

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Aspectos químicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexo rutênio-nitrosilo como precursor de óxido nítrico. Princípios de aplicação como agente citotóxico em linhagens de células tumorais

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de **Doutor em Ciências**

Área de Concentração: **Química e Física Biológica**

Orientada: Tassiele Andréa Heinrich

Orientador: Prof. Dr. Roberto Santana da Silva

Ribeirão Preto
2013

RESUMO

HEINRICH, T. A. **Aspectos químicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexo rutênio-nitrosilo como precursor de óxido nítrico. Princípios de aplicação como agente citotóxico em linhagens de células tumorais.** 2013. 159f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro biológico que tem importância vital em muitos processos fisiológicos, tais como o controle cardiovascular, sinalização neural e defesa contra microrganismos e tumores. No entanto, a formação de outras espécies reativas, resultantes de reações químicas do NO com o ambiente biológico, impõe limites para o entendimento dos mecanismos celulares envolvidos em possíveis respostas biológicas. Devido ao potencial farmacológico e aos benefícios do NO, é de interesse o desenvolvimento de compostos que, quando estimulados, possam liberar esta molécula de forma controlada. Uma das possibilidades envolve complexos rutênio-nitrosilo termodinamicamente estáveis, mas que possam ser ativos sob estimulação. Este trabalho apresenta observações recentes de complexos rutênio-nitrosilo como agentes liberadores de NO e seus efeitos sobre linhagens de células B16-F10, L929 e Jukart. Para entender melhor o efeito NO como agente anticancerígeno o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]\text{Cl}_3$ foi utilizado como agente doador de NO. O efeito biológico do composto, bem como o do seu produto após liberação de NO - $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$ - foi avaliado pelos aspectos químicos e fotoquímicos. Os resultados mostraram que o NO, oriundo deste sistema, apresentou baixa citotoxicidade em células B16-F10. A atividade citotóxica foi maior quando o complexo foi encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas, diminuindo a viabilidade celular para cerca de 50 %. Além disso, sugere-se um efeito sinérgico da espécie aquo-rutênio, cuja viabilidade celular foi diminuída para 25% após 24 horas de incubação com este complexo. O efeito sinérgico do oxigênio singleto e NO foi também avaliado mediante a possibilidade de aplicação em terapia clínica. A produção de espécies radicalares de oxigênio tem sido utilizada para o tratamento do câncer, numa técnica conhecida como terapia fotodinâmica (TFD). O sucesso dessa terapia depende da concentração de oxigênio, e quando em hipóxia, geralmente culmina na formação reduzida de espécies reativas de oxigênio e consequente limitação clínica da TFD. Um dos objetivos deste trabalho é a avaliação do efeito sinérgico entre oxigênio singleto e NO. Para fins destes estudos, a espécie trinuclear $[\{\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy}_2)\}_2\text{RuPc}(\text{pz})_2](\text{PF}_6)_6$ (**I**) foi sintetizada e proposta como fotogeradora de oxigênio singleto e NO. Ensaios fotobiológicos utilizando (**I**) a 0,4 μM , em células B16-F10, resultaram na diminuição da viabilidade celular para 30% sob irradiação luminosa em 660 nm, ao final de 4 horas. Por outro lado, sem fotoestímulo e na mesma concentração do composto (**I**), a viabilidade celular foi de 90%. Estudos relacionados ao mecanismo de morte celular em consequência da ação do oxigênio singleto e NO gerados pelo composto (**I**) também foram discutidos neste trabalho. A possibilidade de aplicação de um sistema como o descrito em (**I**) no tratamento contra o câncer pode ser considerado interessante na terapia fotodinâmica.

Palavras-chaves: óxido nítrico, morte celular, complexos rutênio-nitrosilo, fotobiologia.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do câncer

O processo de sobrevivência dos organismos é dado por uma série de reações de divisão e multiplicação das células, a partir de células preexistentes. A multiplicação celular é uma sequência de eventos ordenados que a natureza, em situações normais, é capaz de regular de maneira eficaz, desde a divisão até a morte celular. A sobrevivência de cada espécie dos organismos vivos abrange uma cascata de eventos celulares complexos que envolvem proteínas, enzimas, ativação de fatores de crescimento, regulação na expressão de oncogenes e controle de genes supressores de tumores. Entretanto, quando dessa divisão surgem células anormais, cuja multiplicação é descontrolada, sem que haja um mecanismo de controle dessa proliferação, por meio da morte celular programada (apoptose), pode haver a formação de aglomerados celulares com capacidade para se expandirem para tecidos vizinhos, formando tumores (ou neoplasmas) (ALBERTS et al., 2002). Essa massa de células malignas contorna os mecanismos de defesa do organismo, podendo desencadear o câncer.

Uma das formas bastante agressivas de câncer de pele, que tem se agravado nos últimos anos, é o melanoma, neoplasia derivada dos melanócitos. Embora esse seja o câncer responsável por aproximadamente 4 % de todos os casos, ele causa cerca de 79 % de morte relacionadas a essa patologia (BALDEA; FILIP, 2012) e 1 % do total de mortes no Brasil (MENDES; KOIFMAN; KOIFMAN, 2010). A ocorrência do melanoma se processa inicialmente na pele, razão pela qual a estrutura deste órgão deve ser observada nos processos de difusão do câncer. Apesar das causas oriundas do melanoma, o número de casos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (INCA, 2013). Sua principal forma de tratamento ainda é a remoção cirúrgica, uma vez que melanomas apresentam resistência para alguns tipos de drogas usadas na quimioterapia (intervenção por compostos químicos). Nesse sentido, a terapia fotodinâmica mostra-se interessante até mesmo como uma terapia coadjuvante, uma vez que seus efeitos adversos esperados são mínimos.

A camada de células da parte basal da epiderme, células essas chamadas melanócitos, produzem um pigmento de cor marrom a preto (melanina) que determina a cor da pele, do cabelo e pelos dos organismos vivos (Figura 1). A

melanina também ajuda a proteger contra os raios solares, principais fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento do melanoma. Dentre eles, o raio UVA (320 – 400 nm) apresenta-se entre os raios solares que mais conseguem penetrar na pele, desencadeando respostas mais agressivas (GARIBYAN; FISHER, 2010). Quando os melanócitos crescem controladamente, dá-se início a uma lesão benigna, conhecida como mancha ou nevos. Entretanto, os melanócitos podem crescer de maneira descontrolada, podendo se transformar em uma lesão maligna, o melanoma.

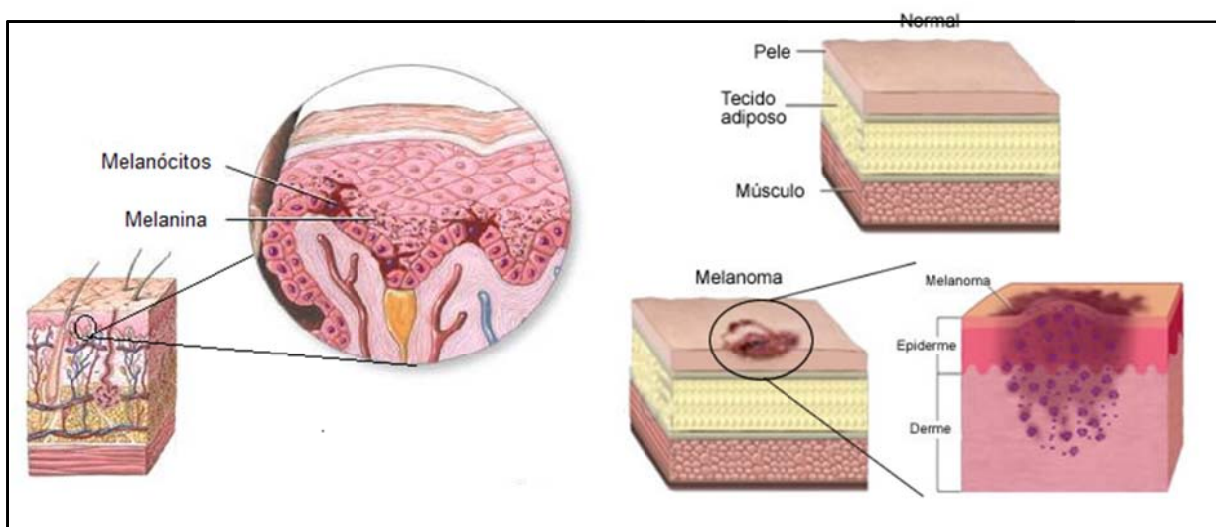


Figura 1. Aspectos gerais do melanoma. O melanoma deriva dos melanócitos (em detalhe à esquerda), células da pele responsáveis pela produção de melanina relacionada à pigmentação da pele. À direita, quando se comparam as camadas da pele normal e a com melanoma, percebe-se que a pele normal, o tecido adiposo e o músculo são saudáveis. Na imagem com melanoma (direita inferior), é mostrado o melanoma em estágio invasivo

Fonte: adaptado de *Nucleus Medical Media* (2013).

1.2 Terapias contra o câncer

No decorrer dos últimos anos, o câncer tem sido uma das maiores causas de morte, ultrapassando outras enfermidades como as doenças cardiovasculares e as infecciosas. As causas para essa tendência são a soma de vários fatores, entre eles os hábitos de vida, como tabagismo e alcoolismo, além do aumento da expectativa de vida da população, que vem contribuindo para essas evidências. Dentre as alternativas para o tratamento de outros tipos de câncer, além do melanoma,

destacam-se a radioterapia, a remoção cirúrgica e a quimioterapia (DAVIDS; KLEEMANN, 2011). Ainda, pesquisas têm mostrado grande interesse e também preocupação pela busca por novas metodologias e novos compostos que possam ser usados na terapia contra o câncer. Dentre essas, pode-se destacar a Terapia Fotodinâmica (TFD), que é descrita como uma técnica pouco invasiva e que pode apresentar efeitos colaterais mínimos (DAVIDS; KLEEMANN, 2011; OCHSNER, 1996; TEDESCO; ROTTA; LUNARDI, 2003). Por suas vantagens, a TFD já foi aprovada pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) como tratamento não só para o câncer mas, também, para outras doenças como vitiligo (COLUCCI; LOTTI; MORETTI, 2012), psoríase (COLLINS et al., 1997), infecções virais e bacterianas na pele, assim como seus processos inflamatórios relacionados, como a acne (BABILAS et al., 2010; RIDDLE et al., 2009). Além disso, tem sido bastante explorado o uso dessa terapia para tratamentos estéticos como no rejuvenescimento e na dermatologia cosmética (BRUSCINO et al., 2010).

1.2.1 A Terapia Fotodinâmica para o tratamento do câncer

A TFD é uma modalidade médica de terapia de neoplasias que emprega combinação de luz e fármaco, a fim de se obter um efeito citotóxico ou um efeito modificador ao câncer, ou a qualquer outro tecido indesejável (DOUGHERTY et al., 1978; DOUGHERTY, 1984; DOUGHERTY, 1995). Isso se deve ao modo de ação duplo-seletivo, ou seja, uma droga fotossensibilizante e de baixa toxicidade é administrada ao organismo. Quando a droga atinge uma razão apropriada de acúmulo em tecidos lesados, em relação ao tecido saudável, uma dose de luz regulada na faixa de 600 a 850 nm (chamada janela terapêutica) é incidida sobre o tecido lesado. A luz ativa a droga e desencadeia sua ação tóxica (DAVIDS; KLEEMANN, 2011; PLAETZER et al., 2009).

A TFD tem sido relatada como uma terapia de sucesso e clinicamente aprovada para o tratamento de neoplasias não malignas (TAUB, 2007) e malignas, em diferentes regiões do organismo, tais como cabeça e pescoço, esôfago, pulmão, bexiga e também no tratamento de câncer de pele, inclusive casos recorrentes e metastáticos (AYARU; BOWN; PEREIRA, 2005; BALDEA; FILIP, 2012; NAVA et al., 2011; QUON et al., 2011).

Considera-se a TFD uma modalidade seletiva já que se faz necessária a existência simultânea de três componentes: fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio molecular (AGOSTINIS et al., 2011; DAVIDS; KLEEMANN, 2011). A efetividade da TFD é dependente da concentração de oxigênio e pode decair em condições de hipóxia tecidual. A ausência de qualquer um dos três fatores descritos inviabiliza a toxicidade da TFD, tornando essa modalidade de terapia segura, com efeitos adversos mínimos ao paciente e com fácil controle de um três fatores, se necessário. Sendo assim, as principais vantagens da TFD sobre os outros tratamentos do câncer como a quimioterapia, cirurgia, radioterapia e imunoterapia é o fato de que aquela terapia clínica agrupa as seguintes características: i) baixa toxicidade sistêmica, com fácil eliminação do organismo; ii) capacidade para destruir seletivamente o tumor, salvando as células saudáveis que o circundam e iii) pode ser usada como uma terapia única ou em combinação com outras terapias usadas e citadas acima (DAVIDS; KLEEMANN, 2011).

O mecanismo de atuação da TFD pode ocorrer por meio de dano oxidativo a componentes celulares como consequência da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), principalmente o oxigênio singlete (1O_2). Após a injeção endovenosa ou aplicação local do fotossensibilizador há acúmulo no tecido tumoral (Figura 2), podendo haver internalização do mesmo para o ambiente intracelular ou ficar aderido à membrana plasmática das células.

