



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Estudo dos mecanismos de morte induzidos pelo complexo de rutênio
hmxrato (*cis*-[Ru^{II}((η²-O₂CC₇H₇O₂)(dppm)₂]PF₆) com atividade contra
Leishmania (Leishmania) amazonensis e células tumorais de pulmão – A549.

Aluna: Ma. Mônica Soares Costa Veiga

Orientadora: Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini

UBERLÂNDIA - MG

2020



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**Estudo dos mecanismos de morte induzidos pelo complexo de rutênio
hmxtrato (*cis*-[Ru^{II}((η²-O₂CC₇H₇O₂)(dppm)₂]PF₆) com atividade contra
Leishmania (Leishmania) amazonensis e células tumorais de pulmão – A549.**

Aluna: Ma. Mônica Soares Costa Veiga

Orientadora: Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini

**Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área de Bioquímica).**

UBERLÂNDIA - MG

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

V426 2020	<p>Veiga, Mônica Soares Costa, 1990-</p> <p>Estudo dos mecanismos de morte induzidos pelo complexo de rutênio hmxato (cis-[RuII((2-O2CC7H7O2)(dppm)2]PF6) com atividade contra Leishmania (Leishmania) amazonensis e células tumorais de pulmão – A549 [recurso eletrônico] / Mônica Soares Costa Veiga. - 2020.</p> <p>Orientador: Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini . Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.569 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Genética. I. , Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini, 1979- , (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.</p> <p>CDU: 575</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico - PPGGB				
Data:	Trinta e um de julho de dois mil e vinte	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	19:25
Matrícula do Discente:	11623GBI003				
Nome do Discente:	Mônica Soares Costa Veiga				
Título do Trabalho:	Estudo dos mecanismos de morte induzidos pelo complexo de rutênio hmxato (<i>cis</i> -[RuII((η ² -O ₂ CC ₇ H ₇ O ₂)(dppm) ₂)]PF ₆) com atividade antiparasitária e antitumoral.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Estrutura e função de proteínas.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	APQ-01307-17.				

Aos trinta e um dias do mês de julho de dois mil e vinte, às 14:00 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma *Google Meet*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof^ª. Dr^ª. Angélica de Oliveira Gomes, Prof^ª. Dr^ª. Daiana Silva Lopes, Prof^ª. Dr^ª. Vivian Alonso Goulart, Prof^ª. Dr^ª. Bruna Cristina Borges e Prof^ª. Dr^ª. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, a Prof^ª. Dr^ª. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (a) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato (a):

APROVADO (A).

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini, Presidente**, em 31/07/2020, às 19:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruna Cristina Borges, Professor(a) Substituto(a) do Magistério Superior**, em 31/07/2020, às 19:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Alonso Goulart, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/07/2020, às 19:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelica de Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 31/07/2020, às 19:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daiana Silva Lopes, Usuário Externo**, em 31/07/2020, às 19:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2097716** e o código CRC **3893F88B**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha prima Débora Nunes por ter contribuído tanto para realização do meu sonho, sempre me incentivando e ajudando para concretização desta conquista. Dedico também aos meus pais, irmã e esposo que sempre me apoiaram e acreditaram nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

- À Deus pela perseverança nos momentos mais difíceis e por todas as bênçãos alcançadas.
- Ao meu marido Lucas, pelo incentivo, paciência e carinho, mas principalmente por sempre acreditar e apoiar minhas escolhas. Você foi muito importante para concretização de mais esta conquista.
- Aos meus pais, Lindolfo e Lacir, pelo incentivo, carinho, orações, paciência e sobretudo por nunca medirem esforços para apoiar meus sonhos. À minha irmã Vanessa e meu afilhado Felipe, pelo carinho, conselhos e amizade. Vocês são meu maior exemplo de amor e carinho.
- À minha prima Dr. Débora Nunes pelos ensinamentos, paciência, incentivo e amizade, contribuindo assim de forma muito importante para realização deste trabalho.
- À minha orientadora Dr. Kelly Yoneyama pela oportunidade, confiança, paciência e principalmente pela contribuição científica e intelectual;
- As professoras do Labitox Dr. Veridiana, Dr. Renata e Dr. Cássia pelo acolhimento, oportunidade e contribuição científica.
- Aos colegas do Labitox pela convivência e ensinamentos. À Tianinha e Marina pela dedicação e apoio. À Izabela, pela amizade sincera e companheirismo.
- Ao professor Dr. Gustavo e sua aluna Yasmim pela parceria de sucesso. Vocês foram muito importantes para concretização deste trabalho
- Ao professor Dr. Marcelo e a Dr. Bruna, pela parceria, pelos ensinamentos e principalmente pela presteza nos momentos necessários.
- A técnica Dr. Natássia do laboratório de Nanobiotecnologia por toda disposição e ajuda nos momentos mais necessários.
- Ao órgão de fomento CAPES pelo apoio financeiro que foi essencial para a realização e o aprimorando deste trabalho.
- Ao programa de pós-graduação em Genética e bioquímica (IBITEC) e professores pela contribuição para o meu crescimento intelectual e profissional.
- À todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento intelectual e profissional, colaborando assim com a concretização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de complexos a base do rutênio que estão em estudos de triagem clínica.....	20
Figura 2 - Rota sintética para a produção dos novos complexos de rutênio(II).....	23
Figura 3 - Características comuns em uma célula tumoral.....	24
Figura 4 - Incidência e letalidade dos tipos de câncer no mundo no ano de 2018.....	26
Figura 5 - Ciclo de transmissão da leishmaniose.....	29
Figura 6 - Esquema de ativação das caspases por meio da via extrínseca e intrínseca.....	32
Figura 7 - Mecanismo de balanço do estresse oxidativo em células normal e tumoral.....	35
Figura 8 - Efeito antiproliferativo causado pelos complexos de rutênio(II) sobre <i>L. (L.) amazonensis</i>	56
Figura 9 - Complexos de rutênio(II) causaram um arraste das células para a fase sub-G1, seguido por diminuição das células nas fase S e G2/M.....	57
Figura 10 - Complexos de rutênio(II) induzem a fragmentação do DNA de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	59
Figura 11 - Danos mitocondriais induzidos pelo hmxato e precursor contra promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	61
Figura 12 - Ensaio de incorporação do CM-H ₂ DCFDA demonstram um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO's) após tratamento com os complexos de rutênio(II).....	63
Figura 13 - Mudanças morfológicas causadas pelos complexos de rutênio(II) em promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	65
Figura 14 - Alterações morfológicas ultraestruturais observadas em promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas com complexos de rutênio(II)...	67
Figura 15 - Hmxato e precursor induzem a formação de vacúolos autofágicos em parasitos.....	68

Figura 16 - Citotoxicidade dos complexos contra macrófagos (BMDM).....	70
Figura 17 - Índice de infectividade em macrófagos BMDM após tratamento de 24h com hmxrato e seu precursor.....	71
Figura 18 - Provável mecanismo de morte de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> induzido pelos complexos de rutênio(II).....	73
Figura 19 - Efeito do hmxrato na proliferação e recuperação de células tumoral e normais de pulmão.....	76
Figura 20 - Hmxrato impede o crescimento clonogênico de células tumoral de pulmão.....	79
Figura 21 - Hmxrato causou um arraste na fase G2/M do ciclo celular.....	82
Figura 22 - Hmxrato induz a apoptose em células tumoral de pulmão.....	84
Figura 23 - Hmxrato induziu alterações na morfologia e no citoesqueleto de células tumoral de pulmão.....	87
Figura 24 - Hmxrato promove aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO's) em células tumoral de pulmão.....	90
Figura 25 - Dano mitocondrial induzido pelo hmxrato em células tumoral de pulmão.....	92
Figura 26 - Efeito genotóxico de hmxrato em células tumoral e normais de pulmão.....	94
Figura 27 - Efeito do hmxrato na atividade da caspase-9 em células tumoral de pulmão.....	95
Figura 28 - Efeito do hmxrato na expressão da caspase-3 e PARP-1 em células tumoral de pulmão.....	96
Figura 29 - Estrutura dos ligantes $[Ru(TAP)_2(11,12-CN_2-dppz)]^{2+}$ (esquerda) e Hmxrato (direita), utilizando o programa AutoDock 4.0.....	98
Figura 30 - Identificação das interações intermoleculares presentes entre o ligante Hmxrato e o DNA, utilizando o programa <i>LigPlot</i>	99
Figura 31: Mecanismo de ação proposto para a atividade antitumoral do hmxrato contra células tumoral – A549 de pulmão.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos fenótipos apoptóticos em Organismos multicelulares e Tripanosomatídeos.....	37
Tabela 2 - Efeito citotóxico do hmxrato e precursor contra promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e macrófagos BMDM com seus respectivos valores de IC ₅₀ , CC ₅₀ e IS.....	69
Tabela 3 - Efeito citotóxico do hmxrato em células tumoral e normais de pulmão e seus respectivos valores de IC ₅₀ e ICS.....	74
Tabela 4 - Estimativas de energia livre de ligação, torsional e respectivas constantes de inibição para ambos complexos com DNA, código 6G8S.....	97

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
1.0 INTRODUÇÃO	16
1.1 Química bioinorgânica medicinal.....	16
1.2 Complexos de Rutênio	18
1.3 Aspectos gerais sobre o câncer.....	23
1.4 Aspectos gerais sobre a Leishmaniose.....	27
1.5 Mecanismos de morte celular em organismos multicelulares	30
1.6 Mecanismos de morte celular em tripanosomatídeos.....	36
2.0 OBJETIVO GERAL.....	38
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. <i>Químicos e Animais</i>	40
3.2. <i>Síntese dos complexos de rutênio</i>	40
3.3. <i>Cultura de células</i>	41
3.4. <i>Avaliação da citotoxicidade em células normal e tumoral de pulmão</i>	41
3.5 <i>Avaliação da citotoxicidade em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) tratados com os complexos de rutênio</i>	42
3.6. <i>Ensaio antiproliferativo</i>	43
3.7. <i>Ensaio clonogênico</i>	44
3.8. <i>Análise do Ciclo Celular</i>	44
3.10. <i>Avaliação da apoptose em células tumoral e normal de pulmão</i> ..	46
3.11. <i>Ensaio Cometa em células normal e tumoral de pulmão</i>	47
3.12. <i>Análise do dano mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)</i>	48
3.13. <i>Mensuração de espécies reativas de oxigênio (ERO's)</i>	49
3.14. <i>Análise da morfologia celular e ultraestrutura de promastigotas de L.(L.) amazonensis</i>	50
3.15. <i>Análise da formação de vacúolos autofágicos</i>	52
3.16. <i>Infectividade em macrófagos BMDM</i>	52
3.17. <i>Análise da atividade da caspase-9 em células tumoral</i>	53
3.18. <i>Análise da expressão de caspase-3 e PARP-1</i>	53
3.19. <i>Estudos de docking do DNA</i>	54
3.20 <i>Análise estatística</i>	55
4.0 Resultados	55
4.1 <i>“Insights” mecanísticos da atividade anti-Leishmania</i>	55
4.1.1. <i>Complexos de rutênio(II) induzem o efeito antiproliferativo em promastigotas</i>	55

4.1.2. Complexos de rutênio promovem alterações no ciclo celular	56
4.1.3. Complexos de rutênio causam fragmentação no DNA.....	58
4.1.4. Complexos de rutênio(II) causam uma marcável alteração no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	60
4.1.5. Complexos de rutênio(II) aumentam a produção de ERO's	62
4.1.6. Complexos de rutênio(II) causam profundas alterações na morfologia do promastigota	64
4.1.7. Complexos de rutênio(II) induzem a formação de vacúolos autofágicos	68
4.1.8. Citotoxicidade dos complexos de rutênio(II) em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM).....	69
4.1.9. Hmxbato reduz substancialmente a infectividade <i>in vitro</i> em macrófagos BMDM	70
4.1.10 Provável mecanismo de morte induzido por complexos de rutênio....	72
4.2 Potencial antitumoral do hmxbato e mecanismo de morte envolvido	74
4.2.1. Hmxbato apresenta alta seletividade e destacado potencial citotóxico contra células A549.....	74
4.2.2. Hmxbato interfere com a proliferação e recuperação de células A549	75
4.2.3. Hmxbato impede a capacidade clonogênica de células A549	78
4.2.4. Hmxbato induz um arraste de células tumoral para a fase G2/M.....	81
4.2.5. Hmxbato induz a apoptose em célula tumoral A549	83
4.2.6. Hmxbato promove mudanças na morfologia celular associada a alterações no citoesqueleto de células tumoral A549	86
4.2.7. Hmxbato causa aumento significativo na geração de ROS em células tumoral de pulmão	88
4.2.8. Hmxbato causa uma acentuada alteração no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células A549.....	91
4.2.9. Hmxbato induz genotoxicidade em células tumoral	93
4.2.10. Hmxbato aumenta a atividade de caspase-9 em células tumorais de pulmão	94
4.2.11. Hmxbato aumenta a expressão da caspase 3 e PARP-1	95
4.2.10. Estudos do Docking de DNA do Hmxbato.....	97
5.0 Discussão	99
5.0 Conclusão	113
6.0 Referências Bibliográficas	115

Abstract

Ruthenium complexes have gained prominence in recent years due mainly to their favorable properties and different therapeutic applications. In this sense, its application as a metallopharmaceutical against parasitic and tumoral diseases has shown increasing interest in the scientific community. In this work we elucidate the probable mechanisms of cell death involved in the anti-*Leishmania* and anti-tumor activity of the ruthenium complex – hmxbate (*cis*-[Ru^{II}((η²O₂CC₇H₇O₂)(dppm)₂)]PF₆). Firstly, we demonstrated that hmxbate and its precursor were able to induce the formation of ROS in *L. (L.) amazonensis* promastigotes, causing the depolarization of mitochondrial potential, significant changes in the cell cycle, DNA damage, increased formation of autophagic vacuoles and expressive structural and ultrastructural morphological changes, thus inducing the death of the parasite through apoptosis and autophagy. The activity of hmxbate in tumor and normal lung cells was also verified. In this sense, we demonstrate that hmxbate is able to interact with DNA through a hydrogen bond existing between the hydrogen atom of the -OH group (hmxbate) and the O (phosphate) atom of the guanine DG10 present in the analyzed DNA structure, promoting cellular stress that culminates in the increase in the production of ROS and consequent changes in the potential of the mitochondrial membrane. Then, activation of caspase-9, caspase-3 and PARPB-1 occurs, thus culminating in programmed cell death by apoptosis of A549 tumor cells. We also demonstrated that apoptosis caused by hmxbate in A549 cells promotes changes in mitochondrial potential; drag in the cell cycle; morphological changes; inhibition of cell proliferation and DNA damage. In addition to the death mechanisms involved in hmxbate activity, we demonstrate a predilection for the action of the complex for tumor cells, an unusual property for most existing chemotherapeutic agents. Thus, we conclude the elucidation of the probable mechanisms of death involved in the anti-*Leishmania* and anti-tumor activity of the ruthenium hmxbate complex which make this molecule an interesting candidate for the design of new drugs against Leishmaniasis and Lung Cancer.

Key words: ruthenium, mechanism of death, *Leishmania*, tumor and normal lung cells, apoptosis.

Resumo

Os complexos de rutênio têm ganhado destaque nos últimos anos devido, principalmente as suas propriedades favoráveis e diferentes aplicações terapêuticas. Neste sentido, sua aplicação como um metalofármaco contra doenças parasitárias e tumorais têm demonstrado crescente interesse pela comunidade científica. Neste trabalho elucidamos os prováveis mecanismos de morte celular envolvidos na atividade anti-*Leishmania* e antitumoral do complexo de rutênio - hmxrato (*cis*-[Ru^{II}](η^2 -O₂CC₇H₇O₂)(dppm)₂PF₆). Primeiramente demonstramos que o hmxrato e seu precursor foram capazes de induzir a formação de ERO's em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, provocando a despolarização do potencial mitocondrial, significativas mudanças no ciclo celular, danos no DNA, aumento da formação de vacúolos autofágicos e expressivas alterações morfológicas estruturais e ultraestruturais, induzindo assim a morte do parasito por meio da apoptose e da autofagia. Além disso, vale ressaltar que os efeitos provocados pelo hmxrato nestes parasitos foram produzidos utilizando-se uma baixa concentração do complexo (0, 52 μ M), a qual não causou nenhuma toxicidade em macrófagos BMDM e ainda reduziu 82% da infectividade *in vitro* nestes macrófagos. A atividade do hmxrato em células tumoral e normal de pulmão também foram verificadas. Neste sentido demonstramos que o hmxrato é capaz de interagir com o DNA por meio de uma ligação de hidrogênio existente entre o átomo de hidrogênio do grupo -OH (hmxrato) e o átomo de O (fosfato) da guanina DG10 presente na estrutura de DNA analisada, promovendo um estresse celular que culmina com o aumento da produção de ERO's e consequente alterações no potencial da membrana mitocondrial. Na sequência ocorre a ativação da caspase-9, caspase-3 e PARPB-1, culminando assim com a morte celular programada por apoptose das células tumorais A549. Demonstramos ainda que a apoptose causada pelo hmxrato em células A549 promove alterações no potencial mitocondrial; arraste no ciclo celular; alterações morfológicas; inibição da proliferação celular e danos no DNA. Ainda, além dos mecanismos de morte envolvidos na atividade do hmxrato, demonstramos a predileção de ação do complexo para células tumoral, propriedade pouco comum para a maioria dos quimioterápicos existentes. Assim, concluímos a elucidação dos prováveis mecanismos de morte envolvidos na atividade anti-

Leishmania e antitumoral do complexo de rutênio hmx bato os quais tornam esta molécula uma interessante candidata para o *design* de novos fármacos contra as Leishmanioses e o Câncer de pulmão.

Palavras-Chave: rutênio, mecanismo de morte, *Leishmania*, células tumoral e normal de pulmão, apoptose.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Química bioinorgânica medicinal

A química bioinorgânica medicinal representa uma importante área de estudo que vem contribuindo de maneira significativa para a prospecção de novos agentes terapêuticos. O crescente interesse nesta área se justifica pelo fato dos elementos químicos desempenharem papéis fundamentais em processos biológicos. Além disso, muitos fármacos constituídos por compostos orgânicos possuem mecanismos de ação que envolvem a ativação ou biotransformação de íons metálicos. Neste sentido, um dos principais objetivos da química bioinorgânica medicinal é a utilização de metais em sistemas biológicos através da utilização dos metalofármacos (FARRELL, 2002; M. C. BENITE, 2007; CASINI, 2012; LIU et al., 2019).

A utilização de metalofármacos teve seu marco inicial na década de 60 após a descoberta das propriedades anticâncer da cisplatina, um complexo de platina (ROSENBERG, 1965). A preparação do complexo $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ foi primeiramente relatada por Michele Peyrone em 1845 e sua estrutura foi reconhecida adequadamente por Alfred em 1893 (PEYRONE, 1844; ALFRED, 1894). Entretanto, seus efeitos biológicos só foram conhecidos posteriormente em 1965 quando Barnett Rosenberg verificou acidentalmente durante um experimento a influência do campo elétrico no crescimento de células bacterianas ao utilizar eletrodos de platina. A partir deste experimento foi constatado que o composto de platina liberado pelo eletrodo, mesmo na ausência de qualquer corrente elétrica, era capaz de inibir a divisão celular de bactérias *Escherichia coli* (ROSENBERG, 1965). Diante de tal descoberta, os estudos foram direcionados para verificação da atividade antitumoral da cisplatina, sendo que em 1969 foi verificada sua atividade em modelo animal (ROSENBERG, 1969). Os resultados promissores obtidos impulsionaram os estudos de triagem clínica pelo Instituto do Câncer e em 1978 a cisplatina foi liberada pela *US Food and Drug Administration (FDA)* para o tratamento de câncer de ovário e câncer testicular. Um ano depois, a cisplatina também foi aprovada no Reino Unido e em vários outros países Europeus (WILTSHAW, 1979; ROSENBERG, 1980). Desde então, complexos a base de

platina, tais como cisplatina, carboplatina e oxaliplatina vêm sendo utilizados em diversos países para o tratamento de uma grande variedade de tumores sólidos, incluindo os cânceres de ovário, testículos, pulmão, bexiga, cabeça e pescoço, entre outros (BRABEC; KASPARKOVA, 2018; DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014; GHOSH, 2019; HO; WOODWARD; COWARD, 2016).

Administrada intravenosamente, a cisplatina é capaz de fluir bem na corrente sanguínea já que ela consegue se ligar fortemente (aproximadamente 65 – 95%) as proteínas plasmáticas, tais como albumina, transferrina, cisteína, entre outras. Além disso, a cisplatina permanece inalterada na corrente sanguínea, principalmente devido ao fato da concentração de cloreto no sangue ser relativamente elevada (ALDERDEN; HALL; HAMBLEY, 2006; NAGAI et al., 1996; PETROVIĆ; TODOROVIĆ, [s.d.]).

Estudos têm demonstrado que a entrada da Cisplatina para o interior de células tumoral ocorre através de transporte passivo, mediado por uma proteína transportadora de cobre – CTR1. Desta forma, células com alta expressão de CTR1 são capazes de acumular uma maior quantidade de Cisplatina em seu interior (ALDERDEN; HALL; HAMBLEY, 2006; DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014; GATELY; HOWELL, 1993; ISHIDA et al., 2002; PETROVIĆ; TODOROVIĆ, [s.d.]). Uma vez dentro da célula, a baixa concentração de cloreto no citoplasma pode favorecer a substituição de um ou dos dois ligantes de cloreto da cisplatina por uma ou duas moléculas de água, sendo este processo denominado de monoquação ou diquação, respectivamente. Esta reação é importante para garantir seu efeito tóxico em células tumoral pois a cisplatina hidrolisada favorece a interação com nucleófilos celulares, tais como DNA, RNA, fosfolípidos de membrana, citoesqueleto, entre outros (DASARI; BERNARD TCHOUNWOU, 2014; FUERTES et al., 2002; GHOSH, 2019).

O mecanismo molecular da atividade anticâncer da cisplatina envolve dano ao DNA, já que nucleobases de DNA podem substituir os ligantes “aqua” da cisplatina por meio de ligações cruzadas as quais podem acontecer entre a mesma fita (intrafitas) ou entre 2 fitas (interfitas) de ácido nucleico. Estas ligações formadas podem promover a distorção da hélice de DNA, inibindo assim a replicação e transcrição da célula e consequente morte celular (GONZALEZ et al., 2001; RABIK; DOLAN, 2007; ZORBAS; KEPPLER, 2005).

Apesar do sucesso da aplicação clínica da cisplatina e de seus derivados, uma série de desvantagens estão associadas ao seu uso, a saber: 1) resistência a droga, que pode ser desenvolvida após o tratamento; (2) baixa toxicidade contra alguns tipos de cânceres, tais como câncer cervical, câncer de pulmão e câncer de pâncreas, e (3) baixa seletividade para as células tumoral, produzindo assim vários efeitos colaterais tais como nefrotoxicidade, ototoxicidade, hepatotoxicidade toxicidade gastrointestinal e neurotoxicidade (BRABEC; KASPARKOVA, 2018; JOHNSTONE; SUNTHARALINGAM; LIPPARD, 2016; OUN; MOUSSA; WHEATE, 2018). Neste sentido novos metalofármacos vêm sendo explorados com o intuito de diminuir as desvantagens causadas pela cisplatina e seus derivados.

