal e são específicos das células gliais (OHGAKI; KLEIHUES, 2009). A classificação dos tumores do SNC está representada na Figura 5.

A OMS (Organização Mundial da Saúde), em sua primeira atualização referente a classificação de tumores do Sistema Nervoso Central, em 2016, trouxe esclarecimentos e confirmações a respeito do que já se discutia na clínica para os gliomas. Os astrocitomas apresentam quatro graus de malignidade associados com a atipia nuclear, mitose, hiperproliferação endotelial e necrose.

Figura 5 – Esquema representando a última classificação de tumores gliais da OMS (Inspirado em Louis et al., 2016).

Os gliomas são subclassificados em graus de I a IV, os de grau I apresentam baixo potencial proliferativo e há chances de cura; gliomas de grau II crescem lentamente, podendo não invadir o tecido cerebral adjacente; grau III são astrocitomas anaplásicos e já apresentam grande proliferação e capacidade de invasão ao tecido normal, também com alta taxa de recorrência; Os de grau IV (glioblastoma) são os mais agressivos e de maior malignidade, apresentam altas taxas de atividade mitótica, tendendo para necrose, além de possibilidade de infiltração e disseminação em outros pontos do SNC (LOUIS et al., 2016; PERSANO et al., 2013).

1.3.1 GBM

A primeira cirurgia em um paciente que apresentava este tipo de tumor ocorreu em Viena, 1904 e a partir deste evento o nome Glioblastoma Multiforme começou a ser utilizado (ŽUKIEL et al., 2004). O Glioblastoma Multiforme, ou hoje apenas Glioblastoma (GBM) se trata de neoplasia primária, proveniente de grupos geneticamente heterogêneos e fenotípicos de tumores (KARCHER et al., 2006; MOORE et al., 1996).

Noventa por cento dos casos de GBM ocorrem de forma primária, a partir de células gliais normais e seguindo diversas vias de tumorigênese. Apenas 10% dos casos ocorrem de forma secundária, desenvolvendo-se através da progressão de tumores de baixo grau (astrocitomas difusos ou anaplásicos) (KABAT et al., 2010; TSO et al., 2006).

Os Gliomas secundários apresentam melhor prognóstico e crescem de forma mais lenta. GBM se desenvolve em curto período de tempo (CVETKOIVČ-DOŽIČ et al., 2004). As vias genéticas e moleculares são diferentes nos dois tipos de tumores, embora não mostrem diferenças morfológicas significantes (KARCHER et al., 2006; KLEIHUES; OHGAKI, 1999).

A etiologia do GBM não foi totalmente elucidada. Acredita-se que o glioblastoma seja um tumor espontâneo. A forma hereditária deste tumor é descrita para 1% dos casos (SCHWARTZBAUM et al., 2006).

GBM também pode ocorrer em paralelo a outras doenças genéticas, como esclerose tuberosa (PADMALATHA et al., 1980), síndrome de Turcot (GRIPS et al., 2002), neoplasia endócrina múltipla (SANCHEZ-ORTIGA et al., 2009) entre outras. Pode ocorrer também pré-disposição em pessoas que tiveram lesões na cabeça, por contusão cerebral (MOORTHY; RAJSHEKHAR, 2004; ZHEN et al., 2010).

GBM é um tumor extremamente agressivo e clinicamente difícil de tratar (CHEN et al., 2012). A sobrevida de um paciente diagnosticado com a doença fica entre 12-15 meses (TANAKA et al., 2013). É necessária uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento de GBM ou que causam resistência às terapêuticas atuais para que se melhore o prognóstico desses pacientes (PEÑARANDA et al., 2016).

Fatores moleculares diversos já foram descritos, o ponto de controle de ciclo celular na fase G1/S é desregulado (LAM et al., 2000), amplificação de genes como EGFR, FGFR2, IRS2 e AKT3, além das mutações em PTEN, TP16, TP53, PARK2 e NF1 (NAYAK et al., 2004; Cancer Genome Atlas, 2008). A incidência de GBM também foi associada a elevados índices de IMC (Índice de Massa Corporal) (BENSON et al., 2008).

O Citomegalovírus humano (HCMV) é considerado também um agente etiológico relacionado ao GBM, esse vírus induz a encefalite congênita e alteração de diversos órgãos, além de possuir tropismo por células gliais e ativar genes relacionados a inflamação e processos celulares como mitose e apoptose, causando perturbações nas funções das células monocíticas e gliais (COBBS et al., 2002; COBBS, 2011).

Campos eletromagnéticos e participação de alguns metais podem estar envolvidos no desenvolvimento de glioma (SPINELLI et al., 2010). Acredita-se que o uso de um telefone celular não aumenta o risco de desenvolver GBM, mas o efeito do uso de longo prazo desses equipamentos ainda é indeterminado. Considera-se que as pessoas empregadas na indústria da borracha e da petroquímica correm maior risco de desenvolver a doença (WRENSCH et al., 2012).

Características como comportamento infiltrativo do tumor fazem com que a massa tumoral não seja facilmente distinguida do tecido normal (KARCHER

et al., 2006; ZHEN et al., 2010). Sintomas comumente relacionados aos tumores sejam eles localizados ou não em regiões subjacentes ao córtex, são dores de cabeça, convulsões, alterações neurológicas focais, pode ocorrer aumento da pressão intracraniana por edema perilesional e etc. (RAJESH et al., 2017).

Tem-se a hipótese de que o baixo potencial metastático do GBM resulta da barreira criada pelas meninges cerebrais, assim como pelo rápido crescimento tumoral e pelo curto curso desta doença (TYSNES; MAHESPARAN, 2001). Porém, mesmo raras, as metástases podem ocorrer e seguiriam pelo líquido cefalorraquidiano (BIRBILIS et al., 2010) ou sangue (LUN et al., 2011) e poderiam atingir baço, pleura, pulmões, gânglios linfáticos, fígado, ossos, pâncreas e intestino delgado (URBAŃSKA et al., 2014).

As características histopatológicas específicas do GBM de grau IV da OMS são mostradas na Figura 6. A localização e o tamanho dos tumores gliais determinam a apresentação clínica (RAJESH et al., 2017).

O GBM supratentorial em diferentes partes do cérebro é apresentado na Figura 6. Essa análise desempenha um papel primordial para monitoramento e implementação do tratamento mais adequado. As células do GBM são poligonais a fusiformes, com citoplasma acidófilo e bordas celulares indistintas. Seus núcleos são ovais ou alongados e possuem cromatina hipercromática aglutinada grosseiramente com nucléolos multiplicados distintos localizados centralmente ou peri-centralmente. As células do GBM têm uma razão núcleo citoplasma aumentada e apresentam pleomorfismo nuclear. Algumas células contêm inclusões intranucleares. Podem também estar presentes células binucleares e multinucleadas, bem como linfócitos, neutrófilos, macrófagos, e células necróticas (SCHULTZ et al., 2005).

Focos necróticos são característica marcante de GBM e ocorrem de duas formas, a primeira apresentando grandes regiões necróticas na área central do tumor, gerando insuficiência no fornecimento de sangue; a segunda é caracterizada por pequenas áreas irregulares orientadas radialmente pelas células gliais (KLEIHUES et al., 2000), que formam populações celulares conhecidas como pseudopaliçadas, representando células que proliferam

rapidamente e apresentam comportamentos resistente a apoptose (BRAT, et al., 2004).

O aumento da malignidade destes tumores é acompanhado por um aumento do grau de atipia, hipercromatose nuclear, aumento do índice mitótico, presença de necrose e áreas com vasos sanguíneos atípicos (BIERNAT, 1999), observamos essas características na figura 7 e 8.

Em GBM há alta expressão de VEGF, fator pró angiogênico correlacionado ao fenótipo maligno deste tipo de tumor (KAUR et al., 2004), assim como a expressão dos receptores são diretamente envolvidos na resposta angiogênica e encontram-se intimamente relacionados a presença das enzimas COX-2 e tumores malignos (PERDIKI et al., 2007).

A complexidade do GBM está diretamente relacionada a sobrevida do paciente e a capacidade de recidivas, que ocorrem em curto tempo de 6 a 12 meses, comparando-se a astrocitomas anaplásicos representa menos da metade do tempo e o crescimento ocorre em 80% dos casos, a partir da margem da lesão cirúrgica (NIEDER et al., 2001).

Figura 6 – Observação microscópica histopatológica de GBM – (HE 200 X). A- fotomicrografia mostrando atividade mitótica; B – Necrose paliçádica típica; C – GBM com proliferação endotelial; D – Celúlas tumorais gigantes multinucleadas; E –Atividade proliferativa (IHC 200x); F – Imunohistoquímica para p53 (UNICAMP, 2017).

Figura 7 – Microscopia ótica em HE aumento 200 x A- Mitose tetrapolar, porém as mitoses não necessariamente precisam ser atípicas; B - Os pseudoglomerulos são vasos tão proliferados que podem imitar glomerulos renais; C e D - As áreas de necrose na periferia em pseudopaliçada, arquitetura típica dos astrocitomas difusos de alto grau (UNICAMP, 2017 – disponível em <http://anatpat.unicamp.br/bineuastrocitomamicro.html#classif>)

Figura 8 – A – Localização supratentorial de GBM em lobo frontal (a-c), lobo temporal (d), lobo parietal (e) e região paraoccipital (f). B – Presença de GBM em região temporo-parietal (a), tálamo (b, c, d) e corpo caloso (e) (UNICAMP, 2017).

1.3.1.1 *Sintomas, Diagnóstico e Tratamento do GBM.*

Os sintomas dependem da evolução do tumor. De acordo com seu tamanho, a pressão intracraniana gerada pode levar a dores de cabeça, ataxia, tontura, distúrbios de visão e síncope frequente. Essa sintomatologia geralmente leva a diagnósticos imprecisos já que não são exclusivos da doença, sendo confundidos com quadros de infecções, inflamações, doenças circulatórias e etc. (LAKHAN; HARLE, 2009; LEVINE et al., 1987).

A ocorrência de convulsões em pessoas não epiléticas poderia ser indicação para exames de neuro-imagem que sugerissem a presença de GBM (SANLI et al., 2010).

O diagnóstico definitivo é feito através de exame histopatológico do tumor removido cirurgicamente (KATSETOS et al., 2009) ou, em caso de impossibilidade de ressecção cirúrgica, pode ser feita a biópsia por aspiração através de agulha fina (SCHULTZ et al., 2005). O diagnóstico morfológico se dá pelos critérios desenvolvidos pela OMS já descritos, conforme grau de malignidade e no caso do GBM, grau IV.

GBM é caracterizado por alta capacidade proliferativa, infiltrativa no tecido circundante e adjacente, sendo a ressecção incompleta por conta disso e a radioterapia nem sempre é eficiente (KARCHER et al., 2006), embora junto a um esquema quimioterápico sejam as únicas alternativas de tratamento (SIMPSON et al., 1993).

O esquema de tratamento padrão para glioma inclui temozolomida (KISLIN et al., 2009). Ao comparar os resultados da quimioterapia observa-se o maior tempo médio de sobrevida nos pacientes tratados com temozolomida, em comparação com outros quimioterápicos (HEGI, et al., 2005), e com a radioterapia associada à sobrevida é maior que apenas radioterapia isolada (KISLIN et al., 2009).

Outra via de tratamento seria através de anticorpo monoclonal que se liga seletivamente a VEGF, já que GBM é um tumor muito vascularizado, essa via é bloqueada pelo bevacizumab inibindo diretamente a angiogênese, diante disso, esse medicamento teve aprovação acelerada como único agente eficaz no GBM recorrente (CHAMBERLAIN, 2011; SPECENIER, 2012).

O que é possível perceber diante de todos os esforços para entendimento dos mecanismos biológicos e moleculares do comportamento de GBM, bem como as estratégias disponíveis para tratamento, é o lento avanço na melhoria da qualidade de vida dos pacientes. Há então uma urgência na busca de alternativas de tratamentos, maior entendimento através dos mecanismos alterados de funcionamento a nível celular (mitose, apoptose, proliferação, migração e angiogênese) e de quais caminhos seguir para que se melhore esse prognóstico tão negativo e definitivo relacionado à doença.

1.4 Uso de Compostos Metálicos e Câncer

Os metais desempenham papéis importantes nos meios biológicos, onde o Ferro que percorre todo nosso corpo ligado em nossas células sanguíneas tem destaque.

A medicina, por sua vez, utiliza metais há milênios. No Egito era comum o uso de cobre, por exemplo, para esterilizar a água. Além do uso de ouro, prata e platina que devido sua nobreza creditava-se a eles poderes benéficos para o corpo. Então, apenas nos últimos 100 anos estudos mais profundos desses materiais começaram a ganhar forma no campo medicinal. No contexto do câncer um composto com essas características se destacou na década de 70, onde tumores de testículos tratados com a cisplatina obtiveram cura em cerca de 80% dos casos deste tipo de tumor (EINHORN; WILLIAMS, 1979).

A história da cisplatina é um daqueles típicos casos onde o acaso trouxe grande importância à medicina oncológica. Em 1975 enquanto pesquisava o efeito de campos elétricos em crescimento bacteriano, Rosenberg et al., verificou que a replicação bacteriana estava sendo inibida através da corrente elétrica que era passada através dos eletrodos de platina. Mais tarde, verificou-se que essa inibição não se dava através do campo elétrico e sim dos vários compostos de platina formados no meio, a cisplatina, composto esse com maior ação antitumoral até então descoberto (WILLIAMS; WHITEHOUSE, 1979).

A partir desses resultados tão promissores diversos estudos foram se desenvolvendo em torno das metalodrogas, em diversas conformações,

modificações estruturais de moléculas e tantas possibilidades quanto pudesse ser imaginada foram sendo exploradas. A possibilidade de novos agentes terapêuticos, avanços nos estudos da farmacologia, mecanismos de ação e melhora de atividade de antigos e novos fármacos foram tomando cenário (AQUINO, 1998).

A grande motivação na busca de novas drogas é a diminuição da toxicidade às células saudáveis, pois apesar do número expressivo na remissão de alguns tipos de câncer com a cisplatina, a mesma debilita muito o paciente e seu uso prolongado se torna demasiado tóxico. Além disso, não é eficaz em diversos tipos de câncer.

Neste cenário, surgem as pesquisas relacionadas ao Rutênio, um metal que apresenta importantes características de afinidade ao meio biológico e que foram testados em linhagens tumorais, demonstrando menor ocorrência de efeitos colaterais e menos graves em comparação aos fármacos de platina.

1.4.1 Compostos de Rutênio

Os compostos de Rutênio apresentam uma propriedade química importante que é a sua conformação octaédrica, o que lhe permite maior número de ligações possíveis para que sejam exploradas em relação à Platina que por sua vez, possui geometria planar quadrada. Características como alta taxa metabólica e afinidade com oxigênio molecular, permitem que os complexos sejam administrados no estado de oxidação III (considerado relativamente inerte), causando danos mínimos às células saudáveis, e em células tumorais sendo reduzido ao estado de oxidação II (ativo) (SCHLUGA et al., 2006).

Por enquanto, essa teoria ainda é bem questionada e os processos para entendimento de como os complexos de Rutênio são incorporados são objetos de debate na literatura (LEI HE et al., 2016).

O Rutênio é um metal de transição da mesma família do Ferro. O Ferro apesar de sua reatividade e toxicidade biológica, é um elemento-chave sem o qual a maioria das células não poderia sobreviver. A natureza desenvolveu mecanismos consideráveis para sequestrar, transportar e fazer uso de ferro.

Devido a essa familiaridade entre Rutênio e Ferro, acredita-se que em alguns casos o Rutênio poderia tomar o lugar do Ferro, especialmente nas proteínas Chaperonas onde ocorreria a interação com a transferrina (VINCENT; LOVE, 2011).

Porém, alguns pesquisadores são céticos quanto a essa teoria e não acreditam que essas semelhanças seriam suficientes para este intercâmbio, já que a ligação do Rutênio seria menos fácil e lenta que do Ferro. Além disso, a natureza definiu esses sítios de ligação do Ferro de forma muito específica, com altíssima afinidade e constantes de ligação, onde talvez o rutênio não tivesse possibilidade de interação (PAGE et al., 2009).

Alguns compostos de Rutênio já foram submetidos à avaliação clínica e dentre todos, dois compostos tiveram melhor ação contra o câncer e foram o Nami-A (trans-imidazoldimetilsulfoxidotetraclororutetano) que demonstrou efetividade em inibir metástases de pulmão (SAVA et al., 1999) e KP-1019 (imidazolio bis-indazoltetraclororutetano) que apresentou atividade promissora em tumores colorretais (HARTINGER et al., 2006) (Figura 09).

Figura 09 – Estruturas químicas à esquerda – NAMI-A, e à direita KP1019 – Os primeiros compostos Rutênicos que entraram em estudos de fase clínica para uso em câncer.

Em estudo com oito complexos de Rutênio diferentes, nomeados de D1 a D8 foi possível observar após 72 horas de incubação que todos os compostos foram capazes de reduzir a viabilidade celular, além de influenciar no ciclo celular e proliferação, já os compostos D3 e D7 estabilizaram o ciclo celular (BERGAMO et al., 2003).

Diante das mais variadas possibilidades conformacionais das moléculas de Rutênio, de mecanismos de ação ainda não bem definidos, especificidade ao alvo, relação estrutura-atividade ainda em estudos, sabendo-se que o composto tem atividade antitumoral, o maior desafio proposto é buscar uma molécula que realmente fará a diferença e se mostrará efetiva para o objetivo de tratamento adjuvante ao câncer.

Em colaboração à Professora Denise Oliveira do Instituto de Química, desenvolvemos os ensaios com os complexos de Rutênio fornecidos por seu laboratório. Ela e sua equipe desenvolveram a molécula do Rutênio com a estrutura “em gaiola”, permitindo que quatro ligantes de anti-inflamatórios estivessem associados a essa estrutura, além de dois ligantes axiais que podem auxiliar na solubilidade da molécula conforme figura abaixo (10).

Figura 10 – Estrutura do complexo dirrutênico em formato de gaiola, permitindo que haja 2 ligantes axiais (L_{ax} = Cl; PF_6 e OTF), onde R = local onde se liga a molécula do AINE (Ibuprofeno ou Cetoprofeno) – (HANIF et al, 2016).

Com o objetivo de sintetizar novos fármacos, testar sua atividade biológica, além de explorar a relação câncer inflamação, o grupo verificou a interação desse tipo de estrutura em associação aos anti-inflamatórios não esteroides (AINES), onde diferentes fármacos dessa classe já foram associados aos complexos rutênicos (RIBEIRO et al, 2008).

Como ligantes, os AINEs apresentam grupamento carboxílico (Figura 11), que por sua vez estabilizam esse tipo de estrutura “em gaiola”, onde quatro carboxilatos equatoriais se ligam em ponte a dois íons metálicos de rutênio (COTTON; PEDERSEN, 1975).

Figura 11 – Estrutura dos AINEs utilizados como ligantes perpendiculares na estrutura em “gaiola” do complexo de rutênio, cetoprofeno (A) e Ibuprofeno (B).

Quando o grupo iniciou os estudos com esses complexos, a molécula $[\text{Ru}(\text{IBP})_4\text{Cl}]$ demonstrou ter atividade anti-inflamatória semelhante ao fármaco Ibuprofeno (HIBP), porém sem o efeito colateral provocado na mucosa gástrica (RIBEIRO et al., 2008). Estudo *in vitro* em linhagens celulares C6 (glioma de ratos) foi avaliada a ação dos complexos referente a proliferação dessas células e verificou-se que as moléculas $[\text{Ru}_2(\text{IBP})_4\text{Cl}]$ e $[\text{Ru}_2(\text{NPX})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$ foram capazes de inibir essa proliferação com maior eficiência que os respectivos fármacos livres (RIBEIRO, 2006).

Algumas alterações na molécula para ampliar os estudos foram feitas visando investigar a influência das mudanças estruturais na resposta biológica do complexo metálico. A posição axial na unidade estruturada “em gaiola” $[\text{Ru}_2(\text{lbp})_4]$ foi modificada com a substituição do anion, trocando o cloreto original (Cl^-) pelo triflato (OTf , CF_3SO_3^-) ou o hexafluorofosfato (PF_6^-). O complexo $\text{Ru}(\text{lbp})\text{Cl}$ foi re-preparado de forma que dois novos complexos $\text{Ru}(\text{lbp})$, axialmente substituídos foram sintetizados e totalmente caracterizados (HANIF et al., 2016). Neste trabalho, nos referiremos aos complexos como: $\text{Ru}(\text{lbp})\text{Cl}$, $\text{Ru}(\text{OTf})$, $\text{Ru}(\text{PF}_6)$ e $\text{Ru}(\text{Ceto})$ para facilitar o entendimento.

As diversas reações bioquímicas que ocorrem ou podem ocorrer com um fármaco devem ser levadas em consideração quando uma nova droga está sendo estudada, além disso, os conhecimentos de características do microambiente tumoral também são importantes para que se possam prever esses tipos de reações, como hidrólise, óxido-redução, substituição e etc. No caso dos complexos metálicos, as biomoléculas podem alterar ou interagir de variadas formas, alterando estrutural, química e funcionalmente essa molécula.

Diante do cenário atual e as estimativas de aumento na população de tumores do SNC, especialmente GBM, do qual apresenta um dos piores prognósticos. Observando a histórica relação câncer e inflamação e o papel das COXs comprovadamente impactantes na tumorigênese, com o destaque das PLA₂ de forma igualmente importante nos mecanismos tumorais e diante da necessidade de maior aprofundamento e investigação de todas essas relações que se permeiam houve o desenvolvimento desse trabalho.

A possibilidade de comparar novos compostos metálicos de Rutênio nos motivou já que alguns complexos com estruturas diferentes, mas com o mesmo metal em seu núcleo demonstraram na clínica menor toxicidade e menor incidência de reações adversas em relação aos complexos metálicos de platina.

Cremos na contribuição que esse trabalho possibilitou através de uma avaliação “*in vitro*” do comportamento celular como proliferação, apoptose, mitose, etc., em linhagens celulares de GBM U87MG e A172.

As enzimas presentes e influentes na cascata de inflamação foram afetadas com o tratamento, sugerindo que estes complexos estudados merecem maiores investigações diante dos resultados apresentados e de sua ação tanto na relação câncer e inflamação, além de mecanismos celulares coordenados por sinalizações genicas como mitose e apoptose.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi contribuir para o avanço dos conhecimentos relacionados ao GBM, inflamação e o uso de complexos metálicos como uma promessa para possibilidades futuras no tratamento nesse tipo de câncer.

Observar o funcionamento dos mecanismos celulares e suas alterações, comportamento celular, e forma de atuação dos tratamentos com complexos de rutênio permeando alguns pontos específicos, como:

- Avaliar os efeitos dos complexos de Rutênio associados à anti-inflamatórios em mecanismos celulares em linhagens celulares de GBM (U87MG e A172);
- Verificar a ocorrência da incorporação do complexo metálico pelas células.
- Verificar a expressão gênica e a atividade das PLA₂ diante dos tratamentos com os compostos;
- Influência desses complexos em componentes da inflamação, como as COXs.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura Celular

Foram realizados os cultivos celulares das seguintes linhagens de glioma humano disponíveis em laboratório: U251MG, U87MG, U138MG, T98G e A172. Essas linhagens foram gentilmente cedidas ao laboratório. U251 pela Profa. Dra. Eugenia Costanzi-Strauss, originalmente da ATCC; U87MG e U138MG Prof. Dr Carlos Frederico Martins Menck do ICB e T98G e A172 da Profa. Dra Silvy Stuchi Maria-Engler da FCF, USP.

As células foram mantidas em meio Dulbecco's (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 50 U/ml, estreptomicina 50 µg/ml). Os frascos foram mantidos em estufa de incubação com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar a 37 °C. Até atingirem a fase exponencial de crescimento.

Após atingirem 80% de sua confluência, as células foram enzimaticamente desagregadas dos frascos com solução de tripsina/EDTA (0,1% de tripsina e 1 mM de EDTA) centrifugadas e ressuspensas em DMEM com 10% SFB para novo plaqueamento e quando em quantidade satisfatória foi confeccionado um estoque, com essas linhagens, congeladas em alíquotas contendo 10% de SFB e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) e mantidas em nitrogênio líquido para posterior utilização nos experimentos pertinentes ao trabalho.

3.2 RT-PCR

3.2.1 Extração e Quantificação de RNAm presentes nas linhagens.

As células foram coletadas, lisadas com 1 mL de Trizol® (Invitrogen, CA – EUA) e mantidas em gelo, para a homogeneização foi submetida ao equipamento Politron PT – 3100 (Kinematica Dispersing and Mixing Technology, Luzern - Suíça) e foram mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio, e centrifugadas a 10600 rpm por 15 minutos a 4 °C de temperatura. A fase aquosa, o sobrenadante transparente, foi retirada e transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 500 µL de isopropanol gelado para que ocorresse a precipitação do

RNA, as amostras foram centrifugadas a 10600 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% livre de RNase, e centrifugado a 7500 RPM por 5 minutos a 4 °C. Essa etapa de lavagem foi realizada duas vezes. Por fim, o sobrenadante foi removido, o precipitado de RNA foi ressuspensionado em 50 µL de água DEPC (dimetil pirocarbonato).

A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio, visualizado no equipamento de imagens quimioluminescente Gbox conforme as bandas apresentadas abaixo.

Fig. 12 – Gel agarose mRNA das 5 linhagens demonstrando a integridade do RNA e confirmando o processo de extração.

A quantificação é realizada através de espectrofotômetro (EPOCH - Microplate Espectofotometer – Biotec), onde o resultado é obtido através do cálculo de absorbância e transmitido por software de computador através da relação A260 nm/A280 nm de absorbância, com pureza $\geq 2,0$. O RNA foi mantido a -80°C, os resultados obtidos podem ser visualizados na tabela 1, em resultados.

3.2.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Esta etapa é muito importante para iniciar a técnica de RT-PCR, pois através do cDNA poderemos identificar a presença do substrato de interesse através do uso de primers.

A síntese de cDNA (DNA complementar) foi realizada com a ação da enzima M-MLV Reverse Transcriptase, de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada amostra utilizou-se 1 µg (linhagens celulares), 2 µL de Random Primer, 2 µL de desoxirribonucleotídeos (dNTPs) e 12 µL de água milli-

Q autoclavada. O protocolo de amplificação do DNA foi pré-determinado, onde as amostras foram incubadas no termociclador a 65 °C por 2 minutos e imediatamente transferidas para o gelo por 2 minutos. Após esta etapa, foram adicionados as amostras 4 µL de tampão RT buffer 5 x, 2 µL de DTT e 1 µL de RNase OUT e incubadas no termociclador a 37 °C por 2 minutos. Em seguida, foi adicionada as amostras 1 µL de M-MLV e incubadas no termociclador a 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 50 minutos e 70 °C por 10 minutos.

A amplificação foi confirmada através de eletroforese em gel a 1% de agarose, brometo de etídio, revelado por equipamento Gbox, através de captura por ultravioleta (UV), apresentado na figura 13.

Figura 13 – Visualização cDNA em gel de Agarose, para confirmação do processo de amplificação e integridade do cDNA. Cada coluna corresponde a (L) Ladder, U251, U87MG, A172, U138MG, T98G

3.2.3 Análise da expressão gênica das PLA₂ (RT-PCR – Teste de Temperatura)

Os primers utilizados para a reação de PCR seguem na tabela 2, e foram desenhados com base em sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e com o auxílio do programa PerlPrimer (Marshall, 2004). Para garantir a eficiência e especificidade dos primers alguns critérios foram adotados como: quantidade de CG entre 30 e 80%, amplificação de fragmentos com tamanho entre 50-150 pb, temperatura de anelamento entre 58 °C e 60 °C e incapacidade de formação de dímeros ou estruturas secundárias.

O programa Primer Express 3.0 foi utilizado para verificar a temperatura de anelamento, presença de estruturas secundárias e proporção CG.

Os primers desenhados foram checados quanto a sua especificidade pelo programa pelo BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Os primers utilizados foram sintetizados pela Invitrogen e constam na tabela 2

Para determinar a melhor temperatura de anelamento, a metodologia aplicada foi com o uso de Platinum *Taq* DNA Polimerase, e foi feita através de uma reação de PCR convencional. Então, o protocolo utilizado foi 0,5 µl de dNTP, 0,75 µl MgCl₂, 2,5 µl PCR buffer, 0,25 µl Platinum *Taq* DNA, 1 µl de *sense*, 1 µl de *anti sense*, 1 µl de cDNA e o restante de H2O milli-Q autoclavada para um volume final da reação de 12 µl, feitos inicialmente na linhagem U251.

A padronização dos primers é processo de grande importância para assegurar a confiabilidade e controle dos resultados. De início realizou-se teste de temperatura para todos os primers definidos de PLA₂, e o uso de genes controle como GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e 18s, submetidos a sete diferentes temperaturas (52,5 °C, 54,2 °C, 56,5 °C, 59,1 °C, 61,8 °C, 64,5 °C, 67 °C).

O PCR foi realizado permitindo definir qual das temperaturas apresentou melhor anelamento para uso nas demais reações de PCR, conforme descrito na tabela 2. Após a finalização da reação de RT-PCR para teste de temperatura, as amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% e reveladas no aparelho G-Box (Ultravioleta), conforme apresentados nos resultados (4.1).

3.2.4 Análises RT- PCR – demais linhagens

Após a confirmação da temperatura de anelamento, conforme especificada na tabela 1, os primers foram testados nas demais linhagens.

O protocolo foi aplicado e padronizado para cada gene de interesse e seguiu uma ordem pré-configurada no aparelho, onde utilizou-se 94 °C por 1 minuto, liberando a *Taq* de seu anticorpo, entrando no ciclo 1, onde atinge a temperatura de anelamento do *primer* testado. Foram realizados 44 ciclos que foi

necessário para a amplificação, confirmadas através da eletroforese em gel de agarose reveladas em Gbox (Ultravioleta).