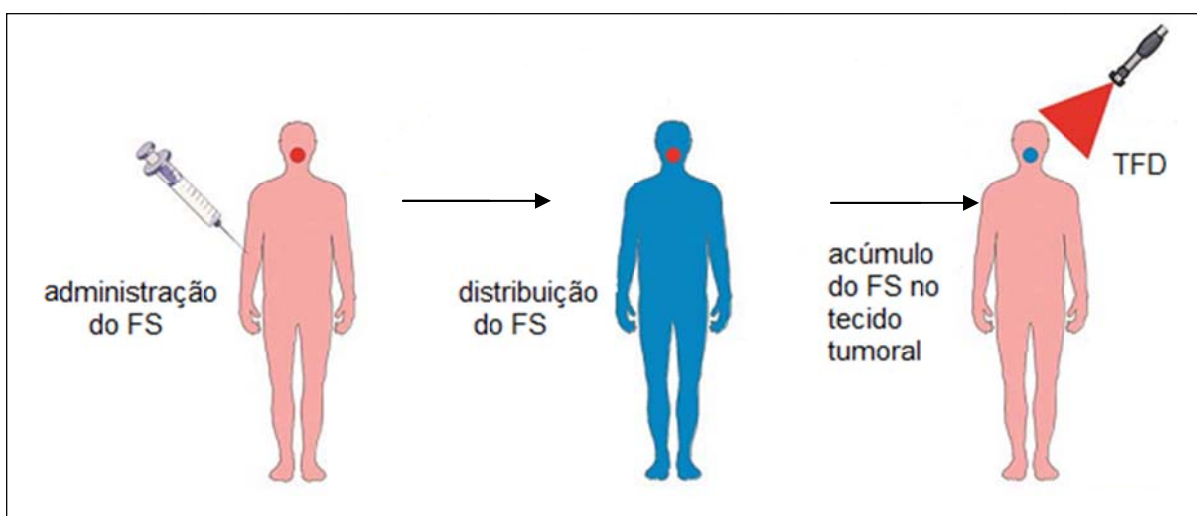


Figura 2. Localização seletiva do fotossensibilizador para uso em Terapia Fotodinâmica.

Fonte: adaptado de Agostinis et al. (2011).

Nesse estágio, o fotossensibilizador encontra-se no estado fundamental, estável, sendo conhecido como estado singleto (^1FS), quando não está reagindo com componentes celulares. Assim que ocorre a irradiação tecidual em comprimento de onda específico, normalmente na região vermelha da janela terapêutica, o FS que se encontra acumulado nas células tumorais absorve a energia fornecida pela fonte luminosa, em forma de fótons, atingindo um estado excitado tripleto (^3FS) de maior energia (AGOSTINIS et al., 2011). Nesse momento, de forma muito rápida, o fotossensibilizador pode sofrer dois tipos de reações fotoenergéticas (Figura 3):

- Reação do Tipo I - o fotossensibilizador pode reagir diretamente com substratos como membrana celular ou moléculas, onde transfere um próton ou um elétron para formar radicais aniônicos ou catiônicos, respectivamente. Esses radicais podem interagir com oxigênio para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs);
- Reação do Tipo II - o fotossensibilizador pode transferir sua energia diretamente ao oxigênio molecular (que, em seu estado fundamental, é tripleto), para formar oxigênio singleto excitado ($^1\text{O}_2$).

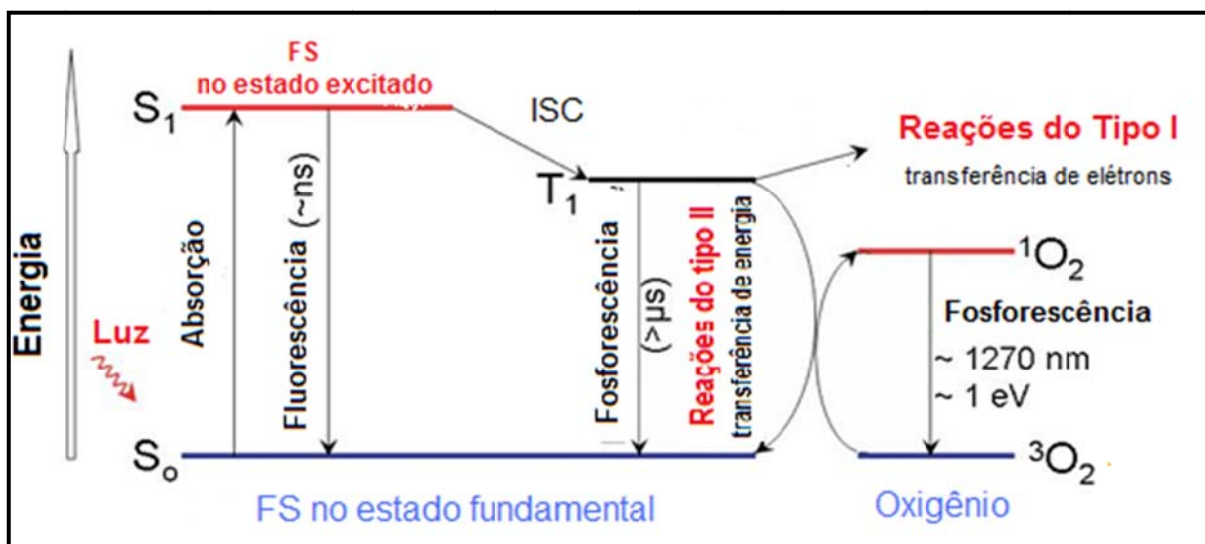


Figura 3. Ilustração do processo de sensibilização de um fotossensibilizador após absorção de luz, baseado no Diagrama de Jablonski. FS = fotossensibilizador; ISC = conversão intersistema.

Fonte: modificado de Agostinis et al. (2011).

Na reação de tipo II, as moléculas do fotossensibilizador funcionam como verdadeiros catalisadores fotoativados para a produção de $^1\text{O}_2$. Ressalta-se, porém,

que outras espécies podem ser formadas devido a irradiação luminosa. Uma destas possibilidades é a formação de Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) (REEVES; REED; BROWN, 2009), podendo isto ter efeito corroborativo ao do $^1\text{O}_2$ na terapia clínica.

Os dois tipos de reações (tipo I e tipo II) podem ocorrer simultaneamente e são dependentes do fotossensibilizador utilizado, da concentração dos substratos e concentração de oxigênio. Devido à alta reatividade e ao curto período de meia-vida do $^1\text{O}_2$ e de outros radicais formados, as moléculas e estruturas que estão próximas às áreas de produção são diretamente afetadas durante a irradiação luminosa (ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009). A geração massiva de EROs promove o disparo de diversos mecanismos celulares que induzirão a morte celular direta por diferentes vias: apoptose, necrose e/ou autofagia. Isto depende do tipo de célula tratada, da concentração de fotossensibilizador empregado, da dose de fotoestímulo e da localização intracelular do fotossensibilizador. A localização intracelular do fotossensibilizador é um fator determinante importante, já que o curto tempo de vida do $^1\text{O}_2$, de aproximadamente 20 nanossegundos, determina o sítio primário de dano oxidativo, que corresponde a aproximadamente 40 nm de distância da sua localização intracelular inicial (HILF, 2007).

A localização intracelular pode ainda prever a sua via de morte. Acúmulos de fotossensibilizadores em mitocôndrias estão associados à indução de apoptose celular pela liberação de citocromo c e indução de resposta, por meio da cascata de caspases. Fotossensibilizadores localizados em membranas de organelas e lisossomos tendem a ocasionar necrose devido à perda rápida de integridade de membrana, bem como à rápida depleção intracelular de ATP. Mroz e colaboradores (2011) relatam que altas doses na TFD, com alta concentração do FS e uma dose de luz alta tendem a causar necrose. É descrito, ainda, que viabilidade celular menor que 70 % é preditiva de apoptose, enquanto que a necrose é encontrada em citotoxicidade de mais de 90%.

Embora os estudos para o uso clínico da TFD estejam avançados, algumas limitações ainda são encontradas em relação ao seu uso. Dentre as desvantagens pode-se citar a baixa penetrabilidade da luz a ser usada na terapia. Dependendo do local onde o tumor se encontra, a maneira como se dará a aplicação da luz poderá ser impeditivo. Há também o fato de essa terapia não ser eficiente em casos de câncer que já tenham entrado em metástase, o que pode levar o paciente à morte

(AGOSTINIS et al., 2011). Além disso, é relacionada ao ambiente intratumoral a baixa concentração de oxigênio, um dos componentes necessários para a formação da espécie $^1\text{O}_2$, fundamental para o efeito da TFD (FINGAR et al., 1992; FREITAS; BARONZIO, 1991; HENDERSON; FINGAR, 1989). Nesse sentido, é de grande interesse a busca por alternativas para tornar essa terapia melhor aproveitada como, por exemplo, fazer uso de outros radicais (por exemplo ERNs) que possam ser gerados no tecido doente. Nesse contexto, complexos metálicos desenhados quimicamente para esse fim podem viabilizar este procedimento, sendo usados como carreadores de diferentes radicais livres.

Neste contexto e no âmbito de ampliar o conhecimento para aplicação de outros radicais em TFD, sistemas que combinam diversidade de aplicação sem grandes alterações estruturais parecem ser interessantes para estes estudos. Compostos de coordenação, dada a sua controlada reatividade, podem ser uma grande possibilidade para este fim.

1.3 Complexos metálicos (compostos de coordenação)

Os químicos definem complexos metálicos, também conhecidos como compostos de coordenação, como compostos contendo um (ou mais) metal(is) de transição, circundado por diferentes grupos de átomos ou moléculas chamados ligantes. Os ligantes estão, geralmente, ligados ao metal por uma ligação covalente coordenada, doando um par de elétrons livre para um orbital vazio do metal (IUPAC, 2013). Dessa forma, esses ligantes podem ser compostos orgânicos que ligados a um metal, geram novas estruturas que podem desempenhar diferentes atividades biológicas, como atividades citotóxicas, apoptóticas, anti-inflamatórias e bactericidas. Dependendo da estrutura química, resultante da união do ligante ao centro metálico, diferentes atividades biológicas podem ser atribuídas ao complexo formado, sendo estas dependentes do tipo de metal e da natureza química do ligante.

É relatado que desde a antiguidade os metais são usados para fins terapêuticos. Desde a era antes de Cristo, o cobre era usado pelos egípcios para esterilizar a água. Árabes e chineses, há mais de 3.500 anos, usavam o ouro para tratamento de certas patologias por acreditarem que, por ser um metal precioso, traria benefícios para a saúde. O ferro já era usado como remédio no Egito, em 1.500 a.C., e o zinco para o tratamento de feridas (ORVIG; ABRAMS, 1999; SCOTT;

ORVIG, 2009). Dentro da abordagem das possíveis ações que os diferentes metais demonstram, unidos ou não a ligantes, ou em forma de sais, estão o ouro para atividade bactericida (ex.: tuberculose) e anti-inflamatória (Auranofin®); o ferro na atividade antitumoral (ex.: bleomicina) e sais de lítio para o tratamento do transtorno bipolar (COHEN, 2007; ORVIG; ABRAMS, 1999).

Em relação aos compostos sintetizados quimicamente para a terapia do câncer, o interesse pela busca por novas drogas com centros metálicos aumentou com a descoberta da ação da cisplatina [*cis*-diclorodiaminaplatina(II)], por Rosenberg e colaboradores, em 1965. Esse composto também sofreu alterações químicas em sua estrutura, com a finalidade de se formarem outras espécies (exemplo: carboplatina) que pudessem diminuir os efeitos adversos causados pela cisplatina (ANG; DYSON, 2006; KALUDEROVIĆ; PASCHKE, 2011). Desde então, complexos metálicos com centro de platina tornaram-se alvos de grande interesse pela investigação de atividade citotóxica e antitumoral. Entretanto, o conhecimento sobre a relação entre a estrutura do ligante e a citotoxicidade de complexos baseados em platina ainda não é totalmente esclarecido, mesmo que algumas regras gerais tenham sido propostas. Descobriu-se por exemplo, que a cisplatina reage com várias biomoléculas no nosso organismo, especialmente com aquelas que contêm grupos de nitrogênio e enxofre. Dessa maneira, acredita-se que deve ocorrer formação de um complexo cíclico com o DNA (HOU et al., 2009; JAMIESON; LIPPARD, 1999), o que seria responsável pela sua ação antitumoral.

Apesar do esforço dispensado pelos pesquisadores para entender como se dá o mecanismo de ação da cisplatina, desde sua interação com biomoléculas até sua possível ação intracelular, há também a preocupação com as limitações do uso desse composto devido aos seus efeitos adversos como nefro e hepatotoxicidade (LU; CEDERBAUM, 2006). A resistência desenvolvida por alguns tipos de câncer contra a cisplatina impulsionou as pesquisas pela busca por complexos que sejam constituídos por outros tipos de metais. Vários complexos com a fórmula geral $ML_2L_2'X_2$ e ou ML_2X_2 (sendo M o átomo metálico, L o ligante inerte e X o grupo lábil ou abandonador) foram sintetizados, caracterizados e testados biologicamente (LIPPARD; BERG, 1994) Dentre estes destacam-se compostos de titânio (Ti), vanádio (V), molibdênio (Mo), rênio (Re), ferro (Fe), rutênio (Ru), ósmio (Os), cobalto (Co), níquel (Ni), paládio (Pd), cobre (Cu), ouro (Au) e bismuto (Bi) (ESPÓSITO;

NAJJAR, 2002; FRIEBOLIN et al., 2005; OTT; GUST, 2007; TAN et al., 2010; VAN RIJT; SADLER, 2009).

Dentre os complexos que têm sido estudados, os compostos com rutênio como centro metálico têm recebido atenção especial. A habilidade dos complexos de rutênio em mimetizar a ligação do ferro a moléculas de importância biológica, e assim explorar os mecanismos que o corpo desenvolveu para o transporte não tóxico do ferro, é uma particularidade atrativa destes complexos (BRABEC; NOVÁKOVÁ, 2006). Em 1999, o complexo de rutênio NAMI-A (*trans*-imidazoldimetilsulfoxidotetraclororutenato(II)) entrou em fase clínica de testes por demonstrar atividade antimetastática. Atualmente, completou a fase I de estudos para o ajuste de dose, estudos farmacocinéticos e análise toxicológica em 24 pacientes com diferentes tipos de câncer que não foram curados com cirurgia e quimioterapia (ALESSIO et al., 2004; BERGAMO et al., 2012; RADEMAKER-LAKHAI et al., 2004; SAVA et al., 1998). Em 2003, estudos com KP1019 [H_2ind][*trans*- $RuCl_4(Hind)_2$], coordenado pelo grupo de B. Keppler (Universidade de Viena, Áustria) entrou em fase I de testes clínicos por demonstrar atividade antitumoral contra câncer de cólon e consequentes metástases. Diferentes mecanismos de ação para a atividade antitumoral deste composto foram descritos como, por exemplo, a ligação com a proteína transferrina, indução apoptose pela via mitocondrial e geração de EROs (BERGAMO et al., 2012; HARTINGER et al., 2006; HARTINGER; PHILLIPS; NAZAROV, 2011).