Diante desse cenário, os complexos de rutênio têm ganhado destaque devido principalmente, suas propriedades favoráveis (JAYAKUMAR et al., 2018; RILAK SIMOVIĆ et al., 2019) e suas diferentes aplicações terapêuticas, incluindo as atividades antitumoral (BAI et al., 2019, 2019; CARNIZELLO et al., 2016; IRACE et al., 2017; JIANG et al., 2019a; LI et al., 2019) e antiparasitária (COSTA et al., 2017, 2019; MIRANDA et al., 2018).

1.2 Complexos de Rutênio

O crescente interesse no uso do rutênio como um metalofármaco se justifica devido as suas propriedades químicas e biológicas favoráveis. Dentre as propriedades químicas podemos ressaltar: (1) geometria octaédrica; (2) vários estados de oxidação e (3) capacidade de mimetizar o metabolismo do ferro (BRABEC; KASPARKOVA, 2018, 2018).

Diferentemente da cisplatina que apresenta uma geometria tetraédrica, os complexos de rutênio exibem uma geometria de coordenação octaédrica que permite o desenvolvimento de um vasto repertório de moléculas para a formação de novos complexos e consequente modulação de sua atividade. Adicionalmente, o rutênio apresenta diferentes estados de oxidação acessíveis sob condições fisiológicas, a saber: Ru (II), Ru (III) e Ru (IV). Esta propriedade permite uma maior versatilidade de coordenação com moléculas alvo podendo, portanto, aumentar sua seletividade (BRABEC; KASPARKOVA, 2018; JOHNSTONE; SUNTHARALINGAM; LIPPARD, 2016; MEGGERS, 2007).

Uma das propriedades mais importantes do rutênio é sua capacidade de mimetizar o metabolismo do ferro se ligando a proteínas transportadoras séricas, tais como transferrina e albumina. Esta propriedade contribui para redução da toxicidade do rutênio e para seu transporte no organismo. Além disso, o aumento da seletividade a células tumoral vista por metalodrogas contendo rutênio pode ser explicado pelo fato das mesmas expressarem maior quantidade de receptores de transferrina para satisfazer sua crescente demanda por ferro, aumentando assim a absorção destes complexos em células tumoral e reduzindo sua concentração livre na corrente sanguínea (PONGRATZ et al., 2004; ZARIĆ; PIRKOVIĆ; HAMZAGIĆ, 2019).

A busca por novos complexos de rutênio também está associada as suas diferentes aplicações terapêuticas, onde a atividade antitumoral vem sendo extensivamente explorada (BRABEC; KASPARKOVA, 2018; NAVES et al., 2019).

Os primeiros complexos a base de rutênio que demonstraram toxicidade contra células tumoral foram desenvolvidos na década de 80 por Clark e colaboradores (CLARKE, 1980). Entretanto, a baixa solubilidade destes complexos em água refletiram na descontinuidade dos estudos envolvendo os mesmos (RILAK SIMOVIĆ et al., 2019). A versatilidade da molécula de rutênio permitiu a elaboração de uma série de novos complexos nas últimas décadas, que apresentassem melhor solubilidade, seletividade e segurança (BHATTI et al., 2019; CARNIZELLO et al., 2016; CHEN et al., 2002, 2013; IRACE et al., 2017; ZARIĆ; PIRKOVIĆ; HAMZAGIĆ, 2019). A consequência desta busca contínua para melhorar a atividade do rutênio foi vista após a aprovação de três complexos de rutênio para ensaios clínicos. São eles: *trans*-RuCl₄(DMSO) (Im)] [Im] (**NAMI-A**, Im = imidazol), *trans* [Ru(In)₂Cl₄] [InH] (**KP1019**, In = Imidazol) e **NKP- 1339** - sal de sódio de KP1019 (HARTINGER et al., 2008; SAVA et al., 1999; TRONDL et al., 2014, p. 1339). A figura 1 demonstra as estruturas destes complexos.

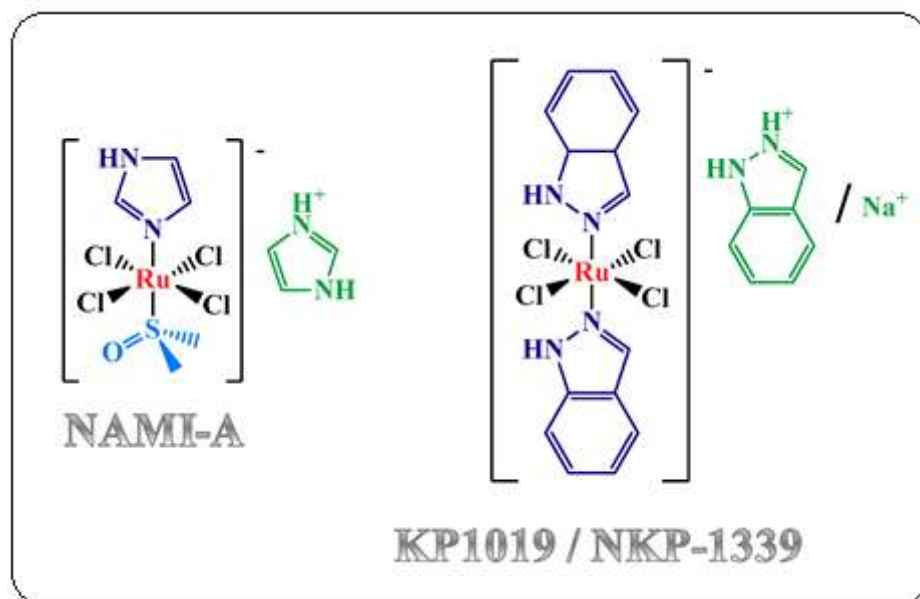


Figura 1: Estrutura química de complexos a base do rutênio que estão em estudos de triagem clínica. Fonte: Adaptado de RICCARDI et al., 2019.

O NAMI-A foi o primeiro complexo de rutênio com atividade antitumoral utilizado em estudos de triagem clínica, sendo inicialmente testados em humanos com diferentes tipos de tumores sólidos (ALESSIO; MESSORI, 2019; RADEMAKER-LAKHAI, 2004) . O complexo passou com sucesso pela primeira fase da pesquisa clínica, onde o principal objetivo é avaliar a segurança do fármaco. Entretanto, ele foi considerado não efetivo durante a fase II da pesquisa clínica sendo, portanto, retirado do estudo (LEIJEN et al., 2015).

O complexo KP1019, testado em humanos em 2006 teve bons resultados, apresentando apenas uma leve toxicidade. Entretanto, devido à baixa solubilidade do complexo o mesmo foi substituído por seu sal de sódio, o NKP-1339. De forma geral, o complexo apresentou uma atividade antitumoral moderada associada a um perfil de tolerabilidade e segurança aceitáveis. Portanto, este complexo ainda segue em pesquisa clínica (BURRIS et al., 2017; FUEREDER; BERGER, 2017; HENKE et al., 2009).

Além dos diversos estudos demonstrando o potencial terapêutico antitumoral dos complexos de rutênio, outra atividade biológica crescente que merece destaque é a atividade antiparasitária que estes complexos podem apresentar (COSTA et al., 2017; JELK et al., 2019, 2019; MIRANDA et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2019).

O trabalho pioneiro envolvendo a atividade antiparasitária do rutênio foi realizado na década de 90, por Sanchez-Delgado e colaboradores. Neste trabalho eles sintetizaram uma molécula de rutênio coordenada com o Clotrimazol $[\text{RuCl}_2(\text{CTZ})_2]$ e demonstraram sua atividade citotóxica contra o *Trypanosoma cruzi* (SANCHEZ-DELGADO et al., 1993). Na sequência, o mesmo grupo sintetizou moléculas de rutênio coordenadas com outro antifúngico, o Cetoconazol, demonstrando novamente atividade citotóxica contra o mesmo tripanosomatídeo (SÁNCHEZ-DELGADO et al., 1998). Adicionalmente, estes trabalhos elucidaram o efeito sinérgico entre metal e ligante ao demonstrarem o aumento da seletividade e consequente citotoxicidade destes complexos coordenados (SANCHEZ-DELGADO et al., 1993; SÁNCHEZ-DELGADO et al., 1998).

Complexos de rutênio coordenados com Clotrimazol e Cetoconazol também demonstraram atividade citotóxica contra parasitos do gênero *Leishmania* (INIGUEZ et al., 2013; MARTÍNEZ et al., 2012). Além destes, outros estudos utilizando complexos de rutênio coordenados com outras moléculas demonstraram o potencial citotóxico contra a Leishmaniose (COSTA et al., 2017; MACHADO et al., 2015; MENDES et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2019).

Além da atividade biológica demonstrada pelos diferentes complexos de rutênio disponíveis na literatura, a compreensão das interações entre os complexos com moléculas alvo se torna crescente, uma vez que esclare os prováveis mecanismos de ação envolvidos, possibilitando assim o aprimoramento de sua seletividade (52, 68 – 71). Neste sentido, alguns estudos mecanicistas envolvendo diferentes complexos de rutênio têm demonstrado sua interação com a molécula de DNA.

A interação do complexo de rutênio(II) com o DNA pode afetar numerosos processos celulares que estão envolvidos no reparo do dano causado. Neste sentido podemos citar (1) ativação de moléculas envolvidas no reparo do DNA, tais como a enzima PARP-1 e as proteínas NER (reparo por excisão de nucleotídeos) e MMR (reparo de incompatibilidade); (2) ativação da via das caspases que podem culminar com a morte celular programada por apoptose e (3) ativação de genes envolvidos no processo de apoptose tais como os genes da família Bcl-2 e o gene p53, considerado por muitos autores como um “guardião” do genoma da célula. Neste sentido, diferentes complexos de rutênio tem demonstrado atividade

antitumoral por meio de sua interferência em processos celulares envolvendo o reparo de danos ao DNA (CHEN et al., 2016; GUPTA et al., 2013; RILAK SIMOVIĆ et al., 2019; SILVA et al., 2018).

As mitocôndrias também são consideradas uma das vias de atuação dos complexos de rutênio(II), já que ela é a maior produtora de ERO's e um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas de oxigênio podem causar danos às células, podendo culminar com a morte celular. Estudos têm demonstrado que compostos lipofílicos de rutênio são capazes de se acumular nas mitocôndrias, podendo induzir a processos apoptóticos por meio da ativação da via intrínseca. Desta forma, vários estudos envolvendo a atividade antitumoral e alguns envolvendo a atividade anti-*leishmania* têm demonstrado o envolvimento da mitocôndria no processo de morte destes organismos celulares (CHEN et al., 2016; COSTA et al., 2019; DIAS et al., 2018; INIGUEZ et al., 2016; JIANG et al., 2019a).

As inúmeras vantagens associadas ao rutênio já discutidas fazem desta molécula uma potencial ferramenta de estudo. Neste sentido, na busca por uma nova classe de complexos de rutênio com atividade antiparasitária contra a Leishmaniose nosso grupo em 2017 sintetizou três novos complexos de rutênio(II) (Figura 2) com fórmula geral $cis-[Ru^{II}(\eta^2-O_2CR)(dppm)_2]PF_6$, with $dppm = bis(diphenylphosphino)methane$ and $R = 4\text{-butylbenzoate (bbato)}, 4\text{-(methylthio)benzoate (mtbato) 2 e } 3\text{-hydroxy-4-methoxybenzoate (hmxrato) 3}$ e demonstrou sua atividade contra promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum*.

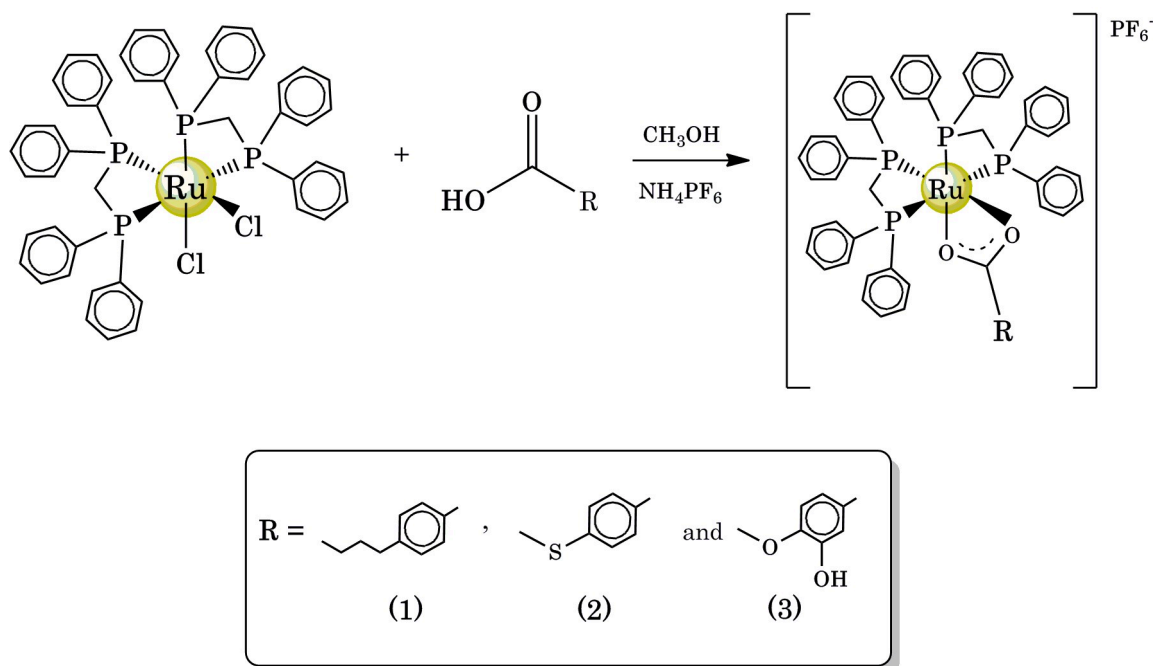


Figura 2: Rota sintética para a produção dos novos complexos de rutênio(II). Fórmula geral $\text{cis-[Ru}^{\text{II}}(\eta^2\text{-O}_2\text{CR})(\text{dppm})_2\text{]PF}_6^-$, com $\text{dppm} = \text{bis(diphenylphosphino)methane}$ e $\text{R} = \text{4-butylbenzoate (bbato) 1, 4-(methylthio)benzoate (mtbato) 2 e 3-hydroxy-4-methoxybenzoate (hmxato) 3}$. Fonte: COSTA et al., 2017.

Considerando que os tripanosomatídeos tais como os parasitos do gênero *Leishmania* e as células tumorais apresentam características metabólicas em comum tais como alta demanda energética e elevada replicabilidade (SÁNCHEZ-DELGADO, 2004; WILLIAMSON; SCOTT-FINNIGAN, 1978), os complexos de rutênio podem ser considerados moléculas alvo visando a prospecção de novos alvos terapêuticos para o tratamento de doenças que causam preocupação para a Saúde Pública, tais como o Câncer (MILLER et al., 2019) e a Leishmaniose (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Essas doenças serão melhores discutidas na sequência.

1.3 Aspectos gerais sobre o câncer

O câncer configura um conjunto de doenças, com características comuns, que podem atingir qualquer parte do corpo. Seu surgimento ocorre a partir da transformação de células normal, as quais adquirem propriedades diferenciadas, tais como capacidade de proliferação descontrolada, resistência a processos

naturais de morte celular e capacidade de invadir e disseminar para outras regiões do corpo, podendo progredir de lesões pré-cancerígenas para tumores malignos (BRAY et al., 2018; KORGAONKAR; YADAV, 2019).

Os tumores, também denominados de células neoplásicas, quando adquirem capacidade de invadir tecidos adjacentes ou longes se transformam em neoplasias malignas. Durante a progressão da doença as células adquirem algumas habilidades importantes que garantem a sua sobrevivência e disseminação. Neste sentido, são bem conhecidas as competências comuns presentes em células cancerígenas (figura 3). São elas: (1) manutenção da proliferação celular, (2) evasão de moléculas supressoras de crescimento; (3) evasão do sistema imune; (4) ativação da imortalidade replicativa; (5) inflamação promovida pelo tumor; (6) ativação de metástase e invasão; (7) indução da angiogênese; (8) instabilidade e mutação genômica; (9) resistência a morte celular e (10) desregulação do metabolismo energético (HANAHA; WEINBERG, 2011).



Figura 3: Características comuns em uma célula tumoral. A figura enumera 10 características importantes que normalmente estão presentes em uma célula tumoral. Fonte: Adaptado de HANAHA; WEINBERG, 2011.

As células cancerígenas podem adquirir estas habilidades através de progressivas mutações no genoma celular, as quais podem conduzi-las a processos que estimulam sua proliferação celular e processos que desempenham papel protetivo para célula como, por exemplo, os genes supressores de tumor. Desta forma, são alvos das células cancerígenas os genes que contribuem para o desenvolvimento de sua malignidade como, por exemplo, os proto-oncogene que garantem o processo de crescimento e diferenciação celular. Vale ressaltar que mutações somáticas nos proto-oncogene resulta no oncogene, que é um gene maligno que desempenham um papel fundamental na progressão do câncer (KORGAONKAR; YADAV, 2019; TSUCHIDA; MURUGAN; GRIECO, 2016).

Os genes supressores de tumor também desempenham um papel chave na garantia de sobrevivência das células tumoral, uma vez que sua inativação implica em uma maior proliferação celular. Proteínas que atuam como checkpoints na propagação celular são importantes para detectar erros no DNA da célula e, se necessário, ativar mecanismos de morte quando estes erros são encontrados. Neste contexto, convém destacar a proteína supressora de tumor - p53 que desenvolve um papel vital na regulação do ciclo celular, impedindo a propagação do dano no DNA e promovendo, caso necessário, apoptose celular (KORGAONKAR; YADAV, 2019; MULLER; VOUSDEN, 2014).

Considerado um problema de saúde pública, o câncer representa a segunda principal causa de morte no mundo, podendo provocar ainda um grande impacto econômico, conforme demonstrado por um estudo que revelou que o custo médio anual estimado com o câncer no ano de 2010 foi de aproximadamente 1.6 trilhões de dólares. Desta forma, apesar dos avanços, o câncer continua sendo um motivo de preocupação para os sistemas de saúde (BRAY et al., 2018; STEWART; WILD, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), considerando ambos os sexos e todas as idades, os três principais tipos de câncer com maior incidência no mundo são o câncer de mama, câncer de próstata e câncer de pulmão, conforme dados representados na figura 4 A. Entretanto, o câncer de pulmão é considerado o mais letal (figura 4 B), seguido do câncer de mama e do câncer colorretal.

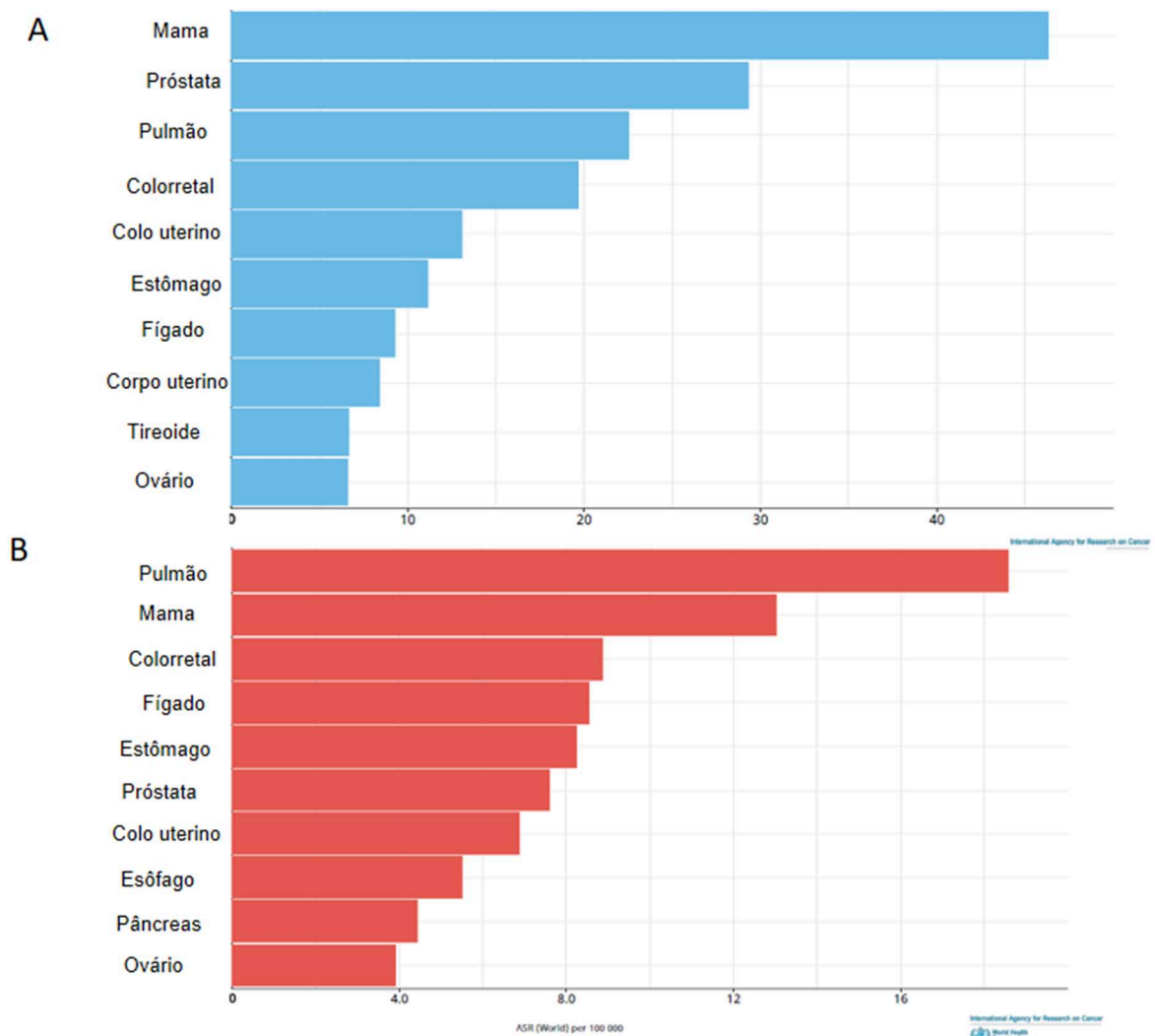


Figura 4: Incidência e letalidade dos tipos de câncer no mundo no ano de 2018. Estimativa da (A) incidência e (B) letalidade dos diferentes tipos de cânceres mundiais no ano de 2018, considerando pessoas de ambos os sexos e todas as idades. Fonte: adaptado de OMS (2018).

Além de ser o mais letal, estudos demonstram que a taxa de incidência do câncer de pulmão vem crescendo nos últimos anos, registrando um aumento de 1.8 milhões para 2.09 milhões de novos casos quando comparados os anos de 2012 e 2018, respectivamente (OMS, 2018). Foi reportado também um aumento da taxa de letalidade nos anos citados anteriormente de para 1.6 milhões para 1.76 milhões de mortes causadas pelo câncer de pulmão (BADE; DELA CRUZ, 2020; BRAY et al., 2018).