A partir desse ensaio foi possível verificar quais primers e quais linhagens apresentaram resultado mais promissor para a continuidade dos experimentos.

3.2.5 Análise da expressão gênica através de RT – qPCR - tempo real.

Para esta técnica foi necessária a padronização da quantidade adequada de cDNA, determinando através de diluições seriadas, diferentes concentrações de cDNA. Essas concentrações para realização dos testes foram: 25.000 pg/μL, 12.500 pg/μL, 6.250 pg/μL, 3.125 pg/μL, 1.265,5 pg/μL e 781,5 pg/μL. Foram utilizadas as mesmas sequências de oligonucleotídeos descritas na tabela 2.

Desenhou-se então uma curva padrão, obtendo-se a melhor concentração de cDNA para se utilizar nos experimentos realizados.

Para os *primers* também foi necessário avaliar a melhor concentração, o que levou à utilização de três concentrações diferentes, sendo 200 nm, 400 nm e 800 nm, também se desenhando uma curva de concentração de *primers* para cada um, visando uma melhor eficiência da reação (Tabela 3).

As reações foram preparadas com um volume final de 12 μL para cada concentração, contendo: 6 μL de Syber Green®, 3 μL de cDNA, 3 μL mistura de *primer* (*sense e antisense*).

As amplificações foram realizadas através do aparelho 7300 REAL TIME PCR system® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando-se o seguinte programa: 50 °C por 2 minutos (incubação), 95 °C por 10 minutos (ativação), 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação do cDNA) e temperatura específica de cada oligonucleotídeos por 1 minuto (anelamento dos primers). Os controles negativos das reações foram feitos substituindo o cDNA por água Milli-Q autoclavada (NTC - No Template Control).

Além das curvas de amplificação, foram realizadas também curvas de dissociação para verificar a especificidade da amplificação (Figura 33-A/B). Para a escolha da concentração mais adequada, foi utilizado o critério de menor

variação entre as duplicatas, confirmando a ausência de dímeros dos *primers* ou qualquer outro produto inespecífico, confirmando a confiabilidade dos resultados. Para todas as concentrações foram realizadas triplicatas biológicas em duplicatas experimentais.

Para avaliar a expressão diferencial dos grupos tratados utilizou-se o método de quantificação relativa. O gene 18s, que codifica uma proteína ribossomal, foi utilizado como normalizador (controle endógeno) nas reações para análise de RNAm. O cálculo da expressão relativa entre as amostras foi realizado de acordo com a fórmula descrita por Pfaffl (2001), que utiliza os valores das eficiências dos primers para o cálculo das quantificações relativas. A expressão relativa do gene alvo foi calculada baseando-se na eficiência de amplificação e no ciclo do PCR onde foi detectado o aumento da fluorescência acima do sinal basal (Ct).

3.3 Tratamentos complexos de Rutênio em cultivo celular

Para iniciar os tratamentos com os compostos de Rutênio propostos para este trabalho, foram necessários os cultivos celulares das linhagens U87MG e A172, linhagens escolhidas após os resultados da padronização e que apresentaram melhores respostas para análise das expressões gênicas.

As células foram mantidas em meio Dulbecco's (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico (penicilina 50 U/ml, estreptomicina 50 µg/ml). Os frascos foram mantidos em estufa de incubação com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar à 37 °C.

As células foram plaqueadas em placas com 24 poços nas seguintes quantidades: Para a linhagem A172 eram plaqueadas 10×10^4 / mL (Cada poço era preenchido com 500 µL totalizando 5×10^4 por poço) e para a linhagem U87MG 6×10^4 / mL (Cada poço foi preenchido com 500 µL totalizando 3×10^4 por poço). Após 12 horas essas células eram então submetidas aos tratamentos em triplicatas para cada experimento e depois repetiu-se cada uma das linhagens com cada um dos tratamentos (aqui denominados RuIbpCl; RuIbpOTf; RuIbpPF₆ e RuCetoCl) nas concentrações testadas para a padronização do experimento - conforme segue.

Solução de Estoque: 10 mM. Diluições para testes nas células: 200 μ M, 150 μ M, 100 μ M, 75 μ M, 50 μ M, 25 μ M, Etanol (Controle). A solução de estoque é preparada no primeiro dia de tratamento e diluída em Etanol. O controle foi em Etanol 1%.

Cada tratamento em cada concentração foi realizado em triplicata, e os tempos determinados de tratamento foram de 24, 48 e 72 horas, onde as células finalmente eram coletadas para análise e contagem na câmara de Neubauer.

O Experimento foi definido para N=3

A cada 24 horas, uma placa era coletada com a retirada do meio de cultura e lavada com 2 mL de solução salina (PBS) por poço e em seguida submetidas a 500 μ L de solução a 10% de tripsina para que houvesse o desprendimento das células da placa, encubadas por 3 minutos em estufa nas condições anteriormente descritas e neutralizadas com 500 μ L de meio de cultura nas especificações já mencionadas, essa mistura foi então centrifugada em 1500 rpm por 2 minutos, formando um *pellet* de células, o qual foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura, posteriormente 10 μ L dessa solução era aplicada de cada lado da câmara de Neubauer, então procedendo uma contagem.

As outras placas que ainda permaneciam em cultura (de 48 e de 72 horas) tinham seus meios de cultura com tratamentos retirados e novo tratamento reaplicado, esse procedimento se repetia a cada 24 horas, conforme esquema apresentado na figura 14.

Figura 14 - Esquema representativo referente ao plaqueamento dos tratamentos descritos nos métodos, onde AINE pode ser ibuprofeno ou cetoprofeno e Ligante refere-se aos ligantes axiais Cloreto (Cl); OTf (Trifletto) ou PF_6 ligante aniônico que em meio aquoso dá lugar a moléculas de H_2O).

Durante o tratamento aspectos como morfologia, aparência do meio de cultura e crescimento das células foram observados (Figura 15).

Figura 15 - Imagens das linhagens A172 (cima) e U87MG (baixo) em cultura celular, no tratamento de 72 horas na concentração de 200 μM onde é possível comparar a diferença no aspecto do meio e morfologia das células entre os tratamentos e o controle.

3.3.1 Tratamento de células para ensaio em RT PCR – RuIBpCl

Plaqueamento – Preparação de amostra – PCR – Análise Image J.

Para o ensaio da Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) a quantidade de material necessário foi maior, foi necessário calcular a quantidade equivalente para o plaqueamento das células, levando em consideração a área da placa e a quantidade de meio em que as células seriam diluídas.

As células da linhagem U87MG foram plaqueadas em duplicata para o controle Etanol e para o tratamento RuIBpCl em garrafas de 25 mL, sendo plaqueadas proporcionalmente 6×10^4 células/mL para U87MG e 10×10^4 para A172. O tratamento foi na dosagem total de 200 μ M com a duração 72 horas para a coleta. Esse ensaio foi feito em duplicatas de controle e tratado, N=3.

Após a coleta, procedemos com a extração do RNAm e a síntese de cDNA conforme protocolo já descrito, seguindo os mesmos parâmetros, assim como a análise da amplificação da amostra em PCR convencional. As análises foram iniciadas em qRT-PCR, porém por conta de dificuldades técnicas e impossibilidade de uso do equipamento, não foi possível finalizar as análises na técnica quantitativa, optando por finalizar em PCR convencional.

Análises semi-quantitativas foram empregadas através de software específico para análise de imagens “Image J”, onde as bandas reveladas em gel de agarose 1% (protocolo já descrito) foram avaliadas quanto a sua intensidade em pixels e calculadas através da área da curva delimitada pelo software.

O objetivo desses ensaios com as células tratadas foi avaliar como a expressão de PLA₂ e COX 1 e 2 estariam afetadas após o tratamento com RuIBpCl. O Experimento foi definido para N=3

3.4 Ensaio Apoptose / Mitose

Neste ensaio, as células foram tratadas exatamente da mesma forma descrita para a padronização de dosagem/tempo, item 3.3.

Porém, no fundo da placa foram colocadas lamínulas de vidro para que fosse permitida sua retirada para a montagem das lâminas e sua análise em microscópio.

No final de 72h, a placa contendo os tratamentos, foram lavadas com PBS (solução salina) por 3 vezes, e em seguida fixadas *in situ* com paraformaldeído 4% - Nesta etapa, a placa pode ficar guardada em geladeira comum (- 8°C) até que seja corada para análise.

Preparo de lâminas e coloração:

Depois de fixadas as células, cada poço foi lavado com PBS para que pudesse receber a coloração de Hoechst 33342 – 1 mL e incubadas por 10 minutos ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. O corante foi retirado e a placa foi lavada mais uma vez com PBS para que fossem eliminados quaisquer resíduos ali presentes.

Então, as lamínulas foram retiradas dos pocinhos das placas para que fossem confeccionadas as lâminas.

A partir da lâmina pronta, estas foram submetidas à visualização em microscópio de fluorescência, Nikon Optiphot-II – acoplado em câmera Cool Snap Pro e Software Image Pro Plus, onde foram tiradas em média 12 fotos de campos aleatórios por lamínula e contadas a partir dos critérios da morfologia nuclear das células.

O índice apoptótico – Determinado através do número de células com cromatina nuclear condensada, geralmente próxima a periferia da célula e núcleo fragmentado.

O índice mitótico – Determinado através do número de células que se apresentam dentro das características morfológicas de divisão celular.

Foram realizados 3 experimentos, cada um em triplicata.

O ensaio para análise de índice apoptótico / mitótico foi realizado através da observação da atividade do núcleo através de coloração de Hoechst e visualização de sua fluorescência através da luz ultravioleta (U.V).

3.5 Análises em ICP/OES – Padronização e ensaio biológico

Técnica Espectroscópica que possui alta energia de ionização que funciona através de plasma indutivo, obtendo-se átomos livres, especialmente utilizadas para análise de metais.

Para adequação das análises foi necessário construir uma curva de calibração, onde os pontos da curva pudessem representar o mínimo possível de detecção para analisar nossas amostras (Figura 17).

O experimento foi feito em duplicata para cada tratamento e para cada uma das linhagens, com intuito de observar se ocorria a entrada dos complexos de Rutênio nas células. O cultivo celular foi feito exatamente da mesma forma que na padronização dos tratamentos (3.3), a coleta foi feita através de tripsinização das células, coleta dos pellets, esses pellets foram centrifugados a 10.000 rpm para a total separação do líquido e lavados por pelo menos três vezes com solução salina PBS, para que interferentes de fora da membrana não alterem a análise do aparelho, os pellets foram mantidos nos frascos e virados para um papel toalha para que o líquido fosse drenado, aproximadamente 15 minutos (Figura 16).

Figura 16 – Etapa final, secagem dos pellets para análise em ICP-OES. Importante observar a coloração que se apresentam as células após lavagem com PBS e centrifugadas, destacando a cor do metal (Rutênio).

Figura 17 – Curva de calibração. Equipamento utilizado: Espectrômetro Ótico de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES, Radial) da marca Spectro, modelo Arcos, pertencente à Central Analítica do Instituto de Química da USP – Pontos da curva: 0 ppm; 0,1 ppm; 0,2 ppm; 0,5 ppm; 1 ppm; 2 ppm.

Para a leitura no equipamento, ocorre uma digestão da amostra, realizada com 1 mL de HNO_3 concentrado e 10 gotas de HCl concentrado, aquecimento a 100 °C em frascos fechados em bloco digestor. Volume final = 10 mL [1% = 10.000 ppm (mg/kg ou mg/L)].

Equipamento utilizado: Espectrômetro Ótico de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES, Radial) da marca Spectro, modelo Arcos.

Tabela 1 - Especificações referente aos parâmetros de leitura do equipamento ICP-OES

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
Potência aplicada	1400 W	Vazão do gás de nebulização	0,85 L min ⁻¹
Radiofrequência do gerador de RF	27,12 MHz	Vazão de introdução de amostra	0,85 L min ⁻¹
Vazão do gás do plasma	12 L min ⁻¹	Velocidade da bomba	30 rpm
Vazão do gás auxiliar	1 L min ⁻¹	Nebulizador	crossflow

3.6 Análises em Microscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica fotônica de alta resolução que pode proporcionar, em poucos segundos, informação química e estrutural de quase qualquer material, composto orgânico ou inorgânico permitindo assim sua identificação. Sua análise se baseia na luz, monocromática, colimada, coerente e de determinada frequência, espalhada ao incidir sobre o material a ser estudado, cuja maior parte da luz espalhada também apresenta a mesma frequência daquela incidente. Somente uma pequena porção da luz é espalhada inelasticamente frente às rápidas mudanças de frequência, devido à interação da luz com a matéria, e é uma característica intrínseca do material analisado e independe da frequência da luz incidente.

Esta técnica é aplicada diretamente sobre a amostra em questão, não sendo necessário fazer uma preparação especial no material. Além do mais, não há alteração na superfície que se faz a análise.

O experimento foi feito em triplicata para o tratamento RuIBPCI, na linhagem U87MG, com intuito de observar a presença dos complexos de Rutênio nas células. O cultivo celular foi feito exatamente da mesma forma que na padronização (item 3.3), a coleta foi feita através de tripsinização das células, coleta dos pellets, esses pellets são centrifugados a 10.000 rpm para a total separação do líquido e lavado por pelo menos três vezes com solução salina PBS, para que interferentes de fora da membrana não alterem a análise no equipamento.

Os espectros Raman foram obtidos utilizando microscópio confocal de Raman a partir do modelo Renishaw inVia equipado com objetiva de 50x (NA = 0,75), uma objetiva 100 X (NA = 0,85) e laser com 632,8 nm (fonte de He-Ne Renishaw RL633) para excitação. Os espectros foram obtidos na gama espectral de 150-3150 cm^{-1} , com tempo de acumulação de 60s e uma potência de laser de 2,5 mW.

A análise do complexo RuIbpCI foi obtida dispersando os complexos de sal de KCl, na proporção 1:5 (m / m, complexo: sal), a fim de evitar a decomposição fototérmica pela exposição a laser. As células U87MG foram analisadas pela deposição do sedimento celular em um substrato de alumínio.

3.7 Análise em ICP/OES e Microscopia Raman das Frações Celulares – núcleo/ citosol.

Para realização dos experimentos foi necessário fazer o isolamento do núcleo, através do seguinte protocolo:

A partir de células U87MG cultivadas em monocamada, tratadas com RulbpCl, HIBp e Controle Etanol.

O Ibuprofeno ácido (HIBp) foi utilizado nos tratamentos para que pudéssemos comparar se haveria interferência apenas do anti-inflamatório nos resultados.

As células foram lavadas com PBS gelado com ajuste do pH 7.4 e coletadas com “scraper” em tubo de 1,5 mL - em 1 mL de PBS; Centrifugadas por 10 segundos; Remoção do sobrenadante de cada amostra e ressuspensão em 900 µL de NP40 – 0,1% (em PBS ele é diluído); Triturar 5 x usando micropipeta de 1 mL; Retirar 300 µL **do lisado** de células inteiras; Os 600 µL restantes foram centrifugados por 10 segundos; 300 µL foram retirados do sobrenadante e denominados **fração citosólica**; Removido o restante do sobrenadante, adicionou-se 1 mL de NP40 – 0,1% gelado; Centrifugação por 10s; Descartou-se o sobrenadante; O que ficou no frasco foi a **fração nuclear**.

Para que fosse possível identificar os locais de concentração do Rutênio, foram analisadas pela técnica não apenas a fração nuclear, como também o citosol e o lisado de células.

Em seguida as amostras foram direcionadas para as diferentes análises, seguindo os protocolos já descritos para ICP-OES e Microscopia RAMAN.

Experimento realizado em triplicata.

3.8 Espectrometria de Massas – ESI-MS

A espectrometria de massas é uma técnica analítica física para detectar e identificar moléculas de interesse por meio da medição da sua massa e da caracterização de sua estrutura química. O princípio básico de um espectrômetro de massa consiste em criar íons por um método adequado, separá-los de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) e, por conseguinte,

detectá-los qualitativa e quantitativamente por sua respectiva razão m/z e abundância.

As amostras biológicas foram preparadas para este ensaio conforme item 3.3, onde as células foram plaqueadas para a linhagem A172 na quantidade de 10×10^4 / mL (Cada poço era preenchido com 500 μ L totalizando 5×10^4 por poço) e para a linhagem U87MG 6×10^4 / mL (Cada poço foi preenchido com 500 μ L totalizando 3×10^4 por poço). Após 12 horas essas células eram então submetidas aos tratamentos em triplicatas para cada experimento com o complexo RulbpCl; HIBP (Ibuprofeno em sua forma ácida) e o Controle na concentração de 200 μ M e 75 μ M, para avaliar se havia diferença entre as concentrações.

Foi avaliado se por esta técnica, seria possível detectar o complexo de Rutênio no comprimento de onda específico. As análises foram realizadas em equipamentos Bruker Daltonics Micro TOF, localizado na Central Analítica que fica no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As amostras foram diluídas em metanol para o teste.

3.9 Ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA

A técnica ELISA tem sido muito empregada na quantificação de proteínas, especialmente quando se trata de uma proteína específica. Nesse método, uma enzima, que reage com um substrato incolor para produzir um produto colorido.

Apenas a $cPLA_2$ tem uma especificidade em relação ao ácido araquidônico, enquanto que todas as outras podem hidrolisar qualquer ácido graxo na posição sn-2 do fosfolípido. O substrato para $cPLA_2$ é um produto relacionado a presença de ácido araquidônico na posição sn-2 do glicerofosfolípido. A hidrólise da ligação de araquinodoil tioéster na posição sn-2 por PLA_2 disponibiliza um tiol livre que pode ser detectado por DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis- 2-nitrobenzóico). Este ensaio pode ser utilizado em preparações purificadas, culturas de células ou homogeneizados de tecidos, conforme demonstra o esquema na Figura 22.

Foi utilizado Kit específico para cPLA₂ ou Grupo IV - Cayman Chemical, item número 765021, que tem as características de medir a cPLA₂ em lisados celulares. O Ensaio permite realizar até 46 amostras em duplicata, medição colorimétrica no comprimento de onda 405 – 420 nm (curva de concentração do Kit, figura 18).

Figura 18 - Curva de Concentração para o Kit cPLA₂

Cada kit contém tampão de ensaio cPLA₂, DTNB / EGTA, Araquidonol Thio-PC (substrato), veneno de abelha PLA₂ (controle), solução de bromoenol lactona.

Preparo de soluções:

- Tampão – 160 mM Hepes pH 7.4, 300 mM de NaCl, 20 mM CaCl₂, 8 mM Triton X-100, 60% glicerol e BSA (Albumina Sérica Bovina) usada diretamente (sem diluição) para reconstituir o substrato. Uma solução 1:1 com água Milli Q autoclavada e tampão foi feita para uso no Kit.
- DTNB/ EGTA – Um frasco de DTNB 25 mM e EGTA 475 mM (incluso no Kit) foi reconstituído com água MilliQ autoclavada, o pH foi ajustado pra 8 com auxílio de Tris-HCl.
- Araquidonil Tiol-PC (Substrato) foi evaporado com auxílio de Nitrogênio (substrato vem em solução de etanol).

Os frascos foram mantidos em gelo durante toda a preparação das soluções. A reconstituição foi feita com 6 mL do tampão, auxiliado por vortex até a solução se apresentar clara, adicionados 6 mL de água Milli Q autoclavada para que a concentração ficasse em 1,5 mM.

- Veneno de abelha (Controle) – Foi transferido 10 μ L da enzima para outro frasco, onde se completou com 490 μ L do tampão já diluído – Foi usado como controle positivo.

O Kit é dividido em áreas para controle positivo, branco e área para as amostras, conforme desenho na figura 19.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	Blk	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
B	+	+	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
C	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
D	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42
E	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35	S43	S43
F	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36	S44	S44
G	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37	S45	S45
H	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38	S46	S46

Figura 19 – Imagem representando a configuração da placa, onde Blk é para o Branco; + é controle positivo, S1-S46 poços reservados para amostras.

Preparo das amostras

Ensaio realizado para as linhagens U87MG e A172. O plaqueamento e tratamento das células seguiram o protocolo descrito no item 3.3 com o uso de todos os complexos de Rutênio em sua concentração máxima de 200 μ M, além do HIBP 200 μ M e Controles por 72 horas e teve como objetivo avaliar a concentração de PLA₂ citosólica.

A coleta e preparação das células seguiu o protocolo recomendado na bula do Kit, onde as células foram retiradas com auxílio de um “scraper” já que não poderia ser submetido à ação de enzimas proteolíticas como a tripsina, por exemplo.

As células coletadas foram submetidas a centrifugação 2000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O pellet formado foi sonificado com 1 mL de tampão gelado (50 mM Hepes, pH 7.4 e 1 mM EDTA), em seguida foi centrifugado mais uma vez a 10000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para ser analisado posteriormente e refrigerado a -80°C.

Para aplicação nas placas, para o branco foi adicionado 15 μ L do tampão (preparo, conforme o preparo de soluções) em 02 poços; Para o controle positivo (veneno de abelha) foi adicionado 10 μ L de PLA₂ e 5 μ L do tampão em

dois outros poços; Para as amostras foram adicionados 10 μ L + 5 μ L de tampão, as amostras foram plaqueadas em duplicata para cada tratamento e linhagem, chegando a um total de 72 poços utilizados.

Após essa etapa inicial, foi adicionado a cada poço 200 μ L da solução do substrato em cada poço e cuidadosamente homogeneizado por 30 segundos e mantido em temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período, foi adicionado 10 μ L de DTNB/ EGTA em cada poço para que fosse interrompida a ação enzimática, cuidadosamente a placa foi movimentada por 30s para homogeneizar e por 5 minutos ficou em temperatura ambiente.

Por fim foi realizada a quantificação através de espectrofotômetro (EPOCH - Microplate Espectofotometer – Biotec), onde o resultado é obtido através do cálculo de absorbância na faixa de 414 nm e transmitido por software de computador.

3.10 Análises Estatísticas

Nos testes de contagem de células (padronização dose/ tempo) foram realizadas análises two-away anova, considerando os parâmetros e a quantidade de variantes que teriam que ser avaliadas, com pós-teste de Bonferroni.

Já nas análises do ensaio de Elisa, aplicamos One-way ANOVA com pós-teste Tukey, comparando as variantes e considerando a significância atrelada ao controle Etanol.

Para os demais ensaios e análises as quais se aplicassem, foram empregados o tratamento estatístico teste t de Student, comparando cada tratamento ao seu controle.

As diferenças foram consideradas significantes com $p < 0,05$.

Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão, estudo de variabilidade e feitas com auxílio do software GraphPad Prism5® instat, as análises contaram com auxílio e supervisão de Rosana Duarte Prisco, Departamento de Estatística – ICB - USP.

4 RESULTADOS

4.1 Padronizações

Tabela 2 - Quantificação da concentração e pureza de RNA nas linhagens de GBM

Linhagem	Pureza	Concentração (ng/mL)
U251	2,0	2,399
U87MG	2,1	1,138
A172	2,1	241
U138MG	2,0	281
T98G	2,1	648

4.1.1 RT-PCR

4.1.1.1 Extração e Quantificação de RNAm presentes nas linhagens.

A leitura feita em espectrometro ao final da extração de RNA segue na tabela 1, especificando a pureza no processo e a concentração de RNA para cálculo da síntese de DNA.

4.1.1.2 Teste de Temperatura

Resultados obtidos para o ensaio de teste de temperatura, apresentando o anelamento obtido para cada primer, estão listados na tabela abaixo (3). Confirmada a temperatura mais adequada através da observação de eletroforese em gel de agarose 1% - As temperaturas foram testadas nessa ordem: 54,2°C, 56,5°C, 59,1°C, 61,8 °C, 64,5°C (figuras 20 a 26).

Tabela 3 - Sequência dos primers utilizados para identificação da expressão gênica e suas respectivas temperaturas.

Molécula	Forward primer	Reverse primer	T°C	Ciclos
PLA₂ G4A	ATTTCTTAATGGGTGTCTGGG	ACATACGATGAATCCAACCTTGCT	61,8 °C	40
PLA₂ G4B	GACCAGAAGTCCTCAGAGCA	GACAAGCCTCACCACCTTGAC	54,2 °C	40
PLA₂ G4C	CCATCAACACTCCCTTCCCA	ATGCCTCAATATCACCTCCACAG	56,5 °C	40
PLA₂ G4D	ACCCTTACGTGATCCTACAG	GCTCCAGAACATTCTTGACC	56,5 °C	40
PLA₂ G5	CTCATCATCGGTCACTCCCA	ACACTACAAGCCAGGAACCA	54,2 °C	40
PLA₂ G6	GGAAACCCAAGGTGATGCTG	GATTGTACTCATGGATCTCGGTC	56,5 °C	40
GAPDH	ATGACATCAAGAAGGTGGTG	CATACCAGGAAATGAGCTTG	61,8 °C	40
18s	CGGCGACGACCCATTGGAAC	GAATCGAACCCCTGATTCCCCGTC	*	40

*Anelamento em todas as temperaturas testadas.

As bandas representam as temperaturas testadas nessa ordem: 52,5°C, 54,2°C, 56,5°C, 59,1°C, 61,8 °C, 64,5°C.

Fig.20 – Teste de temperatura e PCR, PLA₂G4A - da esq. para direita U251MG, U87MG, A172.

Fig.21 – Teste de temperatura e PCR, PLA₂G4A - da esq. para direita U138MG, T98G.

Fig.22 – Teste de temperatura, PLA₂G4B – Linhagem T98G

Fig.23 – Teste de temperatura, PLA₂G4C Linhagem U87MG.

Fig.24 – Teste de temperatura, PLA₂G4D – Linhagem T98G

Fig.25 – Teste de temperatura, PLA₂G5 – Linhagem U87MG

Fig.26 – Teste de temperatura, PLA₂G6 – Linhagem U87MG

4.1.1.3 RT-PCR

Após a definição das temperaturas, foram realizados os PCRs dos primers nas 5 diferentes linhagens (U251, U87MG, A172, T98G e U138MG) para avaliar quais apresentariam melhor expressão das diferentes enzimas PLA₂ nas Figuras 27-32, as imagens obtidas através da eletroforese em gel de agarose reveladas em Gbox (Ultravioleta).

Fig.27 –PCR, PLA₂G4B - da esq. para direita U251, A172, U87MG, T98G, U138MG e branco.

Fig.28 –PCR, PLA₂G4C - da esq. para direita U251, A172, U87MG, T98G, U138MG.

Fig.29 –PCR, PLA₂G4D - da esq. para direita U251, A172, U87MG, T98G, U138MG.

Fig.30 – PCR, PLA₂G5 - da esq. para direita U251, A172, U87MG, T98G, U138MG.

Fig.31 –PCR, PLA₂G6 - da esq. para direita U251, A172, U87MG, T98G, U138MG.

Fig.32 - PCR GAPDH - da esq. para direita U251, U87, A172, U138MG e T98G.

Tabela 4 - Resultado das concentrações de Primer e cDNA.

Enzima	Concentração Primer	Concentração cDNA
PLA2G4A	800 nm	6,25 ng/ μ L
PLA2G4B	800 nm	6,25 ng/ μ L
PLA2G4C	400 nm	6,25 ng/ μ L
PLA2G4D	800 nm	6,25 ng/ μ L
PLA2G5	800 nm	6,25 ng/ μ L
PLA2G6	800 nm	6,25 ng/ μ L

4.1.2 qPCR – Padronização das concentrações

Os níveis de expressão de RNAm dos genes PLA₂ foram quantificados através da técnica de qRT-PCR. As reações foram testadas para cada gene com relação às concentrações mínimas de primer para todos os genes (alvos e referências). Todos os primers foram analisados quanto à sua eficiência de amplificação com diluições seriadas de cDNA (Figura 33).

Figura 33 (A-D). A) Curva padrão de diferentes concentrações de cDNA. B) Curva de dissociação, gene PLA₂G4A; C - Curva de dissociação, gene PLA₂G4B; D - Curva de dissociação, gene PLA₂G4C linhagem U87MG – controle interno 18s.

Foram eleitas duas linhagens para que pudéssemos proceder com as análises posteriores, a U87MG, uma linhagem tumorigênica com potencial invasivo e a A172 que mesmo sendo invasiva não é tumorigênica, avaliando assim as respostas dessas células aos ensaios e tratamentos propostos com os complexos de Rutênio. Além disso, essas células responderam de forma mais satisfatória quanto à expressão de PLA₂, visivelmente melhores que as outras testadas. Das PLA₂ tivemos também um destaque para o grupo 4 PLA₂G4 (ou citosólica) e, na maioria dos ensaios focamos nela.

4.2 Ensaio de Contagem Celular

Avaliação quanto ao tempo de exposição e concentração de tratamento com os complexos de Rutênio nas linhagens U87MG e A172 (Figuras 34 e 35).

4.2.1 Linhagem U87MG

Figura 34 – Gráficos analisados pelo tratamento estatístico two-way Anova através do programa GraphPad Prism 5, para a linhagem U87MG, onde: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. A – Tratamento com RuIbpCl, concentrações de 75 μM a 200 μM apresentaram diferença significativa em relação ao seu controle na coleta de 24 h; nas concentrações de 150 μM e 200 μM na coleta em 48 h; Concentrações de 50 μM a 200 μM na coleta de 72 h. B – RuIbpPF₆, os tratamentos não apresentaram diferença significativa em relação ao controle e tempo. C – O tratamento RuIbpOTf apresentou diferença significativa na concentração de 200 μM no período da coleta de 72 h. D – RuCeto – Tratamento de 150 μM e 200 μM apresentaram diferença significativa em relação ao controle nas coletas de 48 e 72h.