Embora o efeito dos compostos de coordenação na citotoxicidade de células tumorais seja quase sempre condicionado ao metal, a contribuição dos ligantes parece ser um objetivo iminente. Dentre estes ligantes, o óxido nítrico é tido como de interesse para esses estudos.

1.4 Agentes doadores de óxido nítrico

Complexos metálicos podem ser desenhados e utilizados para que liberem, controladamente, a molécula de óxido nítrico. De maneira geral, isso pode se dar de duas formas: a partir de estímulos luminosos ou por ações redutimétricas, como consequência do microambiente do sistema biológico estudado (TFOUNI et al., 2012; FRY; MASCHARAK, 2011).

A hipóxia das neoplasias de grande porte constitui-se na maior barreira quanto ao sucesso da TFD como terapia efetiva na fase clínica. Com isso, há constante procura por outras espécies úteis, como radicais livres derivados dos fotossensibilizadores utilizados, bem como outras espécies radicalares independentes do oxigênio (VAUPEL; KELLEHER; HÖCKEL, 2001; FINGAR et al., 1992; YUE et al., 2013). Uma possibilidade é a utilização de compostos, como os complexos rutênio-nitrosilo, que tenham a propriedade de liberar NO (óxido nítrico), quando estimulados fotoquimicamente. O NO, além de possuir natureza radicalar, reage com o ânion superóxido (O_2^-) presente no meio e forma o peroxinitrito ($ONOO^-$), que é uma espécie altamente reativa e faz parte de uma classe de substâncias denominadas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (HEROLD; KOPPENOL, 2005; IGNARRO, 2000; MONCADA; BOLANOS, 2006).

O NO apresenta surpreendente onipresença em seres vivos. É a única molécula endógena conhecida que reúne as propriedades de neurotransmissor, de mediador constitutivo e indutível e de agente citotóxico. Essa molécula possui ação na regulação da pressão sanguínea, no sistema imunológico e nas atividades do cérebro, fígado, pâncreas, útero e pulmões (CULOTTA; KOSHLAND, 1992; FELDMAN; GRIFFITH; STUEHR, 1993; IGNARRO, 2000; KOVALEVA et al., 2013; REEVES et al., 2009; RICHTER-ADDO; LEGZDINS, 1992). O NO, uma das moléculas mais versáteis produzidas pelo organismo, tornou-se recentemente, matéria-prima de novos materiais destinados a serem empregados como fármacos. Como exemplo, é descrito um anti-inflamatório não esteroideal doador de NO que demonstra inibição do crescimento celular de células de câncer de pâncreas, por liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que atuam em uma via clássica de proliferação celular, a via das MAP quinases (MAPK) (ZHOU et al., 2008). Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) são parte do grupo de enzimas que regulam sobrevivência, desenvolvimento e proliferação celular.

Uma das áreas de pesquisa sobre a bioquímica do NO que mais se desenvolveu nas últimas décadas é relacionada à sua ação vasodilatadora (BENDHACK et al., 2009; BONAVENTURA et al., 2006; BONAVENTURA et al., 2007; BONAVENTURA et al., 2008; BONAVENTURA et al., 2009; da ROCHA et al., 2008; da SILVA et al., 2007; de GAITANI et al., 2009; de LIMA et al., 2005; de LIMA et al., 2006; de LIMA et al., 2007; FERREZIN et al., 2005; LUNARDI et al., 2007; LUNARDI; SILVA; BENDHACK, 2009; OLIVEIRA et al., 2007; RODRIGUES et al.,

2008). Em 1987, constatou-se ser o NO um Fator de Relaxamento Endotélio Dependente (FRED). Nas células endoteliais, o NO é produzido pela isoforma da enzima constitutiva Óxido Nítrico Sintase Endotelial (NOSe) (MUIJSERS et al., 2001). Resumidamente, essa enzima produz NO e o aminoácido L-citrulina a partir do aminoácido L-arginina e de oxigênio (O₂) presentes no meio. Há três isoformas da enzima óxido nítrico sintase: isoenzima constitutiva neuronal (NOSn), isoenzima constitutiva endotelial (NOSe) e isoenzima indutível (NOSi) (CALSGRIERSON; ORMEROD, 2004).

Relatos demonstram que a atuação do NO em carcinogênese, progressão tumoral e terapia do câncer depende de uma variedade de condições no meio intracelular (WELLER, 2003; CHIANG et al., 2005). Sabe-se que o NO possui tanto efeito tumorigênico quanto tumoricida (KOVALEVA et al., 2013). Esse último é favorecido quando existe elevada concentração de NO no meio celular (IGNARRO, 2000; RIDNOUR et al., 2008; WINK et al., 2008). A atividade antitumoral do NO inclui inibição da proliferação, da promoção e da diferenciação de células tumorais. A ação apoptótica do NO é modulada por interações diretas e indiretas, como já descrito, sendo dose-dependente e tipo celular específica. No entanto, ao mesmo tempo em que altas concentrações de NO promovem o efeito tumoricida (morte celular), mecanismos de proteção celular antiapoptóticos (efeito tumorigênico), mediado pelo NO, vêm sendo estudados, embora ainda não completamente elucidados, como a fosforilação de ERK (proteína regulada por sinais extracelulares e membro da família das MAPK) mediada pelo aumento de GMPc em concentrações inferiores a 50 nM de NO (RIDNOUR et al., 2008; THOMAS et al., 2008).

Sob influência citotóxica do NO, as células tumorais podem morrer por apoptose ou necrose, dependendo do tipo de célula (KRÖNCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1997). Dentre as hipóteses para a elucidação dos mecanismos que envolvem o processo de apoptose, ocasionado pelo NO, destacam-se: indução da expressão de Bcl-2 que é um inibidor do processo de ativação das caspases (CALSGRIERSON; ORMEROD, 2004), inativação de enzimas que reparam o DNA (LAVAL; WINK; LAVAL, 1997; WINK; LAVAL, 1994) e indução do fator de transcrição p53 (HOFSETH et al., 2003; THOMAS et al., 2004). Sendo assim, em algumas células o NO pode promover a apoptose enquanto em outros tipos celulares pode inibir o processo de morte celular programada (CHUNG et al., 2001; REEVES; REED; BROWN, 2009).

Em 1998, Gupta e colaboradores demonstraram a produção de NO durante o processo de fotossensibilização de células de tumor, utilizando uma ftalocianina como sensibilizador. As ftalocianinas são consideradas fotossensibilizadores de segunda geração em terapia fotodinâmica (ALLEN; SHARMAN; VAN LIER, 2001). Seu uso é considerado em terapia clínica em função da alta absorvidade molar observada na região de 650 nm e longo tempo de vida no estado excitado (ordem de μ s), o que propicia formação de grande quantidade de oxigênio singleto (NYOKONG, 2011; PLAETZER et al., 2009). Gupta e colaboradores (1998), em estudos envolvendo o uso de ftalocianina em TFD sugeriram, pela primeira vez, o envolvimento de NO em apoptose mediada pela TFD, acreditando na eficácia terapêutica da TFD com o uso de moduladores farmacológicos de NO ou NOS (Óxido Nítrico Sintase). Estudos que relacionam complexos de ftalocianina e doadores de NO têm sido relatados como importantes compostos a serem usados na TFD, uma vez que podem fazer uso de irradiação de luz em comprimentos de onda na janela terapêutica (600 a 850 nm), auxiliando na liberação do NO e aumentando a penetração na pele, o que faz da TFD uma terapia não invasiva (CARNEIRO et al., 2011; CICILLINI et al., 2009; da ROCHA et al., 2008; MARANHO et al., 2009).

1.5 Morte celular

Uma das consequências da ação de substâncias quimioterápicas pode ser o dano ao DNA para levar à morte celular. Na TFD, os fotossensibilizadores, após absorverem luz, produzem espécies reativas excitadas que, na presença de oxigênio, induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (1O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2 , definidas como EROs). Essas espécies podem ter como alvo biomoléculas específicas, como lipídeos, proteínas e DNAs, podendo desencadear a morte de tais tecidos por necrose, apoptose ou autofagia celular (SANABRIA et al., 2013).

Esses eventos são, muitas vezes, relacionados ao efeito de citotoxicidade em células tumorais por diferentes drogas. No contexto de respostas do organismo às ações de quimioterápicos, há estímulos de múltiplos fatores que reconhecem a ação destas drogas, sendo que a primeira tentativa da célula é a busca pela reparação aos danos causados por estas drogas. Um importante mecanismo de ação desse tipo de droga é a indução de apoptose (morte celular programada). A morte celular

programada caracteriza-se por uma série de alterações celulares morfológicas e bioquímicas. O organismo usufrui da apoptose em diferentes momentos, fisiológicos e patológicos, sendo que o desequilíbrio entre fatores pró e antiapoptóticos contribui para o agravamento de várias doenças, como é o caso do câncer (ELMORE, 2007; MILLER; MARX, 1998). O equilíbrio entre esses fatores é de grande importância para que o organismo possa se desenvolver e se defender em situações desfavoráveis.

Múltiplos sinais modulam a proliferação, sobrevivência e morte celular e essa ação coordenada permite que a célula normal cresça e se divida até sua senescência. Entretanto, as células tumorais perdem a capacidade de regular esses sinais, resultando no descontrole de proliferação e ausência de morte celular, levando ao desenvolvimento de tumores. Assim, aumenta a cada dia a busca por novas drogas que possam regular ou levar à morte celular programada das células tumorais. Drogas que conduzam à morte celular podem agir por estímulos tóxicos ou deletérios à célula que podem desencadear a morte celular por necrose, apoptose ou autofagia, as quais são diferenciadas pela morfologia (Figura 4) e vias bioquímicas.

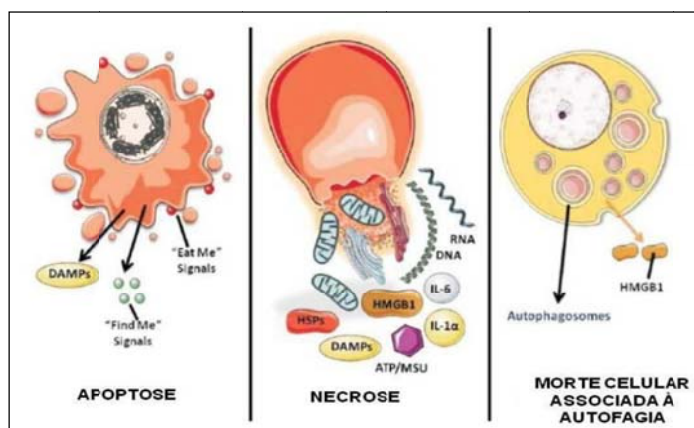


Figura 4. Características do processo de morte celular por apoptose, necrose e autofagia, induzidas pelo dano oxidativo em decorrência da Terapia Fotodinâmica. Apoptose inclui condensação da cromatina, retração celular e uma formação marginal na periferia nuclear com eventual formação de corpos apoptóticos, que contêm organelas, citosol e fragmentos nucleares e são fagocitados sem causar inflamação. As células necróticas tornam-se porosas e são rompidas com extravasamento do seu conteúdo resultando em inflamação
Fonte: modificado a partir de Agostinis et al. (2011).

A apoptose é uma forma de morte celular regulada por diferentes proteínas e é observada em resposta a numerosos estímulos (BRAS; QUEENAN; SUSIN, 2005), dentre eles, a ação citotóxica de algumas drogas. Ela é caracterizada por alterações no citoesqueleto que induzem contração celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, formação de corpos apoptóticos, ativação de caspases, mas sem resposta inflamatória (VAN CRUCHTEN; VAN DEN BROECK, 2002; YASUHARA et al., 2003), já que os macrófagos envolvem estas células e as eliminam. Ela pode ser desencadeada por vários estímulos, endógenos ou exógenos como, por exemplo, pela ligação de moléculas a receptores na superfície celular, pelo dano ao DNA, tratamento com agentes citotóxicos ou irradiação, pela falta de sinais antiapoptóticos, por sinais desordenados do ciclo celular ou pelo desenvolvimento de sinais pró-apoptóticos. Esses sinais que induzem a morte, vindos de formas diferentes, parecem ativar uma via comum de maquinaria celular que leva à morte celular. De maneira geral, a apoptose pode desencadear respostas celulares por duas vias (Figura 5): a intrínseca e a extrínseca. A via intrínseca é desencadeada por sinais advindos de dentro das células ou por um estresse ao qual a célula foi submetida, como no caso de dano ao DNA. Ainda, no caso da via intrínseca, há envolvimento da mitocôndria que, pela ação de proteínas pró-apoptóticas, ativa a via das caspases que levará à morte celular (AGOSTINIS et al., 2011).

A via extrínseca é ativada quando ligantes pró-apoptóticos se ligam a receptores de morte na superfície das células (HAIL et al., 2006; HAJRA; LIU, 2004). As vias intrínseca e extrínseca convergem numa via comum de ativação de caspases (família de cisteína proteases que desempenham papel fundamental na apoptose) que levam à morte celular pela clivagem de proteínas, que são importantes para a sobrevivência das células.

A morte celular por necrose é descrita como forma agressiva de morte celular, afetando boa parte das estruturas celulares e caracterizada por inchaço da célula, destruição das organelas e extravasamento do citoplasma, tendo como uma das consequências a inflamação. Esta forma de morte tem sido, diferentemente da apoptose, relatada como um processo de morte desprogramada e acidental, geralmente causada por danos químicos e físicos à célula. A necrose, como resposta à TFD, é dependente do tipo de célula, da dose de luz empregada e da sublocalização celular do fotossensibilizador (MORZ et al., 2011; NOWIS et al., 2005).