As modalidades de tratamento disponíveis para o câncer de pulmão incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo que, entre estas a quimioterapia é a mais indicada para estágios mais avançados da doença. A falta de seletividade é

um dos maiores problemas associados às drogas utilizadas no tratamento deste tipo de câncer, já que promovem uma série de efeitos colaterais. Ainda, é importante ressaltar o desenvolvimento de resistência das células tumoral às terapias farmacológicas utilizando drogas como a Cisplatina e Carboplatina (FATHI KARKAN et al., 2017; GHOSH, 2019; SADHASIVAM; SUGUMARAN, 2020; XIONG et al., 2020). Portanto, a busca por novos alvos terapêuticos, mais seletivos e seguros para o tratamento do câncer de pulmão, se faz crescente.

1.4 Aspectos gerais sobre a Leishmaniose

As leishmanioses incluem um grupo de doenças parasitárias transmitidas através de um vetor e causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, podendo provocar diferentes manifestações clínicas. A doença está presente em vários continentes, incluindo Europa, Ásia, África e América, podendo ainda ser classificada em velho mundo (Europa, Ásia, África) ou novo mundo (América) de acordo com sua distribuição geográfica (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; STEVERDING, 2017).

Sua transmissão entre os hospedeiros mamíferos ocorre por meio do repasto sanguíneo de flebotomíneos infectados, representados pelo gênero *Phlebotomus* no velho mundo e *Lutzomyia* no novo mundo. Além disso, vale ressaltar que apenas as fêmeas são capazes de transmitir a doença, pois elas são hematófagas e necessitam de sangue para obtenção de nutrientes (proteínas e aminoácidos) necessários para o desenvolvimento de seus ovos (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; MAXFIELD; CRANE, 2020).

Com relação ao ciclo de vida, os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam diferentes formas evolutivas, a forma promastigota e a forma amastigota. Esta condição faz com que os parasitos se alternem entre o vetor e o hospedeiro vertebrado apresentando, portanto, dois estágios de desenvolvimento e garantindo assim seu parasitismo. As formas promastigota estão presentes no flebotomíneo, são flageladas e altamente móveis, podendo ainda apresentar-se sob duas sub-formas: promastigota procíclica e promastigota metacíclica, sendo que a primeira apresenta alta capacidade proliferativa e a última elevada capacidade infectiva. Por outro lado, as formas amastigota estão presentes no interior de

células do sistema fagocítico de vertebrados e apresentam um formato esférico ou oval, sem flagelo aparente (BATES, 2007; BATES; ROGERS, 2004; DE MENEZES; SARAIVA; DA ROCHA-AZEVEDO, 2016).

Flebotomínios infectados iniciam o ciclo de transmissão no hospedeiro vertebrado (figura 5) através do repasto sanguíneo, seguido da regurgitação de formas promastigota metacíclicas no local da inoculação. Na sequência promastigotas infectantes são fagocitadas por células do sistema fagocítico, sobretudo por macrófagos, formando os fagossomos. Em seguida, estes fagossomos se fundem com lisossomos formando os fagolisossomos, e estes por sua vez formam os vacúolos parasitóforos. Já dentro da célula, as promastigotas serão convertidas em amastigotas com o intuito de garantir sua sobrevivência e multiplicação. Após sua adaptação, as amastigotas irão se multiplicar no interior dos macrófagos até provocar a ruptura de sua membrana e consequente liberação de amastigotas para o tecido, estando, portanto, disponíveis para infectar uma nova célula (BATES, 2007; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; DE MENEZES; SARAIVA; DA ROCHA-AZEVEDO, 2016).

Quando o vetor entra em contato com o hospedeiro vertebrado infectado, durante o repasto sanguíneo serão ingeridas células fagocíticas contendo amastigotas em seu interior. O processo de diferenciação da forma amastigota para promastigota procíclica ocorre no trato digestório anterior do vetor, seguidos de sua replicação através de divisão binária. Após o processo de multiplicação, os promastigotas procíclicos são convertidos em promastigotas metacíclicos, com posterior migração destes últimos para a probóscide do vetor. Desta forma, durante um novo repasto sanguíneo o vetor pode transmitir a doença para o hospedeiro vertebrado (BATES, 2007; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; DE MENEZES; SARAIVA; DA ROCHA-AZEVEDO, 2016).

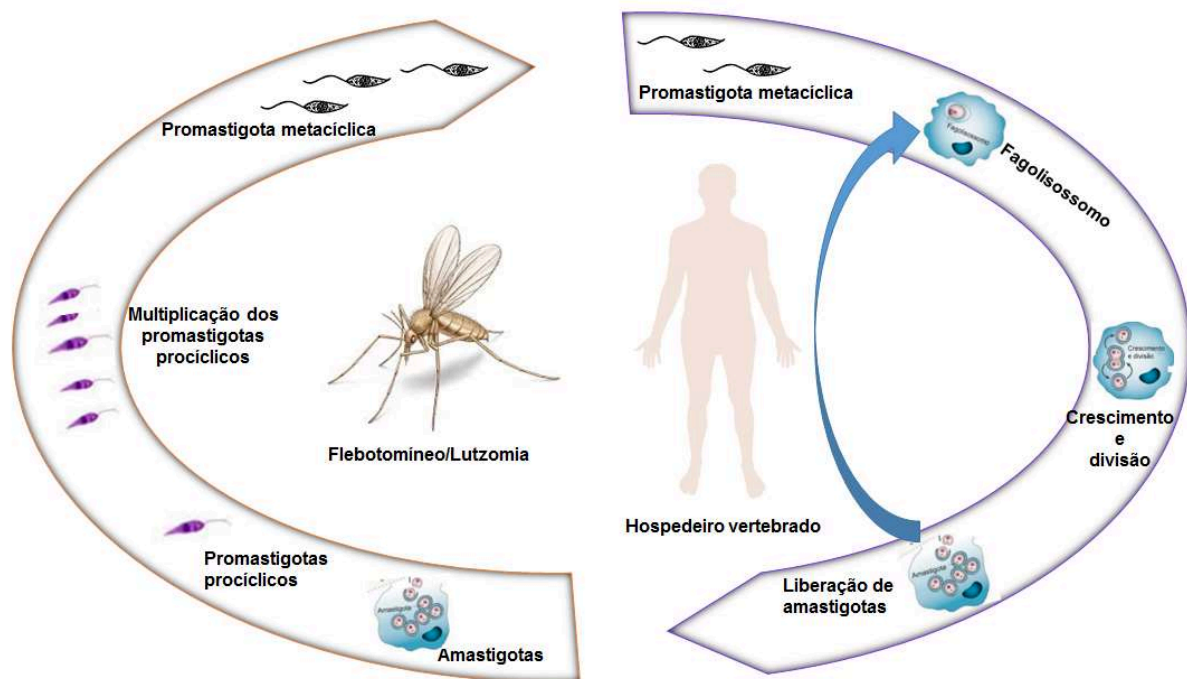


Figura 5: Ciclo de transmissão da leishmaniose. Fonte: próprio autor, 2020.

De acordo com o tropismo da espécie infectante, a resposta imunológica do hospedeiro e a localização das lesões, as leishmanioses podem se manifestar através de diferentes formas clínicas. Dentre elas podemos destacar a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT) (STEVRDING, 2017).

A LV, também conhecida como Kala-azar, configura uma doença crônica, sistêmica que atinge principalmente órgãos como fígado, baço e linfonodos, tendo como principal agente etiológico no Brasil a *Leishmania (Leishmania) infantum*. Enquanto que a LT atinge a pele e ou mucosas podendo, portanto, serem encontradas na forma tegumentar e/ou mucocutânea, respectivamente (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; STEVRDING, 2017).

Segundo a OMS, a LT é a forma mais comum da doença e pode atingir até 1 milhão de pessoas anualmente no mundo, estando o Brasil entre os 10 países mais acometidos. Dentre as 6 espécies causadoras de LT no Brasil, a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é a mais prevalente (GOTO; LINDOSO, 2010; STEVRDING, 2017)

A leishmaniose é considerada no Brasil uma doença negligenciada que causa preocupação a saúde pública devido, principalmente, aos elevados índices de morbidade associados a falta de investimentos financeiros no desenvolvimento de novas terapias mais eficazes e seguras (WHO, 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; MAXFIELD; CRANE, 2020).

Há algumas décadas, o tratamento de primeira escolha utilizado para a maioria das leishmanioses são os antimoniais pentavalente, tais como Glucantime® e Pentostan®, sendo este primeiro disponível apenas através do Ministério da Saúde. Outras drogas podem ser utilizadas quando não há resposta satisfatória ao tratamento ou em casos de contraindicação, a saber: Anfotericina B; Miltefosina, Paramomicina e Pentamidina. Entretanto, vale ainda ressaltar que essas terapias farmacológicas apresentam uma eficácia limitada, além de outras complicações, tais como (1) dificuldade de administração da droga; (2) elevado custo; (3) moderada toxicidade e (4) ocorrência de resistência parasitária (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2019; HALDAR; SEN; ROY, 2011).

Parasitas do gênero *Leishmania*, assim como as células tumoral, apresentam algumas similaridades em suas vias metabólicas, já que são células altamente replicativas e que, desta forma, requerem uma grande demanda de nutrientes (FARRELL; WILLIAMSON; MCLAREN, 1984; SMIRLIS et al., 2010). Além disso, ambas estão associadas com o desenvolvimento de doenças que causam preocupação a saúde pública. Finalmente, existe ainda um interesse no desenvolvimento de novas terapias para o combate das leishmanioses e dos diferentes tipos de câncer. O conhecimento dos mecanismos de morte induzidos pela ação de um medicamento possibilitaria a prospecção de agentes terapêuticos mais eficazes e seguros.

1.5 Mecanismos de morte celular em organismos multicelulares

Recentes estudos têm demonstrado que alguns complexos de rutênio têm como alvo o DNA, podendo causar um arraste no ciclo celular, um aumento de espécies reativas de oxigênio mediado por alterações mitocondriais e uma provável morte celular por apoptose. Estes efeitos têm sido descritos em diferentes linhagens tumorais (CHEN et al., 2016; DE SOUZA OLIVEIRA et al., 2018; ZARIĆ;

PIRKOVIĆ; HAMZAGIĆ, 2019). Neste sentido a compressão dos mecanismos de morte envolvidos na regulação e sobrevivência de organismos multicelulares é necessária.

A morte celular programada exerce um papel essencial na regulação do crescimento e desenvolvimento celular, além de desempenhar papel protetivo contra infecções parasitárias, bacterianas e virais, bem como contra o surgimento do câncer. As células dos organismos multicelulares compartilham a necessidade de garantir a manutenção e desenvolvimento do indivíduo. Dessa forma, apresentam mecanismos de morte celular geneticamente controlados e muito bem regulados. Estes mecanismos são, atualmente, bem conhecidos e envolvem uma série de estímulos que promovem sua ativação ou inibição. Neste sentido, são descritos diferentes tipos de morte celular programada, sendo a apoptose e a necroptose os tipos mais bem estudados (DEBRABANT et al., 2003; GREEN; LLAMBI, 2015a; MENNA-BARRETO, 2019; REECE et al., 2011; YAMADA; YOSHIDA, 2019).

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada bem conservado que envolve a ativação de moléculas cisteíno proteases, denominadas de caspases. Além dessas moléculas, existem ainda as pro-caspases, zimogênios inativos que precisam ser clivados para se tornarem proteoliticamente ativos (GREEN; LLAMBI, 2015a; YAMADA; YOSHIDA, 2019).

As caspases podem ser classificadas em caspases iniciadoras e caspases executoras. As caspases iniciadoras apresentam pró-domínios longos que facilitam a ativação das caspases executoras. Além disso, não são ativadas por clivagem de seus substratos e têm como principais representantes as caspases 2, 8, 9 e 10. Por outro lado, as caspases executoras são ativadas mediante clivagem proteolítica de seus substratos nos resíduos de aspartato. As principais caspases executoras são as caspases 3, 6, e 7. Após ativação, as caspases executoras podem processar mais de 1000 proteínas diferentes, resultando na perda ou ganho de funções destas proteínas. Neste sentido, as caspases executoras podem clivar, por exemplo, a subunidade p75 do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, levando a perda de função proteica e consequente prejuízo na produção de ATP. Por outro lado, essas caspases podem ativar moduladores do citoesqueleto, tais como PAK2 e ROCK1, induzindo modificações no citoesqueleto da célula (GALLUZZI;

KROEMER, 2008; YOSHIDA, 2019; YOULE; STRASSER, 2008; YUAN; KROEMER, 2010).

A morte celular apoptótica pode ser ativada por uma variedade de estímulos intrínsecos e extrínsecos. Dentre eles, estão os receptores de morte localizados na membrana celular, tais como Fas, TRAIL-R, TNFR1 os quais estão envolvidos no processo de ativação da apoptose através da via extrínseca (figura 6). A ligação entre a proteína do domínio de morte ao receptor Fas (FADD) ou TNFR (TRADD) forma o complexo de sinalização de morte, o qual é responsável pelo recrutamento e ativação da caspase-8. Esta por sua vez, promove a ativação das caspases executoras 3, 6 e 7, induzindo assim o processo de apoptose. Além disso, vale ressaltar que a caspase-8 também é capaz de clivar a proteína pro-apoptótica BID a qual irá promover a ativação do gene regulatório BAX, aumentando a amplificação da apoptose mediante a via intrínseca (CZABOTAR et al., 2014; KROEMER; ZAMZAMI; SUSIN, [s.d.]; YAMADA; YOSHIDA, 2019).

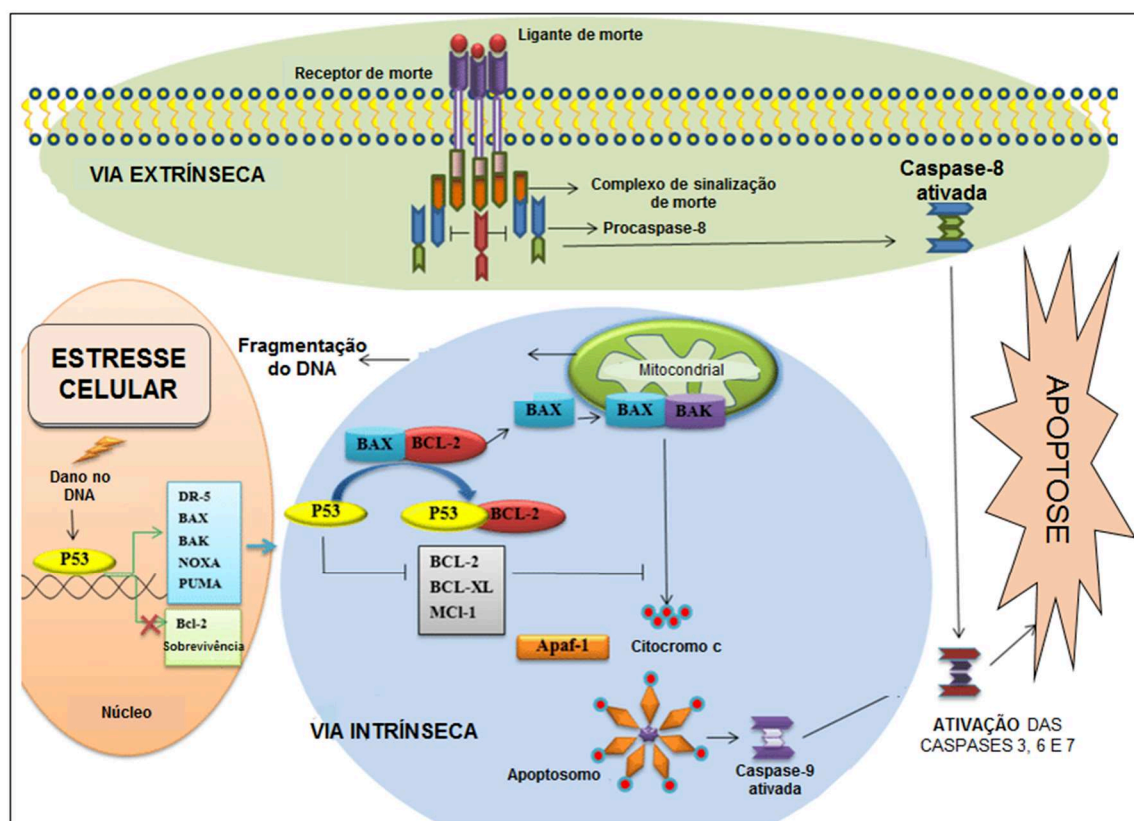


Figura 6: Esquema de ativação das caspases por meio da via extrínseca e intrínseca. A apoptose pode ser executada através de duas vias, a via extrínseca ou via intrínseca. A via extrínseca acontece por meio da ativação de receptores de morte ancorados na membrana, com posterior formação do complexo de sinalização de morte. Este complexo irá ativar o zimogênio pró

caspase-8, tornando a caspase-8 ativa. Na sequência, esta caspase iniciadora promoverá a ativação das caspases executoras 3, 6 e 7, resultando na apoptose da célula. A via intrínseca pode ser ativada após dano no DNA, resultando na ativação da proteína reguladora P53. Esta por sua vez é capaz de promover a ativação de genes pró-apoptóticos, tais como DR-5, Bax, Bak, NOXA e PUMA. Uma vez ativados, estes genes promovem alterações na membrana mitocondrial, com consequente liberação do citocromo C no citosol. Na sequência, ocorre a formação do complexo apoptossomo (associação do citocromo C e Apaf-1) que irá ativar a caspase iniciadora 9 e esta, por sua vez, irá ativar as caspases executoras 3, 6 e 7, promovendo assim a apoptose. Adicionalmente, P53 também é capaz de promover a inibição das proteínas da família Bcl-2, cuja função biológica está associada com a supressão da apoptose. Desta forma, quando inibidas o processo de apoptose é ativado. Fonte: Adaptado de GOLDAR et al., 2015.

A ativação da apoptose intrínseca ocorre via mitocôndria, sendo desencadeada por meio da perda da integridade da membrana mitocondrial e posterior liberação de fatores pró-apoptóticos. A mitocôndria desempenha um papel crucial na respiração celular, e ainda está relacionada com a produção de uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO's). O desequilíbrio entre a produção de ERO's e os mecanismos de defesa antioxidantes pode induzir a célula ao estresse celular. Assim, o aumento do estresse celular pode promover a ativação de genes pró-apoptóticos tais como Bax e Bac, os quais induzirão alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, com posterior liberação do citocromo c no citosol da célula. Em seguida, ocorre a formação do complexo apoptossomo através da associação do citocromo c com o Apaf-1 (fator de ativação de protease apoptótico 1). Uma vez formado, esse complexo irá promover a ativação da caspase-9 e, consequentemente, das caspases executoras 3, 6 e 7, culminando com a morte celular por apoptose (CULLEN; MARTIN, 2009; SHALINI et al., 2015; YAMADA; YOSHIDA, 2019).

A regulação do processo de apoptose é essencial para garantir a homeostasia da célula, sendo, portanto, imprescindível para sobrevivência celular. Neste sentido, a proteína P53 desempenha um papel muito importante na proteção celular, uma vez que esta proteína impede a propagação errônea de danos no DNA. A p53 pode induzir o processo de apoptose através da ativação de genes pró-apoptóticos, tais como DR-5, Bax, Bak, NOXA e PUMA, ou ainda, por meio da inibição das proteínas da família Bcl-2, cuja função é suprimir a apoptose. Assim, induzindo de forma programada a morte celular por apoptose através dos mecanismos supracitados, a proteína p53 consegue impedir a propagação do erro no DNA para outras células (JEFFERS et al., 2003; MAKIN, 2001; ODA, 2000; SHALINI et al., 2015; YAMADA; YOSHIDA, 2019).

Outra molécula frequentemente ativada durante o estresse celular, que desempenha papel central no reparo de DNA é a enzima nuclear PARP-1. Assim, quando ativada, PARP-1 é capaz de se ligar ao DNA e transferir grupos ADP (ribose) através de uma reação dependente de NAD⁺. Ainda, vale ressaltar que algumas caspases, tais como 3 e 7 são capazes de clivar PARP-1, tornando assim a enzima ativa. A ação inicial de PARP-1 está relacionada com o reparo de danos ao DNA, entretanto, quando estes danos são muito extensos a atividade desta enzima é amplificada, resultando no consumo exacerbado de NAD⁺. Como consequência ocorre a privação de moléculas de ATP, e posteriormente a morte celular (BOICE; BOUCHIER-HAYES, 2020; CHAITANYA; ALEXANDER; BABU, 2010; GERMAIN et al., 1999; NING; WAKIMOTO, 2020).

A apoptose é um processo muito bem caracterizado, não somente devido ao conhecimento acerca das mudanças bioquímicas induzidas, mas também devido a uma série de mudanças morfológicas produzidas por este tipo de morte celular. Neste sentido pode-se destacar: (1) encolhimento celular; (2) condensação da cromatina; (3) fragmentação do DNA; (4) formação de *blebbing* na membrana e (5) formação de corpos apoptóticos (GALLUZZI et al., 2018; GOLDAR et al., 2015; KROEMER et al., 2009; REECE et al., 2011).

Outro tipo de morte celular bem caracterizado é a necrose. Estudos recentes têm demonstrado que a necrose pode ser ativada mediante uma série de mecanismos moleculares controlados e regulados, sendo, portanto, considerada uma tipo de morte celular programada e recentemente denominada de necroptose. A ativação da necroptose ocorre de forma independente das caspases e envolve a ativação da proteína MLKL (*Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein*) por meio de sua fosforilação. Uma vez fosforilada, MLKL é capaz de promover a ruptura da membrana plasmática da célula, principal característica associada a este tipo de morte celular (GALLUZZI; KROEMER, 2008; MATSUMURA et al., 2000; NEWTON et al., 2014; YAMADA; YOSHIDA, 2019).

A regulação dos mecanismos de morte celular supracitados desempenha um papel primordial na sobrevivência e no impedimento do desenvolvimento de novas doenças. Portanto, são alvos de estudo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para doenças que ainda apresentam grandes limitações

relacionadas ao seu tratamento, tais como o câncer (MURRAY; DYSON, 2020; ZARIĆ; PIRKOVIĆ; HAMZAGIĆ, 2019).

Considerando o tratamento dos diferentes tipos de câncer, drogas que apresentam a habilidade de modular ERO's podem implicar na produção de efeitos citotóxicos maiores em células tumoral do que em células normal. Isto acontece porque as células tumoral produzem níveis basais de ERO's maiores do que as células normal e consequentemente um balanço de ERO's (relação entre a quantidade de ERO's produzidos com os sistemas antioxidantes presentes nas células) maior. Desta forma, conforme ilustra a figura 7, o aumento dos níveis de ERO's exógenos induzidos, por exemplo, por uma droga faz com que as células tumoral atinjam mais facilmente o limite entre a sobrevivência e morte celular, podendo ultrapassá-lo mais rapidamente do que as células normal (CHANG et al., 2017; HUANG et al., 2018; TANG et al., 2019).