4.2.2 Linhagem A172

Figura 35 – Gráficos analisados pelo tratamento estatístico two-way Anova através do programa GraphPad Prism 5 para a linhagem A172, onde: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. A – O tratamento RuIbpCl, na concentração de 200 μM apresentou diferença significativa no tempo de 48 h; Já as concentrações de 150 μM e 200 μM apresentaram diferença em relação ao controle no período de 72 h. B – Para o tratamento Ru [Ibp]PF₆ não houveram diferenças significativas em nenhuma concentração e tempo observados. C Para o tratamento Ru [Ibp]PF₆ não houveram diferenças significativas em nenhuma concentração e tempo observados. D – Tratamento RuCeto nas concentrações de 150 e 200 μM foram significativos em relação ao controle no período de 72 h.

4.3 Ensaio Apoptose / Mitose

Visualização da morfologia nuclear por coloração de Hoechst 33342. Técnica que permite, através da luz UV, verificar se a célula está em mitose ou apoptose de acordo com o aspecto morfológico de seu núcleo (Figuras 36-43).

4.3.1 Linhagem U87MG – RuIBPCI

Figura 36 – Ensaio de índice apoptótico/ mitótico. O ensaio foi submetido ao tratamento estatístico T-test comparando controle e tratamento após contagem. A – Gráfico representando o tratamento RuIBPCI na concentração 200 μ M comparado ao Controle para apoptose, no qual não observamos diferença estatística significativa, contudo podemos observar que há um leve aumento de apoptose. B- Gráfico representando a comparação entre a droga RuIBPCI e o Controle para mitose, é visível que ocorreu uma diminuição, porém não houve significância estatística. C– Foto de um dos campos aleatórios onde foram feitas as contagens para o controle. D - Foto de um dos campos aleatórios onde foram contadas as células em apoptose ou mitose para o tratamento.

4.3.2 Linhagem U87MG – RuIBP PF₆

Figura 37 Ensaio de índice apoptótico/ mitótico. O ensaio foi submetido ao tratamento estatístico T-test comparando controle e tratamento após contagem. A – Gráfico representando o tratamento RuIBPPF₆ na concentração 200 μ M comparado ao Controle para apoptose, no qual observamos diferença estatística significativa, onde há aumento de apoptose. B- Gráfico representando a comparação entre o tratamento RuIBPPF₆ e o Controle para mitose, é visível que ocorreu uma diminuição das mitoses e houve significância estatística importante comprovando. C– Foto de um dos campos aleatórios onde foram feitas as contagens para o controle. D - Foto de um dos campos aleatórios onde foram contadas as células em apoptose ou mitose para o tratamento.

4.3.3 Linhagem U87MG – RuIBP OTf

Figura 38 – Ensaio de índice apoptótico/ mitótico. O ensaio foi submetido ao tratamento estatístico T-test comparando controle e tratamento após contagem. A – Gráfico representando o tratamento RuIBPOTf para a linhagem U87MG na concentração 200 μ M comparado ao Controle para apoptose, no qual observamos diferença estatística significativa, onde há aumento de apoptose importante. B- Gráfico representando a comparação entre o tratamento RuIBPOTf e o Controle para mitose, ocorreu uma diminuição das mitoses e houve significância estatística importante comprovando. C– Foto de um dos campos aleatórios onde foram feitas as contagens para o controle. D - Foto de um dos campos aleatórios onde foram contadas as células em apoptose ou mitose para o tratamento.

4.3.4 Linhagem U87MG – Ru [Ceto] Cl.

Figura 39 – Ensaio de índice apoptótico/ mitótico. O ensaio foi submetido ao tratamento estatístico T-test comparando controle e tratamento após contagem. A – Gráfico representando o tratamento RuCeto na concentração 200 μ M comparado ao Controle para apoptose, no qual observamos diferença estatística significativa, onde há aumento de apoptose. B- Gráfico representando a comparação entre o tratamento RuCeto e o Controle para mitose, ocorreu uma diminuição das mitoses e houve significância estatística. C– Foto de um dos campos aleatórios onde foram feitas as contagens para o controle. D - Foto de um dos campos aleatórios onde foram contadas as células em apoptose ou mitose para o tratamento.

4.3.5 Linhagem A172MG – Ru [IBP] Cl

Figura 40 – Ensaio de índice apoptótico/ mitótico. O ensaio foi submetido ao tratamento estatístico T-test comparando controle e tratamento após contagem. A – Gráfico representando o tratamento RuIBPCI na concentração 200 μ M comparado ao Controle para apoptose, no qual observamos diferença estatística significativa, onde há aumento de apoptose. B- Gráfico representando a comparação entre o tratamento RuIBPCI e o Controle para mitose, onde houve uma diminuição das mitoses sendo estatisticamente significativa. C– Foto de um dos campos aleatórios onde foram feitas as contagens para o controle. D - Foto de um dos campos aleatórios onde foram contadas as células em apoptose ou mitose para o tratamento.

4.3.6 Linhagem A172MG – Ru [IBP] PF₆.

Figura 41 – Ensaio de índice apoptótico/ mitótico. O ensaio foi submetido ao tratamento estatístico T-test comparando controle e tratamento após contagem. A – Gráfico representando o tratamento RuIBPPF₆ para a linhagem A172, na concentração 200 μ M comparado ao Controle para apoptose, no qual observamos diferença estatística significativa, onde há aumento de apoptose. B- Gráfico representando a comparação entre o tratamento RuIBPPF₆ e o Controle para mitose, é visível que ocorreu uma diminuição das mitoses e houve significância estatística importante comprovando. C– Foto de um dos campos aleatórios onde foram feitas as contagens para o controle. D - Foto de um dos campos aleatórios onde foram contadas as células em apoptose ou mitose para o tratamento.

4.3.7 Linhagem A172MG – Ru [IBP] OTf.

Figura 42 – Ensaio de índice apoptótico/ mitótico. O ensaio foi submetido ao tratamento estatístico T-test comparando controle e tratamento após contagem. A – Gráfico representando o tratamento RuIBPOTf para a linhagem A172 na concentração 200 μ M comparado ao Controle para apoptose, no qual observamos diferença estatística significativa, onde há aumento de apoptose importante. B- Gráfico representando a comparação entre o tratamento RuIBPOTf e o Controle para mitose, ocorreu uma diminuição das mitoses e houve significância estatística importante comprovando. C– Foto de um dos campos aleatórios onde foram feitas as contagens para o controle. D - Foto de um dos campos aleatórios onde foram contadas as células em apoptose ou mitose para o tratamento.

4.3.8 Linhagem A172MG – Ru [Ceto] Cl.

Figura 43 – Ensaio de índice apoptótico/ mitótico. O ensaio foi submetido ao tratamento estatístico T-test comparando controle e tratamento após contagem. A – Gráfico representando o tratamento RuCeto para a linhagem A172 na concentração 200 μ M comparado ao Controle para apoptose, no qual observamos diferença estatística significativa, onde há aumento de apoptose. B- Gráfico representando a comparação entre o tratamento RuCeto e o Controle para mitose, onde houve uma diminuição expressiva das mitoses com significância estatística. C– Foto de um dos campos aleatórios onde foram feitas as contagens para o controle. D - Foto de um dos campos aleatórios onde foram contadas as células em apoptose ou mitose para o tratamento.

4.3.9 Resumo dos Resultados do ensaio

Tabela 5 – Ensaio de índice apoptótico/ mitótico – quadro resumo de resultados destacando os valores mais expressivos, onde o tratamento Ru [IBP]Cl na linhagem A172 demonstrou um aumento na apoptose de 106,8% e para Ru [IBP] Otf verificou-se uma diminuição na mitose de 65,4% na linhagem U87MG.

Tratamento	Linhagem	Aumento Apoptose	Diminuição Mitose
Ru[IBP4]Cl	U87 MG	17,2%	36,5%
	A172	<u>106,8%</u>	40,5%
Ru[IBP4]Otf	U87 MG	12%	<u>65,4%</u>
	A172	81%	48,7%
Ru[IBP4]PF ₆	U87 MG	39,7%	53,8%
	A172	87,9%	46,3%
Ru[Ceto]Cl	U87 MG	48,3%	41,3%
	A172	<u>91,4%</u>	48,7%

4.4 Espectrômetro Ótico de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado - ICP – OES

Análise da presença dos íons de Rutênio nas linhagens celulares U87MG e A172

4.4.1 Linhagem U87MG

Tabela 6 – Quantificação de Rutênio presentes nos Pellets de células da linhagem U87MG realizados em dois experimentos em dias distintos. A – Experimento 1; B – Experimento 2.

A		B	
Amostra	Qtf. de Ru (mg/L)	Amostra	Qtf. de Ru (mg/L)
Ru [IBP]Cl	0,385	Ru[IBP]Cl	0,404
Ru [IBP]PF ₆	0,153	Ru[IBP]PF ₆	0,251
Ru [IBP]Otf	0,291	Ru[IBP]Otf	0,318
Ru[Ceto]Cl	0,347	Ru[Ceto]Cl	0,265
Controle (Etanol)	<0,010	Controle (Etanol)	<0,010

4.4.2 Linhagem A172

Tabela 7 – Quantificação de Rutênio presentes nos Pellets de células da linhagem A172 realizados em dois experimentos em dias distintos. A – Experimento 1; B – Experimento 2.

A		B	
Amostra	Qtf. de Ru (mg/L)	Amostra	Qtf. de Ru (mg/L)
Ru[IBP]Cl	0,265	Ru[IBP]Cl	0,499
Ru[IBP]PF ₆	0,230	Ru[IBP]PF ₆	0,478
Ru[IBP]OTf	0,334	Ru[IBP]OTf	0,330
Ru[Ceto]Cl	0,871	Ru[Ceto]Cl	0,857
Controle (Etanol)	<0,010	Controle (Etanol)	<0,010

4.5 Análises em Microscopia Raman

Figura 44 – Espectro Raman do complexo RuIBpCl - sem diluição, o gráfico representa a leitura do material sólido – Identificação através da setano pico que representa a leitura da estrutura em gaiola na faixa de 330 cm⁻¹.

Figura 45 – Espectro RAMAN das células U87 MG tratadas com complexo de Rutênio, a seta em azul indica o pico que identifica a estrutura em gaiola, a barra em azul mostra que na região de identificação do Rutênio não houveram picos. A – Amostra referente ao pellet de células tratadas com 200 μM de RulbpCl; B - – Amostra referente ao pellet de células tratadas com 75 μM de RulbpCl; C – Amostra referente ao pellet de células tratadas com controle – Etanol; D - Amostra referente ao pellet de células tratadas com Hibf 200 μM , como controle do AINE presente no complexo, neste caso, não foi possível atribuir a área referente ao Ibuprofeno isolado. Identificação na faixa de 330 cm^{-1} .

O equipamento também permite um mapeamento de área delimitada específica, então, tentamos isolar um campo equivalente a uma única célula para mapeamento no interior da mesma e verificar se os espectros se reproduziam nesta localização (Figura 46).

Figura 46 – Imagem ótica das células capturadas por microscópio Raman, na figura A verificamos um campo na lâmina usada para análise com a linhagem U87MG e B imagem ótica com área marcada para mapeamento por espectroscopia Raman em função do sinal em 330 cm^{-1} . Cores mais quentes significam maior intensidade de sinal.

4.6 Espectrometria de Massas

Figura 47. Espectro de massas para detecção de complexo de Rutênio, avaliação da captação celular através dos pellets de células U87MG tratadas com seus respectivos controles. A – Controle de células tratadas com Etanol 1%; B – Controle do tratamento com Ibuprofeno 200 μ M – Não foi detectável na amostra estudada; C – Tratamento com complexo RuIBPCI com 75 μ M, onde se verifica o pico que representa a molécula em destaque na ponta da seta.

4.7 Análises das frações celulares em ICP-OES e Microscopia Raman

Observação da presença de Rutênio, em frações celulares, como núcleo e citosol e avaliação do lisado de células quanto à presença dos complexos.

4.7.1 Resultado em ICP-OES

Tabela 8. Quantificação referente à presença de íons de Ru em cada tipo de material obtido por técnica de isolamento de núcleo podemos ver que o único resultado quantificável foi demonstrado na fração nuclear.

Amostra	Volume final (mL)	Leitura de Ru (mg/L)
12669 – 3 lisado	10	< 0,010
12670 – 2 citosol	10	< 0,010
12671 – 1 núcleo	10	0,059

4.7.2 Resultado em Microscopia Raman

Fig. 48 - Espectro Raman Fração **Nuclear** das células U87MG tratadas A – Tratamento com o complexo RuIBPCI, podemos ver o pico de identificação da estrutura onde a seta está indicada; B – Tratamento com Ibuprofeno, tempo de integração de 60s e acumulação de 1 espectro, não houve pico na área de identificação do AINE.

Fig. 49 - Espectro Raman linhagem U87MG tratadas com RuIBPCI nas frações celulares. A – Lisado total de células, podemos identificar na marcação da seta que há a presença de pico na área de identificação da estrutura em gaiola; B – Na fração Citosólica, tempo de integração de 60s e acumulação de 1 espectro não houve identificação de pico referente ao complexo de Ru.

4.8 Análise em RT-PCR e qRT-PCR para as PLA₂ G4A, G4B

Após confirmar a presença das enzimas PLA₂ nas linhagens celulares, observamos que os principais genes que estavam mais expressos eram o Grupo 4A e 4B, então decidimos verificar como essa enzima estaria alterada após tratamento com o complexo de Rutênio (RuIBpCl) e direcionamos a análise apenas para a linhagem U87MG.

As primeiras análises ocorreram em PCR em real time (qRT-PCR), e os resultados nos levaram a acreditar que a via inflamatória das cicloxigenases estaria sofrendo uma modulação, levando a um feedback entre COX e PLA₂.

4.8.1 qRT-PCR

Figura 50 – Gráficos referentes aos valores obtidos para a expressão gênica das enzimas PLA₂ G4A e G4B realizados em PCR quantitativo, desenvolvida através do programa REST® (relative expression software tool), em que os dados são submetidos a análises estatísticas, considerando-se significativos os valores de probabilidade de $p < 0,05$.

4.8.2 RT-PCR

Devido a problemas técnicos, os experimentos foram finalizados em PCR convencional, e as imagens dos géis de agarose foram submetidas ao software image J, que através de intensidade de pixels as bandas são quantificadas, e a partir disso os gráficos foram construídos (Figura 51-54).

4.8.2.1 COX-1

Figura 51 –Gráfico representando a intensidade das bandas medidas em pixels através do software ImageJ, onde "Tratado" foram as células que receberam o complexo de RuBpCI 200 μ M e "Controle" as células que foram submetidas a apenas Etanol 1%, experimento normalizado por controle endógeno 18s.

4.8.2.2 COX-2

Figura 52 –Gráfico representando a intensidade das bandas medidas em pixels através do software ImageJ, onde " Tratado" foram as células que receberam o complexo de RuIBpCl 200 μ M e "Controle" as células que foram submetidas a apenas Etanol 1%, experimento normalizado por controle endógeno 18s.

4.8.2.3 PLA₂G4A

Figura 53 – A - Gráfico representando a intensidade das bandas medidas em pixels através do software ImageJ, onde " Tratado" foram as células que receberam o complexo de RuIBpCl 200 μ M e "Controle" as células que foram submetidas a apenas Etanol 1%, experimento normalizado por controle endógeno 18s.

4.8.2.4 *PLA₂G4B*

Figura 54 – A - Gráfico representando a intensidade das bandas medidas em pixels através do software ImageJ, onde "Tratado" foram as células que receberam o complexo de RuIBpCI 200 uM e "Controle" as células que foram submetidas a apenas Etanol 1%, experimento normalizado por controle endógeno 18s.

4.9 Ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA

Este ensaio teve o objetivo de verificar a influência de todos os tratamentos dos complexos de Rutênio e a atividade enzimática das cPLA₂, ou PLA₂ citosólicas (o Kit atende todo o Grupo 4). Abaixo temos os dados da leitura compilados no GraphPad Prisma representado esse resultado (Figuras 55 e 56).

4.9.1 Linhagem A172

Figura 55 – Gráfico com os dados obtidos da leitura da placa de ELISA em espectrômetro, onde, em relação ao controle Etanol, os tratamentos com os complexos de Rutênio, OTf, PF₆ e RuCeto apresentaram diminuição significativa (tratamento estatístico one-way ANOVA/ Tukey) na atividade de cPLA₂.

4.9.2 Linhagem U87MG

Figura 56 – Gráfico apresentando os dados obtidos da leitura da placa de ELISA em espectrômetro, onde, em relação ao controle Etanol, o tratamento com o complexo de Rutênio, OTf, apresentou aumento significativo (tratamento estatístico one-way ANOVA/ Tukey) na atividade de cPLA₂.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho procurou elucidar temas integrados como câncer, inflamação e uso de complexos metálicos inovadores com Rutênio, trazendo os primeiros indícios apresentados nos resultados do que possa ser ainda campo promissor para continuidade de pesquisas e que poderão gerar novas perspectivas para tratamento de tumores tão agressivos como GBM.

Observamos na padronização dos testes de temperatura que alguns subtipos de PLA₂ não tinham sua expressão gênica tão evidente como as PLA₂G5, por exemplo, pertencente a classe das PLA₂ secretadas, grupo que em alguns estudos ainda não teve sua importância muito definida, apesar de sua presença estar associada à tumorigênese (MOUNIER et al., 2008; OSTERSTROM et al., 2002). Essa análise preliminar fez com que as linhagens a serem trabalhadas fossem se destacando como também os grupos de PLA₂.

As PLA₂ atuam no metabolismo celular através da clivagem de ácidos graxos (ligação éster na posição sn-2) (WEI-YI ONG, 2015) e liberam especialmente o ácido araquidônico que, por sua vez é metabolizado pelas COXs 1 e 2, o que levará, seguindo essa via a produção de prostanoídes e tromboxanos (MORROW; ROBERTS – In Goodman & Gilman, 2001).

Essa via se torna importante, pois o alvo dos principais AINEs são as enzimas COX-2 que geralmente estão super expressas em muitos tipos de câncer (AGGARWAL et al., 2006). Na literatura diversos pesquisadores já relataram o uso de AINEs e a redução dos riscos de câncer, especialmente os gástricos, além de relatos de efeito profilático em câncer de colon, mama, próstata e pulmão (SANDLER et al., 2003; SCHETTER; HEEGAARD; HARRIS, 2010; THUN; JACOBS; PATRONO, 2012; THUN; NAMBOODIRI; HEATH, 1999; WANG; DUBOIS, 2010).

Para que fosse possível comparar a expressão gênica das PLA₂ após o tratamento com os complexos de Rutênio associados aos AINEs (Ibuprofeno e Cetoprofeno), foi importante verificar nas linhagens de GBM como essa via poderia se alterar, já que a PLA₂ libera o ácido araquidônico, principal substrato para as COXs e que dão origem as prostaglandinas, mediadores importantes do processo inflamatório (THUN; HENLEY; PATRONO, 2002).

As COX-2 se encontram super expressas em gliomas e estão associadas a alterações histopatológicas referentes aos graus da doença (figura 5 e 6) (KURZE et al., 2002; NATHOO et al., 2004; SHONO et al., 2001; WANG et al, 2005). Algumas linhagens tiveram a expressão genica de PLA₂ em maior destaque, como foi o caso da U87MG e da A172, sendo estas eleitas para continuidade dos experimentos deste trabalho.

Os tratamentos com complexos de Rutênio associados aos AINEs foram extremamente importantes para identificar como esse tipo de droga atuaria no meio biológico e sua resposta em mecanismos celulares. Alguns complexos de Rutênio que apresentam atividade anticâncer, e dos quais podem se associar a proteínas e ao DNA já foram abordados em literatura (DJINOVIĆ et al., 2004; GRGURIC-SIPK et al., 2003; ZHANG; LIPPARD, 2003), além disso, o interesse em estudos de ligação entre complexos metálicos e o DNA são alvo de investigação constante nos últimos anos (FOXON et al., 2007; METCALFE et al., 2003; ZEGLIS et al., 2007), sugerindo que para obtenção de um novo tratamento muito ainda pode merecer maior profundidade de conhecimento.

Complexos de Rutênio como NAMI-A, um dos poucos a chegar à fase de estudos clínicos, apresentou propriedades anti-metástasicas relacionadas à angiogênese e ação de metaloproteases (SAVA et al., 2003; ZORZE et al., 2000). Os complexos de Rutênio já foram avaliados também quanto a sua baixa toxicidade e maior seletividade para tumores (SAVA et al., 1995).

Em estudo realizado pelo grupo essa interação entre Rutênio, AINEs e suas propriedades antitumorais foram avaliadas em células da linhagem C6 de glioma de ratos, e a partir de então a importância de elucidar maiores informações referentes a ação deste complexo se fez necessária (RIBEIRO et al., 2008). Outros resultados também obtidos pelo nosso grupo constatou uma diminuição na massa tumoral, através de infusão por meio de bomba osmótica com RulbpCl em ratos inoculados com a linhagem C6, além de avaliar a baixa toxicidade aguda e crônica do tratamento em ratos Wistar (BENADIBA et al., 2010).

5.1 Contagem de células

5.1.1 Tratamentos e avaliação das concentrações utilizadas.

Estudos já demonstraram que alguns AINEs seriam capazes de causar efeito antiproliferativo independente da ação de COX. O efeito de alguns AINEs na proliferação de linhagens celulares de glioma foi investigado e os resultados demonstraram sua importância para uma intervenção farmacológica (BERNARDI et al., 2006; ISHIBASHI et al., 2005).

No trabalho de Ribeiro et al., 2008, a linhagem C6 de glioma de rato não expressa COX-2 em condições normais de cultura, porém os complexos associados aos AINEs ibuprofeno e naproxeno inibiram a proliferação celular, supondo que isso possa ter acontecido por mecanismos independente da via de COX e sugerindo que, talvez estudos em linhagens de glioma humano, esses efeitos poderiam ser potencializados já que um duplo mecanismo pudesse existir, desta vez envolvendo a COX-2.

As modificações ocorridas nos complexos de Rutênio que apresentamos neste trabalho (ver introdução) juntamente com linhagens de GBM que conhecidamente apresentam a via de prostanoídes alteradas (COLQUHOUN et al., 2009; DUBINETT et al., 2003; GOMES; COLQUHOUN, 2012; HASEGAWA et al., 2005; SHONO et al., 2001) seriam possibilidade de novas perspectivas no controle dos processos envolvendo PLA₂-COX, já que esta via é de grande importância em tumores como GBM.

Num ensaio de contagem de células onde variáveis como tempo e concentração eram avaliadas, vimos que o tratamento RuIBpCl na linhagem U87MG teve na maioria das concentrações testadas diferenças significativas entre essas variáveis, inclusive nos períodos de 24 e 48 horas. Já para a linhagem A172 isso foi mais sutil, tendo apenas três concentrações com significância estatística. Fazendo um comparativo com estudos na linhagem celular C6 (RIBEIRO et al., 2008) podemos perceber que a linhagem U87MG apresentou um comportamento parecido, quando pensamos em aspectos tempo dependentes e efeito cumulativo (HANIF et al., 2016).

As moléculas aqui estudadas, as quais os ligantes axiais de Cl foram substituídos (OTf e PF₆) em sua síntese química (HANIF et al., 2016) e foram avaliadas quanto a sua capacidade de ação nos ensaios, já que interferiam na solubilidade e poderiam impactar na proliferação das células por exemplo.

Nos ensaios de contagem celular, para ambas as linhagens, esses ligantes axiais não interferiram de forma importante em relação ao controle. Já quando a substituição foi o AINE (RuCetoCl) percebemos que a resposta apresentada ao tratamento foi melhor em relação ao controle, sendo significativa para os períodos de 72 h nas concentrações de 150 e 200 µM para U87MG e 200 µM para A172. Ressaltando aqui mais uma vez a característica antiproliferativa e sua relação ao tempo de exposição e ao efeito cumulativo observado (RIBEIRO et al., 2008).

Aparentemente, complexos com ligantes axiais Cl atuaram de forma mais expressiva na diminuição da contagem de células em comparação ao controle, aqui definimos uma dosagem única de 200 µM para todos os tratamentos, assim como período de 72 h para que pudéssemos ter um comparativo com grau de equidade que permitisse analisar as diferenças entre os tratamentos.

5.1.2 Apoptose – Mitose

Todas as células apresentaram aumento de apoptose e diminuição da mitose com os tratamentos propostos, dado muito importante já que esses são fatores sempre desregulados na tumorigênese (KINZLER, 2004; SAMUELS; BARDELLI; LÓPEZ, 2011). A indução de apoptose é um dos fatores considerados no desenvolvimento de novos medicamentos. A maioria dos fármacos anticancerígenos e citotóxicos em uso atual demonstrou induzir apoptose em células susceptíveis (DEEPIKA et al., 2016).

Neste ensaio, um dado importante apareceu diferente dos obtidos na contagem de células, o tratamento com ligante axial OTf na linhagem U87MG representou 65,4% de diminuição das mitoses em relação ao controle, embora tenha sido o menor em impacto no aumento de apoptose, 12% apenas. Estudos com diferentes complexos de Rutênio mostraram que mesmo em

linhagens distintas ocorre um aumento da apoptose (DEEPIKA et al., 2016; TANG et al., 2017).

Outro dado que chamou a atenção foi referente a linhagem A172, que apresentou os valores mais expressivo para apoptose relacionado ao tratamento RuIBpCl, 106,8% em relação aos controles. Mesmo sendo um dado que não se correlacionou comparativamente as análises de contagem celular, já que nestas, a linhagem apresentou resultado inferior a linhagem U87MG (traçando um comparativo entre os ensaios), inferindo que os mecanismos de reparo controlados por sinalizações via DNA seriam independentes quando comparado a capacidade proliferativa da célula.

Em seguida podemos observar também que o tratamento com RuCetoCl apresentou 91,4% de aumento na apoptose para a mesma linhagem, mas aqui este mesmo tratamento teve resultado significativo na contagem celular maior que o apresentado na linhagem U87MG.

Os resultados mostraram que todos os tratamentos impactaram nesses tipos de mecanismos de controle celular e sobrevivência das células, onde a linhagem A172 apresentou aumento na apoptose de no mínimo 81%, sugerindo que essa linhagem seria mais susceptível a programar sua morte quando submetidas a estes tratamentos.

Já a linhagem U87MG teve maior propensão a diminuição da mitose com a administração dos tratamentos, salvo no tratamento RuCetoCl que houve um equilíbrio entre apoptose e mitose.

Olhando apenas o impacto do tratamento para mitose podemos dizer que há um equilíbrio entre as duas linhagens, apresentando valores percentuais muito semelhantes entre os tratamentos. Com exceção do RuIBpOTf que teve valor em destaque em relação aos outros tratamentos e apresentou 65,4% na diminuição da mitose (Tabela 4).

Nesse experimento foi importante observar que mesmo 3 dos 4 tratamentos possuírem como ligante perpendicular o anti-inflamatório ibuprofeno, os ligantes axiais parecem ter feito a diferença na resposta da célula, onde a molécula com o ligante PF₆ apresentou um aumento na apoptose de 39,7% para a linhagem U87MG, o ligante OTf chegou apenas a 12% e o Cl a 17,2%. Já os dados para A172 neste comparativo,

demonstraram-se mais uniformes, com o destaque para o CI que chegou a 106,8%. Esses dados reforçam o comportamento diferenciado das linhagens celulares frente aos tratamentos (Ver tabela 5).

Em trabalho anterior do grupo resultados demonstraram que a mitose estaria sendo bloqueada na fase G₂-M após tratamento com complexos de Rutênio associados ao GLA (ácido gama-linolênico) como mecanismo de reparo aos danos ao DNA provavelmente ocorridos na fase S (MIYAKE et al., 2014).

Comparativamente em 2014 para a linhagem A172, RulbpCI apresentava resultado significativo para o tratamento de 100 µM quando se tratava de apoptose (BENADIBA et al., 2014), neste trabalho foi obtida uma significância muito maior para o tempo de 72 h ($p < 0,001$), sugerindo que o aumento da concentração do tratamento teve maior impacto nos índices apresentados naquela ocasião.

É importante ainda ressaltar que no último trabalho (HANIF et al., 2016) apresentamos ensaio de migração nas linhagens U87MG e A172, utilizando as mesmas concentrações e tempo de tratamento definidos de 200 µM e 72 h, levando em consideração a capacidade invasiva de GBM e como os tratamentos poderiam afetar nessa capacidade migratória.

Os tratamentos testados foram com o ligante Ibuprofeno (RulbpCI; RulBpOTf e RulBpPF₆), e eles foram capazes de diminuir a migração das células, o que corrobora com outros resultados de complexos de Rutênio já usados na clínica e que são comparáveis aos efeitos do NAMI-A (BERGAMO; SAVA, 2015; ZORZET et al., 2000).

Estudos que avaliam a migração de células com complexos de Rutênio (II) também foram realizados para linhagem de células de tumor de fígado (BEL-7402) e o resultado foi a inibição da migração em ensaio de ferida; Já em ensaio de invasão por matrigel, essa característica invasiva também foi menor em relação ao controle em média 60% (TANG et al., 2017).

5.2 Avaliação de captação celular dos complexos de Rutênio.

Nas coletas das células após a centrifugação, onde eram formados os *pellets*, a coloração dos mesmos chamou a atenção por apresentarem-se marrom escuro mesmo sendo lavados com PBS, a coloração assim permanecia (figura 16), o que nos fez questionar o quanto dos complexos estariam sendo captados pelas células.

Nas análises em ICP-OES foi realizada a quantificação dos complexos de Rutênio que estavam nos *pellets* de células. Para que resíduos não estivessem nas membranas das células, os *pellets* passaram por lavagens conforme descrito nos materiais.

As amostras de ambas as linhagens apresentaram valores quantificáveis para o Rutênio, essa técnica detecta os íons metálicos não permitindo avaliar os AINEs e os ligantes axiais em separado, mas que nesse ponto, já influenciaram na captação dos complexos pelas células.