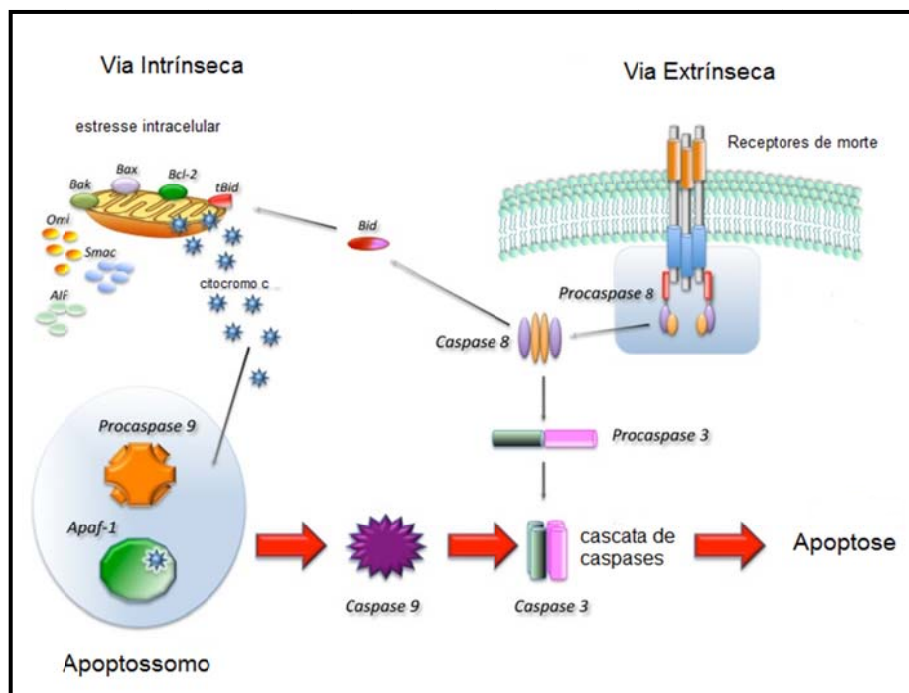


Figura 5. Representação esquemática das vias de morte celular possíveis, após Terapia Fotodinâmica. Os alvos moleculares das EROs geradas pela TFD são dependentes da localização do fotossensibilizador. Quando na membrana, o fotossensibilizador leva à ativação de caspase-8 que ativa a liberação de citocromo c do interior mitocondrial para o citoplasma, com posterior ativação de caspases, o que pode levar à clivagem de PARP, na fase final da apoptose. Se na mitocôndria, o fotossensibilizador pode levar à apoptose por ativação das caspases de maneira rápida. Bcl-2 pode regular as respostas que levam também à clivagem de PARP, na fase final da apoptose

Fonte: adaptado de Moor (2000) e Favaloro et al. (2012).

Outro tipo de morte celular descrita é a autofagia, processo celular que permite à célula manter o equilíbrio entre a síntese, degradação e reaproveitamento dos produtos celulares. Autofagia é definida como um processo que a célula tem que destruir componentes celulares por ação de enzimas ativadas pela mesma célula, o que pode levar à morte celular. O processo envolve a formação de uma vesícula com o auxílio do retículo endoplasmático liso, sendo o alvo celular envolto por uma dupla membrana chamada de autofagossoma, criando uma vesícula que separa o que há dentro desta nova vesícula do restante do citoplasma. Essa vesícula é, então, transportada e há uma fusão com o lisossoma, cujo conteúdo é degradado pelas hidrolases lisossomais (LEE; GIORDANO; ZHANG, 2012). A autofagia está ligada ao câncer porque descobriu-se que há uma proteína, a Beclin 1, essencial para a autofagia que é também um supressor de tumor (KANG et al., 2011). Quando relacionada à TFD, a autofagia se torna importante, principalmente no que diz

respeito à defesa das células contra os produtos celulares gerados por ações danosas das espécies reativas, geradas durante a TFD. Dependendo das espécies reativas geradas e do grau da injúria oxidativa, a TFD pode estimular a autofagia (MORZ et al., 2011).

1.5.1 Morte celular e a terapia fotodinâmica

Há anos sabe-se que a resposta de morte celular por efeito da TFD se dá via apoptose ou via necrose, embora a literatura ainda não descreva, de forma clara, como é o mecanismo de morte celular por ação da terapia fotodinâmica. Os possíveis mecanismos de morte podem estar associados ao dano direto da célula, quando há dano em suas organelas como mitocôndria, retículo endoplasmático, desintegração da membrana celular, por exemplo. O dano à vasculatura que envolve o tumor também pode ser um mecanismo de morte da TFD, por falta de suprimento de nutrientes e oxigênio ao tumor (MORZ et al., 2011).

As respostas celulares, em consequência da TFD, podem ser mediadas por diferentes sinais como, por exemplo, fosforilação e desfosforilação de proteínas, alterações em mensageiros secundários como o Ca^{2+} e o AMPc e ativação de proteínas por proteases (MOOR, 2000). Como descrito anteriormente, a localização do fotossensibilizador é fator determinante para o tipo de morte e a via de sinalização a ser ativada pela resposta à TFD. Fotossensibilizadores com regiões hidrofóbicas são descritos por terem afinidade pela mitocôndria (DUMMIN; CERNAY; ZIMMERMANN, 1997), diminuindo o potencial de membrana desta organela, além de permitir a liberação do citocromo *c* e Ca^{2+} para o citoplasma (KESSEL; LUO, 1998; GRANVILLE et al., 1998; KESSEL; LUO, 1999; VARNES et al., 1999).

Embora não muito evidenciado e elucidado, a TFD pode causar danos ao DNA, responsável pela codificação dos genes. Qualquer dano ao DNA causa danos graves à integridade da célula. Mas, a não ser que a geração de oxigênio singleto se dê nas proximidades do material genético, é difícil que esta espécie reativa cause dano direto ao DNA. Entretanto, como já descrito, outras espécies reativas formadas – como é o caso do radical hidroxil, peróxido de hidrogênio e o superóxido – podem ser as principais causas do dano oxidativo ao DNA. Acredita-se, porém, que os mecanismos de morte estejam mais ligados aos danos causados por essas espécies

às proteínas citoplasmáticas e à mitocôndria do que propriamente ao DNA (NOWIS et al., 2005).

Alguns pesquisadores afirmam que, dependendo do tipo de fotossensibilizador utilizado, devido à sua parte estrutural hidrofóbica, esse tem afinidade por determinada organela dentro da célula como, por exemplo a membrana mitocondrial. É descrito que fotossensibilizadores presentes na mitocôndria da célula levam à morte celular rápida por apoptose, diferentemente daqueles localizados nos lisossomas e na membrana plasmática (KESSEL, 2004). Isso porque os fotossensibilizadores presentes na mitocôndria levam à morte celular por vias específicas, como liberação de citocromo c e clivagem de caspase-3, proteína-chave para os eventos apoptóticos, além de ser responsável pela clivagem de outras proteínas que também levarão à morte celular (YOO; HA, 2012), como é o caso da PARP (poli-ADP-ribose-polimerase) envolvida nas etapas finais da apoptose. A clivagem de PARP já foi descrita para tratamento feito por uma ftalocianina de alumínio (AIPc) (MOOR, 2000).

A ativação de proteínas quinases, responsáveis pela fosforilação de outras proteínas, também pode ser uma das vias de sinalização pós-TFD. A fosforilação é uma alteração pós-traducional das proteínas e é importante mecanismo de regulação das respostas celulares. Entretanto, o entendimento da fosforilação de proteínas, após tratamento com TFD, é bastante incompleto (XUE; HE; OLEINICK, 1999). Uma das vias mais estudadas é a das MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos). ERK (quinase regulada por sinais extracelulares) faz parte da família das MAPK e tem sido descrita para respostas celulares relacionadas à terapia fotodinâmica, embora os estudos ainda se mantenham inconclusivos. O descontrole do crescimento celular é um fator importante para a formação do câncer, como no caso do melanoma, por exemplo, um defeito na via das MAP/ERK é determinante para a proliferação descontrolada dessas células. Por isso, compostos que possam inibir a via das MAP/ERK podem ser considerados interessantes para serem usados como drogas antitumorais, por interferirem na inibição da proliferação das células cancerosas (BUYTAERT; DEWAELE; AGOSTINIS, 2007).

As respostas celulares, atreladas à terapia fotodinâmica, não são simples. O estresse oxidativo, ocasionado pela resposta da ativação de fotossensibilizadores, pode desencadear respostas de diferentes genes, podendo gerar como resposta a inflamação, angiogênese, resposta imune e morte celular. Outra proteína que pode

estar associada à resposta de sobrevivência e proliferação celular de células tumorais é a Akt (BOZKULAK et al., 2007). A inativação ou ativação, por meio da fosforilação, de proteínas envolvidas na morte celular tem sido relatada como resposta ao tratamento da terapia fotodinâmica.

Dentro da complexidade das respostas celulares relacionadas à TFD, há muito que ser explorado no que tange às respostas celulares ligadas à TFD. Muitos são os interferentes nas respostas em meio biológico como, por exemplo, o fotossensibilizador a ser utilizado, a concentração do composto, a organela celular onde o composto está sublocalizado, quais as espécies reativas geradas por ele, o tempo de vida dessas espécies e seus efeitos.

1.5.2 Efeitos do óxido nítrico na morte celular

Os efeitos pró- e antiapoptóticos do NO ainda são controversos na literatura (Figura 6) (RIDNOUR et al., 2008; THOMAS et al., 2008; WINK; MITCHELL, 1998; WINK et al., 1996). Os efeitos apoptóticos parecem estar mais relacionados a condições patológicas onde o NO é produzido, endogenamente, por enzimas específicas (NOS), em concentrações altas. Os efeitos pró- e antiapoptóticos do NO parecem ser celular dependentes. Células de mastocitomas, sarcomas, melanomas e a L929 (linhagem celular de tecido conjuntivo de camundongo) são conduzidas à apoptose quando expostas ao NO, contudo, outras linhagens celulares, como A549 (linhagem celular humana de carcinoma de pulmão), exibem limitadas porcentagens de apoptose (5 a 20 %), quando expostas aos doadores químicos de NO (WINK et al., 1998).

No que tange à ação do NO em vias de morte celular, Wink e Mitchell (1998) classificaram dois tipos de ação do NO: indireta e direta. A via direta consiste na interação do NO com proteínas. A via indireta está relacionada com a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A molécula de NO é a menor molécula classificada como mensageiro nos processos biológicos. Nessa função, o NO não depende de transportadores específicos nem de canais e passagem intracelulares; ele se difunde pela célula, com a mesma facilidade, em meio hidrofílico e em meio lipofílico. Sua ação fisiológica depende mais de suas propriedades físico-químicas do que de sua conformação espacial (FELDMAN; GRIFFITH; STUEHR, 1993). Além dessas propriedades, as ações bioquímicas são atribuídas à diversidade de suas

espécies, ou seja, a espécie NO^+ (ion nitrosônio) e a espécie NO^- (ânion nítróxido), formada pela adição de um elétron ao orbital π - antiligante (WINK et al., 1993).

Relatos demonstram que a atuação do NO em carcinogênese, progressão tumoral e terapia do câncer depende de uma variedade de condições no meio intracelular (WELLER, 2003; CHIANG et al., 2005). Sabe-se que o NO possui tanto efeito tumorigênico quanto tumoricida. Este último é favorecido quando existe uma elevada concentração de NO no meio celular (IGNARRO, 2000).

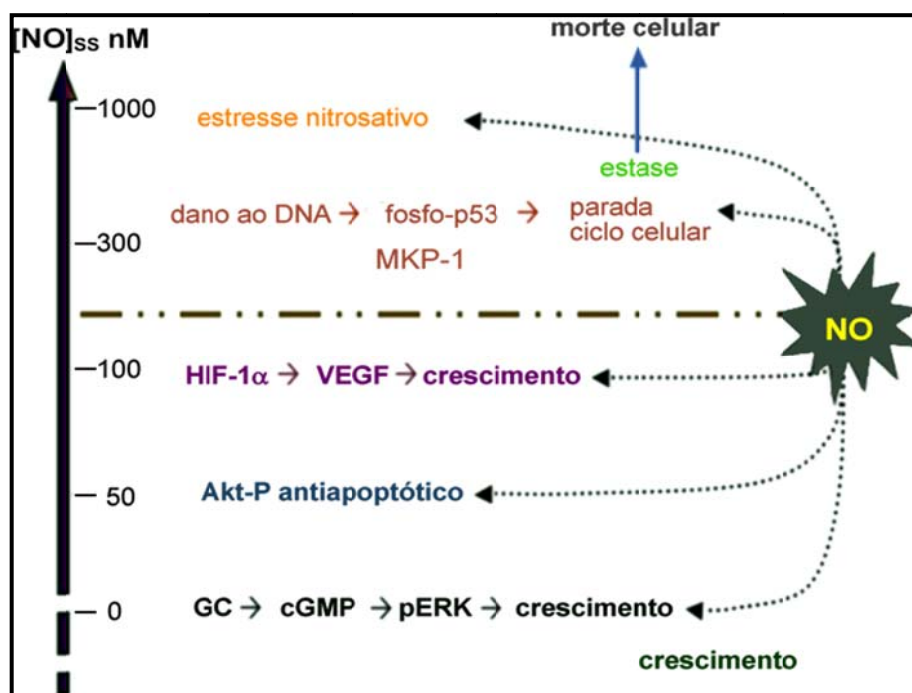


Figura 6. Efeitos pró- e antiapoptóticos do óxido nítrico dependentes da concentração desta molécula
Fonte: adaptado de Ridnour et al. (2008).

O NO pode afetar a expressão e a atividade de proteínas críticas no ciclo celular e, por sua vez, também ser alvo das mutações do DNA celular. A exposição das células aos doadores de NO pode resultar em superegulação do gene supressor de tumor, o p53, possivelmente em resposta ao dano do DNA mediado pelo NO (WINK; MITCHELL, 1998).