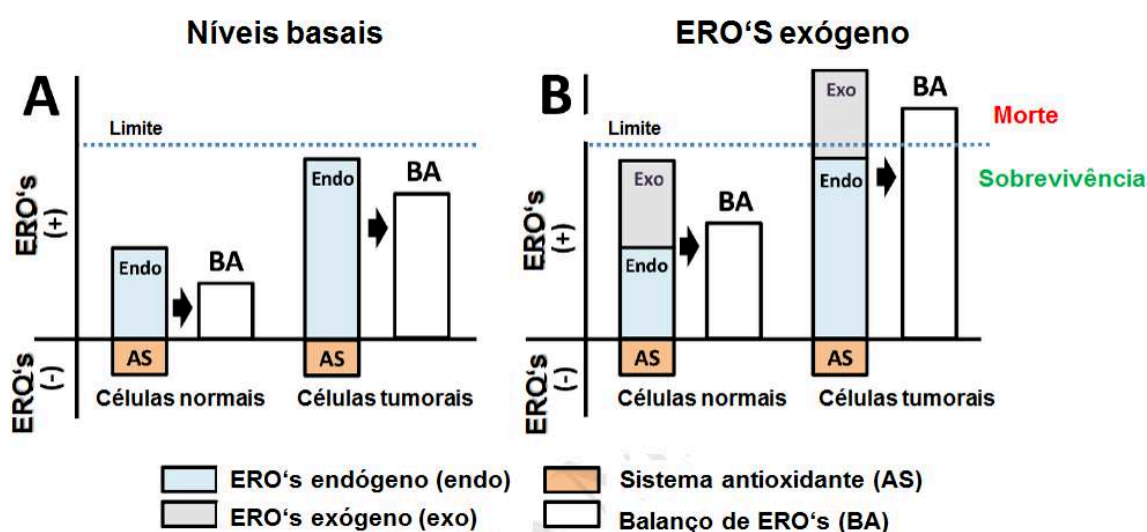


Figura 7: Mecanismo de balanço do estresse oxidativo em células normal e tumoral. (A) Níveis basais de produção de ERO's em células normal e tumoral. (B) Após um estímulo exógeno níveis de ERO's em células normal e tumoral de pulmão. Fonte: TANG et al., 2019.

Estudos têm demonstrado a capacidade de complexos de rutênio em induzir a célula ao estresse celular por meio do aumento na produção de ERO's, desencadeando efeitos apoptóticos, preferencialmente em célula tumoral (CHEN et al., 2016, 2019; COSTA et al., 2019; RIGOLET; YOBOUE; DEVIN, 2011; TANG

et al., 2019) Por essa razão, tais complexos apresentam excelente potencial para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de inúmeros tipos de câncer.

1.6 Mecanismos de morte celular em tripanosomatídeos

Evidências crescentes têm demonstrado a existência de fenótipos apoptóticos em parasitos protozoários unicelulares, tais como os tripanosomatídeos. Entretanto, a existência de morte celular programada nestes organismos permanece controversa, certamente pelo fato das principais proteínas que norteiam o processo de apoptose em organismos multicelulares não serem encontradas nestes protozoários. Por essas razões é comum encontrarmos na literatura a denominação “morte celular do tipo apoptótica” para indicar a ocorrência de fenótipos apoptóticos nestes protozoários (DEBRABANT et al., 2003; MENNA-BARRETO, 2019; MESLIN et al., 2011; NGUEWA et al., 2004; SHADAB et al., 2017; VERCAMMEN et al., 2007).

Estudos recentes têm demonstrado que o fenótipo apoptótico ocorre em tripanosomatídeos. Entretanto, a maquinaria molecular detalhada e os reguladores executores da morte celular ainda permanecem pouco esclarecidos. Neste sentido, os fenótipos apoptóticos, que são marcadores clássicos em organismos multicelulares, em tripanosomatídeos ficam restritos em: (1) fragmentação do DNA; (2) externalização da fosfatidilserina; (3) perda do potencial mitocondrial; (4) modificações no ciclo celular e (5) liberação do citocromo C. Além dessas alterações moleculares, mudanças morfológicas típicas do processo apoptótico também são vistas em tripanosomatídeos, a saber: condensação da cromatina, fragmentação do DNA, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos e formação de *blebbing* na membrana plasmática (DEBRABANT et al., 2003; DUSZENKO et al., 2006; MENDES et al., 2016; MENNA-BARRETO, 2019). A tabela 1 mostra a comparação de fenótipos apoptóticos presentes em organismos multicelulares e tripanosomatídeos.

Tabela 1: Comparação dos fenótipos apoptóticos em Organismos multicelulares e Tripanosomatídeos.

Fenótipos apoptóticos	Organismos multicelulares	Tripanosomatídeos
Atividade proteolítica de caspases	+	nd*
Perda no potencial mitocondrial	+	+
Liberação de Citocromo C	+	+
Regulação de proteínas Bcl-2	+	nd*
Fomação de <i>blebbing</i> na membrana plasmática	+	+
Arredondamento celular	+	+
Fragmentação no DNA	+	+
Presença de genes pro-apoptóticos	+	nd*
Modificações no ciclo celular	+	+
Externalização da fosfatidilserina	+	+

*nd:não determinado

Fonte: Adaptado de (MENNA-BARRETO, 2019)

Estudos recentes têm buscado investigar outras moléculas envolvidas no processo de morte celular por apoptose em tripanosomatídeos, uma vez que moléculas clássicas como, por exemplo, as caspases não foram determinadas nestes organismos celulares. Neste sentido, moléculas denominadas de metacaspases foram identificadas em alguns tripanosomatídeos. Diferentemente das caspases que contém substrato para o aspartato, as metacaspases são específicas para substratos contendo arginina e lisina, e ficam localizadas no citoplasma ou ainda na mitocôndria única do parasito. Entretanto, até o momento, nenhum estudo foi capaz de identificar a atividade proteolítica das metacaspases, estando sua atividade relacionada com os processos de proliferação e diferenciação celular e não diretamente com um mecanismo de morte celular (HELMS, 2006; MENNA-BARRETO, 2019; PROTO; COOMBS; MOTTRAM, 2013).

Outro tipo de morte celular descrita em tripanosomatídeos é a morte celular autofágica que ocorre quando as células perdem o controle homeostático, induzindo de forma exacerbada o processo de autofagia podendo, portanto, degradar as estruturas celulares. A autofagia configura um importante mecanismo de reciclagem e remodelação de componentes celulares, garantindo assim a homeostasia necessária durante os processos de crescimento celular e

diferenciação. Entretanto, quando constantemente ativada, pode levar à morte celular (DOS ANJOS et al., 2016; MENNA-BARRETO, 2019).

Em tripanosomatídeos, o estresse celular pode promover a ativação de fenótipos autofágicos tais como formação de corpos multivesiculares e aumento do número de autofagossomos. Dessa forma, drogas capazes de aumentar o estresse celular vêm sendo bastante utilizadas, com o intuito de induzir a morte celular através de diferentes formas, dentre elas, a morte celular autofágica (COSTA et al., 2019; MENDES et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2019).

Diferentemente da apoptose e da morte celular autofágica, a necrose é um tipo de morte pouco investigada em tripanosomatídeos, certamente devido ao fato deste tipo de morte celular apresentar um perfil não controlado e acidental sendo, portanto, o ponto final do processo de morte. A ruptura da membrana plasmática é o marcador clássico da necrose, podendo ser causada por substâncias químicas e/ou estresse físico (BARRETT; CROFT, 2012, p. 10; MENNA-BARRETO, 2019; PROTO; COOMBS; MOTTRAM, 2013).

Apesar de pouco descrito, os mecanismos de morte em tripanosomatídeos, bem como os mecanismos regulatórios que norteiam estes processos configuram etapas importantes no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Neste sentido, é importante ressaltar a necessidade da compreensão dos mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos no processo de morte celular em parasitos.

2.0 OBJETIVO GERAL

Demonstrar os mecanismos de morte envolvidos na atividade anti-*Leishmania* e antitumoral do complexo de rutênio hmxato (*cis*-[Ru^{II}((η^2 -O₂CC₇H₇O₂)(dppm)₂)]PF₆) em promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania amazonensis* e células tumoral de pulmão (A549).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito antiproliferativo do hmxrato e precursor em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, assim como verificar a interferência no ciclo celular do parasito;
- Analisar a capacidade do hmxrato e do precursor de induzir a fragmentação do DNA através do teste de TUNEL;
- Avaliar alterações mitocondriais produzidas pelo hmxrato e o precursor em promastigotas, além de mensurar os níveis de ERO's nestes parasitos;
- Analisar as alterações morfológicas estruturais e ultraestruturais dos parasitos tratados com o hmxrato e precursor;
- Avaliar a indução de vacúolos autofágicos em promastigotas produzidos pelo hmxrato e seu precursor
- Avaliar a citotoxicidade do hmxrato e seu precursor contra macrófagos extraídos da medula óssea de camundongos BALB/c assim como verificar a interferência do hmxrato na infectividade *in vitro*.
- Avaliar a atividade citotóxica do complexo hmxrato contra célula normal – BEAS-2B e tumoral – A549 de pulmão, assim como a influência do complexo na proliferação e recuperação dessas células;
- Verificar a capacidade do complexo hmxrato em impedir a formação de colônias de células A549 e BEAS-2B, assim como seu efeito no ciclo celular das células A549 e BEAS-2B;
- Analisar as alterações morfológicas estruturais induzidas pelo complexo hmxrato em células tumoral e normais de pulmão;
- Mensurar a interferência do hmxrato na produção de ERO's em células A549 e BEAS-2B, assim como sua capacidade em provocar alterações no potencial mitocondrial destas células.
- Verificar a capacidade do hmxrato em causar danos no DNA de células A549 e BEAS-2B, assim como verificar a interação entre o complexo e o DNA por meio do *docking* molecular;
- Avaliar a capacidade do complexo hmxrato em induzir as células A549 e BEAS-2B ao processo de apoptose e/ou necrose, bem como verificar a interferência do complexo na via de caspases de células A549.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Químicos e Animais

Os reagentes dimetilsulfóxido (DMSO), penicilina, estreptomicina, rodamina 123 (Rh 123), monodansilcadaverina (MDC), glutamina, solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Cisplatina – $Pt(NH_3)_2Cl_2$, metilmetanosulfonato (MMS), meio de cultura DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle: Nutrient Mixture F-12*) foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) e o soro fetal bovino (SFB) foi comprado da Cultilab (São Paulo, Brasil). Todos os outros reagentes foram de grau analítico ou superior.

Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) foram coletados de camundongos BALB/c fêmeas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR / UFU). O protocolo usado foi aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU; process n° 096/2015).

3.2. Síntese dos complexos de rutênio

O complexo precursor ($cis-[Ru^{II}(\eta^2-O_2CR)(dppm)_2]PF_6$) foi sintetizado como descrito na literatura (Sullivan e Meyer, 1982) e o hmxato ($cis-[Ru^{II}(\eta^2-O_2CC_7H_7O_2)(dppm)_2]PF_6$) foi sintetizado e purificado através de métodos químicos aprovados conforme descrito anteriormente (COSTA et al., 2017). Os complexos foram dissolvidos em DMSO para obtenção de uma solução estoque (10 mM), a qual foi armazenada à 4° C. Para a realização dos experimentos, novas diluições foram preparadas em meio de cultura para garantir que a concentração do DMSO não excedesse 0,1%. As concentrações dos complexos utilizadas em todos os ensaios envolvendo os parasitos foram baseadas na concentração citotóxica para 50% (IC_{50}) das promastigotas conforme descrito anteriormente (Costa et al., 2017). Para os ensaios envolvendo as células tumoral e normal de pulmão, o IC_{50} foi inicialmente determinado e posteriormente utilizado nos demais testes.

3.3. Cultura de células

Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (cepa IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas em meio LIT suplementado com 10% SFB, 1% penicilina ($10.000 \text{ UI.mL}^{-1}$) e estreptomicina (10 mg.mL^{-1}), 2% glicose – LIT completo - à $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Promastigotas usadas em todos os experimentos foram isoladas da fase estacionária de crescimento.

As linhagens celulares tumoral - A549 (células epiteliais basais alveolares humanas adenocarcinômicas) e normal – BEAS-2B (células epiteliais brônquicas humanas) foram obtidas da *American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)*. As células A549 e BEAS-2B foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)* e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina ($10.000 \text{ UI.mL}^{-1}$) e estreptomicina (10 mg.mL^{-1}) – DMEM/F12 completo e foram incubadas à 37°C em incubadora umidificada - 5% CO_2 .

3.4. Avaliação da citotoxicidade em células normal e tumoral de pulmão

Brevemente, células A549 e BEAS-2B (3×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços contendo meio DMEM/F12 completo e foram incubadas à 37°C em incubadora umidificada - 5% CO_2 durante 12h para adesão celular. Na sequência, as células foram tratadas ou não (controle) com diferentes concentrações (diluições seriadas a partir de $200 \mu\text{M}$ até $0,097 \mu\text{M}$) do hmxato, precursor ou ligante livre por um período de 24h. A Cisplatina foi utilizada como controle positivo. A viabilidade celular foi verificada através do ensaio de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) de acordo com Mosmann com algumas modificações (MOSMANN, 1983). Desta forma, após tratamento, as células foram incubadas com MTT (5mg.mL^{-1}) durante 3h à 37°C . Em seguida, foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de PBS contendo SDS 10% e HCl $0,01\text{M}$ para completa diluição dos cristais de formazan formados a partir do consumo de MTT por meio das enzimas mitocondriais. Após 12h, a absorbância foi lida a 570 nm no espectrofotômetro (*Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer – Thermo*

Scientific, USA). A concentração inibitória para 50% das células (IC₅₀) tumoral e não tumoral foi determinada através de regressão linear utilizando o *software GraphPad Prism Software version 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA)*. Adicionalmente, o índice de citotoxicidade seletiva (ICS) foi definido através do IC₅₀ de células não tumoral – BEAS-2B dividido pelo IC₅₀ para célula tumoral A549. Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão (DP) e os experimentos foram feitos em quadruplicata, sendo realizados três experimentos independentes.

3.5 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) tratados com os complexos de rutênio.

BMDM foram obtidos de camundongos BALB/C fêmea (idade de 7 – 9 semanas), conforme previamente descrito (BRINGMANN et al., 2013). Brevemente, macrófagos (2 x 10⁵ células/poço) foram semeados em placas de cultura de 96 poços contendo meio RPMI 1640 suplementado com 20% SFB, 1% penicilina (10,000 UI.mL⁻¹) e estreptomicina (10 mg.mL⁻¹), 1,3% glutamina – meio RPMI completo – e mantidos em incubadora umidificada - 5% CO₂ por 18 h. Em seguida, BMDM foram incubados com meio RPMI completo na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações (diluição em série de 2 vezes de 200 µM à 0,097 µM) do hmxato ou precursor por 24h.

Aternativamente, BMDM foram tratados com as seguintes concentrações: 4 x IC₅₀, 3 x IC₅₀, 2 x IC₅₀, IC₅₀ and ½ x IC₅₀. Essas concentrações foram baseadas na concentração inibitória para 50% de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* que foram anteriormente descritas pelo nosso grupo (Costa et al., 2017). A viabilidade celular foi realizada através do método de MTT, de acordo com Mosmann com algumas modificações (MOSMANN, 1983), conforme descrito anteriormente.

A concentração citotóxica para 50% dos macrófagos (CC₅₀) foi determinada através do *software GraphPad Prism Software version 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA)*. Adicionalmente, o índice de seletividade (IS) foi definido através da razão entre a CC₅₀ de macrófagos sobre a IC₅₀ de promastigotas. Os experimentos foram realizados em triplicata e três experimentos independentes foram conduzidos.

3.6. Ensaio antiproliferativo

A fim de avaliar o efeito do hmxrato e seu precursor sobre a proliferação de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, os parasitos (5×10^6 células.mL⁻¹) foram cultivados em garrafas de cultura de 25cm² contendo meio LIT completo na ausência (controle) ou presença de hmxrato ou de seu precursor, nas concentrações de 0,52 µM e 15,48 µM (valores de IC₅₀), respectivamente. As concentrações de promastigotas em meio de cultivo foram monitoradas nos tempos de 6, 12, 24, 48 e 72 h. Após tratamento, as células foram lavadas com tampão PBS e em seguida fixadas com paraformaldeído 1% em tampão cacodilato e tiveram sua densidade determinada através da câmara de Neubauer. O ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram realizados.

Para avaliar os efeitos do hmxrato na proliferação de células tumoral e normal de pulmão, 2×10^4 células/poço de A549 e BEAS-2B foram semeadas em placas de 96 poços contendo meio DMEM/F12 completo e mantidas à 37° C em incubadora umidificada - 5% CO₂ durante 12 horas. Em seguida, as células foram incubadas com meio DMEM/F12 completo na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações do hmxrato (0,95 µM, 1,9 µM, 3,8 µM, 19,0 µM e 38,0 µM) por 24h, 48h ou 72h. O ensaio de proliferação celular foi mensurado através do método de MTT, conforme previamente descrito. Os resultados foram expressos com valores de absorbância à 570 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas e três experimentos independentes foram conduzidos.

Adicionalmente, o ensaio de recuperação da proliferação celular também foi realizado. Para isto, células A549 e BEAS-2B foram semeadas em uma densidade igual a 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços e incubadas por 12h em incubadora umidificada - 5% CO₂. Após adesão, as células foram incubadas com meio DMEM/F12 completo (controle), DMEM/F12 sem SFB ou ainda DMEM/F12 contendo diferentes concentrações do complexo hmxrato (0,95 µM, 1,9 µM, 3,8 µM, 19,0 µM e 38,0 µM) durante 24h. Na sequência, todos os poços contendo meio de cultura ou tratamento foram removidos, lavados duas vezes com PBS e adicionados com meio DMEM/F12 completo. Finalmente, as placas foram mantidas

em incubadora umidificada - 5% CO₂ durante 24h e 48h e a placa correspondente ao tempo de 0h foi processada. A recuperação da proliferação celular foi avaliada através do teste colorimétrico de MTT, conforme protocolo descrito no item 3.4. As absorbâncias obtidas no espectofotômetro (*Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer – Thermo Scientific, USA*) foram coletadas para a construção do gráfico no *software GraphPad Prism Software version 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA)*. Os experimentos foram realizados em triplicata e três experimentos independentes foram conduzidos.

3.7. Ensaio clonogênico

Com o intuito de avaliarmos a capacidade do hmxrato em interferir na formação de colônias de células tumoral e normal de pulmão, 2 x 10⁴ células/poço de A549 e BEAS-2B foram semeadas em placas de 96 poços contendo meio DMEM/F12 e incubadas à 37° C em incubadora umidificada de CO₂ – 5% durante 12h para adesão celular. Após adesão, as células foram tratadas ou não (controle) com hmxrato (1,9 µM, 3,8 µM e 19 µM) e incubadas por mais 24h. Na sequência, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 200 xg por 5 minutos à 4° C e semeadas (100 células/poço) em placas de 6 poços contendo meio DMEM/F12 completo durante 14 dias. O meio de cultura foi substituído após 7 dias de cultivo. Por fim, as colônias foram fixadas com formaldeído 3% e na sequência coradas com cristal violeta. Apenas as colônias contendo mais que 50 células foram contadas através da inspeção visual. Os experimentos foram realizados em triplicata e três experimentos independentes foram conduzidos. Os dados foram apresentados como a média ± desvio padrão.

3.8. Análise do Ciclo Celular

Promastigotas (5 x 10⁶ células.mL⁻¹) foram incubadas à 23 ± 0.5°C por 24h na ausência (controle) ou presença do hmxrato (IC₅₀) ou precursor (IC₅₀). Após a incubação, os parasitos foram lavados com tampão PBS e ressuspensos em solução gelada de etanol 70% em PBS e fixados por 18h à 4° C.

Subsequentemente, os parasitos foram incubados com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de iodeto de propídio e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de RNase A em PBS por 45 minutos à 37°C , sob proteção da luz. A análise da população de células foi realizada em do citômetro de fluxo (*FACSCanto II, BD*). Um total de 10.000 eventos foi adquirido em regiões previamente estabelecidas, correspondente aos parasitos. O *software FlowJo (Treestar)* foi utilizado para analisar a porcentagem de parasitos em cada fase do ciclo celular: sub-G1, G1, S e G2-M.

Este mesmo teste foi realizado para células A549 e BEAS-2B. Para tal, 1×10^6 células.mL⁻¹ foram semeadas em placas de 6 poços e mantidas à 37°C em incubadora umidificada - 5% CO₂ durante 12h para adesão celular. Em seguida, as células foram incubadas por 24h na ausência (controle) ou presença do hmxrato (3,8 μM ou 19,0 μM). Após o tratamento, as células foram lavadas com o tampão PBS, tripsinizadas, ressuspensas em solução gelada de etanol 70% em PBS e fixadas por 18h à 4°C . Na sequência, as células foram lavadas com tampão PBS e finalmente incubadas com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de iodeto de propídio e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de RNase A em PBS por 45 minutos à 37°C , sob proteção da luz. A análise da população celular foi realizada através do citômetro de fluxo (*CytoFLEX Platform – Beckman Coulter*) e mais de 10.000 eventos foram adquiridos. O *software Kaluza version 2.1* foi utilizado para analisar a porcentagem de células de cada fase: G1, S e G2-M. Os experimentos foram realizados em triplicata e três experimentos independentes foram conduzidos. Os dados representam a média \pm desvio padrão.

3.9. Análise da fragmentação do DNA (ensaio de TUNEL)

Para analisar a fragmentação do DNA *in situ*, a técnica de *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assay* (TUNEL) foi realizada através do sistema de detecção de apoptose, Kit fluoresceína (Promega). Este ensaio foi realizado em colaboração com o Instituto Butantan. Brevemente, promastigotas (5×10^6 células.mL⁻¹) foram cultivados na ausência (controle) ou presença do hmxrato (IC₅₀) ou precursor (IC₅₀) e incubadas à $23 \pm 0.5^\circ \text{C}$ por 24h. Na sequência, as células foram lavadas com tampão PBS e fixadas em paraformaldeído 1% em tampão cacodilato por 15 minutos. As células fixadas foram lavadas com tampão PBS e permeabilizadas através da adição de triton X-100

0,1% por 5 minutos à 25° C e os parasitos foram fixados e dispostos em lâminulas. O ensaio de TUNEL foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Para a análise, as lâminas receberam VECTASHIELD® com DAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindole dilactate). Assim, a sobreposição das imagens com a luz verde e azul permitiram a detecção de danos nos núcleos que emitem fluorescência, indicando a incorporação de nucleotídeos modificados (dUTP) nas extremidades de fragmentos de DNA. Controles, positivo e negativo, foram realizados como controles internos do ensaio. Para o controle negativo, a reação de TUNEL foi realizada com a enzima TdT e para o controle positivo, parasitos foram pré-tratados com 1 unidade.mL⁻¹ de DNase I por 10 minutos. As células foram analisadas utilizando microscópio fluorescente Olympus B x 51 (objetiva de 100x) acoplado com uma câmara digital Olympus XM10 e um software controlador Olympus Cell F (Olympus, Japão). Foram analisados 100 núcleos por lâmina, sendo cada tratamento realizado em triplicata. As imagens de fluorescência foram obtidas através do software Olympus Cell F.