Podemos avaliar nas tabelas 6 e 7, que os valores mensurados estão bem próximos nas linhagens celulares e representaram de 3 a 6% do Rutênio administrado *in vitro*, exceto as células que foram tratadas com RuCetoCl para a linhagem A172 que apresentaram valores de aproximadamente três vezes mais do que a média dos outros tratamentos tanto nesta, quanto na linhagem U87MG. Talvez isso possa estar relacionado com o aumento de 91,4% do índice de apoptose nesta linhagem, verificados no experimento anterior.

Fazendo ainda esse tipo de comparativo, podemos observar que o tratamento RuIBpPF₆ para a linhagem U87MG foi o que teve menores quantidades de Rutênio quantificadas em ICP, mas ainda assim apresentou resultados como aumento da apoptose de 39,7% e diminuição da mitose em 53, 8% para esta linhagem, porém nos ensaios de contagem celular não influenciou de forma significativa na diminuição das células.

Outras observações a partir destas se tornaram necessárias, e para tanto, análises através da microscopia Raman permitiram fazer um mapeamento de áreas específicas nas células, onde depósitos de Rutênio também foram encontrados conforme imagem 48 demonstra a identificação através dos espectros da figura em A e B com concentrações diferentes do

tratamento RuIb_pCl, revela a presença do complexo na faixa de 330 cm⁻¹ (Hanif et al., 2016).

Nesse experimento fizemos a análise das células tratadas apenas com Ibuprofeno para que pudéssemos identificar sua influência e não encontramos no espectro Raman a atribuição do pico correspondente, e depois por espectrometria de massas, na faixa de sua localização (~200) também não foi possível fazer a identificação para o *pellet* de células avaliado.

Já a partir daí confirmada a entrada destes complexos nas células, queríamos entender onde na célula esses tratamentos estariam se concentrando, para isso analisamos as frações celulares. Na análise por ICP já foi possível quantificar íons metálicos na fração nuclear da amostra, mesmo que para o lisado e fração citosólica tenham ficado indetectável pelo equipamento, conforme demonstrado na tabela 8.

Em microscopia Raman foi possível detectar a presença do Rutênio na fração nuclear e no lisado de células, conforme figuras 48A e 49A, o que implica que o tratamento estava presente na fração nuclear da célula, dado promissor, pois sugere a possibilidade de que ocorram interações com o DNA.

Diante dos resultados vistos até então poderíamos afirmar que através desta possível interação que ocorre no núcleo das células, mecanismos como apoptose, mitose, capacidade de migração celular estariam então sendo afetados. Resultados similares foram publicados recentemente (meados de 2016), onde Deepika et al., verificaram a ação de um complexo de Rutênio (II), com ligante Dipirido [3,2- a: 2', 3'-c] Fenazina (dppz – sigla em inglês) em células HeLa, onde houve penetração gradual no citoplasma e acúmulo do complexo no núcleo.

5.3 Análise de PLA₂

Em nossos estudos, uma informação que inicialmente chamou a atenção foi o resultado obtido em qPCR, demonstrado na figura 50, no qual tanto o grupo 4A quanto o 4B tiveram uma expressão bem superior quando comparada ao controle (aproximadamente quatro vezes mais). Diante dessa informação, questionamentos a respeito do restante da via surgiram, e avaliamos também a

expressão de COX-1 e COX-2 na busca de identificar mecanismos de regulação dessa via.

Para COX-1 verificamos que com o tratamento os níveis em comparação ao controle foram discretamente mais altos, já para COX-2, principal alvo dos AINEs estes níveis não apresentaram diferença importante quando comparado ao controle (Figuras 51 e 52), sugerindo que o ibuprofeno presente no complexo rutênico possa não ter encontrado atuação para inibição de COX-2 dentro do espectro de ação desses complexos.

Nos ensaios realizados em 2014, nosso grupo demonstrou que há um balanço entre COX-1, COX-2 e tratamentos com RuBpCl e identificou que a proteína p53 sofria interferência com o uso do complexo. As linhagens U87MG e A172 foram as mais sensíveis ao tratamento, creditando esse resultado ao fato dessas linhagens apresentarem a forma selvagem da p53 (BENADIBA et al., 2014).

Os ensaios para os grupos 4A e 4B foram refeitos pela técnica de PCR convencional, e nessa condição tivemos resultado semelhante, onde ocorre discreto aumento de PLA₂ na expressão do G4B para o grupo tratado e para o G4A o resultado foi um aumento significativo estatisticamente deste grupo em relação ao controle, dado que confirma o ensaio anterior, porém como a técnica quantitativa seria mais precisa e devido a impossibilidade de continuá-la naquele momento, os comparativos ficam direcionados para este último ensaio, que por sua vez, confirma a tendência no aumento das PLA₂.

Essa regulação PLA₂ e COX com certeza apresentam informações importantes, já que elas são os componentes principais no processo inflamatório e estão, conforme os dados apresentados, sendo afetadas pelos complexos.

Para confirmar a atividade das cPLA₂ foi realizado imunoensaio de ELISA com todos os tratamentos em ambas as linhagens, com o objetivo de observar se os tratamentos divergiam entre si neste processo e entre as linhagens.

Identificamos que os tratamentos com os complexos tiveram atividade de cPLA₂ reduzidas em relação ao controle para a linhagem A172, tendo

valores estatisticamente significativos em relação ao controle, os complexos OTf, PF₆ e Ceto.

Neste ensaio avaliamos se o AINE ibuprofeno sozinho influenciaria, porém a atividade de PLA₂ com Ibuprofeno foi muito similar ao controle para esta linhagem, dado interessante que leva a avaliar se os AINEs associados ao complexo de Rutênio poderiam ser carregados sem alterações até locais na célula onde desempenhariam sua ação de forma mais efetiva, sem que ocorresse degradação da molécula. Em síntese, para a linhagem A172 obteve-se um resultado uniforme para os complexos, diminuindo a produção de PLA₂ citosólica ou Grupo 4.

O resultado na linhagem U87MG para os controles (Etanol e Ibuprofeno) foram muito parecidos, já para os complexos houve um aumento na sua produção em relação ao controle, com destaque para o tratamento com ligante OTf que foi estatisticamente significante, lembrando que este foi também o complexo que atuou de forma mais significativa na diminuição de mitoses para esta linhagem apesar de ter captado, de acordo com dados obtidos de ICP-OES, 30 mg/L.

Podemos fazer um comparativo com os resultados obtidos na expressão gênica, que nesta linhagem realmente se confirma uma tendência de cPLA₂ aumentada com o uso dos tratamentos, talvez um mecanismo de compensação da via inflamatória que devido a diminuição de COX-2 e consequentemente prostanoídes, associados diretamente ao desenvolvimento tumoral, numa tentativa de “repor” esses metabólitos aumentem a produção de PLA₂ para que mais ácido araquidônico seja disponibilizado e então manter seu metabolismo necessário para este fim.

Devido as variadas isoformas de PLA₂ estarem presentes em câncer e essa presença ser primordial e desempenhar papel importante na inflamação, acredita-se que essa enzima possa ser um alvo de agentes anticancerígenos. Estudos da interação Rutênio e proteínas, dentre elas PLA₂, seriam possivelmente o mecanismo antitumoral desses complexos (MAJA et al., 2016).

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho conseguimos elucidar que os complexos de Rutênio são captados pelas células e pelos resultados obtidos, esse complexo se acumula no núcleo, sugerindo sua interação com o DNA. A partir dessa constatação podemos inferir que os diversos mecanismos celulares foram afetados por conta dessa interação.

Pudemos observar que todos os complexos de Rutênio utilizados apresentaram diminuição na contagem celular, aumento de apoptose e diminuição da mitose, fatores relevantes quando se trata de tumores e principalmente GBM que é um tumor altamente proliferativo e invasivo. Diante dessa observação estes complexos podem ser considerados candidatos para estudos "*in vivo*", onde constatando sua relevância bioquímica e grau de toxicidade, se tornar uma possibilidade de tratamento no futuro.

A Linhagem U87MG apresentou maior susceptibilidade ao complexo RuI_{Bp}Cl no que diz respeito a proliferação, tendo os resultados mais significativos em concentrações e tempos variados, já a linhagem A172 com menor representatividade estatística em relação aos controles também tendeu a uma diminuição na contagem das células.

Nos ensaios para avaliar os índices mitóticos e apoptóticos conclui-se que os complexos atuam na diminuição das mitoses e aumento da apoptose, com destaque para a linhagem A172 que apresentou os maiores índices de apoptose. A linhagem U87MG sofreu mais com a diminuição das mitoses do que com apoptose. Esses mecanismos são importantes para eleição de novos medicamentos anticâncer, dando a nosso estudo credibilidade para aprofundamento nas pesquisas.

Confirmamos pelas técnicas ICP-OES, Raman, Espectrometria de Massas que os complexos não apenas eram captados como também foram detectados na fração nuclear das células de GBM, o que já nos direciona para entendimento nos mecanismos de atuação no núcleo, DNA e as diversas vias sinalizadoras e proteicas que estariam sendo afetadas.

Componentes importantes das vias inflamatórias como as enzimas PLA₂ G4A e G4B, COX-1 e COX-2 foram influenciadas pelo tratamento com

Ru+AINEs, o que sugere também que outros componentes da via como as PGs poderiam ser mais bem explorados. Já para a atividade de cPLA₂ o resultado foi antagônico entre as linhagens, em U87MG houve uma tendência ao aumento e em A172 vimos uma diminuição na atividade dessa classe de PLA₂.

Todos os complexos de Rutênio tiveram atuação importante neste trabalho, e as linhagens celulares avaliadas também apresentaram resultados independentes, demonstrando a complexidade dos GBMs.

Nas avaliações e resultados obtidos neste trabalho percebemos que o complexo RuIBpCl teve um desempenho melhor em relação as outras moléculas *in vitro*, mas por características como solubilidade serem primordiais no desenvolvimento de drogas para uso *in vivo*, ainda é relevante o uso desses diferentes complexos nesse ambiente de estudos já que essa é a principal diferença entre as moléculas, quimicamente.

Acreditamos que esses resultados sejam os primeiros passos para ampliar os conhecimentos e que contribuirá para estudos mais aprofundados no tratamento de GBM e na qualidade de vida dos pacientes, bem como as novas possibilidades quimioterápicas a partir de complexos metálicos com baixa toxicidade.

Para os próximos passos o estudo da interação que ocorre no núcleo poderá trazer novas respostas dos mecanismos de ação destes complexos, permitindo entender e traçar novos rumos para este tipo de droga.

REFERÊNCIAS*

ACKERMANN, E.J.; KEMPNER, E. S.; DENNIS, E. A. Ca (2+)-independent cytosolic phospholipase A2 from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 12, p. 9227-9233, Mar. 1994.

ADLER, D. H.; COGAN, J. D.; PHILLIPS, J. A.; SCHNETZ-BOUTAUD, N.; MILNE, G. L.; IVERSON, T.; OATES, J. A. Inherited human cPLA 2 α deficiency is associated with impaired eicosanoid biosynthesis, small intestinal ulceration, and platelet dysfunction. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 118, n. 6, p. 2121-2131, Set. 2008.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S. K.; PANDEY, M. K.; SETHI, G. Inflammation and cancer: how hot is the link?. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 72, n. 11, p. 1605-1621, Nov. 2006.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; WALTER, P. **Essential cell biology**. New York: Garland Science, 2013. 610 p.

ALONSO, Fernando; HENSON, Peter M.; LESLIE, Christina C. A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, Amsterdam, v. 878, n. 2, p. 273-280, Set. 1986.

ANDERSON, D. E.; TAYLOR, W. B.; FALLS, H. F.; DAVIDSON, R. T. The nevoid basal cell carcinoma syndrome. **American journal of human genetics**, Baltimore, v. 19, n. 1, p. 12, Jan. 1967.

AQUINO, M.A.S. Diruthenium and diosmium tetracarboxylates: synthesis, physical properties and applications. **Coordination chemistry reviews**, Lausanne, v. 170, n. 1, p. 141-202, Mar. 1998.

BALBOA, M. A., BALSINDE, J., JONES, S. S., DENNIS, E. A. Identity between the Ca²⁺-independent phospholipase A2 enzymes from P388D1 macrophages and Chinese hamster ovary cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 13, p. 8576-8580, Mar. 1997.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BALBOA, M. A.; BALSINDE, J.; WINSTEAD, M. V.; TISCHFIELD, J. A.; DENNIS, E. A. Novel group V phospholipase A2 involved in arachidonic acid mobilization in murine P388D1 macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 50, p. 32381-32384, Dez. Nov. 1996.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature reviews. Cancer**, London, v. 9, n. 5, p. 361, Mai. 2009.

BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer cell**, Cambridge, v. 7, n. 3, p. 211-217, Mar. 2005.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow. **The lancet**, New York, v. 357, n. 9255, p. 539-545, Fev. 2001.

BALSINDE, J.; BALBOA, María A.; DENNIS, Edward A. Antisense inhibition of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A2 blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 46, p. 29317-29321, 1997.

BALSINDE, JESÚS; BALBOA, MARÍA A. Cellular Regulation and Proposed Biological Functions of Group via Calcium-Independent Phospholipase a 2 in activated cells. **CELLULAR SIGNALLING**, Oxford, V. 17, N. 9, P. 1052-1062, Set. 2005.

BAO, S.; MILLER, D. J.; MA, Z.; WOHLTMANN, M.; ENG, G.; RAMANADHAM, S.; TURK, J. Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 37, p. 38194-38200, Jul. 2004.

BAO, S.; LI, Y.; LEI, X.; WOHLTMANN, M.; JIN, W.; BOHRER, A.; TURK, J. Attenuated free cholesterol loading-induced apoptosis but preserved phospholipid composition of peritoneal macrophages from mice that do not express group VIA phospholipase A2. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 37, p. 27100-27114, Jul. 2007.

BAO, S.; SONG, H.; WOHLTMANN, M.; RAMANADHAM, S.; JIN, W.; BOHRER, A.; TURK, J. Insulin secretory responses and phospholipid composition of pancreatic islets from mice that do not express Group VIA phospholipase A2 and effects of metabolic stress on glucose homeostasis. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 281, n. 30, p. 20958-20973, Mai. 2006.

BARABÁSI, ALBERT-LÁSZLÓ. SCALE-FREE NETWORKS: A DECADE AND BEYOND. **SCIENCE**, London, V. 325, N. 5939, P. 412-413, Jul. 2009.

BARABASI, Albert-Laszlo.; OLTVAI, Zoltan N. Network biology: understanding the cell's functional organization. **Nature reviews genetics**, London, v. 5, n. 2, p. 101-113, Fev. 2004.

BASKAKIS, C.; MAGRIOTI, V.; COTTON, N.; STEPHENS, D.; CONSTANTINOU-KOKOTOU, V.; DENNIS, E. A.; KOKOTOS, G. Synthesis of polyfluoro ketones for selective inhibition of human phospholipase A2 enzymes. **Journal of medicinal chemistry**, Washington, v. 51, n. 24, p. 8027-8037, Nov. 2008.

BELINSKY, G. S., RAJAN, T. V., SARIA, E. A., GIARDINA, C., & ROSENBERG, D. W. Expression of secretory phospholipase A2 in colon tumor cells potentiates tumor growth. **Molecular carcinogenesis**, New York, v. 46, n. 2, p. 106-116, Nov. 2007.

BENADIBA, M.; COSTA, I. D. M.; SANTOS, R. L.; SERACHI, F. O.; DE OLIVEIRA SILVA, D.; COLQUHOUN, A. Growth inhibitory effects of the Diruthenium-Ibuprofen compound, [Ru₂Cl (Ibp) 4], in human glioma cells in vitro and in the rat C6 orthotopic glioma in vivo. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, Attiki, v. 19, n. 6, p. 1025-1035, Mai. 2014.

BENADIBA, M.; DOS SANTOS, R. R. P.; DE OLIVEIRA S.D.; COLQUHOUN, A. Inhibition of C6 rat glioma proliferation by [Ru 2 Cl (Ibp) 4] depends on changes in p21, p27, Bax/Bcl2 ratio and mitochondrial membrane potential. **Journal of inorganic biochemistry**, New York, v. 104, n. 9, p. 928-935, Set. 2010.

BENADIBA, M. **Análise da expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, apoptose, angiogênese, invasão e migração de células C6 in vitro e in vivo, após o tratamento com o ácido g-linolênico (GLA) e com um novo complexo dirutênico contendo Ibuprofeno (Ru-Ibp).** 2008. 166 f. Tese de Doutorado (Instituto de Ciências Biomédicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BEN-NERIAH, Y.; KARIN, M. Inflammation meets cancer, with NF-[kappa] B as the matchmaker. **Nature immunology**, London, v. 12, n. 8, p. 715-723, Ago. 2011.

BENSON, V. S.; PIRIE, K.; GREEN, J.; CASABONNE, D.; BERAL, V. Lifestyle factors and primary glioma and meningioma tumours in the Million Women Study cohort. **British journal of cancer**, London, v. 99, n. 1, p. 185-190, Jun. 2008.

BERGAMO, Alberta; SAVA, Gianni. Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases. **Chemical Society Reviews**, London, v. 44, n. 24, p. 8818-8835, 2015.

BERGAMO, A.; MESSORI, L.; PICCIOLI, F.; COCCHIETTO, M.; SAVA, G. Biological role of adduct formation of the ruthenium (III) complex NAMI-A with serum albumin and serum transferrin. **Investigational new drugs**, New York, v. 21, n. 4, p. 401-411, Nov. 2003.

BERK, P. D.; STUMP, D. D. Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. In: **Lipid Binding Proteins within Molecular and Cellular Biochemistry**. Dordrecht: Springer US, 1999. p. 17-31.

BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M. C.; DELGADO-CAÑEDO, A.; LENZ, G.; BATTASTINI, A. M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of C6 and U138-MG glioma cell lines. **European journal of pharmacology**, Amsterdam, v. 532, n. 3, p. 214-222, Fev. 2006.

BIERNAT, W. Molekularne podłoże procesu progresji złośliwości glejaków rozlanych ośrodkowego układu NERWOWEGO. **ONKOL POL**, Wrocław, V. 2, P. 113-9, 1999.

BIRBILIS, T. A.; MATIS, G. K.; ELEFThERIADIS, S. G.; THEODOROPOULOU, E. N.; SIVRIDIS, E. Theodossios A. et al. Spinal metastasis of glioblastoma multiforme: an uncommon suspect?. **Spine**, Hagerstown, v. 35, n. 7, p. E264-E269, Abr. 2010.

BLACKIE, J. A.; BLOOMER, J. C.; BROWN, M. J.; CHENG, H. Y.; HAMMOND, B.; HICKEY, D. M.; MILLINER, K. J. The identification of clinical candidate SB-480848: a potent inhibitor of lipoprotein-associated phospholipase A 2. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, Oxford, v. 13, n. 6, p. 1067-1070, Mar. 2003.

BONVENTRE, J. V.; HUANG, Z.; TAHERI, M. R.; O'LEARY, E.; LI, E.; MOSKOWITZ, M. A.; SAPIRSTEIN, A. Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. **Nature**, London, v. 390, n. 6660, p. 622-625, Dez. 1997.

BRAT, D. J.; CASTELLANO-SANCHEZ, A. A.; HUNTER, S. B.; PECOT, M.; COHEN, C.; HAMMOND, E. H.; VAN MEIR, E. G. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. **Cancer research**, Philadelphia, v. 64, n. 3, p. 920-927, Fev. 2004.

BRIGATI, C.; NOONAN, D. M.; ALBINI, A.; BENELLI, R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes?. **Clinical & experimental metastasis**, Dordrech, v. 19, n. 3, p. 247-258, 2002.

BRIVANLOU, A. H.; DARNELL, J. E. Signal transduction and the control of gene expression. **Science**, London, v. 295, n. 5556, p. 813-818, Fev. 2002.
BUCZYNSKI, M.W.; DUMLAO, D.S.; DENNIS, E.A. Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. **Journal of lipid research**, Memphis, v. 50, n. 6, p. 1015-1038, Jun. 2009.

BUHMEIDA, A.; BENDARDAF, R.; HILSKA, M.; LAINE, J.; COLLAN, Y.; LAATO, M.; PYRHÖNEN, S. PLA2 (group IIA phospholipase A2) as a prognostic determinant in stage II colorectal carcinoma. **Annals of oncology**, London, v. 20, n. 7, p. 1230-1235, Mar. 2009.

BURKE, E.; DENNIS, E.A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of lipid research**, Memphis, v. 50, n. Supplement, p. S237-S242, Abr. 2009.

BURKE, J. E., HSU, Y. H., DEEMS, R. A., LI, S., WOODS, V. L., & DENNIS, E. A. A phospholipid substrate molecule residing in the membrane surface mediates opening of the lid region in group IVA cytosolic phospholipase A2. **Journal of Biological Chemistry**, Memphis, v. 283, n. 45, p. 31227-31236, ago.2008.

BURKE, J.E.; DENNIS, E.A. Phospholipase A2 biochemistry. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, Norwell, v. 23, n. 1, p. 49-59, Fev. 2009.

CHEN, J. ENGLE, S. J.; SEILHAMER, J. J.; TISCHFIELD, J. A. Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca (2+)-dependent phospholipase A2. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 4, p. 2365-2368, Jan. 1994.

CHEN, J.; MCKAY, R.M.; PARADA, L.F. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. **Cell**, Cambridge, v. 149, n. 1, p. 36-47, Mar. 2012.

CHEN, L.; ZOU, X.; WANG, Y.; MAO, Y.; ZHOU, L. Central nervous system tumors: a single center pathology review of 34,140 cases over 60 years. **BMC clinical pathology**, London, v. 13, n. 1, p. 14, Mai. 2013.

CHULADA, P. C.; THOMPSON, M. B.; MAHLER, J. F.; DOYLE, C. M.; GAUL, B. W.; LEE, C.; LANGENBACH, R. Genetic disruption of Ptgs-1, as well as of Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. **Cancer research**, Philadelphia, v. 60, n. 17, p. 4705-4708, Set. 2000.

CLARK, J. D.; LIN, L. L.; KRIZ, R. W.; RAMESHA, C. S.; SULTZMAN, L. A.; LIN, A. Y.; KNOFF, J. L. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. **Cell**, London v. 65, n. 6, p. 1043-1051, Jun.1991.

CLAUDE, A; PORTER, K.R.; PICKELS, E.G. Electron microscope study of chicken tumor cells. **Cancer Research**, Baltimore, v. 7, n. 7, p. 421-430, Jul. 1947.

COBBS, C. S.; HARKINS, L.; SAMANTA, M.; GILLESPIE, G. Y.; BHARARA, S.; KING, P. H.;BRITT, W. J. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. **Cancer research**, Baltimore, v. 62, n. 12, p. 3347-3350, Jun. 2002.

COBBS, C.S. Evolving evidence implicates cytomegalovirus as a promoter of malignant glioma pathogenesis. **Herpesviridae**, London, v. 2, n. 1, p. 10, Out. 2011.

COLOTTA, F.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, New York, v. 30, n. 7, p. 1073-1081, Mai. 2009.

COLQUHOUN, A.; MIYAKE, J. A.; BENADIBA, M. Fatty acids, eicosanoids and cancer. **Nutritional Therapy and Metabolism**, Milano, v. 27, n. 3, p. 105-112, Jul-Set. 2009.

CORMIER, R. T.; HONG, K. H.; HALBERG, R. B.; HAWKINS, T. L.; RICHARDSON, P.; MULHERKAR, R.; LANDER, E. S. Secretory phospholipase Pla₂G2A confers resistance to intestinal tumorigenesis. **Nature genetics**, London, v. 17, n. 1, p. 88-91, Set. 1997.

COTTON, F. Albert; PEDERSEN, Erik. Magnetic and electrochemical properties of transition metal complexes with multiple metal-to-metal bonds. II. Tetrabutyratodiruthenium (n+) with n= 0 and 1. **Inorganic Chemistry**, Attiki, v. 14, n. 2, p. 388-391, Fev.1975.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, London, v. 420, n. 6917, p. 860-867, Dez. 2002.

CUMMINGS, B.S. Phospholipase A₂ as targets for anti-cancer drugs. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 74, n. 7, p. 949-959, Out. 2007.
CUTTS, J. H.; NOBLE, R. L. Estrone-induced mammary tumors in the rat. **Cancer research**, Baltimore, v. 24, n. 7, p. 1116-1123, Ago.1964.

CVETKOIVČ-DOŽIČ, D.; SKENDER-GAZIBARA, M.; DOŽIČ, S. Morphological and molecular features of diffuse infiltrating astrocytoma. *Archive of oncology*, Sremska, v. 12, p. 38-9, 2004.

DARNELL, J.E. Transcription factors as targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 2, n. 10, p. 740-749, Out.2002.

DEEPIKA, N.; DEVI, C. S.; KUMAR, Y. P.; REDDY, K. L.; REDDY, P. KUMAR, D. A.; SATYANARAYANA, S. DNA-binding, cytotoxicity, cellular uptake, apoptosis and photocleavage studies of Ru (II) complexes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 160, p. 142-153, Jul. 2016.

DENIZOT, Y.; CHIANÉA, T.; LABROUSSE, F.; TRUFFINET, V.; DELAGE, M.; MATHONNET, M. Platelet-activating factor and human thyroid cancer. **European journal of endocrinology**, London, v. 153, n. 1, p. 31-40, Jul. 2005.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, p. 13057-13057, Mai. 1994.

DENIZOT, Y.; DE ARMAS, R.; CAIRE, F.; POMMEPUY, I.; TRUFFINET, V.; LABROUSSE, F. Platelet-activating factor and human meningiomas. **Neuropathology and applied neurobiology**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 674-678, Ago. 2006.

DEVITA, V.T.; LAWRENCE, T.S.; ROSENBERG, S.A (Ed.). **Cancer: principles & practice of oncology: primer of the molecular biology of cancer**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. 443 p.

DEVITA, V.T.; LAWRENCE, T.S.; ROSENBERG, S.A. (Eds.). **Cancer: principles and practice of oncology-advances in oncology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. 2374p.

DEVITA, V.T.; LAWRENCE, T.S.; ROSENBERG, S.A. (Eds.). **Cancer: principles and practice of oncology-advances in oncology**. Rosenberg: Lippincott Williams & Wilkins, 1989. 2553 p.

DJINOVIĆ, V.; MOMČILOVIĆ, M.; GRGURIĆ-ŠIPKA, S.; TRAJKOVIĆ, V.; STOJKOVIĆ, M. M.; MILJKOVIĆ, D.; SABO, T. Novel ruthenium complex $K_2 [Ru (dmgly) Cl_4] \cdot 2H_2O$ is toxic to C6 astrocytoma cell line, but not to primary rat astrocytes. **Journal of inorganic biochemistry**, New York, v. 98, n. 12, p. 2168-2173, Dez. 2004.

DONG, Q.; PATEL, M.; SCOTT, K. F.; GRAHAM, G. G.; RUSSELL, P. J.; SVED, P. Oncogenic action of phospholipase A 2 in prostate cancer. **Cancer letters**, Limerick, v. 240, n. 1, p. 9-16, ago. 2006.

DUBINETT, S. M.; SHARMA, S.; HUANG, M.; DOHADWALA, M.; POLD, M.; MAO, J. T. (Eds.) Cyclooxygenase-2 in lung cancer. In: **COX-2**. Los Angeles: Karger Publishers, 2003. p. 138-162.

DUCRAY, F.M.Y.; SANSON, M. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **The New England Journal of Medicine**. Boston, v.360, n.1, p. 1-9. 2009.

EDHEMOVIĆ, I.; SNOJ, M.; KLJUN, A.; & GOLOUH, R. Immunohistochemical localization of group II phospholipase A2 in the tumours and mucosa of the colon and rectum. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 27, n. 6, p. 545-548, Set. 2001.

EGEBLAD, Mi.; NAKASONE, Elizabeth, S.; WERB, Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. **Developmental cell**, Cambridge, v. 18, n. 6, p. 884-901, Jun. 2010.

EINHORN, Lawrence H.; WILLIAMS, Stephen D. The role of cis-platinum in solid-tumor therapy. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 300, n. 6, p. 289-291, Jun. 1979.

ERNST, PETER B.; GOLD, B.D. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. **Annual Reviews in Microbiology**, Galveston, v. 54, n. 1, p. 615-640, 2000.

FAJARDO, Natalia M. P.; MEIJER, C.; KRUYT, Frank AE. The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 118, p. 1-8, Out. 2016.

FERRARA, N.; GERBER, Hans-Peter.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature medicine**, London, v. 9, n. 6, p. 669-676, Jun. 2003.

FOXON, S. P.; PHILLIPS, T.; GILL, M. R.; TOWRIE, M.; PARKER, A. W.; WEBB, M.; THOMAS, J. A. A Multifunctional Light Switch: DNA Binding and Cleavage Properties of a Heterobimetallic Ruthenium–Rhenium Dipyridophenazine Complex. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 46, n. 20, p. 3686-3688, Mai. 2007

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W.; WOOD, R.D.; SCHULTZ, R.A.; ELLENBERGER, T. (Ed.). **DNA repair and mutagenesis**. Washington: American Society for Microbiology Press, 2005. 1118 p.

FRIEDEWALD, W.F.; ROUS, P. The initiating and promoting elements in tumor production: an analysis of the effects of tar, benzpyrene, and methylcholanthrene on rabbit skin. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 80, n. 2, p. 101, Ago.1944.

FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, London, v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, Nov. 2001.

FÜRSTENBERGER, G.; KRIEG, P.; MÜLLER-DECKER, K.; HABENICHT, A. J. R. What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis?. **International journal of cancer**, New York, v. 119, n. 10, p. 2247-2254, Ago. 2006.

GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. **Cell**, Cambridge, v. 135, n. 7, p. 1161-1163, Dez. 2008.

GHOSH, M.; TUCKER, D. E.; BURCHETT, S. A.; LESLIE, C. C. Properties of the Group IV phospholipase A 2 family. **Progress in lipid research**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 487-510, Nov. 2006.

GIJÓN, M.A.; LESLIE, Christina C. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. **Journal of leukocyte biology**, New York, v. 65, n. 3, p. 330-336, Mar. 1999.