Com base no exposto, é de grande interesse a pesquisa por compostos que demonstrem atividades citotóxicas (*in vitro*), antitumorais (*in vivo*) e que possam desencadear uma resposta de morte celular das células neoplásicas. Há, ainda, muito a ser estudado para o completo entendimento dos mecanismos de ação dos

diferentes compostos que vêm sendo desenhados para pesquisa de diferentes atividades biológicas, dentre eles complexos de rutênio que possuem em sua esfera de coordenação a molécula de NO. Essas investigações levam a crer que complexos metálicos doadores de NO possam ser futuros agentes usados, senão na terapia antitumoral como importantes ferramentas bioquímicas e farmacológicas, se caracterizados e entendidos os mecanismos de ação moleculares e as vias bioquímicas envolvidas na atividade de cada um desses compostos.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

Os compostos rutênio-nitrosilo propostos para estudo neste trabalho foram isolados satisfatoriamente e se mostraram eficientes para a liberação de óxido nítrico. Entretanto, por se tratarem de sistemas distintos, houve diferença na eficiência da liberação de óxido nítrico pelas diferentes espécies, sendo dependentes do modo de estimulação.

Os métodos de caracterização utilizados para o novo complexo de rutênio-ftalocianina $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bpy})_2]_2\text{RuPc}(\text{pz})_2(\text{PF}_6)_6$ confirmaram a estrutura proposta. Além disso, pelos estudos fotoquímicos realizados, este composto é capaz de gerar oxigênio singlete, uma característica importante para uso na TFD.

No sistema de complexos mononucleares de rutênio-nitrosilo, o complexo $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{3+}$ apresentou atividade citotóxica contra células tumorais B16-F10, tornando-se mais eficiente nesta atividade quando encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas. Neste contexto, considerando a ação de compostos contendo rutênio, novas perspectivas também podem ser esperadas para as espécies rutênio-aquo, pois a ação citotóxica de $[\text{Ru}(\text{H}_2\text{O})(\text{bdqi})(\text{terpy})]^{2+}$ mostrou-se interessante em termos quimioterápicos.

O complexo trinuclear contendo rutênio-ftalocianina apresentou atividade citotóxica contra as linhagens celulares tumorais Jurkat e B16-F10, causando perda de viabilidade celular em mais de 50 % na concentração de 0,4 μM e na dose de luz de 5 J/cm^2 . Não foi observado efeito citotóxico desta espécie, sem fotoestímulo na mesma concentração, no modelo de células não tumorais usadas como controle (L929). Este novo complexo ajusta-se à definição esperada para um protótipo a ser usado na Terapia Fotodinâmica: baixa citotoxicidade quando não se faz uso da luz, mas com atividade citotóxica evidente quando fotoestimulado na região da janela terapêutica, neste caso, em 660 nm. Além disso, mostrou-se uma espécie capaz de ser internalizada pelas células, com potencial de causar a morte celular de células tumorais por apoptose, após a TFD.

Os estudos relacionando aos efeitos de morte celular pelas espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio gerados pelo novo complexo trinuclear leva a crer que, de alguma maneira, o óxido nítrico liberado pelo composto possa sensibilizar as células dependendo da concentração intracelular do NO liberado. Estes resultados

vislumbram o uso em potencial de espécies que liberam tanto NO quando $^1\text{O}_2$ como compostos a serem elucidados para aplicações clínicas em TFD.

Por fim, os resultados abrem perspectivas para inúmeras abordagens para o melhor entendimento de como estas espécies podem, de fato, estar agindo no ambiente celular. Uma vez compreendidas as características fotoquímicas e fotofísicas do novo complexo rutênio-ftalocianina, acredita-se que este trabalho de doutorado contribui para novas frentes de estudos quanto aos aspectos fotoquímicos e fotobiológicos de outros complexos rutênio-nitrosilo que possam contribuir para os efeitos bioquímicos das diferentes vias de morte celular de células tumorais.

Referências

REFERÊNCIAS

ABDELBARY, G.; FAHMY, R.H. Diazepam-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Design and Characterization. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 10, n. 1, p. 211-219, 2009.

AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K.A.; FOSTER, T.H.; GIROTTI, A.W.; GOLLNICK, S.O.; HAHN, S.M.; HAMBLIN, M.R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B.C.; GOLAB, J. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA Cancer J. Clin.**, v. 61, n. 4, p. 250-81, 2011.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Mol. Biol. of the Cell**. 4. ed. New York and London: Garland Science, 2002.

ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; BERGAMO, A.; SAVA, G. Ruthenium antimetastatic agents. **Curr. Top. Med.Chem.**, v. 4, n. 15, p. 1525-35, 2004.

ALLEN, B.W.; DEMCHENKO, I.T.; PIANTADOSI, C.A. Two faces of nitric oxide: implications for cellular mechanisms of oxygen toxicity. **J. Appl. Physiol**, v. 106, p. 662-667, 2009.

ALLEN, C.M.; SHARMAN, W.M.; VAN LIER, J.E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. **J. Porphyr. Phthal.**, v. 5, n. 2, p. 161-169, 2001.

ALMEIDA, R.D.; MANADAS, B.J.; CARVALHO, A.P.; DUARTE, C.B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochim. Biophys. Acta-Rev. Cancer**, v. 1704, n. 2, p. 59-86, 2004.

ANG, W.H.; DYSON, P.J. Classical and Non-Classical Ruthenium-Based Anticancer Drugs: Towards Targeted Chemotherapy. **Eur. J. Inorg. Chem.**, n. 20, p. 4003-4018, 2006.

AYARU, L.; BOWN, S.G.; PEREIRA, S.P. Photodynamic therapy for pancreatic and biliary tract carcinoma. **Int. J. Gastrointest. Cancer**, v. 35, n. 1, p. 1-13. 2005.

BABILAS, P.; SCHREML, S.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R.M. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. **Photoderm. Photoim. Photom.**, v. 26, n. 3, 2010.

BALDEA, I.; FILIP, A.G. Photodynamic therapy in melanoma - an update. **J. Physiol. Pharm.**, v. 63, n. 2, p. 109-118, 2012.

BATES, J.N; BAKER, M.T.; GUERRA JR, R.; HARRISO, D.G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochem. Pharm.**, v. 42, p. S157-S165, 1991.

BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M.; CAVALLI, R.; TROTTA, M. Solid lipid nanoparticles produced through a coacervation method. **J. Microencap.**, v. 27, n. 1, p. 78–85, 2010.

BAYRAK, R.; AKCAY, H.T.; PISKIN, M.; DURMUS, M.; DEGIRMENCIOGLU, I. Azine-bridged binuclear metallophthalocyanines functioning photophysical and photochemical-responsive. **Dyes Pigm.**, v. 95, n. 2, p. 330-337, 2012.

BECKER, J. S. **Inorganic mass spectrometry: principles and applications.** Chichester, England; Hoboken, NJ : John Wiley & Sons, 2007.

BENDHACK, L.M.; RODRIGUES, G.J.; DE LIMA, R.G.; MELO, M.C.; DA SILVA, R.S. Potential Hypotensive Compound Reduces Arterial Pressure Only in Hypertensive Rats. **J. Physiol. Sci.**, v. 59, p. 407-407, 2009.

BERGAMO, A.; GAIDDON, C.; SCHELLENS, J.H.; BEIJNEN, J.H.; SAVA, G. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **J. Inorg. Biochem.**, v. 106, n. 1, p. 90-99, 2012.

BHOWMICK R.; GIROTTI A.W. Cytoprotective Signaling Associated with Nitric Oxide Upregulation in Tumor Cells Subjected to Photodynamic Therapy-like Oxidative Stress. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 57, p. 39–48, 2013.

BONAVENTURA, D.; DE LIMA, R.G.; VERCESI, J.A.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharm.**, v. 46, n. 3, p. 215-222, 2007.

BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C.N.; RODRIGUES, G.J.; NETO, M.A.; VERCESI, J.A.; DE LIMA, R.G.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Endothelium negatively modulates the vascular relaxation induced by nitric oxide donor, due to uncoupling NO synthase. **J. Inorg. Biochem.**, v. 103, n. 10, p. 1366-1374, 2009.

BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C.N.; RODRIGUES, G.J.; NETO, M.A.; DE LIMA, R.G.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Endothelium modulates the vascular relaxation induced by the nitric oxide donor. **Basic Clin. Pharm. Toxic.**, v. 102, s. 1, p. 38-39, 2008.

BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F.S.; LUNARDI, C.N.; VERCESI, J.A.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Characterization of the mechanisms of action and nitric oxide species involved in the relaxation induced by the ruthenium complex. **Nitric Oxide – Biol. Chem.**, v. 15, n. 4, p.387-394, 2006.

BOZKULAK, O.; WONG, S.; LUNA, M.; FERRARIO, A.; RUCKER, N.; GULSOY, M.; GOMER, C.J. Multiple components of photodynamic therapy can phosphorylate akt. **Photochem. Photobiol.**, v. 83, n. 5, p. 1029-1033, 2007.

BRABEC, V.; NOVÁKOVÁ, O. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. **Drug Resist. Update**, v. 9, n. 3, p. 111-22, 2006.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S.A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochem.**, v. 70, n. 2, p. 231-9, 2005.

BRUSCINO, N.; ROSSI, R.; DINDELLI, M.; GHERSETICH, I.; LOTTI, T. Therapeutic Hotline: Facial skin rejuvenation in a patient treated with photodynamic therapy for actinic keratosis. **Dermatol. Ther.**, v. 23, n. 1, p. 86-9, 2010.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1776, n. 1, p. 86-107, 2007.

CAINE, M.A.; MCCABE, R.W.; WANG, L.; BROWN, R.G.; HEPWORTH, J.D. The inhibition of triphenylmethane primary dye fading in carbonless copying paper systems by singlet oxygen quenching bis(dithiocarbamate)nickel(II) complexes. **Dyes and Pigm.**, v. 52, n. 1, p. 55-65, 2002.

CALS-GRIERSON, M.M.; ORMEROD, A.D. Nitric oxide function in the skin. **Nitric Oxide: Biol. Chem.**, v. 10, n. 4, p. 179-193, 2004.

CARNEIRO, Z.A.; BIAZZOTTO, J.C.M.; POSTALLI, F.R.; DE LIMA, R.G.; CURTI, C.; DA ROCHA, Z.N.; PAULO, M.; BENDHACK, L.M.; TEDESCO, A.C.; FORMIGA, A.L.B.; DA SILVA, R.S. Photocytotoxic activity of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex - A system capable of producing nitric oxide and singlet oxygen. **J. Inorg. Biochem.**, v. 105, n. 8, p. 1035-1043, 2011.

CARNERO A.; BLANCO-APARICIO C.; RENNER O.; LINK W.; LEAL J.F. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 8, n. 3, p. 187-198, 2008.

CHEN, Y.; SUBRAMANIAN, L.R.; FUJITSUKA, M.; ITO, O.; O'FLAHERTY, S.; BLAU, W.J.; SCHNEIDER, T.; DINI, D.; HANACK, M. Synthesis and optical limiting properties of axially bridged phthalocyanines: [(tBu₄PcGa)₂O] and [(tBu₄PcIn)₂O]. **Chemistry**, v.8, n. 18, p. 4248-54, 2002.

CHENEY, R.P.; ARMOR, J.N. Reactivity of coordinated nitrosyls .6. Preparation, characterization, and reduction of nitrosylpentaquaoruthenium(³⁺) and reduction of various ruthenium ammine nitrosyls. **Inorg. Chem.**, v. 16, n. 12, p. 3338-3344, 1977.

CHIANG, T.M.; SAYRE, R.M.; DOWDY, J.C.; WILKIN, N.K.; ROSENBERG, E.W. Sunscreen ingredients inhibit inducible nitric oxide synthase (iNOS): a possible biochemical explanation for the sunscreen melanoma controversy. **Melanoma Res.**, v. 15, n. 1, p. 3-6, 2005.

CHUNG, H.T.; PAE, H.O.; CHOI, B.M., BILLIAR, T.R., KIM, Y.M. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 282, n. 5, p. 1075-1079, 2001.

CHUNG, J.; HONG, S.; CHOI, B.Y., CHO, H.; YU, E.; HEWITT, S.M. The Expression of Phospho-AKT, Phospho-mTOR, and PTEN in Extrahepatic Cholangiocarcinoma. **Clin Cancer Res.**, v. 15, n. 2, p. 660-667, 2009.

CICILLINI, S.A.; PRAZIAS, A.C.L.; TEDESCO, A.C., SERRA, O.A.; DA SILVA, R.S. Nitric oxide and singlet oxygen photo-generation by light irradiation in the phototherapeutic window of a nitrosyl ruthenium conjugated with a phthalocyanine rare earth complex. **Polyhedron**, v. 28, n. 13, p. 2766-2770, 2009.

COHEN, S.M. New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v.11, n. 2, p. 115-20, 2007.

COLLINS, P.; ROBINSON, D.J.; STRINGER, M.R.; STABLES, G.I.; SHEEHAN-DARE, R. A. The variable response of plaque psoriasis af ter a single treatment with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. **Br. J. Dermatol.**, v. 137, p. 743-749, 1997.

COLUCCI, R.; LOTTI, T.; MORETTI, S. Vitiligo: an update on current pharmacotherapy and future directions. **Expert. Opin. Pharmacother.**, v. 13, n. 13, p. 1885-99, 2012.

CRAWFORD, D.R.; DAVIES, K.J. Adaptive response and oxidative stress. **Environ. Health Perspect.**, v. 102, n. 10, p. 25-28, 1994.

CULOTTA, E.; KOSHLAND Jr., D.E. NO news is good news. **Science**, v. 18, n. 5090, p. 1862-1865, 1992.

da ROCHA, Z.N.; de LIMA, R.G.; DORO, F.G.; TFOUNI, E.; da SILVA, R.S. Photochemical production of nitric oxide from a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex by irradiation with light in the phototherapeutic window. **Inorg. Chem. Comm.**, v. 11, n. 7, p. 737-740, 2008.

da SILVA, R.S.; MARCHESI, M.S.P; KHIN, C.; LUNARDI, C.N.; BENDHACK, L.M.; FORD, P.C. Photoinduced electron transfer between the cationic complexes $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{pz}(2+)$ and $\text{trans-RuCl}([\text{15}] \text{aneN}(4))\text{NO}^{2+}$ mediated by phosphate ion: Visible light generation of nitric oxide for biological targets. **J. Phys. Chem. B**, v. 111, n. 24, p. 6962-6968, 2007.