3.10. Avaliação da apoptose em células tumoral e normal de pulmão

A avaliação da apoptose foi realizada por meio do Kit de Apoptose (BD Biosciences) seguindo as orientações do fabricante. Brevemente, as células A549 e BEAS-2B (3 x 10⁵/poço) foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas à 37° C em incubadora umidificada - 5% CO₂ por 12h. Após adesão celular, as células foram tratadas ou não (controle) com 3,8 µM e 19,0 µM do hmxato durante 24h. Na sequência, as células foram lavadas com tampão PBS, tripsinizadas, ressuspensas em tampão de ligação e 2µL de FITC-Anexina V e 1 µL de IP foram adicionados. As células foram incubadas por 15 minutos sob proteção da luz à 25° C e na sequência foram imediatamente analisadas no citômetro de fluxo (CytoFLEX Platform – Beckman Coulter) onde foram adquiridos mais de 10.000 eventos. Adicionalmente, foram realizados controles internos do experimento, a saber: (1) células sem tratamento e sem marcação; (2) células tratadas com formaldeído 4% por 20 minutos e marcadas apenas com IP (controle positivo de necrose) e (3) células tratadas com cisplatina a 400µM por 24 h e marcadas apenas com FITC-Anexina V (controle positivo de apoptose). O software Kaluza version 2.1 foi usado

para análise dos resultados. Os gráficos quantitativos apresentam a média dos valores obtidos nos experimentos independentes. Este ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram conduzidos.

3.11. Ensaio Cometa em células normal e tumoral de pulmão

Originalmente descrito por SINGH et al., 1988 e adaptado de acordo com (TICE et al., (2000), o ensaio cometa baseia-se na avaliação da migração do DNA em um gel de agarose. Resumidamente, quando os nucleídeos são submetidos ao processo de eletroforese pode ocorrer a migração do DNA danificado para fora do núcleo, formando assim uma cauda. Desta forma, quanto maior for a quantidade de DNA formado na cauda, maior será o dano no DNA (SINGH et al., 1988; TICE et al., (2000). Para realização do ensaio, células A549 e BEAS-2B (2×10^5 células/poço) foram semeadas e placas de 24 poços e foram incubadas à 37° C em incubadora umidificada - 5% CO₂ por 12h. Após adesão celular, as células foram incubadas com 3,8 µM, 1,9 µM, 0,95 µM do hmx-bato, meio DMEM/F12 completo (controle negativo) ou 200 µM de MMS (controle positivo) durante 4h. Após o tempo de tratamento, a viabilidade celular das culturas foi avaliada pela técnica de exclusão por azul de tripan. Com este método de determinação de citotoxicidade são submetidas ao ensaio do cometa apenas as culturas que apresentarem viabilidade celular superior a 70%. Após esta análise as células foram homogeneizadas com 120 µL de agarose com baixo ponto de fusão e adicionadas sobre uma lâmina previamente preparada com agarose de ponto de fusão normal. As lâminas foram cobertas com lamínulas e incubadas na geladeira por 30 minutos. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas mergulhadas em tampão de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris, pH 10), recentemente preparada, por 1 h a 4°C. Após a lise, as lâminas foram imersas em solução alcalina (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) por 60 minutos a 4°C. Após esse período, as lâminas foram levadas à cuba de eletroforese. A eletroforese foi conduzida em solução alcalina (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) por 20 minutos com voltagem e amperagem constantes (25V/300A). Após a eletroforese, as lâminas foram imersas em solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos e

mantidas em temperatura ambiente até a secagem. As lâminas foram fixadas em álcool etílico absoluto por 5 minutos e mantidas em temperatura ambiente até a secagem. Antes da análise, as lâminas foram coradas com o agente intercalante de DNA *GelRedTM* (0,1 µg/mL) por 3 minutos. Foram analisadas 100 imagens de nucleoides para cada tratamento, de forma aleatória, em microscópio de fluorescência (*Carl Zeiss, Axiostar Plus, Thornwood, NY, Estados Unidos*) utilizando filtro 516-560 nm, barreira de filtro de 590 nm, com aumento original 200x. Os cometas foram avaliados por meio do *software* de análise de imagem *CometAssay IV*, versão 4.3 (*Perceptive Instruments Ltd., Suffolk, Reino Unido*). O *software* determina a quantidade de DNA em um determinado local como sendo proporcional à quantidade de pixels nessa posição. Desta forma, os parâmetros métricos são obtidos por equações matemáticas. O parâmetro avaliado foi a porcentagem de DNA na cauda do cometa (% DNA): *Tail intensity*. Os dados obtidos foram transferidos para o *software GraphPad Prism Software version 6.01*, onde foram construídos os gráficos e realizadas as análises estatísticas.

3.12. Análise do dano mitocondrial ($\Delta\Psi m$)

Rodamina 123 (Rh 123), uma sonda fluorescente específica que se acumula dentro de mitocôndrias ativas, foi usada para avaliar o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$) de promastigotas e células tumoral e normal de pulmão. Parasitos (5×10^6 células.mL⁻¹) foram cultivados na ausência (controle) ou presença do complexo (IC₅₀) ou precursor (IC₅₀) e incubados à $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24h e 48h. Posteriormente, foram incubados com Rh 123 ($15 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por 15 minutos à 25°C sob proteção da luz. Subsequentemente, os parasitos foram lavados em tampão PBS, fixados com paraformaldeído 1% em tampão cacodilato e lavados novamente com tampão PBS. A análise da população de células foi feita no citômetro de fluxo (*FACSCanto II, BD*). Um total de 10.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida como correspondente aos parasitos. Este ensaio foi realizado em triplicata e os dados mostrados nos gráficos apresentam a média dos valores. O *software FlowJo (TreeStar)* foi empregado para análise da intensidade de fluorescência. Alternativamente, parasitos incubados com Rh 123 foram

observados no microscópio confocal (*Zeiss LSM510 Meta*) e as imagens capturadas foram processadas utilizando o software *Adobe Photoshop 5.5* (Adobe Systems, Inc., Mountain View, CA, USA).

O potencial da membrana mitocondrial também foi mensurado em células A549 e BEAS-2B por meio da sonda fluorescente Rh 123. Inicialmente, 3×10^5 células/poço foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas à 37°C em incubadora umidificada - 5% CO₂ por 12 horas para adesão celular. Em seguida, as células foram cultivadas na ausência (controle) ou presença do hmxato (3,8 µM e 19,0 µM) durante 24h. Após o tratamento, as células foram lavadas 2x com tampão PBS e incubadas com Rh 123 (15 µg.mL⁻¹) por 15 minutos à 37° C, sob proteção da luz. Finalmente, as células foram lavadas com tampão PBS, tripsinizadas, centrifugadas à 200 xg por 5 minutos à 4° C, ressuspensas em tampão PBS e imediatamente analisadas por citometria de fluxo (*CytoFLEX Platform – Beckman Coulter*). Neste ensaio, foram adquiridos mais de 10.000 eventos e o *software Kaluza version 2.1* foi utilizado para analisar os resultados. Este experimento foi realizado em triplicada e três experimentos independentes foram conduzidos. Os gráficos apresentam a média dos valores obtidos.

3.13. Mensuração de espécies reativas de oxigênio (ERO's)

Os níveis de ERO's foram mensurados a partir da sonda fluorescente CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester), onde após difusão na célula é desacetilada por esterases celulares e em seguida oxidada por ERO's em 2' 7' -dichlorofluorescein (DCF), formando um composto altamente fluorescente que pode ser detectado por espectroscopia de luminescência. Desta forma, para quantificar a produção de ERO's, promastigotas (5×10^6 células.mL⁻¹) foram cultivados na ausência (controle) ou presença de hmxato (IC₅₀) ou precursor (IC₅₀) e incubados à 23 ± 0.5°C durante 24h. Em seguida, os parasitos foram centrifugados à 250 xg por 5 minutos, lavados com tampão PBS e incubados com 2 µM de CM-H₂DCFDA (Invitrogen) por 30 minutos à 23±0,5°C, sob proteção da luz. Após incubação, as células foram imediatamente analisadas em citômetro de fluxo *BD FACSCanto II* (BD Biosciences), onde 10.000

eventos foram adquiridos. Células tratadas com peróxido de hidrogênio (0,5 mM) por 20 minutos foram utilizadas como controle positivo interno do experimento. A fluorescência foi mensurada e representada através de histogramas. O *software FlowJo (Treestar)* foi utilizado para analisar a intensidade de fluorescência. Este ensaio foi realizado em triplicata e os valores exibidos no gráfico apresentam a média dos valores.

Os níveis de ERO's também foram mensurados em células tumoral e normal de pulmão por meio da sonda fluorescente CM-H₂DCFDA (*Invitrogen*). Células A549 e BEAS-2B foram semeadas á uma densidade de 3×10^5 células/poço em placas de 12 poços e incubadas à 37°C em incubadora umidificada - 5% CO₂ por 12h para adesão celular. Em seguida, as células foram tratadas ou não (controle) com 3,8 µM e 19,0 µM de hmxrato durante 4h.

Alternativamente, células A549 foram tratadas por 4h com 3,8 µM de hmxrato e 5 mM de NAC (N-acetilcisteína), um antioxidante contendo tiol capaz de estimular a síntese de glutathiona, inibindo assim a produção de ERO's (GILLISSEN et al., 1997). Após os tratamentos, as células foram lavadas 2x com tampão PBS e incubadas com 10 µM CM-H₂DCFDA e 10 µg.mL⁻¹ de IP por 30 minutos à 37±0.5°C, sob proteção da luz. As células foram então analisadas em citômetro de fluxo (*CytoFLE Platform – Beckman Coulter*) onde mais de 10.000 eventos foram adquiridos. Células tratadas com peróxido de hidrogênio à 0,1 mM por 20 minutos foram utilizadas como controle positivo interno do experimento. A análise dos resultados foi processada por meio do *software Kaluza version 2.1* e os gráficos apresentam a média dos valores obtidos em triplicatas de três experimentos independentes realizados.

3.14. Análise da morfologia celular e ultraestrutura de promastigotas de *L.(L.) amazonensis*

Promastigotas de *L.(L.) amazonensis* (5×10^6 células.mL⁻¹) foram cultivadas na ausência (controle) ou presença do hmxrato (IC₅₀) ou precursor (IC₅₀) à 23±0,5° C durante 24h. Os parasitos foram lavados em PBS e fixados em paraformaldeído 1% em tampão cacodilato e ressuspensos em PBS. Parasitos fixados foram

dispostos em lâminulas de vidro e corados com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do conjugado fluorescente faloidina (*phalloidin-Atto 565*) e solução de To-Pro em PBS por 50 minutos à 25°C em câmara úmida, de acordo com as instruções do fabricante. A morfologia celular foi analisada no microscópio confocal (*Zeiss LSM510 Meta*) e as imagens capturadas foram processadas utilizando o *software Adobe Photoshop 5.5* (Adobe Systems, Inc., Mountain View, CA, USA). Alternativamente, a intensidade de fluorescência da faloidina e a área de cada célula foi manualmente mensurada por meio do uso do *software ImageJ* (National Institutes of Health, USA).

Para análise ultraestrutural, promastigotas foram tratados ou não (controle) com hmxato (IC_{50}) ou precursor (IC_{50}) por 24h. Após a incubação ou não com os complexos, os parasitos foram fixados por 12h à 4°C em solução contendo 2,5% de glutaraldeído diluído em tampão PBS, lavados em PBS e pós-fixados por 1 hora em solução contendo 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) e 0,8% ferrocianeto de potássio em PBS. Em seguida as células foram lavadas com tampão PBS, desidratadas em uma série de acetona graduada e embebida em resina. Seções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e então observadas no microscópio de transmissão eletrônica (*HITACHI HT7700*).

A morfologia das células tumoral e normal de pulmão também foi avaliada por meio do uso de conjugados fluorescentes faloidina (*phalloidin-Atto 565*) e solução de To-Pro. Células A549 e BEAS-2B ($1 \times 10^5/\text{poço}$) foram semeadas em placas de 24 poços contendo lâminulas de vidro redonda e foram incubadas à 37°C em incubadora umidificada - 5% CO_2 por 12h para adesão celular. Em seguida, as células foram tratadas ou não (controle) com 3,8 μM e 19,0 μM do hmxato durante 24h. Após tratamento, as células foram lavadas com tampão PBS, fixadas com formaldeído 4% em PBS por 30 minutos e permeabilizadas com 0,1% de saponina (PGN – saponina). Na sequência, as células foram coradas com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do conjugado fluorescente faloidina (*phalloidin-Atto 565*) e solução de To-Pro em PBS por 50 minutos à 25°C em câmara úmida, de acordo com as instruções do fabricante. Por fim, as lâminas foram montadas e a morfologia das células analisada em microscópio confocal (*Zeiss LSM510 Meta*). As imagens capturadas foram processadas através do *software Adobe Photoshop 5.5* (Adobe Systems, Inc., Mountain View, CA, USA). Alternativamente, a área da célula e a área do núcleo

foram manualmente mensuradas por meio do *software ImageJ* (*National Institutes of Health, USA*) e apresentadas em gráfico de barras.

3.15. Análise da formação de vacúolos autofágicos

A marcação com monodansilcadaverina (MDC) foi realizada com o intuito de avaliar a formação de vacúolos autofágicos em parasitos. Promastigotas (5×10^6 células.mL⁻¹) cultivados na ausência (controle) ou presença do hmxato (IC₅₀) ou precursor (IC₅₀) por 24 h foram incubadas com 200 µM de MDC, por 1h e sob proteção da luz. Parasitos tratados com 1µM rotlerina por 24h foram utilizados como controle positivo. No próximo passo, os parasitos foram lavados com PBS, fixados com paraformaldeído 1% em tampão cacodilato e lavados novamente com PBS. Os parasitos foram dispostos em lamínulas de vidro para montagem em lâminas de microscopia e analisados em microscópio de fluorescência (Zeiss LSM510, Germany) á um comprimento de onda de excitação igual a 358nm e um comprimento de onda de emissão igual a 463nm. A intensidade de fluorescência foi quantificada através do *software Image J*, versão 1.48.

3.16. Infectividade em macrófagos BMDM

Macrófagos BMDM (3×10^5 /poço) foram semeados sobre lamínulas de vidro redondada em placas de 24 poços e incubados com meio RPMI completo à 37°C em incubadora umidificada - 5% CO₂ por 4 h. Após este tempo, promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram adicionados aos macrófagos aderidos em uma proporção de 10:1 (parasitos:macrófago). Após 2h de infecção os promastogotas não internalizados foram removidos por meio da lavagem do poço com tampão PBS. Os macrófagos infectados foram submetidos ao tratamento com hmxato (IC₅₀) ou precursor (IC₅₀) e incubados por 24h à 37°C em incubadora umidificada - 5% CO₂. Por fim, as lâminas contendo macrófagos infectados foram fixadas com paraformaldeído 1% em tampão cacodilato, coradas com Giemsa modificado e analisadas por meio de microscopia óptica. Foram analisadas 100 imagens para cada tratamento, de forma aleatória, em triplicata. Dois experimentos

independentes foram realizados. O índice de infectividade foi calculado pela multiplicação da porcentagem de macrófagos infectados e do número de amastigotas por macrófago infectado.

3.17. Análise da atividade da caspase-9 em células tumoral

A ativação da caspase-9 foi mensurada utilizando o kit de *Caspase-Glo® 9 Assay (Promega)*, de acordo com as orientações do fabricante. O ensaio fornece um substrato luminogênico da caspase-9 em um sistema tampão. Dessa forma, a adição do reagente resulta na lise celular, seguida pela clivagem da caspase e liberação da aminoluciferina, um substrato para enzima luciferase. Brevemente, células A549 (3×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços contendo meio DMEM/F12 completo e incubadas à 37°C em incubadora umidificada - 5% CO₂ durante 12h para adesão celular. Na sequência, as células foram tratadas ou não (controle) com 3,8 µM do hmxato durante 24h. Após tratamento, as células foram lavadas com tampão PBS e o reagente do kit foi adicionado na proporção 1:1 (PBS:reagente do kit). A placa foi centrifugada por aproximadamente 10 xg durante 2 minutos e incubada em temperatura ambiente, protegida da luz, por 45 minutos. Finalmente, a luminescência foi avaliada no leitor de microplacas *Glomax Discover Promega*, utilizando um tempo de exposição ao equipamento de 0,3 segundos. Os valores da luminescência foram obtidos e transferidos para o *software GraphPad Prism Software version 6.01* para a construção dos gráficos e análise estatística. Os ensaios foram realizados em quadruplicata e dois experimentos independentes foram conduzidos.

3.18. Análise da expressão de caspase-3 e PARP-1

Células A549 foram cultivadas em garrafas de cultura (10^7 células/garrafa) e mantidas à 37°C em incubadora umidificada - 5% CO₂ até atingir confluência de 80%. Subsequentemente, as células foram fixadas e permeabilizadas com o kit *CytoFix/CytoPerm (BD Pharmingen TM)* e incubadas durante 24h com meio DMEM/F12 completo na ausência (controle) ou presença de tratamento (3,8 µM de

hmxrato). Após tratamento, as células foram incubadas por 1h à 25°C com solução contendo anticorpos primários anti-Caspase 3 (*Thermo Fisher Scientific*®, 700182, 1:100) e anti-PARP1 (*Sigma-Aldrich*®, AV33754, 1:100). Após incubação com anticorpos primários, as células foram lavadas por 3x com PBS para posterior incubação com anticorpo secundário IgG *Anti-Rabbit* (1:200; 656111, Invitrogen) marcado com FITC por 1h à 25°C e sob proteção da luz. As células foram analisadas em quadruplicatas por citometria de fluxo (*BD Accuri C6*) e dois experimentos independentes foram conduzidos. Foram coletados 10.000 eventos para cada amostra. Os gráficos foram devidamente analisados e as expressões de Caspase 3 e PARP-1 em células controle e tratadas foram determinadas utilizando o *software FlowJo (Treestar)*. Visando a quantificação da expressão, os valores das medianas dos histogramas gerados foram coletados e analisados no *software GraphPad Prism Software version 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA)*, sendo representados por meio dos gráficos de barras.

3.19. Estudos de docking do DNA

A estrutura cristalina do DNA considerada como alvo foi o duplex d (CCGGACCCGG/CCGGGTCCGG)₂ complexado com [Ru(TAP)₂(11,12-CN₂-dppz)]²⁺, código PDB: 6g8s. Este sistema foi considerado para validar a eficiência da metodologia do *docking* molecular e para descrever o modo de ligação correto e as interações intermoleculares entre o hmxrato e o DNA. Os procedimentos de *redock* foram realizados usando a interface *AutoDockTools 1.5.6 (Scanner)* junto com *autogrid4* e *autodock4 (AD4)*. Para preparar o ligante complexo de rutênio(II) hmxrato para o *docking* molecular, o *AutoDockTools 1.5.6* adicionou cargas de *Gasteiger* e converteu as estruturas cristalinas no formato necessário para AD4 (*Sanner, n.d.*). As configurações usadas para o algoritmo genético Lamarckiano no *Autodock* foram: 150 indivíduos em uma população; 25.000.000 avaliações de energia máxima; 27.000 gerações máximas; um indivíduo sobrevivendo na próxima geração; 150 execuções de acoplamento de algoritmos genéticos; e uma análise de *cluster* classificada foi realizada em cada cálculo de encaixe. A energia de ligação do *Autodock* foi usada para pontuação.

3.20 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicatas ou quadruplicatas e no mínimo dois experimentos independentes. Todos os dados foram verificados pela distribuição normal. Diferenças significativas com relação ao grupo controle foram determinadas por one-way ANOVA e teste de Tukey's múltiplas comparações (*GraphPad Prism Software version 6.01*). Os dados foram considerados estatisticamente significativos em $p < 0.05$ (*). Valores de significância mais elevados $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) e $p < 0.0001$ (****) também foram estimados.

4.0 Resultados

4.1 “Insights” mecanísticos da atividade anti-Leishmania

4.1.1. Complexos de rutênio(II) induzem o efeito antiproliferativo em promastigotas

O tratamento com o precursor e o hmxato causou uma redução estatisticamente significativa na proliferação de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* quando comparados com o controle (grupo não tratado) (Figura 8). O efeito antiproliferativo causado pelos complexos de rutênio pôde ser observado logo após 6h de cultivo, quando reduções de aproximadamente 36 % ($p < 0.001$) e 45 % ($p < 0.001$) foram observadas no crescimento do parasito após o tratamento com o precursor e o hmxato, respectivamente. Efeitos antiproliferativos expressivos foram observados através da cultura de parasitos na presença dos complexos de rutênio. Após 24h, os parasitos tratados apresentaram diminuição da concentração promastigotas em meio de cultura, evidenciando que não houve proliferação após este tempo. Parasitos controle, cultivados na ausência dos complexos de rutênio(II), exibiram um crescimento exponencial característico de parasitos normais.

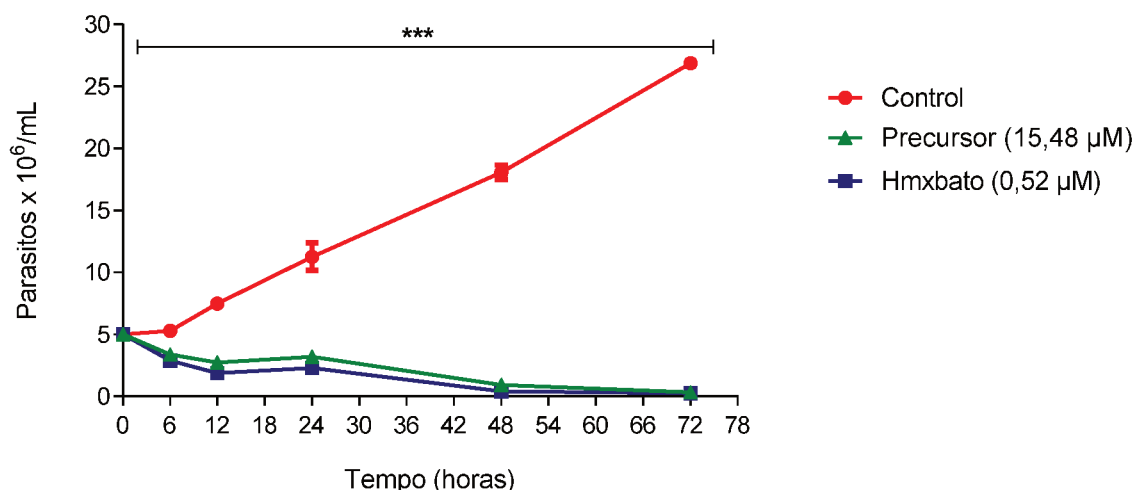
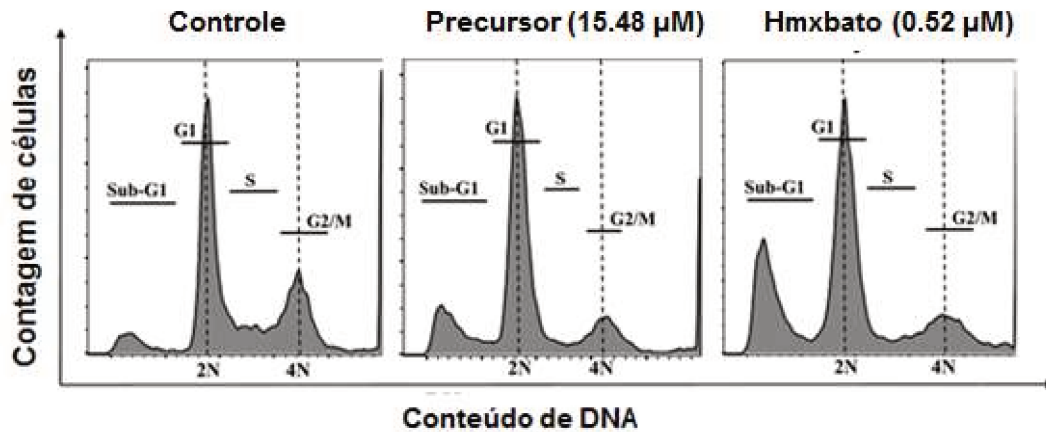


Figura 8: Efeito antiproliferativo causado pelos complexos de rutênio(II) em *L.(L.) amazonensis*. A curva concentração-resposta apresenta a concentração dos parasitos em cultura após tratamento com o precursor e hmxbato nos tempos de 6, 12, 24, 48 e 72h. A concentração dos promastigotas foi determinada através da contagem direta de células fixadas em câmara de Neubauer. As diferenças significativas com relação ao grupo controle foram determinadas utilizando o teste *one-way ANOVA*, *Turkey's* múltiplas comparações. Diferenças estatísticas em relação ao controle foram consideradas altamente significativas quando $p < 0,001$ (***)

4.1.2. Complexos de rutênio promovem alterações no ciclo celular

Para verificar o efeito dos complexos na replicação de promastigotas e confirmar a possibilidade de alterações no ciclo celular, parasitos controle e tratados foram incubados com iodeto de propídeo (IP) e analisados através do citômetro de fluxo (Figura 9 A, B). Os resultados indicam que tanto o precursor quanto o hmxbato promoveram alterações no ciclo celular quando comparados com ao controle, sendo observada uma diminuição estatisticamente significativa na porcentagem de células na fase S (de 11,4% à 3,9% e 4,2%, respectivamente) e na fase G2/M (de 26% à 14,1% e 14,8%, respectivamente). Notavelmente, uma porcentagem significativa de células tratadas com o hmxbato e uma menor porcentagem de células tratadas com o precursor pararam na fase sub-G1 (Figura 9 B).