GLADSON, C. L.; PRAYSON, Richard A.; LIU, W.I. The pathobiology of glioma tumors. **Annual Review of Pathological Mechanical Disease**, Palo Alto, v. 5, p. 33-50, Set. 2010.

GOMES, R.N.; COLQUHOUN, A. E series prostaglandins alter the proliferative, apoptotic and migratory properties of T98G human glioma cells in vitro. **Lipids in health and disease**, London, v. 11, n. 1, p. 171, Dez. 2012.

GOMES, R.N.; COLQUHOUN, A. E series prostaglandins alter the proliferative, apoptotic and migratory properties of T98G human glioma cells in vitro. **Lipids in health and disease**, London, v. 11, n. 1, p. 171, Set. 2012.

GOODMAN, JORDAN ELLIOT. Tobacco in history: the cultures of dependence. **New York: Routledge**. 97 pgs. 1993 ISBN 0-415-04963-6

GORDON, D.J.; BARBIE, D.A.; D'ANDREA, A.D.; PELLMAN, D. Mechanisms of genetic instability. In: DEVITA JR., V.T.; LAWRENCE T.S.; ROSENBERG, S.A. (Eds.). **Cancer, Principles & Practice of Oncology; Primer of the Molecular Biology of Cancer Philadelphia**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer Business, 2011. p. 26-48.

GOROVETZ, M.; BAEKELANDT, M.; BERNER, A.; TROPE, C. G.; DAVIDSON, B.; REICH, R. The clinical role of phospholipase A 2 isoforms in advanced-stage ovarian carcinoma. **Gynecologic oncology**, New York, v. 103, n. 3, p. 831-840, Dez. 2006.

GRGURIC-SIPKA, S.R.; VILAPLANA, R.A.; PÉREZ, J.M.; FUERTES, M.A.; ALONSO, C.; ALVAREZ, Y.; SABO, T.J.; VI'LCHEZ-GONZA'LEZ, F. Synthesis, characterization, interaction with DNA and cytotoxicity of the new potential antitumour drug cis-K[Ru(eddp)Cl (2)]. **Journal of inorganic biochemistry**, New York, v. 97, n. 2, p. 215-220, Out. 2003.

GRIPS, E.; WENTZENSEN, N.; SUTTER, C.; SEDLACZEK, O.; GEBERT, J.; WEIGEL, R.; HENNERICI, M. Glioblastoma multiforme als Manifestation des Turcot-Syndroms. **Der Nervenarzt**, Berlin, v. 73, n. 2, p. 177-182, Fev. 2002.
GRIVENNIKOV, S.I.; GRETEN, F.R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, Cambridge, v. 140, n. 6, p. 883-899, Mar. 2010.

GRÖSCH, S.; MAIER, T. J.; SCHIFFMANN, S.; GEISLINGER, G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 98, n. 11, p. 736-747, Jun. 2006.

GROSS, L. "Spontaneous" Leukemia Developing in G3H Mice Following Inoculation, In Infancy, with AK-Emkemic*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 76, n. 1, p. 27-32, Jan. 1951.

HAJDU, S.I. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. **Cancer**, New York, v. 117, n. 5, p. 1097-1102, Out. 2011.

HAJDU, S.I. A note from history: landmarks in history of cancer, part 4. **Cancer**, New York, v. 118, n. 20, p. 4914-4928, Mar. 2012.

HAJDU, S.I.; DARVISHIAN, F. A note from history: landmarks in history of cancer, part 5. **Cancer**, New York, v. 119, n. 8, p. 1450-1466, Jan. 2013.

HAJDU, S.I.; VADMAL, M. A note from history: Landmarks in history of cancer, Part 6. **Cancer**, New York, v. 119, n. 23, p. 4058-4082, Set. 2013.

HANIF-UR-REHMAN.; FREITAS, T. E.; GOMES, R. N.; COLQUHOUN, A.; DE OLIVEIRA SILVA, D. Axially-modified paddlewheel diruthenium (II, III)-ibuprofenato metallodrugs and the influence of the structural modification on U87MG and A172 human glioma cell proliferation, apoptosis, mitosis and migration. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 165, p. 181-191, Dez. 2016.

HARTINGER, C. G.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; JAKUPEC, M. A.; KYNAST, B.; ZORBAS, H.; KEPLER, B. K. From bench to bedside—preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis (1H-indazole) ruthenate (III)](KP1019 or FFC14A). **Journal of inorganic biochemistry**, New York, v. 100, n. 5, p. 891-904, Mai. 2006.

HARTWELL, J. L. Survey of Compounds which have been tested for Carcinogenic Activity. **Survey of Compounds which have been tested for Carcinogenic Activity**. Washington: Govt. Printing Office, 1951. 583p.

HASEGAWA, K.; OHASHI, Y.; ISHIKAWA, K.; YASUE, A.; KATO, R.; ACHIWA, Y.; UDAGAWA, Y. Expression of cyclooxygenase-2 in uterine endometrial cancer and anti-tumor effects of a selective COX-2 inhibitor. **International journal of oncology**, Athens, v. 26, n. 5, p. 1419-1428, Mai. 2005.

HE, L.; CHEN, X.; MENG, Z.; WANG, J.; TIAN, K.; LI, T.; SHAO, F. Octahedral ruthenium complexes selectively stabilize G-quadruplexes. **Chemical Communications**, Cambridge, v. 52, n. 52, p. 8095-8098, Abr. 2016.

HEASLEY, L. E.; THALER, S.; NICKS, M.; PRICE, B.; SKORECKI, K.; NEMENOFF, R. A. Induction of cytosolic phospholipase A2 by oncogenic Ras in human non-small cell lung cancer. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 23, p. 14501-14504, Jun. 1997.

HEGI, M. E.; DISERENS, A. C.; GORLIA, T.; HAMOU, M. F., DE TRIBOLET, N.; WELLER, M.; BROMBERG, J. E. HEGI, Monika E. et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 352, n. 10, p. 997-1003, Mar. 2005.

HOLLAND, James F.; FREI, E. (Ed.). **Cancer medicine**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1973.

HOOKS, S. B.; CUMMINGS, B.S. Role of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in cell growth and signaling. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 76, n. 9, p. 1059-1067, Out. 2008.

HUDSON, J. D.; SHOAIBI, M. A.; MAESTRO, R.; CARNERO, A.; HANNON, G. J.; BEACH, D. H. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 190, n. 10, p. 1375-1382, Nov.1999.

HUEBNER, R. J.; TODARO, G. J. Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 64, n. 3, p. 1087-1094, Set.1969.

HUGGINS, C.; HODGES, C. V. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. **Cancer research**, Philadelphia, v. 1, n. 4, p. 293-297, Mar. 1941.

HUGGINS, C.; MASINA, M. H.; EICHELBERGER, L.; WHARTON, J. D. Quantitative studies of prostatic secretion: I. Characteristics of the normal secretion; the influence of thyroid, suprarenal, and testis extirpation and androgen substitution on the prostatic output. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 70, n. 6, p. 543, Nov. 1939.

ILSLEY, J. N.; NAKANISHI, M.; FLYNN, C.; BELINSKY, G. S.; DE GUISE, S.; ADIB, J. N.; ROSENBERG, D. W. Cytoplasmic phospholipase A₂ deletion enhances colon tumorigenesis. **Cancer research**, Philadelphia, v. 65, n. 7, p. 2636-2643, Abr. 2005.

INCA. **Estimativa 2016 Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp>>. Acesso em: 18 Jun. 2017.

Iñiguez, M. A.; Rodríguez, A.; Volpert, O. V.; Fresno, M.; Redondo, J. M. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. **Trends in molecular medicine**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 73-78, Fev. 2003.

ISHIBASHI, M.; BOTTONE, F. G.; TANIURA, S.; KAMITANI, H.; WATANABE, T.; ELING, T. E. The cyclooxygenase inhibitor indomethacin modulates gene expression and represses the extracellular matrix protein laminin γ 1 in human glioblastoma cells. **Experimental cell research**, Venetiis, Orlando, v. 302, n. 2, p. 244-252, Jan. 2005.

KABAT, G. C.; ETGEN, A. M.; ROHAN, T. E. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma?. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, Philadelphia, v. 19, n. 10, p. 2421-2427, out. 2010.

KARCHER, S.; STEINER, H. H.; AHMADI, R.; ZOUBAA, S.; VASVARI, G.; BAUER, H.; HEROLD-MENDE, C. Different angiogenic phenotypes in primary and secondary glioblastomas. **International journal of cancer**, New York, v. 118, n. 9, p. 2182-2189, Dez. 2006.

KARIN, M. Apparition de cancers de la mamelle chez la souris male, etc. **Comptes rendus academie des sciences**, Paris, v. 195, n.1, p. 630-632, Jul-Dez. 1932.

KARIN, M. Nuclear factor-[kappa] B in cancer development and progression. **Nature**, Londres, v. 441, n. 7092, p. 431, Mai. 2006.

KARIN, M.; GRETEN, F.R. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 5, n. 10, p. 749-759, Out. 2005.

KASHIWAGI, M.; FRIESS, H.; UHL, W.; BERBERAT, P.; ABOU-SHADY, M.; MARTIGNONI, M.; BÜCHLER, M. W. Group II and IV phospholipase A2 are produced in human pancreatic cancer cells and influence prognosis. **Gut**, London, v. 45, n. 4, p. 605-612, Jun.1999.

KATSETOS, C. D.; DRÁBEROVÁ, E.; LEGIDO, A.; DUMONTET, C.; DRÁBER, P. Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. I. class III β -tubulin. **Journal of cellular physiology**, New York, v. 221, n. 3, p. 505-513, Jul. 2009.

KAUR, B.; TAN, C.; BRAT, D. J. Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas. **Journal of neuro-oncology**, New York, v. 70, n. 2, p. 229-243, Nov. 2004.

KESSENBROCK, Kai.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, Cambrige, v. 141, n. 1, p. 52-67, Abr. 2010.

KITAGAWA, M.; HAYAKAWA, T.; KONDO, T.; SHIBATA, T., SAKAI, Y.; SOBAJIMA, H.; NAKAE, Y. The diagnostic value of serum pancreatic phospholipase A2 (PLA2) in pancreatic diseases. **Gastroenterologia Japonica**, Tokyo, v. 26, n. 1, p. 62-68, Fev. 1991.

KISLIN, K. L.; MCDONOUGH, W. S.; ESCHBACHER, J. M.; ARMSTRONG, B. A.; BERENS, M. E. NHERF-1: modulator of glioblastoma cell migration and invasion. **Neoplasia**, New York, v. 11, n. 4, p. 377IN7-387, Apr. 2009.

KITAMURA, T.; QIAN, B.; POLLARD, J.W. Immune cell promotion of metastasis. **Nature reviews Immunology**, London, v. 15, n. 2, p. 73, Fev. 2015.

KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. **Neuro-oncology**, Boston, v. 1, n. 1, p. 44-51, Jan. 1999.

KLEIHUES, Paul; CAVENEE, Webster K. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. In: **Pathology and genetics of tumours of the nervous system**. Lyon: IARC Press, 2000.

KRAMER, R. M., ROBERTS, E. F., MANETTA, J., & PUTNAM, J. E. The Ca²⁺(+)-sensitive cytosolic phospholipase A2 is a 100-kDa protein in human monoblast U937 cells. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 8, p. 5268-5272, Mar. 1991.

KRAMER, R. M.; CHECANI, G. C.; DEYKIN, A.; PRITZKER, C. R.; DEYKIN, D. Solubilization and properties of Ca²⁺-dependent human platelet phospholipase A2. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, Amsterdam, v. 878, n. 3, p. 394-403, out. 1986.

KRAMER, R. M.; HESSION, C.; JOHANSEN, B.; HAYES, G.; MCGRAY, P.; CHOW, E. P.; PEPINSKY, R. B. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, n. 10, p. 5768-5775, Abr. 1989.

KUCHLER, K.; GMACHL, M.; SIPPL, M. J.; KREIL, G. Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honeybee venom glands. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 184, n. 1, p. 249-254, Set.1989.

KULBE, H.; THOMPSON, R.; WILSON, J. L.; ROBINSON, S.; HAGEMANN, T.; FATAH, R.; BALKWILL, F. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. **Cancer research**, Philadelphia, v. 67, n. 2, p. 585-592, Jan. 2007.

KÜRZEL, F.; HAGEL, C. H.; ZAPF, S.; MEISSNER, H.; WESTPHAL, M.; GIESE, A. Cyclo-oxygenase inhibitors and thromboxane synthase inhibitors differentially regulate migration arrest, growth inhibition and apoptosis in human glioma cells. **Acta neurochirurgica**, Wien, v. 144, n. 1, p. 71-87, Jan. 2002.

LACASSAGNE, A. Apparition de cancers de la mamelle chez la souris male, soumise a des injections de folliculine. **CR Acad. Sci.(Paris)**, Paris, v. 195, n. 630-632, 1932.

LAGORCE-PAGÈS, C.; PARAF, F.; WENDUM, D.; MARTIN, A.; FLÉJOU, J. F. Expression of inflammatory secretory phospholipase A2 and cytosolic phospholipase A2 in premalignant and malignant Barrett's oesophagus. **Virchows Archiv**, Berlin, v. 444, n. 5, p. 426-435, Mai. 2004.

LAKHAN, Shaheen E.; HARLE, Lindsey. Difficult diagnosis of brainstem glioblastoma multiforme in a woman: a case report and review of the literature. **Journal of medical case reports**, London, v. 3, n. 1, p. 87, out. 2009.

LAMBEAU, G.; GELB, M.H. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 77, p. 495-520, Jul. 2008.

LANCASTER, M. C.; JENKINS, F. P.; PHILP, J. McL. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nature**, London, v. 192, n. 4807, p. 1095-1096, Dez. 1961.

LAVI, S.; HERRMANN, J.; LAVI, R.; MCCONNELL, J. P.; LERMAN, L. O., & LERMAN, A. Role of lipoprotein-associated phospholipase A 2 in atherosclerosis. **Current atherosclerosis reports**, Philadelphia, v. 10, n. 3, p. 230-235, Abr. 2008.

LAYE, J. P.; GILL, J.H. Phospholipase a 2 expression in tumours: a target for therapeutic intervention?. **Drug discovery today**, Kidlington, V. 8, N. 15, P. 710-716, Ago. 2003.

LERMAN, Amir; MCCONNELL, Joseph P. Lipoprotein-associated phospholipase A 2: a risk marker or a risk factor?. **The American journal of cardiology**, New York, v. 101, n. 12, p. S11-S22, jun. 2008.

LEVINE, STEVEN A.; MCKEEVER, PAUL E.; GREENBERG, HARRY S. PRIMARY CEREBELLAR GLIOBLASTOMA MULTIFORME. **JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY**, New York, v. 5, N. 3, P. 231-236, Out. 1987.

LEWIS, A. C. W.; DAVISON, B. C. C. Familial ovarian cancer. **The Lancet**, London, v. 294, n. 7614, p. 235-237, Ago. 1969.

LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta neuropathologica**, Berlin, v. 114, n. 2, p. 97-109, Ago. 2007.

LOUIS, D. N.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; VON DEIMLING, A.; FIGARELLA-BRANGER, D.; CAVENEE, W. K.; ELLISON, D. W. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta neuropathologica**, Berlin, v. 131, n. 6, p. 803-820, Jun. 2016.

LUN, M.; LOK, E.; GAUTAM, S.; WU, E.; WONG, E. T. The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. **Journal of neuro-oncology**, New York, v. 105, n. 2, p. 261-273, Nov. 2011.

LYNCH, H. T.; ANDERSON, D. E.; KRUSH, A. J. Heredity and intraocular malignant melanoma: Study of two families and review of forty-five cases. **Cancer**, New York, v. 21, n. 1, p. 119-125, Jan. 1968.

LYNCH, H. T.; SHAW, M.W.; MAGNUSON, C. W.; LARSEN, A. L.; KRUSH, A. J. Hereditary factors in cancer: study of two large midwestern kindreds. **Archives of internal medicine**, Chicago, v. 117, n. 2, p. 206-212, Fev. 1966.

MACKENZIE, I.; ROUS, P. The experimental disclosure of latent neoplastic changes in tarred skin. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 73, n. 3, p. 391, Fev. 1941.

MACPHEE, M.; CHEPENIK, K. P.; LIDDELL, R. A.; NELSON, K. K.; SIRACUSA, L. D.; BUCHBERG, A. M. The secretory phospholipase A2 gene is a candidate for the Mom1 locus, a major modifier of ApcMin-induced intestinal neoplasia. **Cell**, Cambridge, v. 81, n. 6, p. 957-966, Jun. 1995.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**, London, v. 454, n. 7203, p. 436, Jul. 2008.

MATHONNET, M.; DESCOTTES, B.; VALLEIX, D.; TRUFFINET, V.; LABROUSSE, F.; DENIZOT, Y. Platelet-activating factor in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v. 12, n. 17, p. 2773, Mai. 2006.

MCKEW, J. C.; LEE, K. L.; SHEN, M. W.; THAKKER, P.; FOLEY, M. A.; BEHNKE, M. L.; CHEN, L. Indole Cytosolic Phospholipase A2 α Inhibitors: Discovery and in Vitro and in Vivo Characterization of 4- {3-[5-Chloro-2-(2-[(3, 4-dichlorobenzyl) sulfonyl] amino} ethyl)-1-(diphenylmethyl)-1 H-indol-3-yl] propyl} benzoic Acid, Efipladib. **Journal of medicinal chemistry**, Washington, v. 51, n. 12, p. 3388-3413, Mai. 2008.

MCLENDON, R.; FRIEDMAN, A.; BIGNER, D.; VAN MEIR, E. G.; BRAT, D. J.; MASTROGIANAKIS, G. M.; YUNG, W. A. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, London, v. 455, n. 7216, p. 1061-1068, Out. 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, Cambridge, v. 140, n. 6, p. 771-776, Mar. 2010.

METCALFE, C.; THOMAS, J.A. Kinetically inert transition metal complexes that reversibly bind to DNA. **Chemical Society Reviews**, London, v. 32, n. 4, p. 215-224, Mai. 2003.

MEYER, A. M.; DWYER-NIELD, L. D.; HURTEAU, G. J.; KEITH, R. L.; O'LEARY, E.; YOU, M.; MALKINSON, A. M. Decreased lung tumorigenesis in mice genetically deficient in cytosolic phospholipase A2. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 1517-1524, Ago. 2004.

MISHRA, R.S.; CARNEVALE, K.A.; CATHCART, Martha K. iPLA2 β : front and center in human monocyte chemotaxis to MCP-1. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 205, n. 2, p. 347-359, Jan. 2008.

MIYAKE, J. A.; BENADIBA, M.; RIBEIRO, G.; SILVA, D. D. O.; COLQUHOUN, A. Novel Ruthenium–Gamma-linolenic Acid Complex Inhibits C6 Rat Glioma Cell Proliferation In Vitro and in the Orthotopic C6 Model In Vivo After Osmotic Pump Infusion. **Anticancer research**, Attiki, v. 34, n. 4, p. 1901-1912, Abr. 2014.

MIYAKE, J. A.; BENADIBA, M.; RIBEIRO, G.; SILVA, D. D. O.; COLQUHOUN, A. Novel Ruthenium–Gamma-linolenic Acid Complex Inhibits C6 Rat Glioma Cell Proliferation In Vitro and in the Orthotopic C6 Model In Vivo After Osmotic

Pump Infusion. **Anticancer research**, Attiki, v. 34, n. 4, p. 1901-1911, Abr. 2014.

MOHLER, E. R.; BALLANTYNE, C. M.; DAVIDSON, M. H.; HANEFELD, M.; RUILOPE, L. M.; JOHNSON, J. L. The effect of darapladib on plasma lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity and cardiovascular biomarkers in patients with stable coronary heart disease or coronary heart disease risk equivalent: the results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of the American College of Cardiology**, Chicago, v. 51, n. 17, p. 1632-1641, Abr. 2008.

MOOLENAAR, W. H.; KRANENBURG, O.; POSTMA, F. R.; ZONDAG, G. C. Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. **Current opinion in cell biology**, London, v. 9, n. 2, p. 168-173, Abr. 1997.

MOORE, M. P.; RODNEY, S. B.; MICHAEL, L. H.; GAVIN, P. R. Intracranial tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 759-777, Jul. 1996.

MOORE, R.J.; OWENS, D.M.; STAMP, G.; ARNOTT, C.; BURKE, F.; EAST, N.; KOLLIAS, G. Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. **Nature medicine**, New York, v. 5, n. 7, Jul. 1999.

MOORTHY, R.K.; RAJSHEKHAR, V. Development of glioblastoma multiforme following traumatic cerebral contusion: case report and review of literature. **Surgical neurology**, New York v. 61, n. 2, p. 180-184, Feb. 2004.

MORENO, J.J. New aspects of the role of hydroxyeicosatetraenoic acids in cell growth and cancer development. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 77, n. 1, p. 1-10, Jan. 2009.

MORROW, J. D.; ROBERTS, L.J(EDs.). Lipid-derived autacoids: eicosanoids and platelet-activating factor. In: Hardman, J.G.; Limbird L.E.; Gilman A.G. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10th ed. New York: McGraw-Hill. McGraw-Hill-International. P. 669-685.

MOUNIER, C. M.; WENDUM, D.; GREENSPAN, E.; FLEJOU, J. F.; ROSENBERG, D. W.; LAMBEAU, G. Distinct expression pattern of the full set of secreted phospholipases A₂ in human colorectal adenocarcinomas: sPLA₂-III as a biomarker candidate. **British Journal of Cancer**, London, v. 98, n. 3, p. 587-595, Jan. 2008.

NATHOO, N.; BARNETT, G. H.; GOLUBIC, M. The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. **Journal of clinical pathology**, London, v. 57, n. 1, p. 6-13, Jun. 2004.

NAYAK, A.; RALTE, A. M.; SHARMA, M. C.; SINGH, V. P.; MAHAPATRA, A. K.; MEHTA, V. S.; SARKAR, C. p53 protein alterations in adult astrocytic tumors and oligodendrogliomas. **Neurology India**, Mumbai v. 52, n. 2, p. 228, Jun. 2004.

NEŠIĆ, M.; POPOVIĆ, I.; LESKOVAC, A.; PETKOVIĆ, M. Biological activity and binding properties of [Ru (II)(dcbpy) 2Cl₂] complex to bovine serum albumin, phospholipase A2 and glutathione. **BioMetals**, Dordrecht, v. 29, n. 5, p. 921-933, Out. 2016.

NEW, P. Cyclooxygenase in the treatment of glioma: its complex role in signal transduction. **Cancer Control**, Tampa, v. 11, n. 3, p. 152-164, May-Jun. 2004.

NIEDER, C.; GROSU, A. L.; MOLLS, M. A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas. **Cancer treatment reviews**, London, v. 26, n. 6, p. 397-409, Dez. 2000.

NOWELL, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, Washington, v. 194, n. 4260, p. 23-28, Out. 1976.

NUTT, C.L.; MATTHEWS, R.T.; HOCKFIELD, S. Glial tumor invasion: a role for the upregulation and cleavage of BEHAB/brevican. **The Neuroscientist**, Baltimore v. 7, n. 2, p. 113-122, Abr. 2001.

OHGAKI, Hi.; KLEIHUES, P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer science**, Tokyo, v. 100, n. 12, p. 2235-2241, Ago. 2009.

OKA, Y.; OGAWA, M.; MATSUDA, Y.; MURATA, A.; NISHIJIMA, J.; MIYAUCHI, K.; MORI, T. Serum immunoreactive pancreatic phospholipase A2 in patients with various malignant tumors. **Enzyme**, new York, v. 43, n. 2, p. 80-88, Jan. 1989.

ONG, W. Y.; FAROOQUI, T.; KOKOTOS, G.; FAROOQUI, A. A. Synthetic and natural inhibitors of phospholipases A2: their importance for understanding and treatment of neurological disorders. **ACS chemical neuroscience**, Washington, v. 6, n. 6, p. 814-831, Abr. 2015.

OSHIMA, H.; MATSUNAGA, A.; FUJIMURA, T.; TSUKAMOTO, T.; TAKETO, M. M.; OSHIMA, M. Carcinogenesis in mouse stomach by simultaneous activation of the Wnt signaling and prostaglandin E 2 pathway. **Gastroenterology**, Bethesda, v. 131, n. 4, p. 1086-1095, Out. 2006.

OSHIMA, M.; DINCHUK, J. E.; KARGMAN, S. L.; OSHIMA, H.; HANCOCK, B.; KWONG, E.; TAKETO, M. M. Suppression of intestinal polyposis in Apc Δ 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **Cell**, Cambridge, v. 87, n. 5, p. 803-809, Nov.1996.

ÖSTERSTRÖM, A.; DIMBERG, J.; FRANSÉN, K.; SÖDERKVIST, P. Expression of cytosolic and group X secretory phospholipase A 2 genes in human colorectal adenocarcinomas. **Cancer letters**, Limerick, v. 182, n. 2, p. 175-182, Ago.2002.

PADMALATHA, C.; HARRUFF, R. C.; GANICK, D.; HAFEZ, G. B. Glioblastoma multiforme with tuberous sclerosis. Report of a case. **Archives of pathology & laboratory medicine**, Chicago, v. 104, n. 12, p. 649, Dez. 1980.

PAGE, S.M.; BOSS, S. R.; BARKER, P.D. Tuning heavy metal compounds for anti-tumor activity: is diversity the key to ruthenium's success?. **Future medicinal chemistry**, Londres, v. 1, n. 3, p. 541-559, Jun. 2009.

PANEL, V.; BOËLLE, P. Y.; AYALA-SANMARTIN, J.; JOUNIAUX, A. M.; HAMELIN, R.; MASLIAH, J.; WENDUM, D. Cytoplasmic phospholipase A2 expression in human colon adenocarcinoma is correlated with cyclooxygenase-2 expression and contributes to prostaglandin E2 production. **Cancer letters**, Limerick, v. 243, n. 2, p. 255-263, Nov. 2006.

PARKIN, D. MAXWELL; BRAY, F. I.; DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European journal of cancer**, Oxford, v. 37, p. 4-66, Out. 2001.

PERDIKI, M.;KORKOLOPOULOU, P.; THYMARA, I.; AGROGIANNIS, G.; PIPERI, C.; BOVIATIS, E.; PATSOURIS, E. Cyclooxygenase-2 expression in astrocytomas. Relationship with microvascular parameters, angiogenic factors expression and survival. **Molecular and cellular biochemistry**, ordrecht, v. 295, n. 1, p. 75-83, Jul. 2007.

PERSANO, L.; RAMPAZZO, E.; BASSO, G.; VIOLA, G. Glioblastoma cancer stem cells: role of the microenvironment and therapeutic targeting. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 85, n. 5, p. 612-622, Mar. 2013.

PFAFFL, Michael W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, London, v. 29, n. 9, p. e45-e45, Mai. 2001.

PHAM, H.; CHEN, M.; LI, A.; KING, J.; ANGST, E.; DAWSON, D. W.; EIBL, G. Loss of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase increases prostaglandin E2 in pancreatic tumors. **Pancreas**, New York, v. 39, n. 3, p. 332, 2010.

PIKARSKY, E.; PORAT, R. M.; STEIN, I.; ABRAMOVITCH, R. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. **Nature**, London, v. 431, n. 7007, p. 461, Set. 2004.

POLLARD, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nature reviews. Cancer**, London, v. 4, n. 1, p. 71, Jan. 2004.
POLO, S. E.; JACKSON, S. P. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. **Genes & development**, Cold Spring Harbor, v. 25, n. 5, p. 409-433, Jun. 2011.

POPIVANNOVA, B. K.; KITAMURA, K.; WU, Y.; KONDO, T.; KAGAYA, T.; KANEKO, S.; MUKAIDA, N. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 118, n. 2, p. 560-570, Jan. 2008.

PRAML, C.; AMLER, L. C.; DIHLMANN, S.; FINKE, L. H.; SCHLAG, P.; SCHWAB, M. colorectal carcinoma derived cell lines and in normal colonic mucosa. **Oncogene**, Basingstoke, v. 17, p. 2009-2012, mai.1998.

RAJESH, Y.; PAL, I.; BANIK, P.; CHAKRABORTY, S.; BORKAR, S. A.; DEY, G.; MANDAL, M. Insights into molecular therapy of glioma: current challenges and next generation blueprint. **Acta Pharmacologica Sinica**, Beijing, V. 38 n. p. 591-613, Mar. 2017.

RAMANADHAM, S.; YARASHESKI, K. E.; SILVA, M. J.; WOHLTMANN, M.; NOVACK, D. V.; CHRISTIANSEN, B.; TURK, J. Age-related changes in bone morphology are accelerated in group VIA phospholipase A 2 (iPLA 2 β)-null mice. **The American journal of pathology**, New York, v. 172, n. 4, p. 868-881, Abr.2008.

REYNOLDS, L. J.; HUGHES, L. L.; LOUIS, A. I.; KRAMER, R. M.; DENNIS, E. A. Metal ion and salt effects on the phospholipase A 2, lysophospholipase, and transacylase activities of human cytosolic phospholipase A 2. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, Amisterdam, v. 1167, n. 3, p. 272-280, Abr. 1993.

RIBEIRO, G.; BENADIBA, M.; COLQUHOUN, A.; DE OLIVEIRA SILVA, D. Diruthenium (II, III) complexes of ibuprofen, aspirin, naproxen and indomethacin non-steroidal anti-inflammatory drugs: Synthesis, characterization and their effects on tumor-cell proliferation. **Polyhedron**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 1131-1137, Fev. 2008.

RIBEIRO, G. **Complexos de dirutênio com os fármacos ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, naproxeno, indometacina, e com ácido γ -linolêncio: Síntese, caracterização, avaliação da ação antiproliferativa sobre células tumorais e estudo da interação da unidade dimetálica com adenina e adenosina**. 2006. 157 f. Tese de Doutorado (Instituto de Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

RIGGINS, G. J.; MARKOWITZ, S.; WILSON, J. K.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Absence of secretory phospholipase A2 gene alterations in human colorectal cancer. **Cancer research**, Denville, v. 55, n. 22, p. 5184-5186, Nov.1995.