DAVIDS, L.M.; KLEEMANN, B. Combating melanoma: The use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. **Cancer Treat. Rev.**, v. 37, n. 6, p.465-475, 2011.

de GAITANI, C.M.; de MELO, M.C.C; LUNARDI, C.N.; OLIVEIRA, F.D.; da SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Hypotensive effect of the nitrosyl ruthenium complex nitric oxide donor in renal hypertensive rats. **Nitric Oxide – Biol. Chem.**, v. 20, n. 3, p. 195-199, 2009.

de LIMA R.G., SAUAIA M.G., BONAVENTURA D., TEDESCO A.C., LOPEZ R.F.V., BENDHACK L.M., DA SILVA R.S. Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: The vasodilator response produced by UV light irradiation. **Inorg. Chim. Acta.**, v. 358, n. 9, p. 2643-2650, 2005.

de LIMA, R.G. **Reatividade química e fotoquímica de complexos nitrosilos de rutênio do tipo $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{L})\text{NO}]^{n+}$** . 2006. 259 f. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

de LIMA, R.G.; SAUAIA, M.G.; BONAVENTURA, D.; TEDESCO, A.C.; BENDHACK, L.M.; DA SILVA, R.S. Influence of ancillary ligand L in the nitric oxide photorelease by the $[\text{Ru}(\text{L})(\text{tpy})\text{NO}](3+)$ complex and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorg. Chim. Acta**, v. 359, n. 8, p. 2543-2549, 2006.

de LIMA, R.G.; SAUAIA, M.G.; FERREZIN, C.; PEPE, L.M.; JOSE, N.M.; BENDHACK, L.M.; DA ROCHA, Z.N.; DA SILVA, R.S. Photochemical and pharmacological aspects of nitric oxide release from some nitrosyl ruthenium complexes entrapped in sol-gel and silicone matrices. **Polyhedron**, v. 26, n. 16, p. 4620-4624, 2007.

de OLIVEIRA, A.R.M.; da FONSECA, P.; CURTI, C.; da SILVA, R.S.; BONATO, P.S. In vitro metabolism study of a new nitrosyl ruthenium complex $[\text{Ru}(\text{NH center dot NHq})(\text{terpy})\text{NO}](3+)$ nitric oxide donor using rat microsomes. **Nitric Oxide**, v. 21, n. 1, p. 14-19, 2009.

de SANTANA, D.C.; PUPO, T.T.; SAUAIA, M.G.; DA SILVA, R.S.; LOPEZ, R.F. Nitric oxide photorelease from hydrogels and from skin containing a nitro-ruthenium complex. **Int. J. Pharm.**, v. 391, n. 1-2, p. 21-28, 2010.

DeROSA, M.C.; CRUTCHLEY, R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coord. Chem. Rev.**, v. 233, p. 351-71, 2002.

DOUGHERTY, T.J. Photodynamic therapy: part II. **Sem. Surg. Oncol.**, v. 11, n. 5, p. 333-40, 1995.

DOUGHERTY, T.J.; KAUFMAN, J.E.; GOLDFARB, A.; WEISHAUP, K. R.; BOYLE, D.; MITTLEMAN, A. Photoradiation therapy for treatment of malignant-tumors. **Cancer Res.**, v. 38, n. 8, p. 2628-33, 1978.

DOUGHERTY, T.J. Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors, **Critical Rev. Oncol./Hemat.**, v. 2, p. 83-90, 1984.

DRAGO, R.S.; PAULIK, F.E. The reaction of nitrogen(II) oxide with diethylamine. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 82, n. 1, p. 96-98, 1960.

DUMMIN, H.; CERNAY, T.; ZIMMERMANN, W.H. Selective photosensitization of mitochondria in HeLa cells by cationic Zn(II)phthalocyanines with lipophilic side-chains. **J. Photochem. Photobio. B: Biology**, v. 37, n. 3, p. 219-229, 1997.

DURMUS, M.; NYOKONG, T. The synthesis, fluorescence behaviour and singlet oxygen studies of new water-soluble cationic gallium(III) phthalocyanines. **Inorg. Chem. Comm.**, v. 10, p. 332-338, 2007.

DWYER, F.P.; GOODWIN, H.A.; GYARFAS, E.C. Mono- And Bis-(2,2-Bipyridine) And (1,10-Phenanthroline) Chelates Of Ruthenium And Osmium .1. Monochelates Of Bivalent, Tervalent, And Quadrivalent Ruthenium. **Australian J. Chem.**, v. 16, n. 1, p. 42-&, 1963.

ELAHI, M.M., NASEEM, K.M.; MATATA, B. M. Nitric oxide in blood - The nitrosativeoxidative disequilibrium hypothesis on the pathogenesis of cardiovascular disease. **FEBS Journal**, v. 274, n. 4, p. 906-923, 2007.

EL-MOFTY, M.; MOSTAFA, W.; YOUSSEF, R.; EL-FANGARY, M.; ELRAMLY, A.Z.; MAHGOUB, D.; FAWZY, M. Ultraviolet A in vitiligo. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v. 22, n. 4, p. 214-216, 2006.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol. Pathol.**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ESPÓSITO, B.P.; NAJJAR, R. Interactions Of Antitumoral Platinum-Group Metallodrugs With Albumin. **Coord. Chem. Rev.**, v. 232, p. 137-149, 2002.

FABRIS, C.; SONCIN, M.; MIOTTO, G.; FANTETTI, L.; CHITI, G.; DEI, D.; RONCUCCI, G.; JORI, G. Zn(II)-phthalocyanines as phototherapeutic agents for cutaneous diseases. Photosensitization of fibroblasts and keratinocytes. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, v. 83, p. 48–54, 2006.

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

FELDMAN, P.L.; GRIFFITH, O.W.; STUEHR, D.J. The surprising life of Nitric Oxide. **Chem. Engen. News**, v. 20, n. 51, p. 26-38, 1993.

FEREZIN, C.Z.; OLIVEIRA, F.S.; DA SILVA, R.S.; SIMIONI, A.R.; TEDESCO, A.C.; BENDHACK, L.M. The complex trans-[RuCl([¹⁵aneN₄NO]₂)²⁺ induces rat aorta relaxation by ultraviolet light irradiation. **Nitric Oxide**, v. 13, n. 3, p. 170-175, 2005.

FERREIRA, K.Q.; CARDOSO, L.N.; NIKOLAOU, S.; DA ROCHA, Z.N.; SILVA, R.S.; TFOUNI, E. Solvent dependent conformational isomerism and ligand oxidation of novel Ru(II) cyclen complexes. **Inorg. Chem.**, v. 44n. 16, p. 5544-5546, 2005.

FINGAR, V.H.; WIEMAN, T.J.; PARK, Y.J.; HENDERSON, B.W. Implications of a pre-existing tumor hypoxic fraction on photodynamic therapy. **J. Surg. Res.**, v. 53, n. 5, p. 524-528, 1992.

FORD, P.C.; BOURASSA, J.; MIRANDA, K.; LEE, B.; LORKOVIC, I.; BOGGS, S.; KUDO, S.; LAVERMAN, L. Photochemistry of metal nitrosyl complexes. Delivery of nitric oxide to biological targets. **Coord. Chem. Rev.**, v. 171, p. 185-202, 1998.

FRANK, S.; KÄMPFER, H.; WETZLER, C.; PFEILSCHIFTER, J. Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. **Kidney Int.**, v. 61, n. 3, p. 882-888, 2002.

FREITAS, I.; BARONZIO, G.F. Tumor hypoxia, reoxygenation and oxygenation strategies: possible role in photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 11, n. 1, p. 3-30, 1991.

FRIEBOLIN, W.; SCHILLING, G.; ZOLLER, M.; AMTMANN, E. Antitumoral activity of non-platinum xanthate complexes. **J. Med. Chem.**, v. 48, n. 25, p. 7925-31, 2005.

FRY, N.L.; MASCHARAK, P.K. Photoactive ruthenium nitrosyls as NO donors: how to sensitize them toward visible light. **Acc. Chem. Res.**, v. 44, n. 4, p. 289-98, 2011.

FUKUTO, J.M.; CARRINGTON, S.J. HNO Signaling Mechanisms. **Antiox. Redox Signal.**, v. 14, n. 9, p. 1649-1657, 2011.

FUKUTO, J.M.; JACKSON, M.I.; KALUDERCIC, N.; PAOLOCCI, N. Examining nitroxyl in biological systems. In: CADENAS, E.; PACKER, L. **Methods in Enzymology**. Nitric oxide, part F: Oxidative and nitrosative stress in redox regulation of cell signaling, v. 440, p. 411-431, 2008.

GARIBYAN, L.; FISHER, D.E. How sunlight causes melanoma. **Cur. Oncol. Rep.**, v. 12, n. 5, p. 319-326, 2010.

GODWIN, J.B.; MEYER, T.J. Preparation Of Ruthenium Nitrosyl Complexes Containing 2,2'-Bipyridine And 1,10-Phenanthroline. **Inor. Chem.**, v. 10, n. 3, p. 471-&, 1971.

GONZÁLEZ-CABELLO, A.; VÁZQUEZ, P.; TORRES, T.; GULDI, D. Highly Coupled Dyads Based on Phthalocyanine-Ruthenium(II) Tris(bipyridine) Complexes. Synthesis and photoinduced Processes. **J. Org. Chem.**, v. 68, p. 8635-8642, 2003.

GORELSKY, S.I.; DA SILVA, S.C.; LEVER, A.B.P.; FRANCO, D.W. Electronic spectra of trans-[Ru(NH₃)₄(L)NO]^(3+/2+) complexes. **Inorg. Chim. Acta**, v. 300, p. 698-708, 2000.

GRANVILLE, D.J.; CARTHY, C.M.; JIANG, H.; SHORE, G.C.; McMANUS, B.M.; HUNT, D.W. Rapid cytochrome *c* release, activation of caspases 3, 6, 7 and 8 followed by Bap31 cleavage in HeLa cells treated with photodynamic therapy. **FEBS Lett.**, v. 437, p. 5–10, 1998.

GULYAS, P.T.; HUMBLEY, T. W.; LAY, P.A. The Crystal Structure of (2,2'-Bipyridine) (pyrazine) (2,2':6',2"- terpyridine) ruthenium(II) Hexafluorophosphate. **Aust. J. Chem.**, v. 49, p. 527-332, 1996.

GUO, J.J.; WANG, S.R.; LI, X.G.; YUAN, M.Y. The synthesis, photophysical and thermal properties of novel 7-hydroxy-4-methylcoumarin tetrasubstituted metallophthalocyanines with axial chloride ligand. **Dyes and Pigm.**, v. 93, n. 1–3, p. 1463–1470, 2012.

GUPTA, S.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Involvement of nitric oxide during phthalocyanine (Pc4) photodynamic therapy-mediated apoptosis. **Cancer Res.**, v. 58, n. 9, p. 1785-8, 1998.

HAIL JR, N.; CARTER B.Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v.11, n.6, p. 889–904, 2006.

HAJRA, K.M.; LIU, J.R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, n. 6, p. 691- 704, 2004.

HANACK, M.; KAMENZIN, S.; KAMENZIN, C.; SUBRAMANIAN, L.R. Synthesis and properties of axially disubstituted monomeric and oligomeric phthalocyaninato ruthenium(II) compounds. **Synthetic Metals**, v. 110, n. 2, p. 93-103, 2000.

HARTINGER, C.G.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; JAKUPEC, M.A.; KYNAST, B.; ZORBAS, H.; KEPPLER, 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). **J. Inorg. Biochem.**, v. 100, n. 5-6, p. 891-904, 2006.

HARTINGER, C.G.; PHILLIPS, A.D.; NAZAROV, A.A. Polynuclear ruthenium, osmium and gold complexes. The quest for innovative anticancer chemotherapeutics. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 11, n. 21, p. 2688-2702, 2011.

HEINRICH, T.A. **Avaliação de novos compostos metálicos com potencial ação citotóxica e antitumoral**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

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

HENDERSON, B.W.; FINGAR, V.H. Oxygen limitation of direct tumor cell kill during photodynamic treatment of a murine tumor model. **Photochem. Photobiol.**, v. 49, n. 3, p. 299-304, 1989.

HEROLD, S.; KOPPENOL, W.H. Peroxynitritometal complexes. **Coord. Chem. Rev.**, v. 249, n. 3-4, p. 499-506, 2005.

HILF, R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 39, n. 1, p. 85-9, 2007.

HINTZE, R.E.; FORD, P.C. Photochemical Reaction Pathways Of Ruthenium(II) Complexes - Ultraviolet-Irradiation Of Pyridine Complex $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{py}^{2+}$. **Inorg. Chem.**, v. 14, n. 5, p. 1211-1213, 1975.

HOFSETH, L.J.; SAITO, S.; HUSSAIN, S.P.; ESPEY, M.G.; MIRANDA, K.M.; ARAKI, Y.; JHAPPAN, C.; HIGASHIMOTO, Y.; HE, P.; LINKE, S.P.; QUEZADO, M.M.; ZURER, I.; ROTTER, V.; WINK, D.A.; APPELLA, E.; HARRIS, C.C. Nitric Oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, n. 1, p. 143-8, 2003.

HOU, X.M.; ZHANG, X.H.; WEI, K.J.; JI, C.; DOU, S.X.; WANG, W.C.; LI, M.; WANG, P.Y. Cisplatin induces loop structures and condensation of single DNA molecules. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. 5, p. 1400-1410, 2009.

HSIEH, Y.J.; WU, C.C.; CHANG, C.J.; YU, J.S. Subcellular localization of Photofrin (R) determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: When plasma membranes are the main targets. **J. Cell. Phys.**, v. 194, n. 3, p. 363-375, 2003.

HUERTA, S.; CHILKA, S.; BONAVIDA, B. Nitric oxide donors: Novel cancer therapeutics (Review). **Intern. J. Oncol.**, v. 33, n. 5, p. 909-927, 2008.

IGNARRO, L.J. **Nitric Oxide: Biology and Patobiology**, San Diego, California, U.S.A., 1. Ed., Academic Press, 2000.