A



B

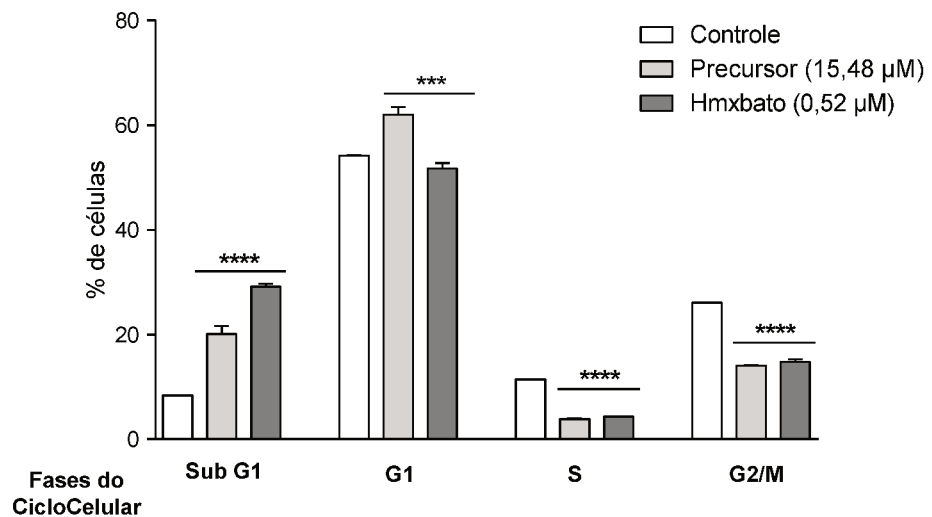
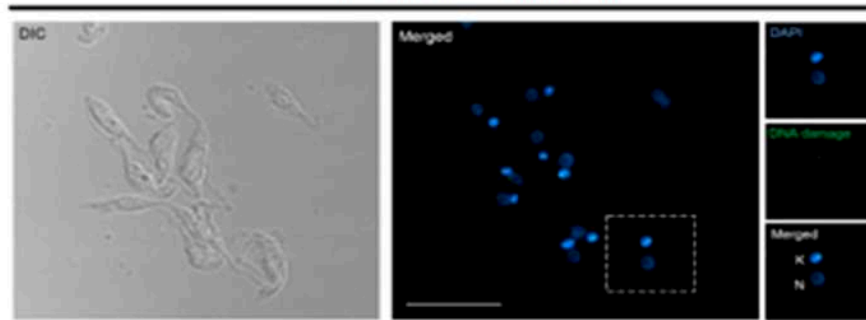


Figura 9: Complexos de rutênio(II) causaram um arraste das células para a fase sub-G1, seguido por diminuição das células nas fase S e G2/M. Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas na ausência (controle) ou presença do precursor (IC_{50}) e hmxbato (IC_{50}) e depois foram submetidas a análise do ciclo celular. **(A)** Os histogramas apresentam a distribuição de células de acordo com o conteúdo de DNA dos parasitos após coloração com iodeto de propídeo (IP). A fluorescência foi mensurada em citômetro de fluxo. **(B)** O gráfico apresenta a porcentagem de células em cada subpopulação nas fases do ciclo celular: sub-G1, G1, S, G2/M. Os dados são expressos em médias \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Em cada triplicata 10.000 células foram analisadas. Diferenças estatisticamente significativa em relação ao grupo controle foram determinadas utilizando o teste one-way ANOVA, Tukey's múltiplas comparações **(B)**. Diferenças foram consideradas como altamente significativas quando $p < 0.001$ (***) ou $p < 0.0001$ (****).

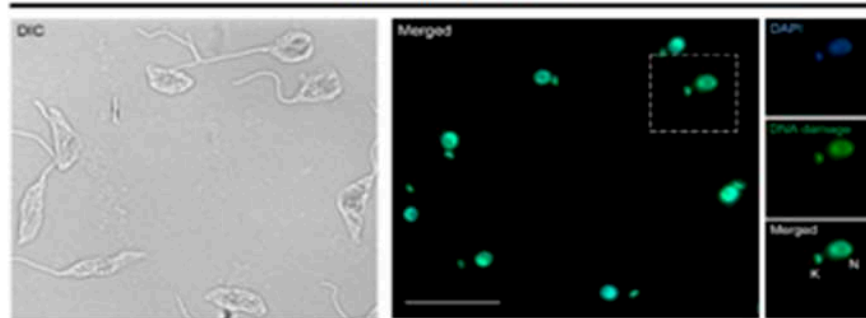
4.1.3. Complexos de rutênio causam fragmentação no DNA

A fragmentação no DNA fornece futuras evidências de morte por apoptose. Assim, para verificar o efeito dos complexos de rutênio e sua possível ação na fragmentação do DNA, foi realizado o ensaio de TUNEL. A figura 10 representa as imagens de fluorescência dos parasitos em diferentes condições analisadas: controle negativo (parasitos em que a reação de TUNEL foi realizada sem a enzima TdT), controle positivo (parasitos pré-tratados com 1 unidade/mL de DNase I), controle (parasitos sem tratamento), precursor (parasitos tratados com precursor) e hmxrato (parasitos tratados com hmxrato. Promastigotas tratados com o precursor ou hmxrato, assim como o controle positivo (+ DNase I), exibiram fluorescência verde, indicando uma forte fragmentação no DNA de parasitos tratados. Além disso, observou-se que o hmxrato causou uma fragmentação no DNA mais intensa quando comparado com o precursor, uma vez que as imagens de fluorescência dos parasitos tratados com o hmxrato não mostraram organelas (núcleo e cinetoplasto) contendo DNA bem definido. É importante ressaltar que a fragmentação no DNA foi tão intensa que não foi possível quantificar a porcentagem de células com DNA fragmentado após tratamento com o hmxrato e seu precursor.

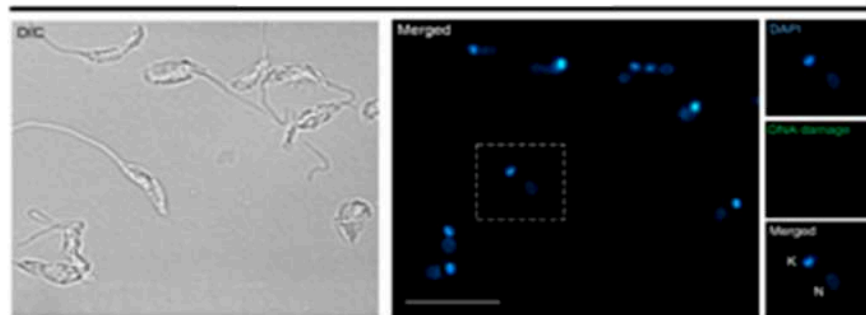
Controle negativo (- enzima Tdt)



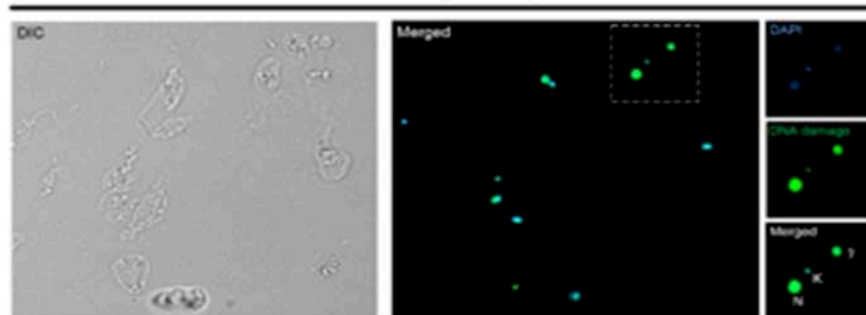
Controle positivo (+DNase I)



Controle



Precursor (15.48 μ M)



Hmxbato (0.52 μ M)

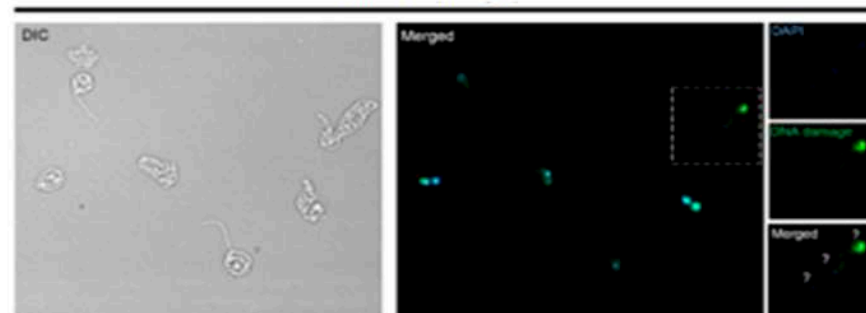
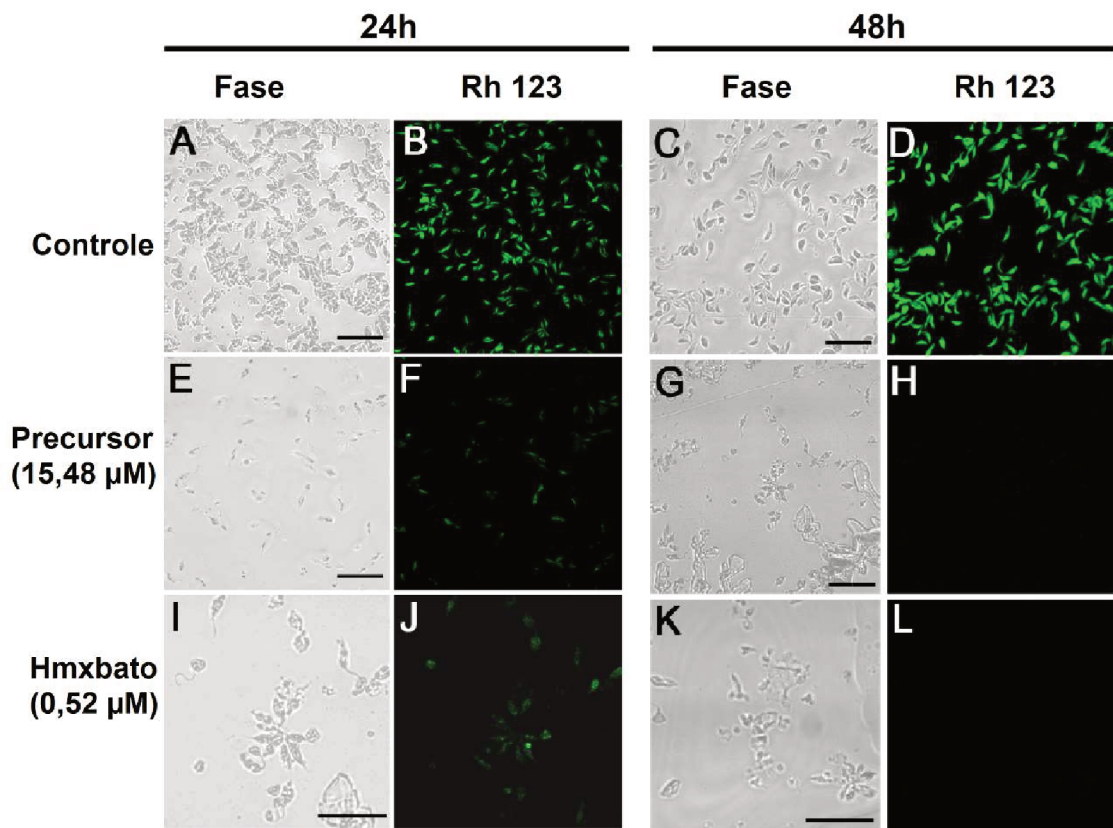


Figura 10: Complexos de rutênio(II) induzem a fragmentação do DNA de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Promastigotas foram cultivados por 24h na ausência (controle) ou presença do precursor (IC₅₀) e hmxato (IC₅₀). Controles internos para o ensaio foram incluídos: controle negativo (sem a enzima Tdt) e controle positivo (pré-tratados com DNase I). O ensaio de TUNEL foi realizado como previamente descrito para avaliar a fragmentação do DNA. A coluna DIC evidência a morfologia das células. A coluna *merged* representa a sobreposição entre organelas coradas com DAPI (campo azul) e fragmentação do DNA (campo verde). O quadrado tracejado em branco representa células em cada condição e sua decomposição (em DAPI e DNA frag) está representada a direita da figura. Este ensaio foi realizado em triplicata. K = Cinetoplasto; N = Núcleo; ? = Organelas indefinidas. A barra corresponde à 10µM. As imagens de sobreposição foram geradas usando o software Olympus- Cell F.

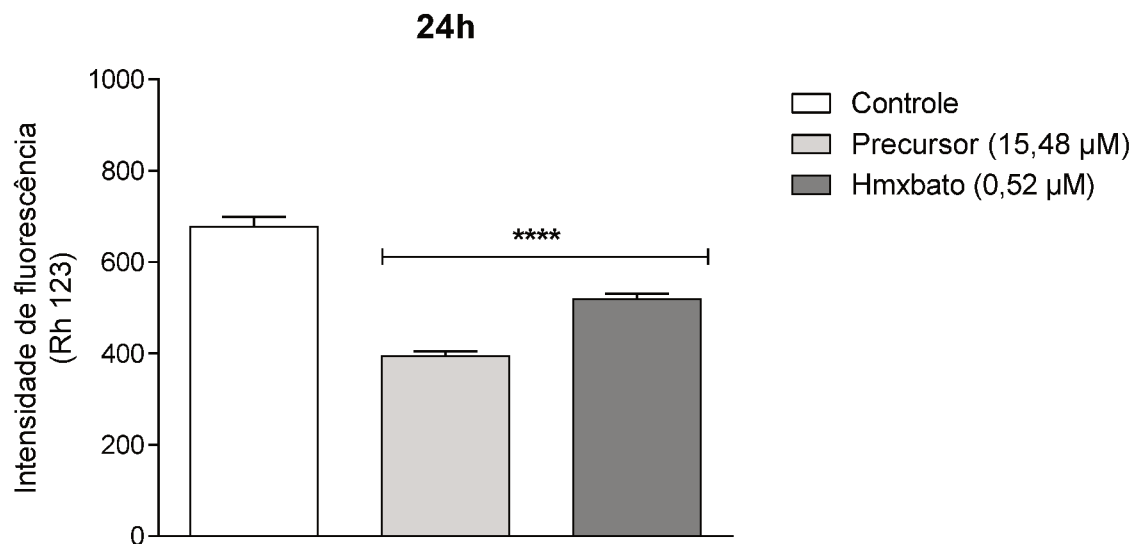
4.1.4. Complexos de rutênio(II) causam uma marcável alteração no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Parasitas do gênero *Leishmania* apresentam uma mitocôndria única a qual é essencial para garantir sua sobrevivência. Neste sentido, mudanças no potencial mitocondrial podem implicar na ativação de caminhos apoptóticos intrínsecos (Marinho et al, 2014; Scariot, 2017). Á fim de verificarmos o efeito dos complexos sobre $\Delta\Psi_m$, promastigotas (controle e tratadas) foram coradas com Rh 123, uma sonda fluorescente que se acumula dentro da mitocondrial com membrana polarizada, resultando na emissão de uma fluorescência verde. A análise através do microscópio de fluorescência revelou que após 24h de tratamento tanto o precursor quanto o hmxato causaram uma diminuição na fluorescência da Rh 123 (Figura 11 A, painéis F e J). A análise da citometria de fluxo realizada após 24h também revelou uma redução estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência da Rh 123 para os parasitos tratados (Figura 11 B, 24h). Juntos, estes resultados indicam que os complexos de rutênio causam uma despolarização no potencial mitocondrial. Esta despolarização foi mais pronunciada após o tratamento com os complexos por 24h, já que nenhuma fluorescência foi detectada através do microscópio (Figura 11 A, painéis H e L. Ainda, após 48h de tratamento com os complexos de rutênio(II), uma discreta fluorescência foi detectada apenas através da análise por meio de citômetro de fluxo. Como esperado, parasitos controle exibiram uma alta intensidade de fluorescência, tanto com 24h quanto 48h. (Figura 11 A, painéis B e D; Figura 11 B).

A



B



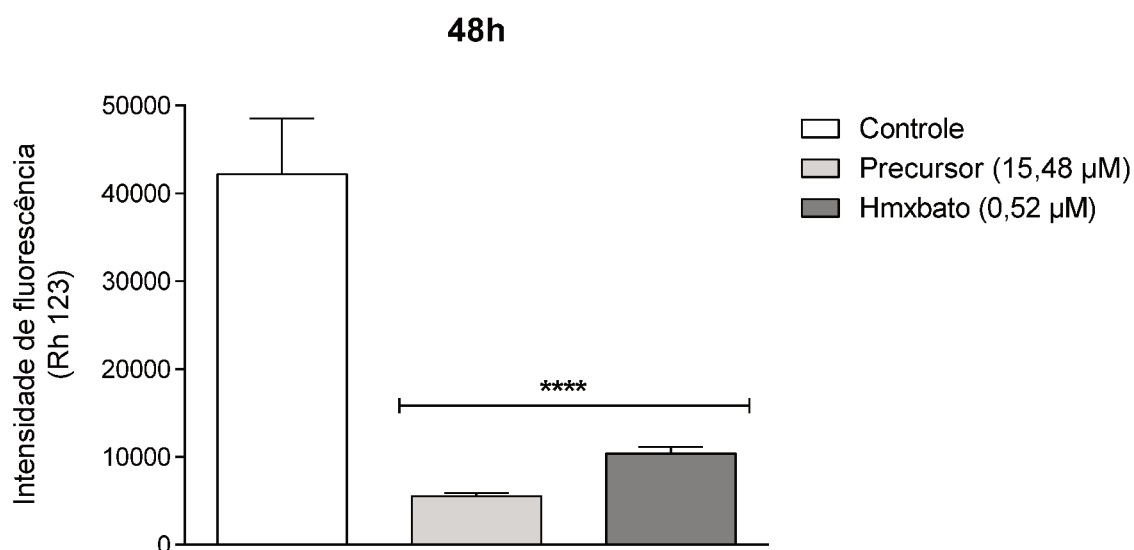


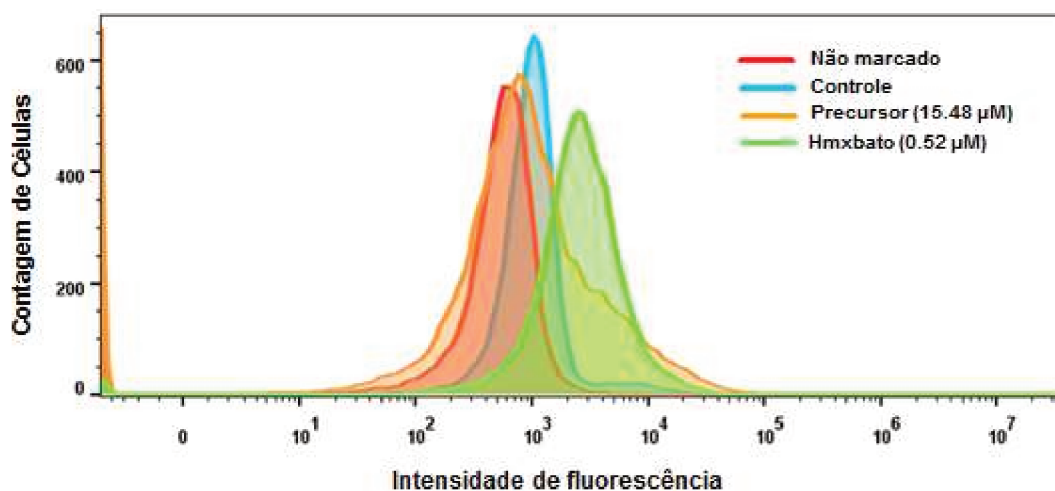
Figura 11: Danos mitocondriais induzidos pelo hmxato e precursor em promastigotas de *L. amazonensis*. (A) Imagens obtidas em microscópio confocal mostram parasitos cultivados na ausência (controle, painéis A – D) ou presença do precursor (IC₅₀ – painéis E – H) e hmxato (IC₅₀ – painéis I – L) por 24h ou 48h e submetidas à marcação com Rh 123 para detecção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). A despolarização do potencial mitocondrial está representada através da diminuição da fluorescência verde. Barras: 20 µm. (B) Alternativamente, parasitos submetidos ao mesmo tratamento descrito anteriormente foram usados para a quantificação da intensidade de fluorescência emitida por meio de citometria de fluxo. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata, onde 10.000 células foram analisadas em cada triplicata. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando o teste one-way ANOVA, Tukey's múltiplas comparações. Diferenças foram consideradas altamente significativas quando $p < 0.0001$ (****).