ROFFO, A.H. (Ed.). **Correlacion del valor cancerigeno del alquitran de tabaco con el de hulla**. Buenos Aires: Separata del Boletín del Instituto de Medicina Experimental, 1941. 16 p.

ROUS, P.; KIDD, J.G. Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states: a study of the tar tumors of rabbits. **The Journal of experimental medicine**, New York v. 73, n. 3, p. 365, Fev. 1941.

SAEGUSA, J.; AKAKURA, N.; WU, C. Y.; HOOGLAND, C.; MA, Z.; LAM, K. S.; TAKADA, Y. Pro-inflammatory secretory phospholipase A2 type IIA binds to integrins $\alpha\beta 3$ and $\alpha 4\beta 1$ and induces proliferation of monocytic cells in an integrin-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 283, n. 38, p. 26107-26115, Jul. 2008.

SAMUELS, Y.; BARDELLI, A.; LÓPEZ-OTÍN, C. THE CANCER GENOME. IN: DEVITA JR, V.T.; LAWRENCE, T.S.; ROSENBERG S.A. (Eds). **Cancer, Principles & Practice of Oncology, Primer of the Molecular Biology of Cancer**, Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, 2011, p.25.

SANDLER, R. S.; HALABI, S.; BARON, J. A.; BUDINGER, S.; PASKETT, E.; KERESZTES, R.; STEINBACH, G. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, Boston, Mar. v. 348, n. 10, p. 883-890, 2003.

SANLI, A. M.; TURKOGLU, E.; DOLGUN, H.; SEKERCI, Z. Unusual manifestations of primary Glioblastoma Multiforme: A report of three cases. **Surgical neurology international**, Mumbai, v. 1, Dez. 2010.

SAVA, G.; CLERICI, K.; CAPOZZI, I.; COCCHIETTO, M.; GAGLIARDI, R.; ALESSIO, E.; PERBELLINI, A. Reduction of lung metastasis by ImH [trans-RuCl₄ (DMSO) Im]: mechanism of the selective action investigated on mouse tumors. **Anti-Cancer Drugs**, London, v. 10, n. 1, p. 129, Jan. 1999.

SAVA, G.; PACOR, S.; BERGAMO, A.; COCCHIETTO, M.; MESTRONI, G.; ALESSIO, E. Effects of ruthenium complexes on experimental tumors: irrelevance of cytotoxicity for metastasis inhibition. **Chemico-biological interactions**, Limerick, v. 95, n. 1, p. 109-126, Mar. 1995.

SAVA, G.; ZORZET, S.; TURRIN, C.; VITA, F.; SORANZO, M.; ZABUCCHI, G.; SARTOR, L. Dual Action of NAMI-A in Inhibition of Solid Tumor Metastasis. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 9, n. 5, p. 1898-1905, Mai. 2003.

SCHALOSKE, Ralph H.; DENNIS, Edward A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, Nov. 2006.

SCHETTER, Aaron J.; HEEGAARD, Niels HH; HARRIS, Curtis C. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. **Carcinogenesis**, New York, v. 31, n. 1, p. 37-49, Dez. 2009.

SCHIMKE, R. N.; HARTMANN, W. H.; PROUT, T. E.; RIMOIN, D. L. Syndrome of bilateral pheochromocytoma, medullary thyroid carcinoma and multiple neuromas: a possible regulatory defect in the differentiation of chromaffin tissue. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 279, n. 1, p. 1-7, Jul. 1968.

SCHLUGA, P.; HARTINGER, C. G.; EGGER, A.; REISNER, E.; GALANSKI, M.; JAKUPEC, M. A.; KEPPLER, B. K. Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium (III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP. **Dalton transactions**, Cambridge, n. 14, p. 1796-1802, Ago. 2006.

SCHOPPMANN, S. F.; BIRNER, P.; STÖCKL, J.; KALT, R.; ULLRICH, R.; CAUCIG, C.; KERJASCHKI, D. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. **The American journal of pathology**, New York, v. 161, n. 3, p. 947-956, Set. 2002.

SCHULTZ, S.; PINSKY, G. S.; WU, N. C.; CHAMBERLAIN, M. C.; RODRIGO, A. S.; MARTIN, S. E. Fine needle aspiration diagnosis of extracranial glioblastoma multiforme: Case report and review of the literature. **CytoJournal**, London, v. 2, n. 1, p. 19, Nov. 2005.

SCHWARTZBAUM, J. A.; FISHER, J. L.; ALDAPE, K. D.; WRENSCH, M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. **Nature clinical practice Neurology**, London, v. 2, n. 9, p. 494-503, set. 2006.

SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. **Science (New York, NY)**, New York, v. 250, n. 4987, p. 1541, Dez.1990.

SCOTT, K. F.; SAJINOVIC, M.; HEIN, J.; NIXDORF, S.; GALETTIS, P.; LIAUW, W.; RUSSELL, P. J. Emerging roles for phospholipase A 2 enzymes in cancer. **Biochimie**, Paris, v. 92, n. 6, p. 601-610, Jun. 2010.

SEILHAMER, J. J.; PRUZANSKI, W.; VADAS, P., PLANT, S.; MILLER, J. A.; KLOSS, J.; JOHNSON, L. K. Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritis synovial fluid. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, n. 10, p. 5335-5338, Abr. 1989.

SERRUYS, P. W.; GARCÍA-GARCÍA, H. M.; BUSZMAN, P.; ERNE, P.; VERHEYE, S.; ASCHERMANN, M.; VON BIRGELEN, C. Effects of the direct lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitor darapladib on human coronary atherosclerotic plaque. **Circulation**, Hagerstown, v. 118, n. 11, p. 1172-1182, Set. 2008.

SHARP, J. D.; WHITE, D. L.; CHIOU, X. G.; GOODSON, T.; GAMBOA, G. C.; MCCLURE, D.; SPORTSMAN, J. R. Molecular cloning and expression of human Ca (2+)-sensitive cytosolic phospholipase A2. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 23, p. 14850-14853, Ago. 1991.

SHONO, T.; TOFILON, P. J.; BRUNER, J. M.; OWOLABI, O.; LANG, F. F. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas. **Cancer research**, Philadelphia, v. 61, n. 11, p. 4375-4381, Jun. 2001.

SIMPSON, J. R.; HORTON, J.; SCOTT, C.; CURRAN, W. J.; RUBIN, P.; FISCHBACH, J.; WEINSTEIN, A. S. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, Elmsford, v. 26, n. 2, p. 239-244, Mai.1993.

SINGER, A. G.; GHOMASHCHI, F.; LE CALVEZ, C.; BOLLINGER, J.; BEZZINE, S.; ROUAULT, M.; GELB, M. H. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 50, p. 48535-48549, Set. 2002.

SIX, D.A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A 2 enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam, v. 1488, n. 1, p. 1-19, Out. 2000.

SMITH, M. W.; YUE, Z. N.; GEISS, G. K.; SADOVNIKOVA, N. Y.; CARTER, V. S.; BOIX, L.; BRUIX, J. Identification of novel tumor markers in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. **Cancer research**, Philadelphia, v. 63, n. 4, p. 859-864, Fev. 2003.

SPECENIER, P. Bevacizumab in glioblastoma multiforme. **Expert review of anticancer therapy**, London, v. 12, n. 1, p. 9-18, Jan. 2012.

SPINELLI, V.; CHINOT, O.; CABANIOLS, C.; GIORGI, R.; ALLA, P.; LEHUCHER-MICHEL, M. P. Occupational and environmental risk factors for brain cancer: a pilot case-control study in France. **La Presse Medicale**, Paris, v. 39, n. 2, p. e35-e44, Fev. 2010.

SPITZ, S.; MAGUIGAN, W. H.; DOBRINER, K. The carcinogenic action of benzidine. **Cancer**, New York, v. 3, n. 5, p. 789-804, Mai. 1950.

STEPHENS, J. W. W.; MYERS, W. The action of cobra poison on the blood: a contribution to the study of passive immunity. **The Journal of Pathology**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 279-301, mar. 1898.

STEWART, S.E. Leukemia in mice produced by a filterable agent present in AKR leukemic tissues with notes on a sarcoma produced by the same agent. In: DIV JOHN WILEY; SONS INC. **Anatomical Record**. New York: WILEY-LISS, 1953. p. 532-532.

SUN, B.; ZHANG, X.; TALATHI, S.; CUMMINGS, B. S. Inhibition of Ca²⁺-independent phospholipase A2 decreases prostate cancer cell growth by p53-dependent and independent mechanisms. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 326, n. 1, p. 59-68, Jul. 2008.

SUNDERLAND, D.A.; SMITH, W. E.; SUGIURA, K. The pathology and growth behavior of experimental tumors induced by certain petroleum products. **Cancer**, New York, v. 4, n. 6, p. 1232-1245, Nov. 1951.

SURREL, F.; JEMEL, I.; BOILARD, E.; BOLLINGER, J. G.; PAYRE, C.; MOUNIER, C. M.; LAMBEAU, G. Group X phospholipase A2 stimulates the proliferation of colon cancer cells by producing various lipid mediators. **Molecular pharmacology**, Bethesda, v. 76, n. 4, p. 778-790, Out. 2009.

SUTER, C.M.; MARTIN, D.I.; WARD, Robyn L. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. **Nature genetics**, London, v. 36, n. 5, p. 497-501, Abr. 2004.

TANAKA, S.; LOUIS, D. N.; CURRY, W. T.; BATCHELOR, T. T.; DIETRICH, J. Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: no longer a dead end?. **Nature reviews Clinical oncology**, London, v. 10, n. 1, p. 14-26, Jan. 2013.

TANG, B.; WAN, D.; LAI, S. H.; YANG, H. H.; ZHANG, C.; WANG, X. Z.; LIU, Y.J. Design, synthesis and evaluation of anticancer activity of ruthenium(II)polypyridyl complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 173, p. 93-104, Ago. 2017.

THUN, M. J.; JACOBS, E. J.; PATRONO, C. The role of aspirin in cancer prevention. **Nature reviews. Clinical oncology**, London, v. 9, n. 5, p. 259, Mai. 2012.

THUN, M. J.; NAMBOODIRI, M. M.; HEATH JR, C. W. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 325, n. 23, p. 1593-1596, Dez. 1991.

THUN, M.J.; HENLEY, S. J.; PATRONO, C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda v. 94, n. 4, p. 252-266, Fev. 2002.

TJOELKER, L. W.; EBERHARDT, C.; UNGER, J.; LE TRONG, H.; ZIMMERMAN, G. A.; MCINTYRE, T. M.; GRAY, P. W. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, n. 43, p. 25481-25487, Out. 1995.

TJOELKER, L. W.; WILDER, C.; EBERHARDT, C.; STAFFORINI, D. M. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. **Nature**, London, v. 374, n. 6522, p. 549, Abr. 1995.

TRÉDAN, Olivier et al. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 99, n. 19, p. 1441-1454, Out. 2007.

TRUGLIO, J. J.; CROTEAU, D. L.; VAN HOUTEN, B.; KISKER, C. Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. **Chemical reviews**, Washington, v. 106, n. 2, p. 233-252, Jan. 2006.

TSO, C. L.; FREIJE, W. A.; DAY, A.; CHEN, Z.; MERRIMAN, B.; PERLINA, A.; LIAU, L. M. Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. **Cancer research**, Philadelphia, v. 66, n. 1, p. 159-167, Jan. 2006.

TSUNG, K.; DOLAN, J. P.; TSUNG, Y. L.; NORTON, J. A. Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection. **Cancer research**, Philadelphia, v. 62, n. 17, p. 5069-5075, 2002.

TYSNES, B.B; MAHESPARAN, R. Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. **Journal of neuro-oncology**, New York, v. 53, n. 2, p. 129-147, Jun. 2001.

UNICAMP. **Astrocitomas difusos - microscopia e classificação**. Disponível em: <<http://anatpat.unicamp.br/bineuastrocitomamicro.html#classif>>. Acesso em: 18 Jun. 2017.

UOZUMI, N.; SHIMIZU, T. Roles for cytosolic phospholipase A 2 α as revealed by gene-targeted mice. **Prostaglandins & other lipid mediators**, New York v. 68, p. 59-69, Ago. 2002.

UOZUMI, N.K.; KUME, T.; NAGASE, N.; NAKATANI, S.; ISHII, F.; TASHIRO, Y.; KOMAGATA, K.; MAKI, K.; IKUTA, Y.O. Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition. **Nature**, London v. 390, n. 6660, p. 618-622, 1997.

URBAŃSKA, K.; SOKOŁOWSKA, J.; SZMIDT, M.; SYSA, P. Glioblastoma multiforme—an overview. **Contemporary Oncology**, Poznań, v. 18, n. 5, p. 307, Ago. 2014.

VENDRAMINI-COSTA, D.; E CARVALHO, J. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 18, n. 26, p. 3831-3852, Set. 2012.

VISSER, K.E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature reviews cancer**, London, v. 6, n. 1, p. 24-37, Jan. 2006.

VINCENT, John B.; LOVE, Sharifa. The binding and transport of alternative metals by transferrin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, Amsterdam, v. 1820, n. 3, p. 362-378, Mar. 2012.

VINEIS, P.; SCHATZKIN, A.; POTTER, J.D. Models of carcinogenesis: an overview. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 31, n. 10, p. 1703-1709, Abr. 2010.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature medicine**, London, v. 10, n. 8, p. 789-799, Jul. 2004.

VOGT, M.; DULBECCO, R. Virus-cell interaction with a tumor-producing virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, California, v. 46, n. 3, p. 365-370, Jan. 1960.

WALCZAK, H. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. **Immunological reviews**, Copenhagen, v. 244, n. 1, p. 9-28, Out. 2011.

WANG, D.; DUBOIS, R.N. Eicosanoids and cancer. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 10, n. 3, p. 181-193, Mar. 2010.

WANG, D.; DUBOIS, R.N. Prostaglandins and cancer. **Gut**, London, v. 55, n. 1, p. 115-122, Jun. 2006.

WANG, M.; YOSHIDA, D.; LIU, S.; TERAMOTO, A. Inhibition of cell invasion by indomethacin on glioma cell lines: in vitro study. **Journal of neuro-oncology**, New York, v. 72, n. 1, p. 1-9, Mar. 2005.

WEINBERG, R.A. **A biologia do câncer**. Porto Alegre: Artmed 2008. 728 p.

WHITE, E.; K.C.; STROHECKER, A. M.; G. Y.; MATHEW, R. Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer. **Current opinion in cell biology**, London, v. 22, n. 2, p. 212-217, Abr. 2010.

WILENSKY, R. L.; SHI, Y.; MOHLER, E. R.; HAMAMDZIC, D.; BURGERT, M. E.; LI, J.; PELCHOVITZ, D. J. Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 reduces complex coronary atherosclerotic plaque development. **Nature medicine**, London, v. 14, n. 10, p. 1059-1066, Set. 2008.

WILKINS, I. I. I.; BARBOUR, S. E. Group VI phospholipases A2: homeostatic phospholipases with significant potential as targets for novel therapeutics. **Current drug targets**, Hilversum, v. 9, n. 8, p. 683-697, Ago. 2008.

WILLIAMS, C. J.; WHITEHOUSE, J. M. Cis-platinum: a new anticancer agent. **British medical journal**, London, v. 1, n. 6179, p. 1689, Jun. 1979.

WOODGATE, R. A plethora of lesion-replicating DNA polymerases. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 13, n. 17, p. 2191-2195, Jun. 1999.

WRENSCH, M.; MINN, Y.; CHEW, T.; BONDY, M.; BERGER, M. S. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. **Neuro-oncology**, New York, v. 4, n. 4, p. 278-299, Out. 2002.

WYMAN, M. P.; SCHNEITER, R. Lipid signalling in disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 9, n. 2, p. 162-176, Fev. 2008.

YAKSH, T. L.; KOKOTOS, G.; SVENSSON, C. I.; STEPHENS, D.; KOKOTOS, C. G.; FITZSIMMONS, B.; DENNIS, E. A. Systemic and intrathecal effects of a novel series of phospholipase A2 inhibitors on hyperalgesia and spinal prostaglandin E2 release. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 316, n. 1, p. 466-475, Jan. 2006.

YAMASHITA, S. I.; OGAWA, M.; SAKAMOTO, K.; ABE, T.; ARAKAWA, H.; YAMASHITA, J. I. Elevation of serum group II phospholipase A₂ levels in patients with advanced cancer. **Clinica chimica acta**, Amsterdam, v. 228, n. 2, p. 91-99, Ago. 1994.

YP LAM, E. DI TOMASO, H.-K. NG, JCS PANG, MF ROUSSEL, NM HJELM, P. EXPRESSION OF P19 INK4D, CDK4, CDK6 IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME. **BRITISH JOURNAL OF NEUROSURGERY**, Bristol, V. 14, N. 1, P. 28-32, Jul. 2000.

YU, Lin; DENNIS, E.A. Critical role of a hydrogen bond in the interaction of phospholipase A2 with transition-state and substrate analogues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Maywood, v. 88, n. 20, p. 9325-9329, Ago.1991.

ZEGLIS, B.M.; PIERRE, V.C.; BARTON, J.K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chemical Communications**, Cambridge, n. 44, p. 4565-4579, Jul. 2007.

ZHANG, C.Xin.; LIPPARD, S.J. New metal complexes as potential therapeutics. **Current opinion in chemical biology**, London, v. 7, n. 4, p. 481-489, Ago.2003.

ZHEN, L., YUFENG, C., ZHENYU, S., & LEI, X. Multiple extracranial metastases from secondary glioblastoma multiforme: a case report and review of the literature. **Journal of neuro-oncology**, New York, v. 97, n. 3, p. 451-457, Mai. 2010.

ZORZET, S.; BERGAMO, A.; COCCHIETTO, M.; SORC, A.; GAVA, B.; ALESSIO, E.; SAVA, G. Lack of in vitro cytotoxicity, associated to increased G2-M cell fraction and inhibition of matrigel invasion, may predict in vivo-selective antimetastasis activity of ruthenium complexes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 295, n. 3, p. 927-933, Dez. 2000.

ŻUKIEL, R.; PIESTRZENIEWICZ, R.; NOWAK, S.; JANKOWSKI, R.; WIELOCH, M. Historia leczenia operacyjnego guzów mózgu. **Neuroskop**, Poznań, v. 6, p. 9-19, 2004.

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinorgbio

Axially-modified paddlewheel diruthenium(II,III)-ibuprofenato metallodrugs and the influence of the structural modification on U87MG and A172 human glioma cell proliferation, apoptosis, mitosis and migration

Hanif-Ur-Rehman^{a,1}, Tatiana E. Freitas^b, Renata N. Gomes^b, Alison Colquhoun^b, Denise de Oliveira Silva^{a,*}^a Department of Fundamental Chemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil^b Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 June 2016

Received in revised form 3 October 2016

Accepted 13 October 2016

Available online 14 October 2016

Keywords:

Metallodrug

Diruthenium

Ibuprofen

Non-steroidal anti-inflammatory drugs

Metal-metal bond

Human glioma cells

ABSTRACT

The metallodrug chloridotetrakis(ibuprofenato)diruthenium(II,III) ($[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4\text{Cl}]$ or RuIbpCl (1), Ibp = carboxylate anion derived from the non-steroidal anti-inflammatory drug ibuprofen) has shown promising results *in vitro* and *in vivo*, which point to its potential as an inhibitor of glioma tumour growth *in vivo*. In order to get insight into the influence of structural changes on the biological response of the metallodrug, the $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4]$ metal-metal multiply bonded paddlewheel unit was modified for the axial ligand. Two new analogues, $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4(\text{CF}_3\text{SO}_3)]$ (2) and $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4(\text{EtOH})_2]\text{PF}_6$ (3), were synthesized and fully characterized by elemental analysis, ESI-MS, vibrational (FTIR, Raman) and electronic (UV/VIS/NIR) spectroscopy, magnetic susceptibility, molar conductivity measurements, and thermal analysis. RuIbpCl was re-prepared and complementary characterization to previous work was performed. The three axially-modified RuIbp metallodrugs were compared for their effects on U87MG and A172 human glioma cell proliferation, apoptosis, mitosis, and cell migration *in vitro*. The results provide evidence that the chloride ligand in RuIbpCl may play key role in the mode of action of the metallodrug, since the best results for antiproliferative activity were found for (1) in both types of human glioma cells. All the metallodrugs, (1), (2) and (3), were uptaken by the cells, and were shown to cause increase on number of apoptotic cells and decrease on number of mitotic cells. Additionally, the RuIbp metallodrugs were capable of inhibiting cell migration process in both human glioma cell lines. These data are extremely promising as drugs which can inhibit both cell proliferation/mitosis and inhibit cell migration could target two major chemotherapeutic targets in high grade gliomas.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: AAS, Atomic Absorption Spectroscopy; ACN, acetonitrile; ATR, Attenuated Total Reflectance; CNS, Central Nervous System; COX, cyclooxygenase; DCM, dichloromethane; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DFT, Density Functional Theory; dmso, dimethylsulfoxide; DSC, Differential Scanning Calorimetry; DTG, Derivative Thermogravimetric; EDTA, 2,2',2'',2'''-(1,2-ethanedithyldinitrilo)tetracetic acid; EDXRF, Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometry; ESI-MS, Electrospray Ionization Mass Spectrometry; EtOH, ethanol; FCS, Fetal Calf Serum; FDA, Food and Drug Administration; FTIR, Fourier Transformed Infrared; GBM, glioblastoma; HEW, Hen Egg White; Hlbp, ibuprofen, (α -methyl-4-(isobutyl)phenylacetic acid); im, 1-*H*-imidazole; ind, 1-*H*-indazole; HSA, Human Serum Albumin; ICP-AES, Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy; Ibp, ibuprofenate or carboxylate derived from ibuprofen; LMCT, Ligand Metal Charge Transfer; MS, Mass Spectrometry; MeOH, methanol; mRNA, messenger Ribonucleic Acid; NIR, Near Infrared; NSAID, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug; OTf, trifluoromethanesulfonate or triflate; PBS, Phosphate Buffered Saline; SCE, Self-Consistent Field; TGA, Thermogravimetric Analysis; TOF, Time of Flight; UV, ultraviolet; VIS, visible; ZINDO, Zerner's Intermediate Neglect Differential Overlap; WHO, World Health Organization.

* Corresponding author.

E-mail address: deosilva@iq.usp.br (D. de Oliveira Silva).URL: http://www3.iq.usp.br/pessoas_view.php?idDocente=26 (D. de Oliveira Silva).¹ Present address: Department of Chemistry, Women University of Azad Jammu & Kashmir, Bagh Pakistan.

1. Introduction

The development of new metal-based drugs targeting cancer treatment is the focus of current scientific interest driven by the success of the FDA (Food and Drug Administration) approved platinum drugs, which despite the benefits and the highly relevant role in worldwide clinical routine use still show undesirable drawbacks in patients under chemotherapy [1–4]. The search for more effective and less toxic next generation of antitumour metallodrugs pointed to the ruthenium as a key metal to build a structural variety of compounds (from coordination complexes to organometallics) linked to promising biological activities [5–13]. The recognition of ruthenium compounds as potential anticancer drug candidates was strongly supported by the entrance of the Ru(III) -chlorido-*N*-heterocyclic complexes, *i.e.*, the anti-metastatic NAMI-A, $(\text{Him})[\text{RuCl}_4(\text{dmso})(\text{im})]$, im = 1-*H*-imidazole [14–15], and the cytotoxic KP1019, $(\text{Hind})[\text{RuCl}_4(\text{ind})_2]$, ind = 1-*H*-indazole [16] and the more soluble analogue NKP1339, $\text{Na}[\text{RuCl}_4(\text{ind})_2]$ [17], into clinical trial phases.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.10.003>

0162-0134/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Ruthenium complexes bearing the Ru₂ metal-metal multiply bonded core coordinated to four carboxylate equatorial ligands in a paddlewheel structured unit of the type [Ru₂(O₂CR)₄] show interesting properties related to a range of potential applications [18]. Our strategy of coordinating the mixed-valence Ru₂(II,III) dimetallic center to carboxylates derived from drugs of clinical use, such as the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and the γ -linolenic acid, succeeded in developing a novel class of metallodrugs displaying unique biological properties [6,19–25]. In particular, our studies have been focused on the biological activity of the Ru₂-drug complexes targeting malignant glioma cancer, which has rarely been the object of study in the field of metallodrugs.

Anticancer therapy lacks efficient drugs to treat malignant gliomas such as glioblastoma (GBM) (classified as grade IV by the WHO (World Health Organization)), a highly aggressive astrocytic brain tumour of the CNS (Central Nervous System), and responsible for most adult brain cancers. This type of cancer is associated with genetic alterations affecting genes that control cell growth, migration, apoptosis, and invasion [26]. Conventional procedures (surgical resection followed by radiotherapy and/or chemotherapy) have not shown effectiveness in treating GBM primary brain tumour [27–28], consequently resulting in a poor patient prognosis associated with an average one year survival after surgical resection [29–30]. The highly invasive nature of the tumour and the resistance to conventional chemotherapy and radiotherapy are considered the major factors for such poor survival rates [31].

The lead compound of the class of Ru₂-NSAID metallodrugs, of formula [Ru₂(lbp)₄Cl] (represented here as RuIbpCl), in which lbp is the anion derived from the NSAID ibuprofen (Hlbp), was shown to exhibit antiproliferative activity against the C6 rat glioma cell line, probably arising from synergistic effects between the metal and the drug [19]. The effect of this metallodrug on the cell cycle distribution in the C6 glioma cell line was found to involve several important proteins including p21, p27, p53, Bax and the cyclooxygenase COX1 [20]. The *in vivo* efficacy of RuIbpCl in glioma model pointed to its potential as an inhibitor of tumour growth *in vivo*. The administration of the metallodrug led to a decrease in tumour size, by either chronic intraperitoneal or chronic Alzet osmotic pump infusion, in the C6 rat orthotopic glioma model *in vivo*. Acute and chronic toxicology studies revealed a relatively low toxicity of the metallodrug in normal Wistar rats [21]. Furthermore, the RuIbpCl metallodrug was shown to be capable of inhibiting proliferation of human glioma cell lines *in vitro*, including both the p53 wild type (U87MG, A172) and the p53 mutant type (U138MG, U251MG) which express COX1 and COX2 mRNA. A marked dose- and time-dependent inhibition of cell number was found when each one of these human glioma cells were exposed to RuIbpCl. The U87MG and the A172 cell lines were found to be the most sensitive to the effects of the metallodrug. These studies suggested that p53 and COX1 may play key role in the metallodrug mode of action since the U138MG, which has a mutant form of p53 and expressed low levels of COX1 mRNA, was the most resistant cell line. Additionally, all the four human cell lines showed a time-dependent increase in the number of apoptotic cells after 72 h exposure to RuIbpCl [21].

Cisplatin, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], and the ruthenium(III)-based drugs NAMI-A, KP1019 and NKP1339 are examples of relevant anticancer chlorido-complexes. The chloride ligand is suggested to play key role in the mode of action of such metallodrugs, by acting as a leaving ligand capable of promoting ligand substitution reactions that may transform the chlorido-(pro-drug) into the biologically active species (activation reaction) in the physiological environment. The replacement of chloride by water molecule, as a consequence of decreased halide concentration (in relation to the extracellular environment) when cisplatin enters into the cell, is considered as a key step in the activation of the chemotherapeutic drug before it binds to the DNA [3]. The labilization of the Ru(II)—Cl bond is thought to be relevant in the binding of KP1019 to biomolecules, after an activation-by-reduction process that might reduce Ru(III) to Ru(II), according to the suggested mode of action for

this compound [16,32]. In the class of the Ru₂(II,III) complexes, our studies have shown that non-drug acetato-precursor [Ru₂(O₂CCH₃)₄Cl], or RuAcCl, is capable of undergoing chloride/water axial ligand substitution reactions [33], and also of binding axially to small biomolecules [33,34], while it keeps the paddlewheel dimetallic core. Conversely, this complex was found to release two of the four equatorial acetate ligands in the presence of the model HEW (Hen Egg White) lysozyme to give crystals of a stable protein adduct in which two diruthenium moieties bind to aspartate residues of the protein [35]. Additionally, the non-drug precursor was found to interact with the serum protein HSA (Human Serum Albumin) mainly through electrostatic forces, involving coordination to the amino acid side chains of the protein. In contrast, the interaction of the RuIbpCl drug with HSA seems to be predominantly driven by covalent/hydrophobic forces [36].

Taking into account the findings pointing to the potential of the RuIbpCl drug complex as an inhibitor of glioma tumour growth, here we have expanded our studies, by investigating the influence of structural changes on the biological response of the metallodrug. The axial position in the [Ru₂(lbp)₄] paddlewheel structured unit was modified as a consequence of the replacement of the anion, by exchanging the original chloride (Cl[−]) by triflate (OTf, CF₃SO₃[−]) or hexafluorophosphate (PF₆[−]). The RuIbpCl complex was re-prepared and complementary characterization in relation to the previous reported data [19,20] was performed. Two new axially-substituted RuIbp complexes were synthesized and fully characterized. The effects of the three axially-modified RuIbp metallodrugs on U87MG and A172 human glioma cell proliferation, apoptosis, mitosis and cell migration were investigated *in vitro*.