INCA (Instituto Nacional do Câncer), 2013. Câncer de pele tipo melanoma. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma>. Acesso em: 5 fev 2013.

INCA (Instituto Nacional do Câncer), 2012. Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/>>. Acesso em: 15 jan 2012.

IOANNIDIS, I; BATZ M.; PAUL, T.; KORTH, H.; SUSTMANN, R.; DE GROOT, H. Enhanced release of nitric oxide causes increased cytotoxicity of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine and sodium nitroprusside under hypoxic conditions. **Biochem. J.**, v. 318, p. 789-795, 1996.

IQBAL, M.A.; MD, S.; SAHNI, J.K.; BABOOTA, S.; DANG, S.; ALI, J. Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery. **J. Drug Targeting**, v. 20, n. 10, p. 813-830, 2012.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). A.D. McNAUGHT, A.D.; WILKINSON, A. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997. Disponível em: <<http://www.iupac.org/goldbook/C01203.pdf>>. Acesso em: 19 fev 2013.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). A.D. McNAUGHT, A.D.; WILKINSON, A. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/Q04991.html>>. Acesso em: 4 nov 2012.

JAKUPEC M.A., GALANSKI M., KEPPLER B.K. Tumour-inhibiting platinum complexes--state of the art and future perspectives. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 146, p. 1-5, 2003.

JAMIESON, E.R.; LIPPARD, S.J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. **Chem. Rev.**, v. 99, n. 9, p. :2467-98, 1999.

JEANNIN, J.F.; LEON, L.; CORDER, M.; SASSI, N.; PAUL, C.; BETTAIEB, A. Nitric oxide-induced resistance or sensitization to death in tumor cells. **Nitric Oxide-Biol. Chem.**, v. 19, n. 2, p. 158-163, 2008.

JORES, K.; HABERLAND, A.; WATEWING, S.; MÄDER, K.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded SLN studied by spectrofluorimetry and raman spectroscopy, **Prar. Res.**, v.22, n. 11, p.1887-1897, 2005.

KALUDEROVIĆ, G.N.; PASCHKE, R. Anticancer metallothiopythetics in preclinical development. **Curr. Med. Chem.**, v. 18, n. 31, p. 4738-4752, 2011.

KANG, R.; ZEH, H.J.; LOTZE, M.T.; TANG, D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. **Cell Death Differ.**, v. 18, n. 4, p. 571-580, 2011.

KESSEL, D. Correlation between subcellular localization and photodynamic efficacy. **J. Porph. Phthaloc.**, v. 8, p. 1009-1014, 2004.

KESSEL, D. Subcellular Targets for Photodynamic Therapy: Implications for Initiation of Apoptosis and Autophagy. **J. Natl. Compr. Canc. Netw.**, v. 10, p. S-56-S-59, 2012.

KESSEL, D.; LUO, Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.**, v. 42, p. 89-95, 1998.

KESSEL, D.; LUO, Y. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. **Cell Death Differ.**, v. 6, p. 28–35, 1999.

KOBEL, W; HANACK, M. Bis axially coordinated (phthalocyaninato)ruthenium(II) compounds. **Inorg. Chem.**, v. 25, n. 1, p. 103–107, 1986.

KOJIMA, H; NAKATSUBO, N; KIKUCHI, K; URANO, Y; HIGUCHI, T; TANAKA, J; KUDO, Y; NAGANO, T. Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA. **Neuroreport.**, v. 9, n. 15, p. 3345–3348, 1998.

KOVALEVA, V.D.; BEREZHNYAYA, E.V.; KOMANDIROV, M.A.; RUDKOVSKII, M.V., UZDENSKY, A.B. Involvement of nitric oxide in photodynamic injury of neurons and glial cells. **Nitric Oxide**, v. 29, p. 46–52, 2013.

KRÖNCKE, K.D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection - How, why, when, and where? **Nitric Oxide-Biol. Chem.**, v. 1, n. 2, p. 107-120, 1997.

KUDO, S.; BOURASSA, J.L.; BOGGS, S.E.; SATO, Y.; FORD, P.C. *In situ* nitric oxide (NO) measurement by modified electrodes: NO labilized by photolysis of metal nitrosyl complexes. **Anal. Biochem.** v. 247, n. 2, p. 193-202, 1997.

LAKE, B.G. Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. In: *Biochemical Toxicology – a practical approach*. **Oxford, IRL Press**, cap. 8, p. 183-215, 1987.

LAVAL, F.; WINK, D.A.; LAVAL, J. A discussion of mechanisms of NO genotoxicity: implication of inhibition of DNA repair proteins. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 131, p. 175-91, 1997.

LEE, J.; GIORDANO, S.; ZHANG, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. **Biochem. J.**, v. 441, p. 523-540, 2012.

LIPPARD, S.J.; BERG, J.M. **Principles of Bioinorganic Chemistry**. University Science Books, 1994.

LIU, J.; HE, W.; CHEN, H.; NI, Q.; XU, H.; YANG, X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. **Intern. J Pharm.**, v.328, n. 2, p. 191-195, 2007.

LU, Y.; CEDERBAUM, A.I. Cisplatin-Induced Hepatotoxicity Is Enhanced by Elevated Expression of Cytochrome P450 2E1. **Toxicol. Scie.**, v. 89, n. 2, p. 515–523, 2006.

LUNARDI, C.N.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. New nitric oxide donors based on ruthenium complexes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 42, n. 1, Jan. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2009000100013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 13 Fev. 2013.

LUNARDI, C.N.; VERGESI, J.A.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Vasorelaxation induced by the new nitric oxide donor cis-[Ru(Cl)(bpy)₂(NO)](PF₆) is due to activation of K-Ca by a cGMP-dependent pathway. **Vascular Pharm.**, v. 47, n. 2-3, p. 139-144, 2007.

LUO, J.D.; CHEN, A.F. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 26, n. 3, p. 259-64, 2005.

MacDonald, I.J.; Dougherty, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. **J. Porph. Phthal.**, v. 5, n. 2, p. 105–129, 2001.

MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422000000200015&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 13 Fev. 2013.

MACK, J.; STILLMAN, J.M. Electronic Structures of Metal Phthalocyanine and Porphyrin complexes from Analysis of the UV-Visible absorption and magnetic nuclear dichroism spectra and molecular orbital calculations. In: KADISH, K.M.; SMITH, K. M.; GUILARD, R. **The Porphyrin Handbook**. Phthalocyanines: Spectroscopy and electrochemical Characterization, v. 16, 1. ed., San Diego: Elsevier Science, 2003.

MARANHO, D.S.; DE LIMA, R.G.; PRIMO, F.L.; DA SILVA, R.S.; TEDESCO A.C. Photoinduced nitric oxide and singlet oxygen release from ZnPC liposome vehicle associated with the nitrosyl ruthenium complex: synergistic effects in photodynamic therapy application. **Photochem. Photobiol.**, v. 85, p. 705–713, 2009.

MARCHESI, M.S.P. **Aspectos químicos e fotoquímicos de liberação controlada de óxido nítrico a partir de complexos nitrosilos de rutênio: ensaios farmacológicos e de citotoxicidade**. 169 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; SANTANA, D.C.D.; TAVEIRA, S.F.; VERMEULEN, D.M.; de OLIVEIRA, A.R.M.; da SILVA, R.S.; LOPEZ, R.F.V. Development of nitrosyl ruthenium complex-loaded lipid carriers for topical administration: improvement in skin stability and in nitric oxide release by visible light irradiation. **J. Pharm. Biom. Analysis**, v. 53, n. 4, p. 843–851, 2010.

MENDES, G.L.Q.; KOIFMAN, R.J.; KOIFMAN, S. Mortality Frequency and Trends Attributed to Melanoma in Brazil from 1980-2005. **J. Toxicol. Environ. Health A**, v. 73, n. 13-14, p. 850-7, 2010.

MIGLIETTA, A.; CAVALLI, R.; BOCCA, C.; GABRIEL, L.; GASCO, M. R. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin and paclitaxel. **Inter. J. Pharm.**, v. 210, n. 1-2, p. 61-67, 2000.

MILLER, L.J.; MARX, J. Apoptosis. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1301, 1998.

MONCADA, S.; BOLANOS, J.P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration, **J. Neurochem.**, v. 97, n. 6, p. 1676–1689, 2006.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. **Pharm. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MOOR, A.C.E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B – Biology**, v. 57, n. 1, p. 1-13, 2000.

MORI, V.; BERTOTTI, M. Nitric oxide solutions: standardisation by chronoamperometry using a platinum disc microelectrode. **Analyst**, v. 125, p. 1629-32, 2000.

MORZ, P.; YAROSLAVSKY, A.; KHARKWAL, G.B.; HAMBLIN, M.R. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. **Cancer**, v. 3, p. 2516-2539, 2011.

MOSEROVA, I.; KRALOVA, J. Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways. **PLoS One**, v. 7, n. 3, 2012.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immuno. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUDIGONDA T; DABADE T.S.; FELDMAN S.R. A review of targeted ultraviolet B phototherapy for psoriasis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 66, n. 4, p. 664-72, 2012.

MUIJSERS, R.B.; TEN HACKEN, N.H.; VAN ARK, I.; FOLKERTS, G.; NIJKAMP, F.P.; POSTMA, D.S. L-Arginine is not the limiting factor for nitric oxide synthesis by human alveolar macrophages in vitro. **Eur. Respir. J.**, v. 18, n. 4, p. 667-71, 2001.

MULLER, R.H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **Eur. J Pharm. Biopharm.**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

NAGAO, H.; ITO, K.; TSUBOYA, N.; OYOYAMA, D.; NAGAO, N.; HOWELL, F.S.; MUKAIDA M. Evidence for a new nitrosyl-to-nitro reaction and an acetamide formation in the {RuNO}(6)-type complex, cis-[Ru(NO)(CH₃CN)(bpy)(2)]⁽³⁺⁾. **Inorg. Chim. Acta**, v. 290, n. 1, p. 113-9, 1999.

NAVA, H.R.; ALLAMANENI, S.S.; DOUGHERTY, T.J.; COOPER, M.T.; TAN, W.; WILDING, G.; HENDERSON, B.W. Photodynamic therapy (PDT) using HPPH for the treatment of precancerous lesions associated with barrett's esophagus. **Lasers Surg Med.**, v. 43, n. 7, p. 705-12, 2011.

NESSEEM, D.I. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 26, n. 3, p. 387-399, 2001.

NIST Mass Spec Data Center, in NIST ChemistryWebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, P. J. Linstrom and W. G. Mallard (Eds.) (2003), National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C14320048&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>>. Acesso em: 2 mar 2011.

NOMBONA, N. **Photophysicochemical and photodynamic studies of Phthalocyanines conjugated to selected drug delivery agents**. 257 f. Thesis (Doctor of Philosophy). Rhodes University. 2012a.

NOMBONA, N.; MADURAY, K.; ANTUNES, E.; KARSTEN, A.; NYOKONG, T. Synthesis of phthalocyanine conjugates with gold nanoparticles and liposomes for photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, v. 107, p. 35-44, 2012b.

NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKŁOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; GOŁAB, J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochim. Pol.**, v. 52, n. 2, p. 339-52, 2005.

NUCLEUS MEDICAL MEDIA. Types for melanoma. Disponível em: <<http://catalog.nucleusmedicalmedia.com/chooseexhibit.php?A=2&I=2&TL=5889&ExhibitKeywords=melanoma&Action=Search>>. Acesso em: 18 ago 2010.

NYOKONG, T. Desired properties of new phthalocyanines for photodynamic therapy. **Pure Appl. Chem.**, v. 83, n. 9, p. 1763-1779, 2011.

OCHSNER, M. Light scattering of human skin: A comparison between zinc(II)—phthalocyanine and photofrin II®. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 32, n. 1-2, p. 3-9, 1996.

OLBRICH, C.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C. M.; MULLER, R. H.; KNEUER, C. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. **J. Control. Release**, v.77, n.3, p.345-355, 2001.

OLIVEIRA, F.S.; TOGNILOLO, V.; PUPO, T.T.; TEDESCO, A.C.; SILVA, R.S. Nitrosyl ruthenium complex as nitric oxide delivery agent: synthesis, characterization and photochemical properties. **Inor. Chem. Comm.**, v. 7, n. 2, p.160-164, 2004.

OLIVEIRA, F.D.; FERREIRA, K.Q.; BONAVENTURA, D.; BENDHACK, L.M.; TEDESCO, A.C.; MACHADO, S.D.; TFOUNI, E.; DA SILVA, R.S. The macrocyclic effect and vasodilation response based on the photoinduced nitric oxide release from trans-[RuCl(tetraazamacrocyclic)NO]⁽²⁺⁾. **J. Inorg. Biochem.**, v.101, n. 2, p. 313-320, 2007.

OTT, I.; GUST, R. Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. **Arch. Pharm.**, v. 340, n. 3, p. 117-26, 2007.

PAOLINO, D.; VENTURA, C.; NISTICO, S.; PUGLISI, G.; FRESTA, M. Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. **Intern. J. Pharm.**, v. 244, n. 1-2, p. 21-31, 2002.

PATTANI, A.S.; MANDAWGADE, S.D.; PATRAVALE, V.B. Development and comparative antimicrobial evaluation of lipid nanoparticles and nanoemulsion of Polymyxin B, **J. Nanosci. Nanotech.**, v. 6, n. 9-10, p. 2986-2990, 2006.

PAULO, P.M.R.; COSTA, S.M.B. Single-Molecule Fluorescence of a Phthalocyanine in PAMAM Dendrimers Reveals Intensity-Lifetime Fluctuations from Quenching Dynamics. **J. Phys. Chem. C**, v. 114, n. 44, 2010.

PESTANA, C.R.; PHELIPPIN, D.P.S.; POLIZELLO, A.C.M.; DORTA, D.J.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A.C.; DORO, F.; RODRIGUES, F. P.; TFOUNI, E.; CURTI, C. Effects on mitochondria of mitochondria-induced nitric oxide release from a ruthenium nitrosyl complex. **Nitric Oxide. Biol. Chem.**, v. 20, p. 24-30, 2009.

PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers Med. Sci.**, v. 24, n. 2, p. 259-268, 2009.