4.1.5. Complexos de rutênio(II) aumentam a produção de ERO's

Alterações no $\Delta\Psi_m$ podem ocorrer devido ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's). Desta forma, para analisar a produção de ERO's, parasitos controle e tratado (precursor e hmxato) foram incubados com a sonda fluorescente CM-H₂DCFDA e submetidas à análise em citômetro de fluxo. O software *FlowJo* foi utilizado para analisar a porcentagem de parasitos positivos para ERO's. Tanto o precursor quanto o hmxato, após 24h de tratamento, promoveram um aumento nos níveis de ERO's quando comparados com os parasitos controle (Figura 12). A análise quantitativa de células positivas para ERO's foi realizada de acordo com o histograma e exibiu um aumento estatisticamente significativo ($P < 0.0001$) após tratamento com o precursor (21 % de células positivas para ERO's) e hmxato (42 % de células positivas para ERO's).

quando comparadas com o controle (8 % células positivas para ERO's) (Figura 12 B).

A



B

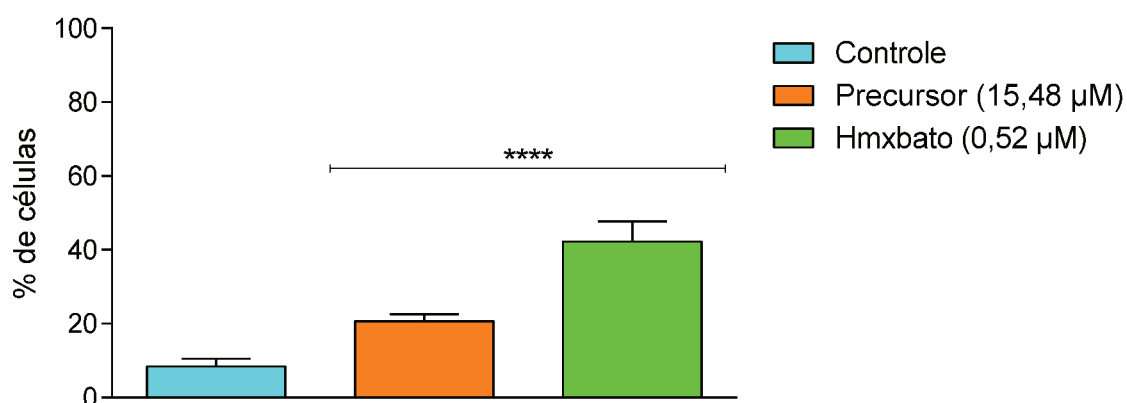


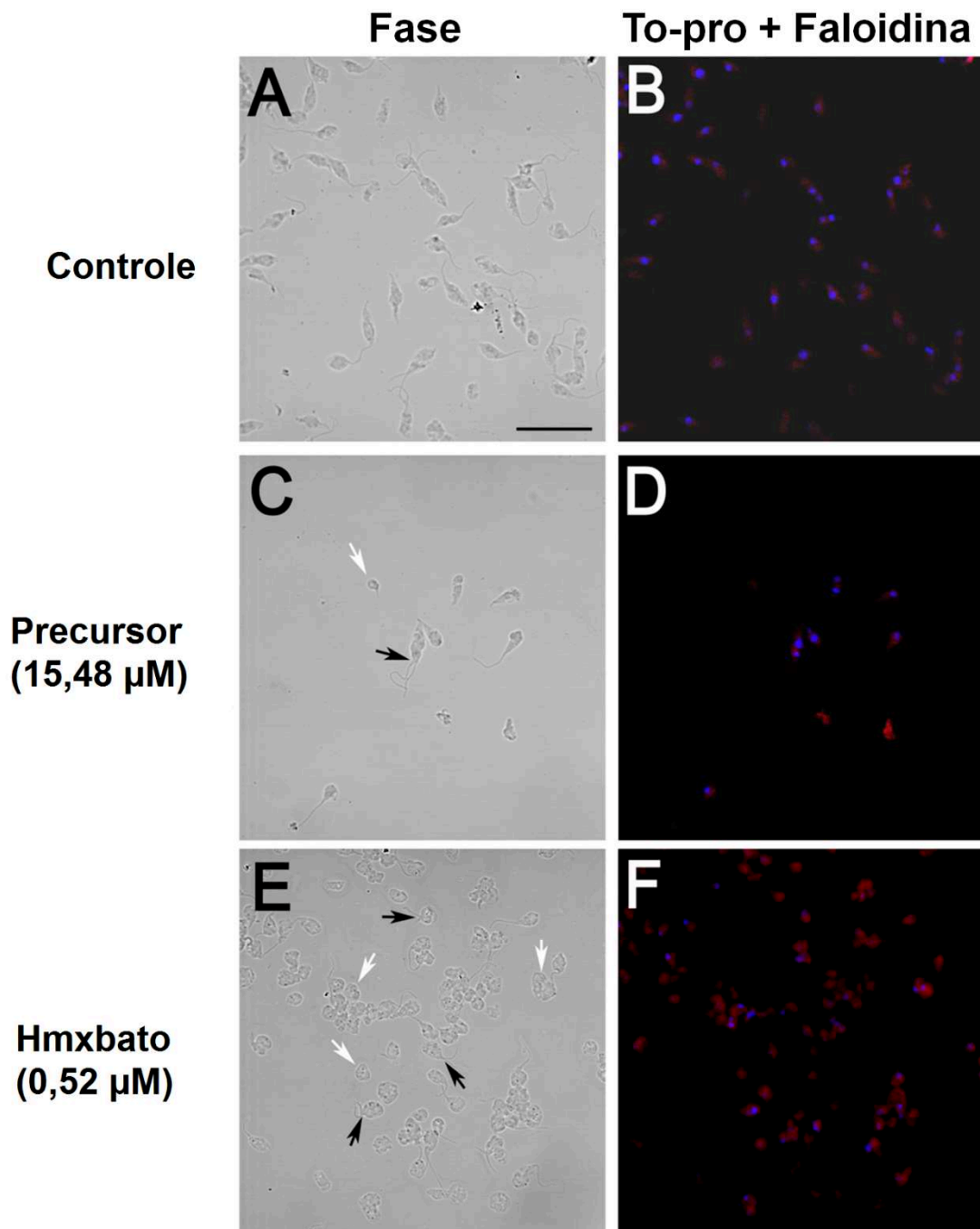
Figura 12. Ensaio de incorporação do CM-H2DCFDA demonstram um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO's) após tratamento com os complexos de rutênio(II). Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas na ausência (controle) ou presença do precursor (IC₅₀) e hmxbato (IC₅₀). **(A)** O histograma apresenta os níveis de ERO's produzidos pelos parasitos após incubação com a sonda fluorescente CM-H2DCFDA e posterior análise em citômetro de fluxo. **(B)** O gráfico apresenta a porcentagem de células positivas para ERO's em cada tratamento. Os valores mostrados no gráfico foram obtidos por meio dos dados do histograma (A). Os ensaios foram realizados em triplicata e 10.000 células foram analisadas em cada triplicata. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes. Diferenças foram consideradas altamente significativas quando $p < 0.0001$ (****).

4.1.6. Complexos de rutênio(II) causam profundas alterações na morfologia do promastigota

Alterações na morfologia celular podem gerar informações adicionais importantes a respeito de tratamentos sobre os parasitos. Assim, promastigotas cultivados por 24h com complexos de rutênio ou não (controle) foram corados com os fluoróforos faloidina e To-pro, e submetidos à análise morfológica por microscopia confocal. Tanto o precursor quanto o hmxrato promoveram mudanças na morfologia dos parasitos (Figura 13 A). Contudo, alterações mais pronunciadas foram observadas após tratamento com o hmxrato (Figura 13, painéis E e F), como seguem: (1) arredondamento do corpo do parasito (indicado por setas brancas), (2) perda no volume celular, (3) alterações no número de flagelos (indicada por setas pretas) e (4) alterações no padrão de polimerização da actina. Adicionalmente, a intensidade de fluorescência da faloidina e a área do parasito foi quantificada através do *Software ImageJ*. Nossos resultados mostram que tanto o precursor quanto o hmxrato promoveram uma hiperpolarização dos filamentos de actina (Figura 13 B) e uma diminuição da área do parasito (Figura 13 C). Estas alterações foram mais evidentes após o tratamento com o hmxrato do que com o precursor.

A análise ultraestrutural revelou mais detalhes com relação aos danos morfológicos que os complexos promoveram nos parasitos. Alterações drásticas foram observadas (Figura 14), tais como: pronunciado inchaço mitocondrial, alterações no padrão de condensação da cromatina/ fragmentação do DNA, presença de corpos lipídicos e acidocalcisomas, vacuolização e *blebbing* na membrana (precursor). Para o hmxrato, as mesmas alterações foram observadas, sobretudo a presença de uma maior quantidade de acidocalcisomas. É importante ressaltar que, em ambos os tratamentos, o cinetoplasto manteve-se intacto e a membrana celular continuou a apresentar os microtúbulos subpeliculares.

A



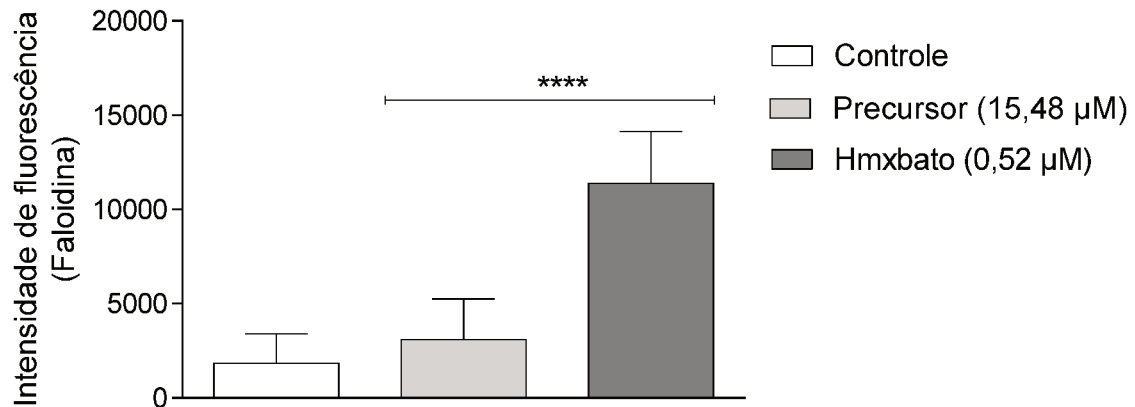
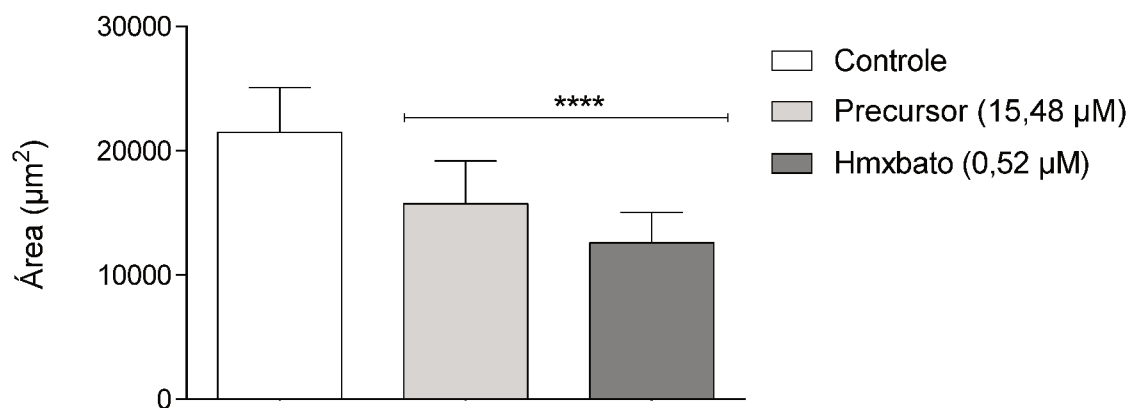
B**C**

Figura 13: Mudanças morfológicas causadas pelos complexos de rutênio(II) em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Parasitos foram cultivados por 24h na ausência (controle) ou presença do precursor (IC_{50}) e hmxbato (IC_{50}) e em seguida submetido à análise microscópica. (a) Os painéis A, C and E apresentam os parasitos em contraste de fase. Os painéis B, D e F apresentam os parasitos marcados com faloidina e To-Pro. As setas brancas indicam promastigotas com o corpo arredondado. As setas pretas indicam parasitos com alterações no número de flagelos. As imagens são representativas de três experimentos independentes. Barra: 20 µm. Os gráficos apresentam a quantificação da intensidade de fluorescência da faloidina (b) e a área do parasito (c). Os dados são expressos em média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando o teste one-way ANOVA, Tukey's múltiplas comparações. Diferenças com relação ao grupo controle foram consideradas altamente significativas quando $p < 0.0001$ (****).

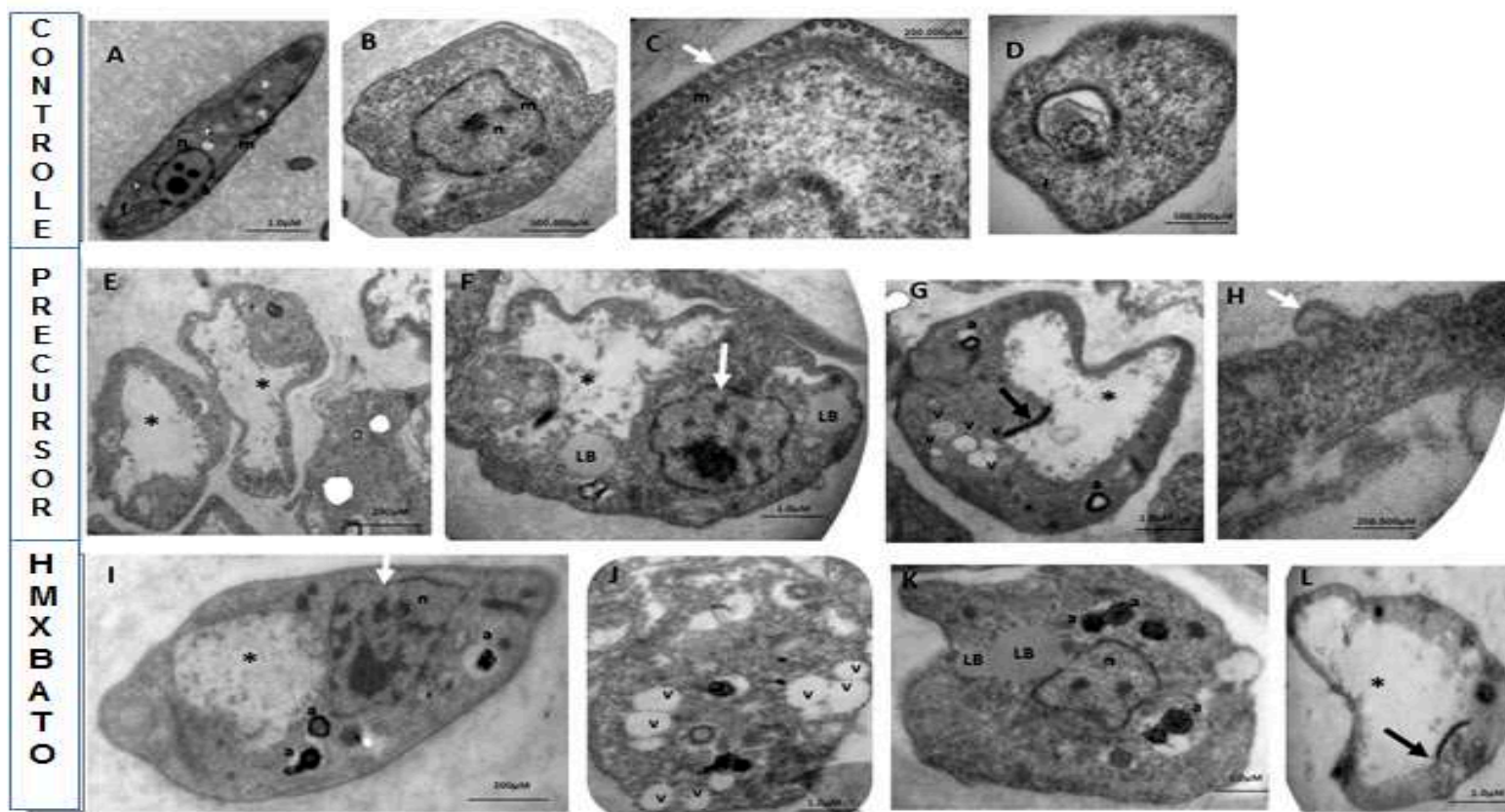
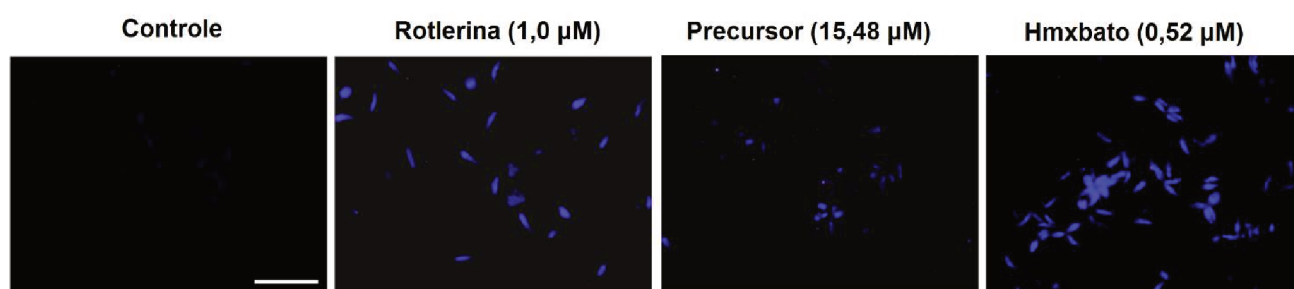


Figura 14: Alterações morfológicas ultraestruturais observadas em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com complexos de rutênio(II). Microscopia eletrônica de transmissão (MET): **A-D.** Parasito controle: **A-B.** Morfologia típica com uma mitocôndria única e simples; **C.** Membrana intacta com microtúbulos subpeliculares (seta branca); **D.** Flagelo simples. **E-H.** Parasitos tratados com precursor: **E.** Inchaço mitocondrial (asterisco preto); **F.** Corpos lipídicos (LB); Alteração no padrão de condensação da cromatina (seta branca); **G.** Vacuolização, presença de acidocalcisomas e cinetoplasto intacto (seta preta); **H.** *Blebbing* na membrana. **I-L.** Parasitos tratados com o hmxbato: **I.** Inchaço mitocondrial (seta preta); Alteração no padrão de condensação da cromatina (seta preta) e presença de acidocalcisomas; **J.** Intensa vacuolização; **K.** Corpos lipídicos (LB) e acidocalcisomas. **L.** Inchaço mitocondrial (asterisco preto) e cinetoplasto intacto (seta preta). **a** = acidocalcisoma; **m** = mitocôndria; **n** = núcleo; **v** = vacúolo.

4.1.7. Complexos de rutênio(II) induzem a formação de vacúolos autofágicos

A fim de investigar se o mecanismo de morte induzido pelos complexos de rutênio(II) no parasito envolveria o processo de autofagia, parasitos controle e tratados foram incubados com monodansilcadaverina (MDC), um fluoróforo capaz de detectar a presença de vacúolos autofágicos. Tanto o precursor quanto o hmxrato induziram a formação de vacúolos autofágicos nos promastigotas (Figura 15 A). Como esperado, parasitos controle não exibiram fluorescência, enquanto que parasitos tratados com a rotlerina, um indutor de autofagia, apresentaram fluorescência. Contudo, tanto o precursor quanto o hmxrato promoveram um aumento estatisticamente significativo na intensidade de fluorescência do MDC quando comparados com parasitos controle (Figura 15 B).

A



B

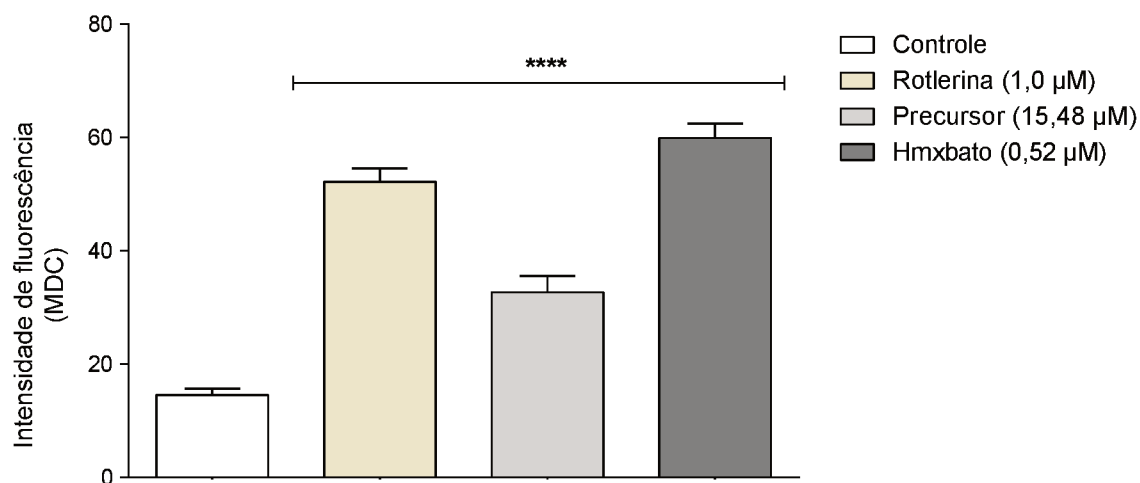


Figura 15: Hmxbato e precursor induzem a formação de vacúolos autofágicos em parasitos. Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas por 24h na ausência (controle) ou presença do precursor (IC₅₀) e hmxbato (IC₅₀). **(A)** Após tratamentos, os parasitos foram incubados com o corante MDC, e analisados no microscópio confocal (Zeiss LSM510, Germany) com comprimento de onda de excitação igual a 358nm e emissão igual a 463 nm. Barra: 20 µm. Parasitos previamente incubados com rotterina (indutor de autofagia) foram considerados como controle positivo. **(B)** O gráfico apresenta a quantificação da intensidade de fluorescência exibida na análise por microscopia de fluorescência. Os dados são expressos como média ± desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando o teste *one-way* ANOVA, Tukey's múltiplas comparações. Diferenças com relação ao grupo controle foram consideradas altamente significativas quando $p < 0.0001$ (****).

4.1.8. Citotoxicidade dos complexos de rutênio(II) em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM)

Em vista do excelente potencial citotóxico dos complexos de rutênio contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis* apresentado nos resultados acima, fomos motivados a investigar o efeito dos complexos em células hospedeiras de mamíferos. Assim, macrófagos BMDM incubados na ausência (controle) e presença do precursor ou hmxbato foram submetidos ao ensaio para a análise da citotoxicidade e definição da concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) e índice de seletividade (IS). Após 24h de incubação com o precursor e hmxbato os valores de CC₅₀ para BMDM foram 61,79 µM e 8,09 µM, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito citotóxico do hmxbato e precursor contra promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e macrófagos BMDM com seus respectivos valores de IC₅₀, CC₅₀ e IS.

	IC ₅₀ (95% CI), µM	CC ₅₀ (95% CI), µM	IS (Índice de seletividade)
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Macrófagos BMDM	
Precursor	15,48 (14,29 – 16,77)*	61,79 (50,96 - 74,91)	3,99
Hmxbato	0,52 (0,44 – 0,63)*	8,09 (6,75 - 9,70)	15,55

* Resultados obtidos por Monica et al, 2017.