2. Experimental

2.1. General methods for the synthesis of the diruthenium-ibuprofenato complexes. Instrumentation and preparation of samples for characterization

The reagent grade chemicals (Sigma-Aldrich) and organic solvents (Merck or LabSynth) were used without further purification. Water was deionized. Ibuprofen was from Natural Pharma manipulation pharmacy (São Paulo, Brazil) and its purity was confirmed by elemental analysis and spectroscopic techniques. The precursors, [Ru₂(O₂CCH₃)₄Cl] or RuAcCl [33,37] and [Ru₂(O₂CCH₃)₄(H₂O)₂]PF₆ or RuAcPF₆ [20,38] were synthesized from RuCl₃·xH₂O, according to the literature described procedures. The syntheses of the diruthenium-ibuprofenato complexes are described below. The complexes were mainly characterized by non-metal elemental analysis and metal analysis (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, ICP-AES; Atomic Absorption Spectroscopy, AAS; Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometry, EDXRF); Electrospray Ionization Mass Spectrometry, ESI-MS; Fourier Transformed Infrared, FTIR, Spectroscopy; Raman Spectroscopy; UV/VIS/NIR Electronic Spectroscopy; and Thermogravimetric Analysis/Derivative Thermogravimetric/Differential Scanning Calorimetry/Mass Spectrometry, TGA/DTG/DSC/MS.

2.1.1. Chloridotetrakis(ibuprofenato)diruthenium(II,III), [Ru₂(lbp)₄Cl], RuIbpCl (1)

The compound was prepared according to previously described procedure [20] starting from RuAcCl. The dark-brown solid isolated from the ethanolic solution kept under nitrogen stream, was dried in vacuum oven at 60 °C for 3 h. Yield, 88%. Anal. calc. (%) for C₅₂H₆₈O₈Ru₂: Ru, 19.09; C, 58.99; H, 6.47. Found: Ru, 18.67 [average from 17.92 (ICP-AES), 19.20 (AAS), 18.90 (EDXRF)]; C, 58.54; H, 6.61. ESI-MS, in MeOH (*m/z*): (+) 1024.3, [Ru₂(C₁₃H₁₇O₂)₄]⁺ requires 1024.3. FTIR major bands (cm^{−1}), ν (CH): 2955 ms, 2932 sh, 2866 m; ν (CC)/def(ring): 1540 sh, 1514 m; region of def(CH), ν (CC), def(ring), ν (CO), def(COO): 1372 m, 1264 sh, 1210 vw, 1190 w, 1167 w, 1118 w, 1071 m, 1023 m; ν _a(COO): 1464 s; ν _s(COO): 1412 s; def(CORu): 1286 m; def(OCO):

738 m; $\nu(\text{RuO})$: 496 m. Raman (cm^{-1}), $\nu(\text{RuRu})$: 332 vs. Magnetic moment, μ_{eff} (B.M.) 4.2. UV/VIS/NIR λ (nm)/ ϵ ($\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$): 484/— and 1117/— (solid state); 458/1094 (DCM); 430/870 (EtOH); 425/755 (MeOH). Molar conductivity ($\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$): 0.20 (DCM), 23.7 (EtOH), 70.0 (MeOH). TGA ($^{\circ}\text{C}$)/mass loss (%) /main fragments (m/z): 220–330/66.3/18, 44; 330–400/8.7/18, 44.

2.1.2. Tetrakis(ibuprofenato)(trifluoromethanesulfonate)diruthenium(II,III), $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4(\text{CF}_3\text{SO}_3)]$, RuIbpOTf (2)

Compound (1) (200 mg, 0.19 mmol) was kept in dichloromethane, DCM (50 mL) under magnetic stirring and slow stream of nitrogen for 30 min. A solution of AgCF_3SO_3 (50 mg, 0.19 mmol, in 25 mL MeOH) and 25 mL EtOH were added, and the resulting mixture was maintained under magnetic stirring for 1 h. The precipitate of AgCl was filtered off and the volume of the filtrate was reduced in a rotary evaporator. The residue was dissolved in DCM, kept in refrigerator overnight, and, after filtration, the solvent was removed in water-bath at about 40 $^{\circ}\text{C}$. The product was dissolved in diethyl ether, water was added, and the organic phase was extracted and then evaporated to give a brown solid which was dried in vacuum oven at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 3 h. Yield, 80%. Anal. calc. (%) for $\text{C}_{53}\text{F}_3\text{H}_{68}\text{O}_{11}\text{Ru}_2\text{S}$: Ru, 17.24; C, 54.30; H, 5.85; S, 2.73. Found: Ru, 17.38 [average from 14.57 (ICP-AES), 18.98 (AAS), 18.60 (EDXRF)]; C, 54.21; H, 6.03; S, 2.50; Cl < 0.3%. ESI-MS, in MeOH (m/z): (+) 1024.3, $[\text{Ru}_2(\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_2)_4]^{+}$ requires 1024.3; (–) 1322.2, $[\text{Ru}_2(\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_2)_4(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2]^{-}$ requires 1322.2. FTIR major bands (cm^{-1}), $\nu(\text{CH})$: 2955 ms, 2932 sh, 2866 m; $\nu(\text{CC})/\text{def}(\text{ring})$: 1536 sh, 1512 m; region of $\text{def}(\text{CH})$, $\nu(\text{CC})$, $\text{def}(\text{ring})$, $\nu(\text{CO})$, $\text{def}(\text{COO})$: 1372 m, 1262 m, 1208 w, 1115 sh, 1073 m; $\nu_a(\text{COO})$: 1464 s; $\nu_s(\text{COO})$: 1412 s; $\text{def}(\text{CORu})$: 1288 m; $\text{def}(\text{OCO})$: 738 m; $\nu(\text{RuO})$: 494 m; $\nu_a(\text{SO}_3)$: 1308 sh, 1230 m; $\nu_s(\text{CF}_3)$: 1262 m; $\nu_a(\text{CF}_3)$: 1208 m, 1169 m; $\nu_s(\text{SO}_3)$: 1024 s. ATR, Attenuated Total Reflectance, major bands (cm^{-1}), solid state, $\nu_a(\text{SO}_3)$: 1308 mw, 1230 mw; $\nu_s(\text{CF}_3)$: 1262 w; $\nu_a(\text{CF}_3)$: 1208 m, 1169 w; $\nu_s(\text{SO}_3)$: 1024 s; in DCM, $\nu_a(\text{SO}_3)$: 1308 w, 1229 w; $\nu_s(\text{CF}_3)$: 1260 sh; $\nu_a(\text{CF}_3)$: 1204 m, 1169 w; $\nu_s(\text{SO}_3)$: 1024 m; in CH_3CN , $\nu_a(\text{SO}_3)$: 1270 w; $\nu_s(\text{CF}_3)$: 1221 vw; $\nu_a(\text{CF}_3)$: 1156 w. Raman (cm^{-1}), $\nu(\text{RuRu})$: 340 s. Magnetic moment, μ_{eff} (B.M.) 3.7. UV/VIS/NIR λ (nm)/ ϵ ($\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$): 438/— and 1026/— (solid state); 433/1017 (DCM); 430/850 (EtOH); 425/762 (MeOH). Molar conductivity ($\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$): 3.70 (DCM), 33.0 (EtOH), 72.9 (MeOH). TGA ($^{\circ}\text{C}$)/mass loss (%) /main fragments (m/z): 200–330/54.0/18, 44, 64; 330–420/20.0/18, 44, 64.

2.1.3. Di(ethanol)tetrakis(ibuprofenato)diruthenium(II,III) hexafluorophosphate, $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4(\text{EtOH})_2]\text{PF}_6$, RuIbpPF₆ (3)

Solutions of RuAcPF_6 (200 mg, 0.32 mmol, in 40 mL water, obtained after reducing in a rotary-evaporator the initial volume of 100 mL previously stirred under nitrogen for 30 min), Hlbp (265 mg, 1.28 mmol, in 40 mL EtOH) and NH_4PF_6 (300 mg in 10 mL water) were mixed and stirred under nitrogen at about 60 $^{\circ}\text{C}$ for 3 h. The solvent was removed, the product was washed with water and then dissolved in a small volume of EtOH. The resulting solution was evaporated under nitrogen flow and the dark-brown solid was dried in vacuum oven at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 3 h. Yield, 75%. Anal. calc. (%) for $\text{C}_{56}\text{F}_6\text{H}_{80}\text{O}_{10}\text{PRu}_2$: Ru, 16.04; C, 53.37; H, 6.39. Found: Ru, 16.46 [average from 14.94 (ICP-AES), 16.90 (AAS), 17.54 (EDXRF)]; C, 53.73; H, 6.22; Cl < 0.3%. ESI-MS, in MeOH: (+) (m/z): 1024.3, $[\text{Ru}_2(\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_2)_4]^{+}$ requires 1024.3; (–) (m/z): 144.97, PF_6^{-} requires 144.96. FTIR major bands (cm^{-1}), $\nu(\text{CH})$: 2955 ms, 2932 sh, 2866 m; $\nu(\text{CC})/\text{def}(\text{ring})$: 1537 m, 1514 m; region of $\text{def}(\text{CH})$, $\nu(\text{CC})$, $\text{def}(\text{ring})$, $\nu(\text{CO})$, $\text{def}(\text{COO})$: 1366 m, 1263 m, 1206 w, 1192 w, 1167 w, 1123 w, 1070 m, 1020 ms; $\nu_a(\text{COO})$: 1464 s; $\nu_s(\text{COO})$: 1412 s; $\text{def}(\text{CORu})$: 1286 m; $\text{def}(\text{OCO})$: 738 m; $\nu(\text{RuO})$: 496 m; $\nu(\text{PF}_6)$: 849 s; $\text{def}(\text{PF}_6)$: 560 ms. Raman (cm^{-1}), $\nu(\text{RuRu})$: 350 s. Magnetic moment, μ_{eff} (B.M.) 3.7. UV/VIS/NIR λ (nm)/ ϵ ($\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$): 438/— and 1011/— (solid state); 437/923 (DCM); 430/790 (EtOH); 425/813 (MeOH). Molar conductivity ($\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$): 36.3 (DCM), 31.0 (EtOH), 75.0 (MeOH). TGA ($^{\circ}\text{C}$)/mass loss (%) /main fragments (m/z): 100–200/7.5/46; 200–320/54.5/18, 44; 320–450/11.0/18, 44.

2.1.4. Instrumentation and preparation of samples for characterization

Elemental analyses for C, H, N (Perkin-Elmer 2400 Elemental Analyzer), Cl (volumetric analysis), Ru (ICP-AES, SpectroCiros CCD, Arcos, 267.876 nm) and S (ICP-AES), and also the ESI-MS experiments (Bruker Daltonics Micro TOF equipment, capillary, 4 kV, nebulizer 0.4 bar, dry gas 5.0 L min^{-1} , 180 $^{\circ}\text{C}$) were performed at the Analytical Center of Institute of Chemistry, University of São Paulo. AAS analysis of Ru was conducted on a Shimadzu Spectrophotometer AA 6300; typically the samples of compounds (10 mg) were heated in 5.0 mL HCl:HNO_3 (3:1 v/v) at 110 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h, further diluted with water to 10 ppm, and the metal content was determined from a calibration curve previously built for an AAS standard solution of Ru. EDXRF analysis of Ru was performed on a Shimadzu Spectrometer EDX-720 (50 W Rh target X-ray tube); typically, 100 mg pellet samples were prepared by grinding the compounds with H_3BO_3 , and the RuIbpCl complex previously analysed by AAS was used as a standard to calibration curve. The electronic absorption spectra of compounds in solution (in 1.0 cm quartz cuvettes) were recorded on a Shimadzu UV-1650 PC (190–1100 nm) or Shimadzu UV-2600 (190–900 nm) spectrophotometer. The reflectance spectra (further converted to absorbance) of solid samples of RuIbp complexes (dispersed in BaSO_4) were registered on a Shimadzu UV-2600 spectrophotometer (200–2600 nm). FTIR spectra of solids (dispersed in KBr) were recorded on a Bomem MB-102 spectrophotometer (4000–400 cm^{-1}) coupled to diffuse reflectance accessory (Pike Technologies Inc.). ATR spectra of solid and solutions were registered on Bruker ATR equipped with Ge crystal (4000–600 cm^{-1}). Raman spectra of solids were registered on Invia Renishaw Raman equipment, laser line 785 nm. Magnetic susceptibility of powdered samples at room temperature were determined by the Faraday method using AUW-220D Shimadzu balance; $\text{Hg}[\text{Co}(\text{SCN})_4]$ was the calibrant and diamagnetic corrections were based on Pascal's constants. Molar conductivity of compounds in DCM, EtOH and MeOH ($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) were measured on a Digimed DM-31 conductivity meter at 25.0 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ (cell constant 0.1 cm^{-1} ; KCl solution, 146.9 $\mu\text{S cm}^{-1}$ at 25 $^{\circ}\text{C}$ was used as standard). TGA/DTG/DSC/MS fragment detection were conducted on a NETZSCH STA 409 PC Luxx thermobalance coupled to NETZSCH QMS 403C Aeolos and PulseTA injector for gases (~10 mg sample; alumina crucible; synthetic air atmosphere; 30–1000 $^{\circ}\text{C}$; 50 mL min^{-1} ; 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$).

2.2. Bioassays

2.2.1. Cell culture

Human glioma cell lines (U87MG and A172) were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Cells were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplemented with 10% FCS (Fetal Calf Serum), 50 $\mu\text{m L}^{-1}$ penicillin, and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ streptomycin (GIBCO® Invitrogen Corporation, CA, USA). Cells in the exponential phase of growth were used, growing in 75 cm^2 flasks in a humidified atmosphere of 5% CO_2 , 95% air, at 37 $^{\circ}\text{C}$. After growth to the desired density, cells were washed with PBS (Phosphate Buffered Saline), and trypsinized (trypsin 0.025%/EDTA (2,2',2''-(1,2-ethanediyldinitrilo)tetraacetic acid) 0.02%) for subsequent plating.

2.2.2. Cell proliferation assays

Cells were seeded into 24-well plates at a density of 3×10^4 and 5×10^4 cells/well for U87MG and A172 cell lines, respectively. After the cell adhesion period of 12 h, the medium was replaced, and the ruthenium compounds initially dissolved in ethanol were individually added to the culture medium to give concentrations at the range 25–200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (i.e., 25, 50, 75, 100, 150 and 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Ethanol was used as the vehicle control. Medium and drug treatments/controls were replaced every 24 h. After 24, 48 and 72 h the cells were washed with PBS, harvested by trypsinization (trypsin 0.025%/EDTA 0.02%), centrifuged, and counted in an improved Neubauer counting chamber.

The experiment was performed three times and each individual experiment was performed in triplicate for each concentration.

2.2.3. Cell uptake of ruthenium

Both cell lines were treated with $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ drug concentration according to the procedure described in Section 2.2.2. At 72 h, the pellets of cells were collected by centrifugation, after extensive washing with PBS, and the ruthenium content was determined by ICP-AES. The experiment was performed in duplicate for each treatment of cells.

2.2.4. Apoptosis and mitosis assays

The U87MG and A172 cell lines were cultivated on circular glass coverslips placed in 24-well plates. After the cell adhesion period, cells were treated every 24 h with the ruthenium compounds (initially dissolved in ethanol and then diluted in the culture medium to $200 \mu\text{mol L}^{-1}$) for a total of 72 h. After 72 h, the cells were collected and fixed with 4% formaldehyde in 0.1 mol L^{-1} PBS. The samples were washed three times with PBS, Hoechst 33342 stain ($50 \mu\text{L}$ Hoechst/ 10 mL PBS) was applied and they were placed in a dark environment for 10 min to allow visualization of the nucleus. The glass coverslips containing the stained cells were then removed and secured on glass slides using mounting medium, Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), for observation under a microscope. They were photographed in twelve random fields, and the cells undergoing apoptosis and mitosis were separately counted. The experiment was performed three times and each individual experiment was performed in triplicate.

2.2.5. Migration assays

For the U87 MG cell line, the cell migration assay was performed using a 24-well Boyden chamber plate with $8 \mu\text{m}$ pore size polycarbonate membrane filters. The cells were placed in the upper part of the Boyden chamber containing DMEM and 10% FCS, the lower chamber also contained DMEM and 10% FCS. After a cell adhesion period of 12 h, the medium was replaced and the ruthenium compounds (initially dissolved in ethanol and then diluted in the culture medium to $200 \mu\text{mol L}^{-1}$) were individually added to both parts of the chamber. After 24 h, the cells on the membrane filter were fixed with methanol and stained with 0.05% crystal violet for 30 min. The cells on the upper surface of the filter were removed with a cotton swab. The membranes were then rinsed in PBS until the excess stain was removed. The membranes were air-dried for 20 min. The migratory cells were determined by counting the cells that migrated to the lower side of the filter by bright field microscopy at $200\times$ magnification. Ten random fields were counted for each filter. The experiment was performed three times and each individual experiment was performed in triplicate. For the A172 cell line, a scratch wound migration assay was used. The cells were seeded in 24-well plates. Cells were cultured for approximately 24 h, at which time they were approximately 80% confluent. After 24 h, a wound was made by scratching a line across the bottom of the dish on the monolayer of confluent cells with a sterile p-200 pipette tip. Then, the cells were washed with PBS to remove non-adherent cells and individually treated with the ruthenium compounds (initially dissolved in ethanol) at $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. Thereafter, the plate was incubated in the IN Cell Analyzer system for a further 24 h to allow time for migration into the cell-free area. The migration of the cells into the resulting wound was recorded as time-lapse images at 6 h intervals over a 24 h observation period. The difference between initial and final areas was calculated using Image J software. The experiment was performed three times and each individual experiment was performed in triplicate.

2.2.6. Statistical analysis

Two-way ANOVA with the Bonferroni post-test was used for analysis of the proliferation assay data. All data were presented with the mean and standard error (SE), and all treatments were compared with the control. An unpaired *t*-test was used for the analysis of

apoptosis, mitosis and migration assay data. Differences between groups were considered significant when $p < 0.05$. The analysis were performed using Graphpad Prism 5.0 – Instat Software, San Diego, CA, USA.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of diruthenium-ibuprofenato, *Rulbp*, complexes

3.1.1. Synthesis and composition of the complexes

In this work, the structure of the diruthenium-ibuprofenato complex has been axially modified as a consequence of the replacement of the anion, by exchanging the original chloride (Cl^-) by triflate (CF_3SO_3^-) or hexafluorophosphate (PF_6^-). Elemental analysis (see Experimental section) for non-metal elements as well as %Ru (determined as an average value from three different analytical techniques, i.e., ICP-AES, AAS, EDXRF) gave support to the composition of the three compounds which were formulated as $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4\text{Cl}]$ (1), $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4(\text{CF}_3\text{SO}_3)]$ (2) and $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4(\text{EtOH})_2]\text{PF}_6$ (3). The negligible Cl content ($<0.3\%$) for (2) and (3) confirms the absence of this ligand in both *Rulbp*OTf and *Rulbp*PF₆. The characterization data further discussed provide evidence that the three complexes have in common the $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4]^+$ paddlewheel structured unit (Fig. 1). The four *O,O*-donor Ibp-drugs equatorially coordinated as bridging ligands stabilize the metal-metal multiple bond in the Ru_2 core. The axial positions are occupied by different ligands, i.e., the Cl^- and OTf anionic ligands in (1) and (2), respectively, and the EtOH solvent molecule in (3).

The synthesis of the chlorido-complex from RuAcCl and *Hlbp* was reported in our previous work [19,20]. The reaction involves deprotonation of *Hlbp* to give the Ibp carboxylate anion which replaces the acetate ligand in the coordination sphere of the dimetallic core in the acetato-precursor. The chloride ligand keeps its axial position in the paddlewheel structured $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4\text{Cl}]$ neutral unit, and the axial bridges formed by the $\text{Ru}-\text{Cl}$ bonds generate polymeric chains in the solid state [19,20]. The removal of the Cl^- from (1), accompanied by the introduction of CF_3SO_3^- ions, and followed by a reaction with *Hlbp* gives compound (2) with the formula $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4(\text{CF}_3\text{SO}_3)]$. This is consistent with the coordination of the CF_3SO_3^- anion counterbalancing the positive charge of the $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4]^+$ unit. The data thus suggest that the OTf anion plays similar role as that of chloride to form $\text{Ru}-\text{OTf}$ axial bridges generating polymeric chains in the solid state. Similar behaviour has been found for the $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{Cet})_4(\text{CF}_3\text{SO}_3)]$ compound that was shown to have infinite chains of alternating $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{Cet})_4]^+$ cations and OTf anions in the crystal [39]. Compound (3) was obtained from the reaction of *Hlbp* with the RuAcPF_6 precursor, which led to the coordination of four Ibp drug ligands (replacing the acetate ligands in the aqua-precursor) accompanied by the axial substitution of the water by EtOH molecules. The uncommon coordination of ethanol solvent molecules has been found also in the reported $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{C}_6\text{H}_5)_4(\text{EtOH})_2]^+$ cationic species [40]. In complex (3) the positive charge of the $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4]^+$ unit is

Fig. 1. The $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4]$ paddlewheel dimetallic structure of the diruthenium-ibuprofenato complexes ($\text{L}_{\text{ax}} = \text{Cl}^-$, OTf and EtOH in (1), (2) and (3), respectively, in the solid state).

counterbalanced by the non-coordinated counter ion PF_6^- . Therefore, in contrast to RuIbpCl and RuIbpOTf , which have neutral dinuclear units linked by Ru-anion axial bridges to form polymeric chains, RuIbpPF_6 contains discrete cationic dinuclear units having the non-coordinated PF_6^- as a counter ion, in the solid state.

The RuIbp complexes (in MeOH) were characterized by Mass Spectrometry according to the data shown in Table 1. The representative mass spectra in the positive mode, ESI-MS(+), associated to the simulated patterns for the correspondent fragment is illustrated in Fig. 2 for compound (2). The ESI-MS(+) spectra of the three RuIbp complexes, (1), (2) and (3), exhibit a peak with typical pattern of isotopic distribution of ruthenium with maximum m/z at 1024.3. This peak can be assigned to the $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4]^+$ ionic fragment, in good agreement with the simulated MS pattern $([\text{Ru}_2(\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_2)_4]^+)$, calc. m/z , 1024.3, Fig. 2) and, thus, provide evidence for the integrity of the dimetal-drug paddlewheel unit. Compound (2) shows also an additional peak in the negative mode, ESI-MS(−), with typical pattern of Ru isotopic distribution with maximum m/z at 1322.2, that can be assigned to the $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4(\text{OTf})]^-$ anionic fragment according to the simulated MS pattern $([\text{Ru}_2(\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_2)_4(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2]^-)$, calc. m/z 1322.2, Fig. 2). The results, therefore, support the proposal that RuIbpOTf may form infinite chains connected by Ru-OTf axial bridges in the solid state. The presence of the PF_6^- anion in compound (3) was confirmed by a ESI-MS(−) peak at m/z 144.97 (calc. m/z 144.96).

3.1.2. Vibrational spectra

Table 1 shows the major FTIR bands of the RuIbp complexes, for which tentative attributions are suggested. All the three complexes

have in common the Ibp drug equatorial ligand, but are structurally distinct in relation to the axial ligands due to the different anions present in their compositions. The FTIR spectrum of the chlorido-complex (1) is in good agreement with the vibrational data previously reported [19]. The two new axially-modified complexes, (2) and (3), in addition to the bands of the Ibp drug, show the typical bands of their correspondent polyatomic anions, CF_3SO_3^- and PF_6^- , respectively. No significant changes on frequencies were found in the spectra of the RuIbp complexes at 3000–1000 cm^{-1} when the major bands of the Ibp ligand were compared with those of the Hlbp , except for the bands related to the COOH group [41,42]. The Hlbp parent drug (spectrum not shown) exhibits the $\nu(\text{C}=\text{O})$ carbonyl stretching band at 1720 cm^{-1} , which is absent in the spectra of the RuIbp complexes. Instead, the two typical bands of the carboxylate stretching modes (i.e., $\nu_a(\text{COO})$, 1464; $\nu_s(\text{COO})$, 1412 cm^{-1}) appeared. The data, consequently, corroborate the deprotonation of the Hlbp drug which coordinates to the dimetallic cores through the carboxylate group. The values of the $\Delta\nu$ difference $[\nu_a(\text{COO})-\nu_s(\text{COO})]$ are all in the range of 40–75 cm^{-1} , supporting the bridging coordination mode of Ibp as an O,O-donor ligand to the Ru_2 cores [43]. The band at 738 cm^{-1} shown by the RuIbp complexes is absent in the Hlbp spectrum and thus may be assigned to $\text{def}(\text{OCO})$ mode of the carboxylate ligand. Moreover, the RuIbp complexes show a new band at 1285 cm^{-1} that might be assigned to the $\text{def}(\text{CO-Ru})$ mode. Since this band is absent for Hlbp which, instead, shows $\text{def}(\text{CO-H})$ of the COOH group at 1232 cm^{-1} , it might be plausible to consider that the replacement of the hydrogen by the metal atom upon coordination of the drug to the dimetallic core would shift the band to higher frequency. Additional evidence for the coordination of the Ibp drug to the Ru_2 core is the appearance of a band at 495 cm^{-1} , that may be assigned to the $\nu(\text{RuO})$ stretching mode involving the $\text{Ru}-\text{O}(\text{carboxylate})$ metal-ligand bond [44].

The presence of the hexafluorophosphate counter-ion in compound (3) was confirmed by the appearance of bands assigned to the vibrational modes of the octahedral PF_6^- , i.e., $\nu_a(\text{PF}_6)$ at 849, and $\text{def}(\text{PF}_6)$ at 560 cm^{-1} [20,42]. In the case of compound (2), a more detailed investigation was needed since OTf can act as either a counter-ion or a coordinating ligand. The assignment of non-coordinated (“free”) or metal-coordinated OTf was made by comparison with reported spectral changes for triflate [45–47]. In relation to the chlorido-analogue (1), compound (2) exhibited new bands which could be assigned to CF_3SO_3^- vibrational modes, i.e., double degenerated $\nu_a(\text{SO}_3)$, 1308/1230; $\nu_s(\text{CF}_3)$, 1262; double degenerated $\nu_a(\text{CF}_3)$, 1208/1169; and $\nu_s(\text{SO}_3)$, 1024 cm^{-1} . These assignments gave support to the coordination of the triflate anion to the dimetallic core, thus corroborating the characterization data discussed in the previous section for RuIbpOTf . The proposal was confirmed by ATR studies, by comparing the spectrum of the solid with those of the complex in non-coordinating and coordinating solvents. The ATR spectrum of compound (2) in DCM resembles the spectrum of the corresponding solid (see data in Experimental section) confirming that RuIbpOTf retains the structural features in the non-coordinating solvent by keeping the triflate ligand coordinated to the dimetallic core. The spectrum of (2) in ACN, in contrast, revealed the shift of the SO_3 and CF_3 vibration modes to lower frequencies ($\nu_a(\text{SO}_3)$, 1270; $\nu_s(\text{CF}_3)$, 1221; $\nu_a(\text{CF}_3)$, 1156 cm^{-1}) in agreement with the assignment for “free” CF_3SO_3^- [48], thus suggesting the dissociation of triflate from RuIbpOTf when the complex is dissolved in acetonitrile.

The Raman spectra were registered to investigate the metal-metal stretching mode [44], revealing that the $\nu(\text{RuRu})$ frequency value of the RuIbp compounds slightly increases according to the order (1) < (2) < (3) (Table 1). These data indicate an influence of the nature of the axial ligand on the $\text{Ru}-\text{Ru}$ bond distance, thus suggesting that the presence of the stronger coordinating chloride may contribute to weaken the metal-metal bond in the Ru_2 core, in relation to OTf and EtOH axial ligands. This finding might be corroborated by crystal data of the acetate analogue which show that the $\text{Ru}-\text{Ru}$ distance (2.265 Å) in the

Table 1
Characterization data for the RuIbp complexes.

	RuIbpCl (1)	RuIbpOTf (2)	RuIbpPF_6 (3)
Mass spectrum, ESI-MS (m/z)			
ESI-MS(+), MeOH	1024.3	1024.3	1024.3
ESI-MS(−), MeOH		1322.2	144.97
FTIR major bands (ν/cm^{-1}) ^a			
$\nu(\text{CC})_{\text{ring}}/\text{def}_{\text{ring}}$	1540 sh; 1514 m	1536 m; 1512 m	1537 m; 1514 m
$\nu_a(\text{COO})$	1464 s	1464 s	1464 s
$\nu_s(\text{COO})$	1412 s	1412 s	1412 s
$\text{def}(\text{OCO})$	738 m	738 m	738 m
$\text{def}(\text{CORu})$	1287 m	1288 m	1286 m
$\nu(\text{RuO})$	496 m	496 m	496 m, 490 sh
$\nu_a(\text{PF}_6)$			849 s
$\text{def}(\text{PF}_6)$			560 ms
$\nu_a(\text{SO}_3)$		1308 sh, 1230 m	
$\nu_s(\text{CF}_3)$		1262 m	
$\nu_a(\text{CF}_3)$		1208 m, 1169 m	
$\nu_s(\text{SO}_3)$		1024 s	
Raman band (cm^{-1})			
$\nu(\text{RuRu})$	332 vs	340 s	350 s
Magnetic moment, μ_{eff} (B.M.) per Ru_2/T (K)	4.2/297	3.7/298	3.7/299
Electronic transitions, λ (nm)/ ϵ ($\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$)			
Solid state	484/—; 1117/—	438/—; 1026/—	438/—; 1011/—
DCM	458/1094	433/1017	437/923
EtOH	430/870	430/850	430/790
MeOH	425/755	425/762	425/813
Molar conductivity ($\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$)			
DCM	0.2	3.7	36.3
EtOH	23.7	32.0	31.0
MeOH	70.0	72.9	75.0
Thermogravimetric data, temperature range ($^\circ\text{C}$)/mass loss (%) / main fragments (m/z)			
	200–330/66.3/18, 44	200–330/54/18, 44, 64	100–200/7.5/46
	330–400/8.7/18, 44	330–400/21/18, 44, 64	200–320/54.5/18, 44
			320–450/11/18, 44

^a asymmetric; s, symmetric; def, angle deformation; m, medium; s, strong; sh, shoulder; v, very; w, weak.