PRICE, M.; TERLECKY, S.R.; KESSEL, D. A Role for Hydrogen Peroxide in the Pro-apoptotic Effects of Photodynamic Therapy. **Photochem. Photobiol.**, v. 85, n. 6, p. 1491-1496, 2009.

QUON, H.; GROSSMAN, C.E.; FINLAY, J.C.; ZHU, T.C.; CLEMMENS, C.S.; MALLOY, K. M.; BUSCH, T. M. Photodynamic therapy in the management of pre-malignant head and neck mucosal dysplasia and microinvasive carcinoma. **Photodiag. Photodyn. Ther.**, v. 8, n. 2, p. 75-85, 2011.

RADEMAKER-LAKHAI, J. M.; VAN DEN BONGARD, D.; PLUIM, D.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLENS, J.H. A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent. **Clin. Cancer. Res.**, v. 10, n. 11, p. 3717-27, 2004.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REEVES, K.J.; REED, M.W.R.; BROWN, N.J. Is nitric oxide important in photodynamic therapy? **J Photochem. Photobiol. B – Biology**, v. 95, n. 3, p. 141-147, 2009.

RICHTER-ADDO, G.B.; LEGZDINS, P. **Metal Nitrosyls**. Nova Iorque, Oxford University Press, Inc., 1992.

RIDDLE, C.C.; TERRELL, S.N.; MENSER, M.B.; AIRES, D.J.; SCHWEIGER, E.S. A review of photodynamic therapy (PDT) for the treatment of acne vulgaris. **J. Drugs Dermatol.**, v. 8, n. 11, p. 1010-1019, 2009.

RIDNOUR, L.A.; THOMAS, D.D.; SWITZER, C.; FLORES-SANTANA, W.; ISENBERG, J.S.; AMBS, S.; ROBERTS, D.D.; WINK, D.A. Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 2, p. 73-6, 2008.

ROBERTS, P.J.; DER, C.J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3291-310, 2007.

ROBERTSON, C.A.; EVANS, D.H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **J Photochem. Photobiol. B.**, v. 96, n. 1, p. 1-8, 2009.

RODRIGUES; G.J.; LUNARDI, C.N.; LIMA, R.G.; SANTOS, C.X.; LAURINDO, F.R.M.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide-Biol. Chem.**, v. 18, n. 3, p. 176-183, 2008.

ROSENBERG, B.; VANCAMP L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature**, v. 205, p. 698-9, 1965.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v. 60, n. 2, 2008. Disponível em <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252008000200024&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 12 fev 2013.

RUCKMANI, K.; SIVAKUMAR, M.; GENESHKUMAR, P. A. Methotrexate loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for effective treatment of carcinoma, **J. Nanosci. Nanotech.**, v. 6, n. 9-10, p. 2991-2995, 2006.

SANABRIA, L.,M.; RODRÍGUEZ, M.E.; COGNO, I.S.; VITTAR, N.B.R.; PANSA, M.F.; LAMBERTI, M.J.; RIVAROLA, V.A. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. **Biochim Biophys. Acta**, v. 1835, n. 1, p. 36-45, 2013.

SAUAIA, M.G.; DE LIMA, R.G.; TEDESCO, A.C.; DA SILVA, R.S. Nitric oxide production by visible light irradiation of aqueous solution of nitrosyl ruthenium complexes. **Inorg. Chem.**, v. 44, n. 26, p. 9946-9951, 2005b.

SAUAIA, M.G.; DA SILVA, R.S. The reactivity of nitrosyl ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. **Trans. Metal Chem.**, v. 28, n. 3, p. 254-259, 2003.

SAUAIA, M.G.; OLIVEIRA, F.S.; DE LIMA, R.G.; CACCIARI, A.L.; TFOUNI, E.; DA SILVA R.S. Syntheses, characterization and photochemical properties of new NO center dot-ruthenium(II) complexes. **Inorg. Chem. Comm.**, v. 8, n. 4, p. 347-349, 2005a.

SAUAIA, M.G.; OLIVEIRA, F.S.; TEDESCO, A.C.; SILVA R.S. Control of NO release by light irradiation from nitrosyl-ruthenium complexes containing polypyridyl ligands. **Inorg. Chim. Acta**, v. 355, p. 191-196, 2003.

SAVA, G.; CAPOZZI, I.; CLERICI, K.; GAGLIARDI, G.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G. Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 16, n. 4, p. 371-9, 1998.

SCOTT, L.E.; ORVIG, C. Medicinal inorganic chemistry approaches to passivation and removal of aberrant metal ions in disease. **Chem. Rev.**, v. 109, n. 10, p. 4885-910, 2009.

SHAH, V.P.; MIDHA, K.K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I.J.; YACOB, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C.T.; COOK, C.E.; MCDOWALL, R.D.; PITTMAN, K.A.; SPETOR, S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies, **J. Pharm. Sciences.**, v.81, n.3, p. 309-312, 1992.

SIBATA, C.H.; COLUSSI, V.C.; OLEINICK, N.L.; KINSELLA, T.J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.

SILVA, A.; YUNES, J.A.; CARDOSO, B.A.; MARTINS, L.R.; JOTTA, P.Y.; ABECASIS, M.; NOWILL, A.E.; LESLIE, N.R.; CARDOSO, A.A.; BARATA, J.T. PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 11, p. 3762-3774, 2008.

SKULACHEV, V.P. Phenoptosis: Programmed death of an organism. **Biochem.-Moscow**, v. 64, n.12, p. 1418-1426, 1999.

SLOCIK, J.M.; SOMAYAJULA, K.V.; SHEPHERD, R.E. Electrospray mass spectrometry of trans-[Ru(NO)Cl(dpaH)₂]²⁺ (dpaH=2,2-dipyridylamine) and 'caged NO', [RuCl₃(NO)(H₂O)₂]: loss of HCl and NO from positive ions versus NO and Cl from negative ions. **Inor. Chim. Acta**, v. 320, p. 148–158, 2001.

SMITH, J.N.; DASGUPTA, T.P. Mechanism of Nitric Oxide Release. I. Two-electron Reduction of Sodium Nitroprusside by l -cysteine in Aqueous Solution. **Inorg. React. Mech.**, v, 3, n. 3, p. 181-195, 2002.

SRISOOK, K.; JUNG, N.H.; KIM, B.R.; CHA, S.H.; KIM, H.S.; CHA, Y.N. Heme oxygenase-1-mediated partial cytoprotective effect by NO on cadmium-induced cytotoxicity in C6 rat glioma cells. **Toxic. In vitro**, v. 19, n. 1, p. 31-39, 2005.

STEIN, K.R.; PEARCE, D.J.; FELDMAN, S.R. Targeted UV therapy in the treatment of psoriasis. **J. Dermatolog. Treat.**, v. 19, p. 141–145, 2008.

SUBEDI, R.K.; KANG, K.W.; CHOI, H. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin. **Eur. J. Pharm. Scie.**, v. 37, n. 3-4, p. 508–513, 2009.

SUZUKI, T.; NAGAE, O.; KATO, Y.; NAKAGAWA, H.; FUKUHARA, H.; MIYATA, N. Photoinduced nitric oxide release from nitrobenzene derivatives. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 127, p. 1720–1726, 2005.

TADA, D.; VONO, L.L.R.; DUARTE, E.L.; ITRI, R.; KIYOHARA, P.K.; BAPTISTA, M.S.; ROSSI, L.M. Methylene blue-containing silica coated magnetic particles: a potential magnetic carrier for photodynamic therapy. **Langmuir**, v. 23, n. 15, p. 8194-8199, 2007.

TAN S.J.; YAN Y.K.; LEE P.P.; LIM K.H. Copper, gold and silver compounds as potential new anti-tumor metallodrugs. **Future Med. Chem.**, v. 2, v. 10, p. 1591-1608, 2010.

TAUB, A.F. Photodynamic therapy: other uses. Review. **Derm. Clin.** v. 25, n. 1, p. 101-9, 2007.

TEDESCO, A.C.; ROTTA, J.C.G.; LUNARDI, C.N. Synthesis, Photophysical and Photochemical aspects of Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. **Curr. Org. Chem.** v. 7, p. 187-196, 2003.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; MUELLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC) - Effects of formulation parameters on physicochemical stability. **Inter. J. Pharm.**, v. 340, n. 1-2, p. 198-206, 2007.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E.B.; MUELLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. Physicochemical characterization and in vitro release studies of ascorbyl palmitate-loaded semi-solid nanostructured lipid carriers (NLC gels). **J. Microencap.**, v. 25, n. 2, p. 111-120, 2008.

TFOUNI, E.; KRIEGER, M.; MCGARVEY, B.R.; FRANCO, D.W. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. **Coord. Chem. Rev.**, v. 236, n. 1-2, p. 57-69, 2003.

TFOUNI, E.; TRUZZI, D.R.; TAVARES, A.; GOMES, A.J.; FIGUEIREDO, L.E.; FRANCO, D.W. Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes. **Nitric Oxide-Biol. Chem.**, v. 26, n. 1, p. 38-53, 2012.

THOMAS, D.D.; RIDNOUR, L.A.; ISENBERG J.S.; FLORES-SANTANA, W.; SWITZER, C.H.; DONZELLI, S.; HUSSAIN, P.; VECOLI, C., PAOLOCCI, N.; AMBS, S.; COLTON, C.A.; HARRIS, C.C.; ROBERTS, D.D.; WINK, D.A. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 45, n. 1, p. 18-31, 2008.

TOLEDO JR, J.C.; AUGUSTO O. Connecting the Chemical and Biological Properties of Nitric Oxide. **Chem. Res. Tox.**, v. 25, p. 975-989, 2012.

TONG, Z.; SINGH, G.; RAINBOW, A.J. Sustained activation of the extracellular signal regulated kinase pathway protects cells from Photofrin-mediated photodynamic therapy. **Cancer Res.**, n. 62, p. 5528-5535, 2002.

UZDENSKY, A.B. Signal transduction and photodynamic therapy. **Curr. Signal Trans. Therapy**, v. 3, n. 1, p.55-74, 2008.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 4, p. 214-23, 2002.

VAN RIJT, S.H.; SADLER, P.J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. **Drug. Discov. Today**, v. 14, n. 23-24, p. 1089-1097, 2009.

VARNES, M.E.; CHIU, S.M.; XUE, L.Y.; OLEINICK, N.L. Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 255, p. 673–679, 1999.

VAUPEL, P.; KELLEHER, D.K.; HÖCKEL, M. Oxygenation status of malignant tumors: Pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. **Sem. Oncol.**, v. 28, s. 8, p. 29-35, 2001.

WAHL, M.L.; OWEN, J.A.; BURD, R.; HERLANDS, R.A.; NOGAMI, S.S.; RODECK, U.; BERD, D.; LEEPER, D.B; OWEN, C.S. Regulation of intracellular pH in human melanoma: Potential therapeutic implications. **Mol. Cancer Ther.**, v. 1, n. 8, p. 617-628, 2002.

WELLER, R. Nitric Oxide: a key mediator in cutaneous physiology. **Clin Exp Dermatol.**, v. 28, n. 5, p.511-514, 2003.

WINK D.A.; MITCHELL J.B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 25 n. 4-5, p. 434-456, 1998.

WINK, D. A.; RIDNOUR L. A.; HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C. The reemergence of nitric oxide and cancer. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 2, p. 65-67, 2008.

WINK, D.A.; HANBAUER, I.; KRISHNA, M.C.; DEGRAFF, W.; GAMSON, J.; MITCHELL, J.B. Nitric-Oxide protects against cellular-damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, n. 21, p. 9813-9817, 1993.

WINK, D.A.; LAVAL, J. The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 10, p. 2125-9, 1994.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. **Am. J. Surg.**, v. 183, n. 4, p. 406-12, 2002.

WOJTKOWIAK, J.W.; ROTHBERG, J.M.; KUMAR, V.; SCHRAMM, K.J.; HALLER, E.; PROEMSEY, J.B.; LLOYD, M.C.; SLOANE, B.F.; GILLIES, R.J. Chronic autophagy is a cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironments. **Cancer Res.**, v. 72, n. 16, p. 3938-3947, 2012.

WONG, H.L., BENDAYAN, R., RAUTH, A.M., WU, X.Y. Development of solid lipid nanoparticles containing ionically complexed chemotherapeutic drugs and chemosensitizers. **J. Pharm. Sci.**, v. 93, n. 8, p. 1993-2008, 2004.

XUE, L.Y.; HE, J.; OLEINICK, N.L. Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by stress kinases. **Cell Death Differ.**, v. 6, n. 9, p. 855-864, 1999.

YOO, J.O.; HA, K.S. New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death. **Int. Rev. Cell Mol. Biol.**, v. 295, p. 139-74, 2012.

YSLAS, E.I.; MILLA, L.N.; ROMANINI, S.; DURANTINI, E.N.; BERTUZZI, M.; RIVAROLA, V.A. Comparative photodynamic therapy study using two phthalocyanine derivatives. **Exp. Ther. Med.**, v. 1, n. 4, p. 713-718, 2010.

YU, D.E.; KIKUCHI, A.; TAKETSUGU, T.; INABE, T. Crystal Structure of Ruthenium Phthalocyanine with Diaxial Monoatomic Ligand: Bis(Triphenylphosphine)Iminium Dichloro(Phthalocyaninato(2-))Ruthenium(III). **J. Chem.**, p. 6, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/486318>>. Acesso em: 1 fev 2013.

YUE, X.; YANEZ, C.O.; YAO, S.; BELFIELD, K.D. Selective Cell Death by Photochemically Induced pH Imbalance in Cancer Cells. **J. Am. Chem. Soc.**, 2013. In press.

ZHOU, H.; HUANG, L.; SUN, Y.; RIGAS, B. Nitric oxide-donating aspirin inhibits the growth of pancreatic cancer cells through redox-dependent signaling. **Cancer Lett.**, v. 273, n. 2, p. 292-299, 2008.

ZHUANG, S.; KOICHEVAR, I.E. Singlet oxygen-induced activation of Akt/ protein kinase B is independent of growth factor receptors. **Photochem. Photobiol.**, v. 78, p. 361-371, 2003.