Fig. 2. (a) ESI-MS(+) of Ru(bppOTf)(2) in MeOH; ESI-MS(+) (left) and correspondent expanded ESI-MS(+) (right); (b) simulated MS(+) for $[\text{Ru}_2(\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_2)_4]^+$ fragment (left) and correspondent expanded pattern showing the isotopic distribution for Ru (right); (c) ESI-MS(-) of Ru(bppOTf)(2) in MeOH; ESI-MS(-) (left) and correspondent expanded ESI-MS(-) (right); (d) simulated MS(-) for $[\text{Ru}_2(\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_2)_4(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2]^-$ fragment (left) and correspondent expanded pattern showing the isotopic distribution for Ru (right).

diaqua-complex, $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{PF}_6$, is shorter than that (2.281 Å) of the correspondent chlorido-complex, $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4\text{Cl}]\text{PF}_6$ [18].

3.1.3. Magnetic moment

The effective magnetic moment (μ_{eff}) values for complexes (1), (2) and (3), as determined from magnetic susceptibility measurements, are all in the range of 3.6–4.4 B.M. per Ru_2 , at room temperature (Table 1). The high μ_{eff} values are characteristic of the class of $\text{Ru}_2(\text{II,III})$ -tetracarboxylato complexes bearing a metal-metal multiply bonded core of bond order 2.5. These complexes usually exhibit three unpaired electrons per dinuclear unit, which is characteristic of the ground state electronic configuration $(\sigma)^2 (\pi)^2 (\delta)^2 (\pi^*)^3 (\delta^*)^3$ [18,43]. The near-degeneracy of the π^* and δ^* molecular orbitals is explained as a consequence of distinct interactions of the Ru *d*-orbitals (d_{xy} , d_{xz} and d_{yz}) with the orbitals of the carboxylate ligands on the basis on SCF (Self-Consistent Field) calculations [49]. The present results thus confirm our previous data for the electronic configuration of Ru(bppCl) (1) [19]. Moreover, they indicate that the two new axially-modified complexes also exhibit three unpaired electrons per dinuclear unit, thus corroborating the presence of the mixed-valence $\text{Ru}_2(\text{II,III})$ core in both Ru(bppOTf) and Ru(bppPF₆).

3.1.4. Electronic spectra

The electronic spectra (Table 1) were registered for the Ru(bpp) complexes in their solid state and also in solution (DCM, EtOH and MeOH). Although data of (1) were previously reported [19], a more detailed investigation was conducted here based on the spectrum of solid registered in a broader UV/VIS/NIR spectral range (220–2600 nm) and also on the spectra in different solvents. Moreover, interesting features

were found when spectrum of (1) was compared with spectra of (2) and (3) in the solid state (Fig. 3). Compound (1) shows an UV band at $\lambda_{\text{max}} \sim 320$ nm, accompanied by a shoulder at ~ 265 nm, which might be characteristic of the chlorido-complex since absorptions at 200–350 nm in $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{Cl}]$ complexes have been assigned to LMCT (Ligand Metal Charge Transfer) $\pi(\text{Cl}) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$ and $\sigma(\text{Cl}) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$ electronic transitions [43]. The band of diruthenium(II,III)-tetracarboxylatos

Fig. 3. Electronic spectra of Ru(bppCl) (1), Ru(bppOTf) (2) and Ru(bppPF₆) (3) in the solid state (absolute absorbance scales in the overlay are not comparable).

at the VIS region (~420–490 nm) has been discussed (on the basis on theoretical calculations, SCF, ZINDO/S and Density Functional Theory – DFT, and experimental data including single crystal polarized optical spectroscopy and Resonance Raman [18,43,44,49–53]) to have a dominant character of the $\pi(\text{Ru}-\text{O}) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$ electronic transition. Recently, time dependent DFT studies for $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CH})_4\text{X}_2]^-$, $\text{X} = \text{halide}$, species have suggested that, instead of a single transition, the VIS band may exhibit a mixed character with significant contributions of $\alpha(\text{Cl}) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$ (unsolvated complex) and $\alpha(\text{Ru}_2) \rightarrow \sigma^*(\text{Ru}_2)$ (solvated species) [50]. The electronic spectra of solid for the RuIbp complexes studied here are shown in Fig. 3. All of them exhibit the characteristic band of the mixed-valence $\text{Ru}_2(\text{II,III})-(\text{O},\text{O}-\text{carboxylato})$ chromophore at the VIS region. However, the λ_{max} observed at 484 nm in the spectrum of complex (1) shifts to higher energy (438 nm) in the spectra of (2) and (3), giving evidence for the effect of the chloride ligand on the energy of the $\pi(\text{Ru}-\text{O}) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$ electronic transition. The chlorido-complex (1) also exhibits a more prominent shoulder around 600 nm, in relation to the analogues (2) and (3), that might have some contribution of the $\sigma(\text{RuCl}) \rightarrow \pi^*(\text{Ru}_2)$ transition [43,49]. The band at $\lambda_{\text{max}} \sim 1117$ nm in the spectrum of the chlorido-complex (1) could be assigned to the $\delta(\text{Ru}_2) \rightarrow \delta^*(\text{Ru}_2)$ NIR electronic transition, while compounds (2) and (3) showed a weak band at 900–1100 nm. The significant spectral changes when the chloride is replaced by the O-donor ligands OTf or EtOH indicate that the energies of the electronic transitions are strongly affected by the nature of the axial ligands in the RuIbp complexes in the solid state.

The electronic spectrum of (1) dissolved in DCM showed significant changes when compared with the spectrum of the correspondent solid. The VIS band shifted to higher energy (458 nm), and the NIR band appeared at $\lambda_{\text{max}} \sim 1000$ nm showing decreased intensity, in relation to the solid complex. In contrast, the spectra of (2) and (3) in DCM were very similar to those of the corresponding solids, showing only small shifts on the energy of the VIS band (Table 1). The spectral changes found for the chlorido-complex (1) might be related to the breakage of the polymeric chains accompanied by dissociation of one of the chloride ligands to give $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4\text{Cl}(\text{Solv})]$ mono-solvated species. Similar behaviour was shown by the analogue $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{C}_3\text{H}_7)_4\text{Cl}]$ (λ_{max} 456 nm, DCM) for which electrochemical studies suggested considerable dissociation of chloride in the same solvent [54]. In contrast to the behaviour exhibited in DCM, the three axially modified RuIbp complexes showed similar electronic spectra when they were dissolved in O-donor solvents such as ethanol and methanol (Table 1). The VIS band shifted to higher energy (λ_{max} 430 nm, EtOH; 425 nm, MeOH) in relation to the spectra of the respective solid complexes, and the NIR band showed very low intensity. Overall, the spectroscopical studies suggested that the RuIbp complexes may exchange the axial ligands by coordinating solvent molecules in solution while the Ru_2 -drug paddlewheel structure is maintained.

3.1.5. Molar conductivity

The molar conductivity of the RuIbp complexes was determined in DCM, EtOH and MeOH. The interpretation of data was based on the comparison of the values shown among the three complexes (Table 1), taking into account also the literature ranges for electrolyte and non-electrolyte behaviour [55]. Compound (3) that is formed by $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4(\text{EtOH})_2]^+$ cationic species, and has the PF_6^- as a counterion in the solid state, behaves as 1:1 electrolyte in solution, as corroborated by the molar conductivity values (DCM, 36.3; EtOH, 31.0; MeOH, 75.0 $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$) which are all close to the literature expected range. Compound (2) for which the characterization data discussed above indicate coordination of OTf to the dimetallic core in the solid, exhibited very low molar conductivity in DCM (3.7 $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$), that agrees with the neutral character of the RuIbpOTf species. Conversely, in EtOH and MeOH (32.0 and 72.9 $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$, respectively) compound (2) showed 1:1 electrolyte behaviour, indicating dissociation of the triflate ligand in both O-donor solvents. The chlorido-complex (1)

behaved as non-electrolyte in DCM (0.2 $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$) supporting that the chloride ligand remained coordinated to the dimetallic core in this solvent. In EtOH, the molar conductivity of (1) (23.7 $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$) was slightly lower than those of (2) and (3), suggesting that the chloride anionic ligand remained mostly coordinated. In contrast, the values found for the three RuIbp complexes in MeOH were very similar, indicating total dissociation of chloride ligand to give $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4(\text{Solv})_2]^+$ cationic bi-solvated species.

3.1.6. Thermogravimetric Analysis

The thermogravimetric data for the three RuIbp complexes are shown in Table 1. Compound (1) undergoes thermal degradation at ~220–400 °C in two major events (66.3 % weight is lost at the first step (DTG at 257, 280 °C) and 8.7% at the second step (DTG, 360 °C)), both of them associated to exothermic processes. These data agree with our previous results [19], and additional study shows the release of fragments m/z 18 (H_2O) and m/z 44 (CO_2) at 220–400 °C, with a more pronounced release of CO_2 in relation to H_2O , at the range 300–400 °C. The total mass loss (75%) indicates dissociation of all the Ibp ligands (except for four O atoms) and also of the chloride ligand from the complex undergoing thermal degradation [calc. 74.9%, for 4 Ibp + Cl – 4O]. The final mass (25%) agrees with the formation of RuO_2 (2 mol, calc. 25.0%) as thermal residue. Compound (2) undergoes thermal degradation at 200–400 °C in two main exothermic events (the weight loss at the first step (DTG, 270, 306 °C) was ~54%, while 21% weight was lost at the second step (DTG, 347 °C)); additionally, the compound lost 2.4% weight above 400 °C. The fragments m/z 18 (H_2O) and m/z 44 (CO_2) were mainly detected at 250–400 °C, while the fragment m/z 64 (SO_2) was released above ~150 °C. The total mass loss (77.4%) suggests dissociation of the Ibp ligands (except for four O atoms) and the triflate ligand [calc. 77.3%, for 4 Ibp + CF_3SO_3 – 4O]. The residual mass (22.6%) could be associated also in this case to a thermal residue of RuO_2 (2 mol, calc. 22.7%). Compound (3) shows three events of weight loss. The first step at 100–200 °C (DTG, 140 °C) associated to an endothermic process and accompanied by 7.5% mass loss and release of fragment m/z 46 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), could be assigned to dissociation of the two axially coordinated ethanol molecules (calc. 7.3%). The two following events, at 200–320 °C (54.5% weight loss; DTG, 297 °C; exothermic) and 320–450 °C (11% weight loss; DTG, 347 °C; exothermic), both accompanied by release of fragments m/z 18 (H_2O) and m/z 44 (CO_2), were associated to the thermal degradation of the dimetallic unit. In this case, however, differently from compounds (1) and (2), the final thermal residue could not be ascribed. The mass loss (65.5%) was lower than the calculated value for release of four Ibp ligands (except for four O atoms) and PF_6 [calc. 71.5%, for 4 Ibp + PF_6 – 4O], and the residual mass (26%) was higher than the calculated value for RuO_2 (2 mol, calc. 21.1%), suggesting that other types of residues may be formed probably due to the presence of the hexafluorophosphate.

3.2. Biological assays

3.2.1. Cell proliferation assays

In a previous study we have shown that the RuIbpCl metallodrug (1) inhibits the proliferation of human glioma cell lines. The U87MG and A172 cell lines which express the wild type p53 tumour suppressor protein [56] were found to be the most sensitive among four human glioma cell line types (U87MG, A172, U138MG, U251MG) tested for RuIbpCl [22]. The EC_{50} (effective dose that causes 50% inhibition of proliferation) values were approximately 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ after treatment of these two cell lines with RuIbpCl in a period of time of 72 h [22].

In the present work, we have re-investigated the effects of compound (1) on the proliferation of U87MG and A172 cell lines in order to make a comparison with the activities of the other two axially-modified RuIbp metallodrugs, (2) and (3). The effects of the three RuIbp complexes on cell proliferation were monitored for the periods of time of 24, 48 and 72 h (Fig. 4). In support to our previous results [22],

Fig. 4. Cell proliferation assay data for U87MG and A172 cell lines. Plots are shown in number of cells ($\times 10^4$) for the control (Ctl) and for treatments with the RuIbp compounds (1), (2) and (3), at 24, 48 and 72 h (drug concentration was 25, 50, 75, 100, 150 and 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, from left to right for each time) [* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$].

the RuIbpCl metallodrug (1) was found to cause a marked dose and time dependent inhibition of cell number for both studied human glioma cell lines. Inhibitory effects occurred at all incubation periods of time for concentrations at 50–200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in the case of the U87MG cell line. Comparatively, significant values of decreased number of cells were found at drug concentrations ($\mu\text{mol L}^{-1}$): 75 ($p < 0.05$), 100 and 150 ($p < 0.01$) and 200 ($p < 0.001$) at 24 h; 150 and 200 ($p < 0.01$) at 48 h; and 50 and 75 ($p < 0.05$), 100 ($p < 0.01$), and 150 and 200 ($p < 0.001$) at 72 h. Thus, the antiproliferative activity slightly decreased at 48 h, in relation to 24 h, but became highly significant again at 72 h. These data suggest that the effects of (1) in the U87MG cell line, in similar behaviour to the C6 rat glioma cells [20], are time dependent involving cumulative exposure to the metallodrug to become more antiproliferative. In the case of the A172 cell line, however, the tendency of inhibiting proliferation upon exposure to (1) was observed only after 48 and 72 h, with significant decreased number of cells at drug concentrations ($\mu\text{mol L}^{-1}$): 200 ($p < 0.05$) at 48 h; 150 ($p < 0.01$) and 200 ($p < 0.001$) at 72 h.

The axially-modified metallodrugs (2) and (3) exhibited distinct behaviour as both U87MG and A172 cell lines did not respond to them in a similar way to (1). Compound (2) showed significant ($p < 0.05$) inhibition of cell proliferation at the highest concentration (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) after 72 h treatment of U87MG cells, while all the other concentrations did not show significant effects in terms of response to cell proliferation at 24, 48 or 72 h. Additionally, no significant effects occurred either for variable concentration or different times of exposure of the A172 cell line to (2). Conversely, compound (3) did not show significant effects in response to cell proliferation for both U87MG and A172 cell lines, either for variable concentration or different times of exposure to the drug, although a tendency of

inhibiting cell proliferation with increasing drug concentration could be observed for the A172 cells at 72 h.

3.2.2. Cellular uptake of metal

The uptake of ruthenium by both U87MG and A172 cell lines was estimated by ICP-AES analysis of the metal. In an attempt to compare the metal cellular uptake for the three RuIbp complexes, the amounts of Ru in the isolated cell pellets in relation to the total amount of Ru in the corresponding original metallodrugs, which were added to the culture medium during 72 h treatment, were estimated. The values expressed as % Ru were in the range of 3.0–6.0%, suggesting the cellular uptake of metal by both types of the human glioma cell lines.

3.2.3. Apoptosis and mitosis assays

The effects of the RuIbp complexes (1), (2) and (3) on apoptotic and mitotic processes were investigated at 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ metallodrug concentration after 72 h exposure, a common condition in which the three complexes exhibited the best response to inhibition of cell proliferation of U87MG and A172 cell lines. The data (Fig. 5) reveal a clear tendency with increase of the number of apoptotic cells and decrease of the number of cells undergoing mitosis when both types of human glioma cells were exposed individually to each one of the RuIbpCl complexes. Compound (1), in a previous work, was shown to cause a time dependent increase in the number of apoptotic cells with significant ($p < 0.05$) increase at 72 h exposure of both cell lines to the metallodrug [22]. In the present study, although a tendency of increasing number of apoptotic cells in relation to the control was visible, the apoptotic effects of (1) were found to be not significant in the U87MG cells. This distinct behaviour in relation to the previous reported data might be assigned to the higher drug concentration used here (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, compared with

Fig. 5. Apoptotic (a) and mitotic (b) assays data for U87MG and A172 cell lines. Plots are shown in number of cells per field for the control (Ctl) and for treatments with the RuIbp compounds (1), (2) and (3) at 72 h (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ drug) [* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$].

100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in our previous work). Conversely, the effects of (1) on increasing the number of apoptotic cells of the A172 cell line were highly significant ($p < 0.001$) compared to the previous reported results ($p < 0.05$). These findings indicate that an increased concentration of RuIbpCl might favor the increase of apoptotic cells in the A172 cell line, in contrast to the behaviour of the U87MG cell line. Compound (2) did not show significant effects while compound (3) was found to increase the number of apoptotic cells ($p < 0.05$) for the U87MG cell line. Interestingly, however, the three RuIbp complexes (1), (2) and (3) were able to increase the number of apoptotic cells of the A172 cell line in a similar extent ($p < 0.001$).

The effect of the RuIbpCl metallodrug (1) on the mitotic process was investigated here for the first time, for both human glioma cell lines. This metallodrug showed a tendency to decrease the number of mitotic cells, although the data were statistically not significant for the U87MG cell line. In contrast, a significant decrease in the number of mitotic cells ($p < 0.001$) was found when the A172 cell line was exposed to metallodrug (1). Conversely, complexes (2) and (3) were capable of inhibiting the mitotic process for both the investigated human glioma cell lines with significant decreased number of mitotic cells compared to the control.

3.2.4. Migration assays

The effect of metallodrug (1) on the migration process of both U87MG and A172 cell lines was investigated here also for the first time. This study is particularly important in relation to the highly migratory and invasive nature of glioma cells in the progression and recurrence of the disease in the patient setting. Interestingly, the results (Fig. 6) show that the three RuIbp complexes, (1), (2) and (3), have capacity of inhibiting cell migration process ($p < 0.05$) for both the

investigated human glioma cell lines. The inhibition of migration might be compared to some extent to the anti-migratory and thus anti-metastatic effects of the compound NAMI-A [15,57].

4. Conclusions

The RuIbpCl complex of formula $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4\text{Cl}]$ (1), a lead anticancer metallodrug belonging to the class of diruthenium-NSAID compounds investigated in our group, had its structure successfully modified here. The original chloride (Cl^-) anion was replaced by either triflate (OTf , CF_3SO_3^-) or hexafluorophosphate (PF_6^-). The change on the nature of the anion resulted in the axial modification of the $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4]$ paddlewheel unit. The developed synthetic methods succeeded in giving two new axially-modified RuIbp complexes of formulas $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4(\text{CF}_3\text{SO}_3)]$ (2) and $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4(\text{EtOH})_2]\text{PF}_6$ (3), for OTf and PF_6^- , respectively. The characterization was performed for the compounds in the solid state as well as for the complexes in solution. Data from elemental analysis, ESI-MS, vibrational (FTIR, ATR, Raman) and electronic (UV/VIS/NIR) spectroscopies, magnetic susceptibility, molar conductivity measurements, and thermal analysis provided evidence for the proposed composition and structure of the three RuIbp compounds. The solids of compounds (1) and (2) are formed by neutral species with axial anionic (Cl^- or CF_3SO_3^-) ligands counterbalancing the positive charge of the $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4]$ paddlewheel units which are connected by Ru-anion axial bridges to generate polymeric chains. Conversely, the solid of compound (3) is formed by discrete dinuclear positively charged $[\text{Ru}_2(\text{Ibp})_4(\text{EtOH})_2]^+$ paddlewheel species having the PF_6^- as a counter-ion. Studies in solution suggest that the presence of an anionic ligand in the coordination sphere of the Ru_2 dimetallic core contributes to increase the stability of the RuIbp metallodrug.

Fig. 6. Cell migration assays data for U87MG and A172 cell lines. Plots are shown in number of migrating cells for the control (Ctl) and for treatments with the RuIIp compounds (1), (2) and (3) at 24 h (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ drug) [* $p < 0.05$].

To get insight into the influence of the axial structural modification (arising from the axial ligand exchange in the paddlewheel unit) on the biological response of human glioma cell lines, the effects of the three RuIIp metallodrugs on U87MG and A172 cell proliferation, apoptosis, mitosis and cell migration *in vitro* were examined. Overall, the results provide evidence that the presence of the chloride ligand in RuIIpCl (1) may play key role in the mode of action of the metallodrug. Compound (1) showed distinct behaviour when compared with (2) and (3) in the cell proliferation response. RuIIpCl was capable of inhibiting cell proliferation significantly and in higher extent than the two axially-modified analogues, for either U87MG or A172 cells. The three compounds were uptaken by both human glioma cell lines. The effects of the RuIIp metallodrugs on apoptotic and mitotic processes were found to depend on the type of cell line. The increase in number of apoptotic cells as well as the decrease in number of mitotic cells was shown to be pronounced when the A172 cell line was exposed to each one of the three metallodrugs. In contrast, although a tendency in increasing the number of apoptotic cells was clear when the U87MG cells were exposed to the drugs, the effect was not significant. In regard to the mitotic process, the three complexes caused decrease on the number of cells undergoing mitosis with more significant effect for (2) and (3) than for (1). Conversely, the exposure to RuIIp metallodrugs led a significant increase on the number of apoptotic cells and to a significant decrease on the number of mitotic cells in the A172 cell line. Interestingly, all RuIIp metallodrugs were capable of inhibiting cell migration process for the U87MG and the A172 human glioma cell lines. These data are extremely promising as drugs which can inhibit both cell proliferation/mitosis and inhibit

cell migration could target two major chemotherapeutic targets in high grade gliomas.

Acknowledgements

Authors gratefully acknowledge financial support from the Brazilian agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP, research grants to D. de Oliveira Silva (2011/06592-1 and 2014/23047-5) and to A. Colquhoun (2010/51999-0 and 2015/08777-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, productivity fellowships to D. de Oliveira Silva (305914/2015-4) and A. Colquhoun) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, PhD fellowships to Hanif-Ur-Rehman (33002010191P0), T. E. Freitas and R.N. Gomes)). Authors also acknowledge H. E. Toma, R. Ando and L. Rossi for experimental support from their research groups. We thank the National Institutes of Health and National Cancer Institute for grant 1R13CA200223-01A1 (Conference Organization support, 1st International Symposium on Clinical and Experimental Metallodrugs in Medicine: Cancer Chemotherapy, CEMM).

References

- [1] L.R. Kelland, Nat. Rev. Cancer 7 (2007) 573–584.
- [2] Y. Jung, S.J. Lippard, Chem. Rev. 107 (2007) 1387–1407.
- [3] J. Reedijk, Eur. J. Inorg. Chem. 10 (2009) 1303–1312.
- [4] N.J. Wheate, S. Walker, G.E. Craig, R. Oun, Dalton Trans. 39 (2010) 8113–8127.
- [5] W.H. Ang, P.J. Dyson, Eur. J. Inorg. Chem. 20 (2006) 4003–4018.
- [6] D. de Oliveira Silva, Anti Cancer Agents Med. Chem. 10 (2010) 312–323.
- [7] A. Bergamo, C. Gaidon, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, G. Sava, J. Inorg. Biochem. 106 (2012) 90–99.

- [8] S.J. Dougan, P.J. Sadler, *Chimia* 61 (2007) 704–715.
- [9] G.S. Fink, *Dalton Trans.* 39 (2010) 1673–1688.
- [10] W.H. Ang, A. Casini, G. Sava, P.J. Dyson, *J. Organomet. Chem.* 696 (2011) 989–998.
- [11] G. Gaspar, I. Ott, N. Metzler-Nolte, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 3–25.
- [12] A.A. Nazarov, C.G. Hartinger, P.J. Dyson, *J. Organomet. Chem.* 751 (2014) 251–260.
- [13] B.S. Murray, M.V. Babak, C.G. Hartinger, P.J. Dyson, *Coord. Chem. Rev.* 306 (2016) 86–114.
- [14] E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo, G. Sava, *Curr. Top. Med. Chem.* 4 (2004) 1525–1535.
- [15] A. Bergamo, G. Sava, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 8818–8835.
- [16] C.G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M.A. Jakupcic, B. Kynast, H. Zorbas, B.K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 891–904.
- [17] R. Trondl, P. Heffeler, C.R. Kowol, M.A. Jakupcic, W. Bergerbd, B.K. Keppler, *Chem. Sci.* 5 (2014) 2925–2932.
- [18] F.A. Cotton, C.A. Murillo, R.A. Walton, *Multiple Bonds Between Metal Atoms*, third ed. Springer, Berlin, 2005.
- [19] A. Andrade, S.F. Namora, R.G. Woisky, G. Wielez, R. Najjar, J.A.A. Sertié, D. de Oliveira Silva, *J. Inorg. Biochem.* 81 (2000) 23–27.
- [20] G. Ribeiro, M. Benadiba, A. Colquhoun, D. de Oliveira Silva, *Polyhedron* 27 (2008) 1131–1137.
- [21] M. Benadiba, R.R.P. Santos, D. de Oliveira Silva, A. Colquhoun, *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 928–935.
- [22] M. Benadiba, I.M. Costa, R.L.S.R. Santos, F.O.S. Serachi, D. de Oliveira Silva, A. Colquhoun, *J. Biol. Inorg. Chem.* 19 (2014) 1025–1035.
- [23] G. Ribeiro, M. Benadiba, D. de Oliveira Silva, A. Colquhoun, *Cell Biochem. Funct.* 28 (2010) 15–23.
- [24] J.A. Miyake, M. Benadiba, G. Ribeiro, D. de Oliveira Silva, A. Colquhoun, *Anticancer Res.* 34 (2014) 1901–1911.
- [25] D. de Oliveira Silva, *Ruthenium Compounds Targeting Cancer Therapy*, in: Atta-ur-Rahman, M.J. Choudhary (Eds.), *Frontiers in Anti-cancer Drug Discovery*, vol. 4, Bentham Science Publishers, Sharjah, UAE, 2014, pp. 88–156.
- [26] R.N. Gomes, A. Colquhoun, *Lipids Health Dis.* 11 (2012) 171.
- [27] T.S. Armstrong, *Oncol. Nurs. Forum* 36 (2009) E232–E240.
- [28] M. Bredel, *Lancet Oncol.* 10 (2009) 928–929.
- [29] A. Giese, R. Bjerkvig, M.E. Berens, M. Westphal, *J. Clin. Oncol.* 21 (2003) 1624–1636.
- [30] E.A. Maher, F.B. Furnari, R.M. Bachoo, D.H. Rowitch, D.N. Louis, W.K. Cavenee, R.A. DePinho, *Genes Dev.* 15 (2001) 1311–1333.
- [31] F. Lefranc, J. Brochi, R. Kiss, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 2411–2422.
- [32] E. Reisner, V.B. Anton, B.K. Keppler, A.J.L. Pombeiro, *Inorg. Chim. Acta* 361 (2008) 1569–1583.
- [33] R.L.S.R. Santos, R. van Eldik, D. de Oliveira Silva, *Inorg. Chem.* 51 (2012) 6615–6625.
- [34] R.L.S.R. Santos, R. van Eldik, D. de Oliveira Silva, *Dalton Trans.* 42 (2013) 16796–16805.
- [35] M. Messori, T. Marzo, R.N.F. Sanches, Hanif-Ur-Rehman, D. de Oliveira Silva, A. Merlino, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 6172–6175.
- [36] R.L.S.R. Santos, R.N.F. Sanches, D. de Oliveira Silva, *J. Coord. Chem.* 68 (2015) 3209–3228.
- [37] R.W. Mitchell, A. Spencer, G.J. Wilkinson, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 8 (1973) 846–854.
- [38] K.D. Drysdale, E.J. Beck, T.S. Cameron, K.N. Robertson, M.A.S. Aquino, *Inorg. Chim. Acta* 256 (1997) 243–252.
- [39] F.A. Cotton, J. Lu, A. Yokochi, *Inorg. Chim. Acta* 275–276 (1998) 447–452.
- [40] M. McCann, A. Garvill, C. Cardin, M. Convery, *Polyhedron* 12 (1993) 1163–1169.
- [41] R.A. Nyquist, C.L. Putzig, M.A. Leugers, *Infrared and Raman Spectral Atlas of Inorganic Compounds and Organic Salts: Text and Explanations*, vol. 1, Academic Press, San Diego, 1996.
- [42] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Parts A and B*, 5th ed. John Wiley & Sons Inc., New York, 1997.
- [43] M.A.S. Aquino, *Coord. Chem. Rev.* 170 (1998) 141–202.
- [44] V.M. Miskowski, T.M. Loefer, H.B. Gray, *Inorg. Chem.* 26 (1987) 1098–1108.
- [45] E.D. Risberg, I. Eriksson, J. Mink, I.G.M. Pettersson, M.Y. Skripkin, M. Sandstro, *Inorg. Chem.* 46 (2007) 8332–8348.
- [46] S. Gosiewska, J.J.L.M. Cornelissen, M. Lutz, A.L. Spek, G. van Koten, R.J.M.K. Gebbink, *Inorg. Chem.* 45 (2006) 4214–4227.
- [47] A. Molla-Abbassi, I. Eriksson, J. Mink, I. Persson, M. Sandström, M. Skripkin, A. Ullström, P. Lindqvist-Reis, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (2002) 4357–4364.
- [48] P. Bergström, R. Frech, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 12603–12611.
- [49] J.G. Norman, G.E. Renzoni, D.A. Case, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 5256–5267.
- [50] M.A. Castro, A.E. Roitberg, F.D. Cukiernik, *Inorg. Chem.* 47 (2008) 4682–4690.
- [51] R.J.H. Clark, L.T.H. Ferris, *Inorg. Chem.* 20 (1981) 2759–2766.
- [52] V.M. Miskowski, H.B. Gray, *Inorg. Chem.* 27 (1988) 2501–2506.
- [53] G. Estiú, F.D. Cukiernik, P.E. Maldini, O. Poizat, *Inorg. Chem.* 38 (1999) 3030–3039.
- [54] F.A. Cotton, E. Pedersen, *Inorg. Chem.* 14 (1975) 388–391.
- [55] W.J. Geary, *Coord. Chem. Rev.* 7 (1971) 81–122.
- [56] L.F. Batista, W.P. Roos, B. Kaina, C.F. Menck, *Mol. Cancer Res.* 7 (2009) 237–246.
- [57] S. Zorzet, A. Bergamo, M. Cocchiello, A. Sorc, B. Gava, E. Alessio, E. Iengo, G. Sava, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295 (2000) 927–933.