Embora o potencial citotóxico do hmxrato em BMDM ser maior do que no precursor, a análise do índice de seletividade revelou que o hmxrato (IS = 15,55) apresenta um efeito seletivo muito maior. Em adição, o hmxrato não exibiu toxicidade contra BMDM na concentração correspondente ao IC₅₀ e 2xIC₅₀ para promastigotas. Por outro lado, o precursor nas mesmas concentrações mencionadas acima promoveu uma toxicidade de aproximadamente 23,5% e 30% para os macrófagos, respectivamente (Figura 16).

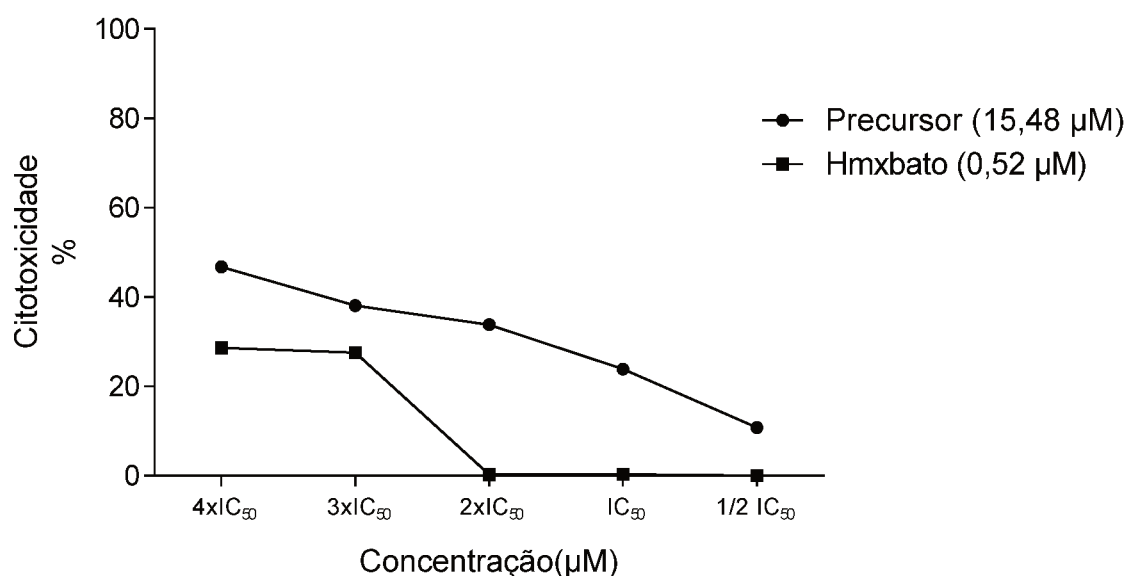


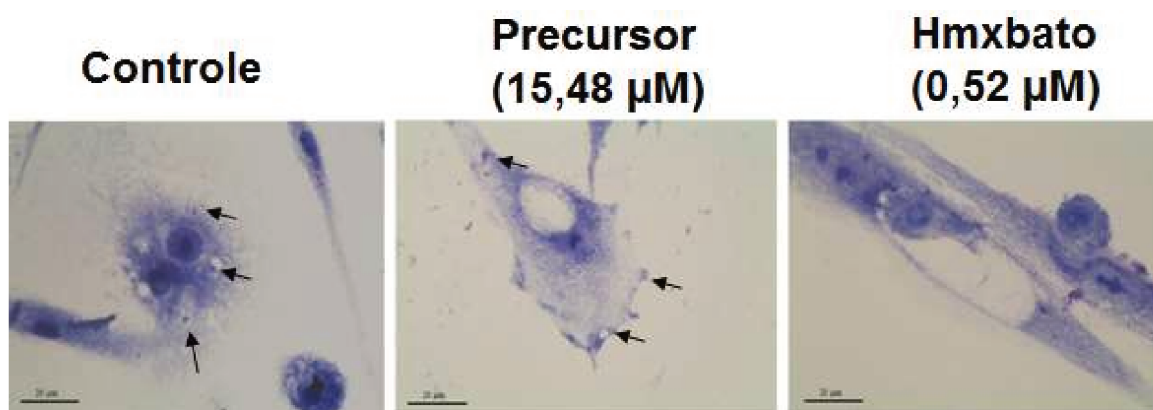
Figura 16: Citotoxicidade dos complexos contra macrófagos (BMDM). Células foram expostas por 24h a diferentes concentrações do hmxrato (4 x IC₅₀: 2,08 µM; 3 x IC₅₀: 1,56 µM; 2 x IC₅₀: 1,04 µM; IC₅₀: 0,52 µM; 1/2 x IC₅₀: 0,26 µM) e precursor (4 x IC₅₀: 61,92 µM; 3 x IC₅₀: 46,44 µM; 2 x IC₅₀: 30,96 µM; IC₅₀: 15,48 µM; 1/2 x IC₅₀: 7,74 µM). A citotoxicidade foi determinada através do ensaio de MTT. Os dados foram expressos como média ±desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata.

4.1.9. Hmxrato reduz substancialmente a infectividade *in vitro* em macrófagos BMDM

O fato do complexo hmxrato, na concentração de 0,52 µM, apresentar citotoxicidade para 50% das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e não apresentar nenhuma toxicidade para macrófagos BMDM (nesta mesma concentração) nos motivou a investigar a interferência do complexo no processo de infectividade *in vitro*. Nossos resultados (figura 17 A) mostraram que o hmxrato, reduziu substancialmente o índice de infectividade, reduzindo em até 84% o mesmo

(Figura 17 B). O complexo precursor também foi capaz de reduzir o índice de infectividade, diminuindo aproximadamente 48% (Figura 17 B). Este resultado torna o complexo hmxrato uma molécula interessante para a prospecção de novas terapêuticas para leishmaniose, uma vez que o complexo promove toxicidade para o parasito sem, no entanto, alterar a viabilidade de macrófagos. Tal condição é ideal para o tratamento.

A



B

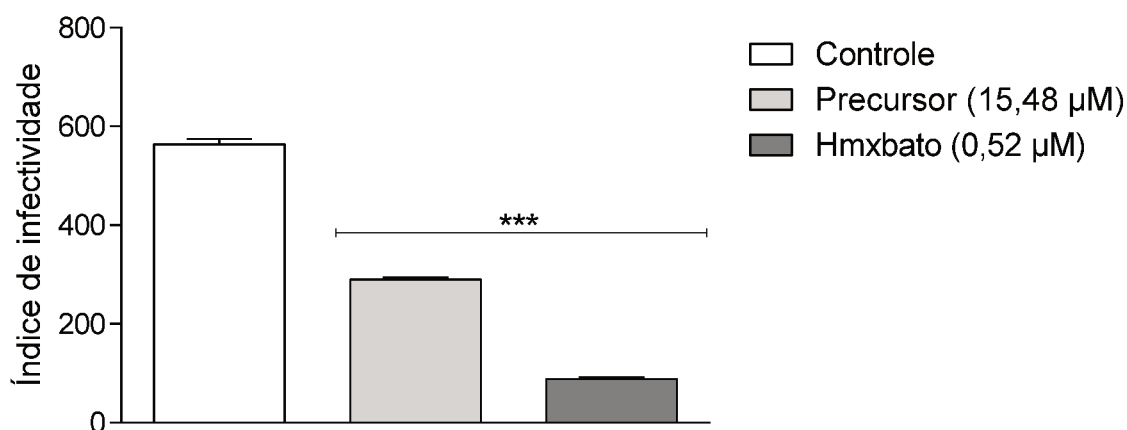


Figura 17: Índice de infectividade em macrófagos BMDM após tratamento de 24h com hmxrato e seu precursor. (A) Imagens representativas obtidas por microscopia óptica demonstrando a diminuição do número de amastigotas nos vacúolos parasitóforos dos macrófagos BMDM tratados com precursor e hmxrato. As setas pretas indicam as amastigotas dentro dos vacúolos parasitóforos. Barra: 20 µm. **(B)** O gráfico apresenta o índice de infectividade que foi calculado através da multiplicação da porcentagem de macrófagos infectados pela média do número de amastigotas por macrófago infectado. Foram analisadas 100 imagens, de maneira aleatória, em triplicata, para cada tratamento. Dois experimentos independentes foram realizados. Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas utilizando o teste *one-way* ANOVA, Tukey's

múltiplas comparações. Diferenças foram consideradas altamente significativas quando $p < 0.0001$ (****).

4.1.10 Provável mecanismo de morte induzido por complexos de rutênio

Nossos resultados sugerem que os complexos de rutênio estariam atuando como agentes oxidantes, os quais promoveriam um aumento da geração de ERO's no parasito. A elevação dos níveis de ERO's geraria um *stress* para a célula, induzindo os seguintes efeitos: (1) despolarização do $\Delta\Psi_m$, como revelado através da diminuição da Rh 123; (2) clivagem do DNA, como observado através do ensaio de TUNEL e detecção do pico pré-apoptótico na análise do ciclo celular; (3) alterações na morfologia do parasito, como alteração na forma (arredondada), perda no volume celular e alteração no padrão de polimerização da actina; (4) formação de vacúolos autofágicos (detectado no teste utilizando o MDC). Tais efeitos indicam a tentativa do parasito em remodelar e lutar contra o *stress* gerado naquele ambiente. Entretanto, tal tentativa do parasito parece ser insuficiente para a sobrevivência e dessa forma, os complexos acabam por gerar a morte do parasito, envolvendo os processos de apoptose e autofagia (Figura 18).

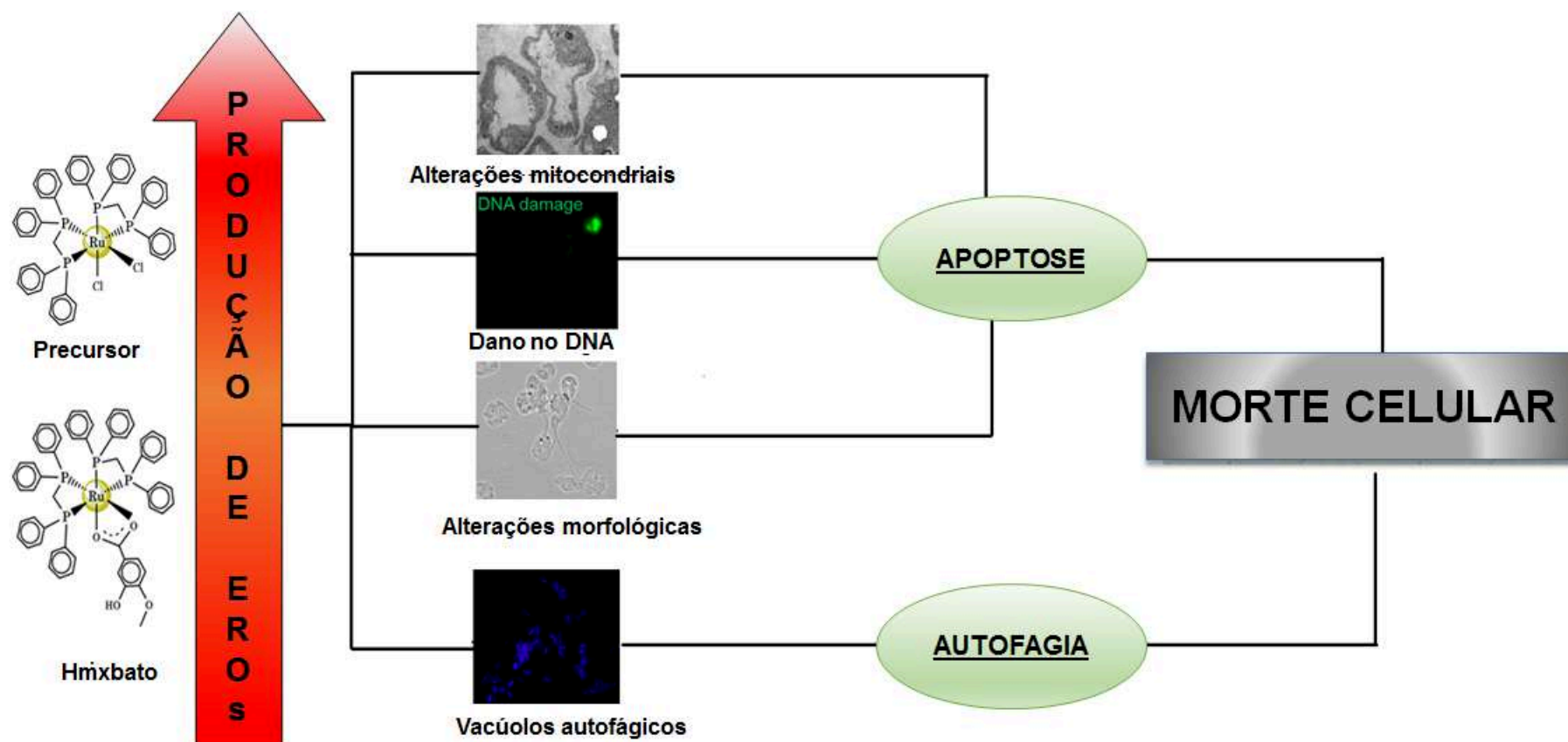


Figura 18. Provável mecanismo de morte de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* induzido pelos complexos de rutênio(II). A elevação de ERO's induz a despolarização do potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$); clivagem do DNA; alterações na morfologia do parasito e aumento da formação de vacúolos autofágicos. Em conjunto, estes resultados indicam que os complexos de rutênio(II) estão induzindo a morte de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* através da apoptose e autofagia.

4.2 Potencial antitumoral do hmxrato e mecanismo de morte envolvido

4.2.1. Hmxrato apresenta alta seletividade e destacado potencial citotóxico contra células A549

A citotoxicidade *in vitro* do complexo hmxrato, seu precursor metálico e ligante livre foi determinada através do ensaio de MTT. Adicionalmente, a citotoxicidade da cisplatina também foi avaliada para fins de comparação. A concentração inibitória para 50% (IC₅₀) para célula tumoral (A549) - e normal (BEAS-2B) estão expressas na tabela 3.

Tabela 3: Efeito citotóxico do hmxrato em células tumoral e normal de pulmão e seus respectivos valores de IC₅₀ e ICS.

Treatmento	^a IC ₅₀ (95% IC), µM*	IC ₅₀ (95% IC), µM*	^b Índice de citotoxicidade seletiva (ICS)
	A549	BEAS-2B	
Cisplatina	26,4 (21,1 – 33,0)	13,38 (10,1 – 17,7)	0,5
Precursor	21,2 (16,0 – 28,1)	29,2 (22,3 – 38,2)	1,4
Ligante livre	< 200	< 200	Não determinado
Hmxrato	3,8 (2,3 – 6,2)	40,3 (22,6 - 71,7)	10,6

^a Concentração inibitória para 50% das células

^b ICS = IC₅₀ para célula não tumoral dividido pelo IC₅₀ para célula tumoral

*Os valores de IC₅₀ foram calculados com base em ensaio utilizando as seguintes concentrações: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19 and 0,097 µM

O hmxrato e seu precursor apresentaram considerável atividade citotóxica contra células A549, exibindo valores de IC₅₀ iguais a 3,8 µM e 21,2 µM, respectivamente. O hmxrato apresentou atividade citotóxica bem superior à droga cisplatina, que apresentou um valor de IC₅₀ de 26,4 µM. Como esperado, o ligante livre não apresentou atividade citotóxica. A análise comparativa mostrou que hmxrato exibe um alto potencial citotóxico quando comparado à cisplatina (valor de IC₅₀ 23 vezes menor) ou seu precursor (valor de IC₅₀ 5 vezes menor). Adicionalmente, a citotoxicidade dos compostos foi também testada em células normal de pulmão (BEAS-2B). Os resultados mostraram que o hmxrato, precursor

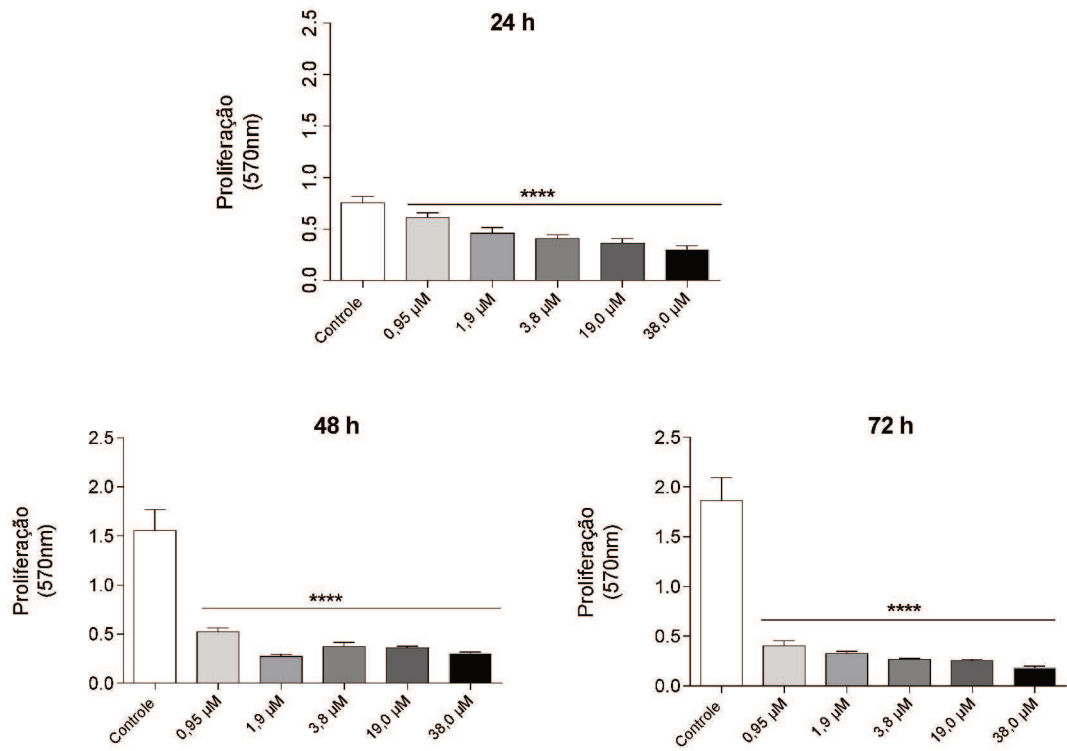
e cisplatina exibiram em células normais, valores de IC₅₀ de 40,3 µM, 29,2 µM e 13,38 µM, respectivamente. Os índices de citotoxicidade seletividade (ICS), calculado através da razão entre os valores de IC₅₀ para célula normal e IC₅₀ para célula tumoral, mostram valores de 0,5 para cisplatina, 1,4 para o precursor e 10,6 para o hmxrato. Em conjunto, os resultados mostram que a associação metal-ligante resultou em um complexo efetivo contra célula tumoral de pulmão (A549).

4.2.2. Hmxrato interfere com a proliferação e recuperação de células A549

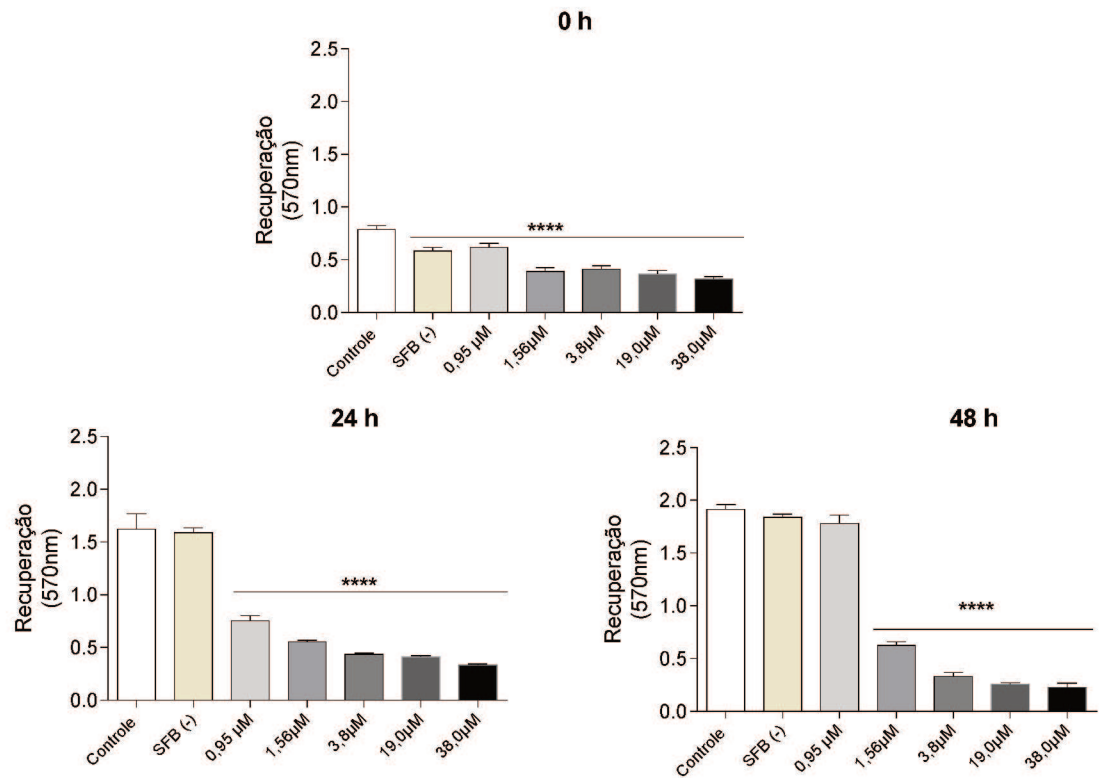
Após a determinação do valor de IC₅₀ de hmxrato para célula tumoral A549, cinco diferentes concentrações correspondentes aos valores de ¼ IC₅₀ (0,95 µM), ½ IC₅₀ (1,9 µM), IC₅₀ (3,8 µM), 5 x IC₅₀ (19 µM) e 10 x IC₅₀ (38 µM) foram utilizadas para avaliar o efeito do complexo na proliferação e recuperação de células tumoral e normal de pulmão. Hmxrato inibiu significativamente a proliferação de células A549 em todas as concentrações e tempos testados (Figura 19 A).

A remoção de hmxrato após tratamento de 24h e adição do meio de cultura completo não foi capaz de recuperar a proliferação de células A549 nos tempos testados, com exceção da concentração de 0,95 µM, após 48h de recuperação (Figura 19 B). O ensaio de proliferação para célula BEAS-2B mostrou que as concentrações de 0,95 µM, 1,9 µM e 3,8 µM de hmxrato não promoveram efeito antiproliferativo com o tratamento de 24h (Figura 19 C). Contudo, as concentrações de 19 µM e 38 µM causaram inibições estatisticamente significativas na proliferação da célula normal em todos os tempos testados (24, 48 e 72h). O ensaio de recuperação da proliferação celular em BEAS-2B (Figura 19 D) mostrou que, assim como os resultados observados para célula tumoral, a remoção do tratamento e incubação das células com o meio de cultura completo por 24 h e 48h não foi capaz de recuperar a proliferação das células BEAS-2B, com exceção do hmxrato na menor concentração (0,95 µM) após 48h de incubação da célula apenas com o meio de cultura.

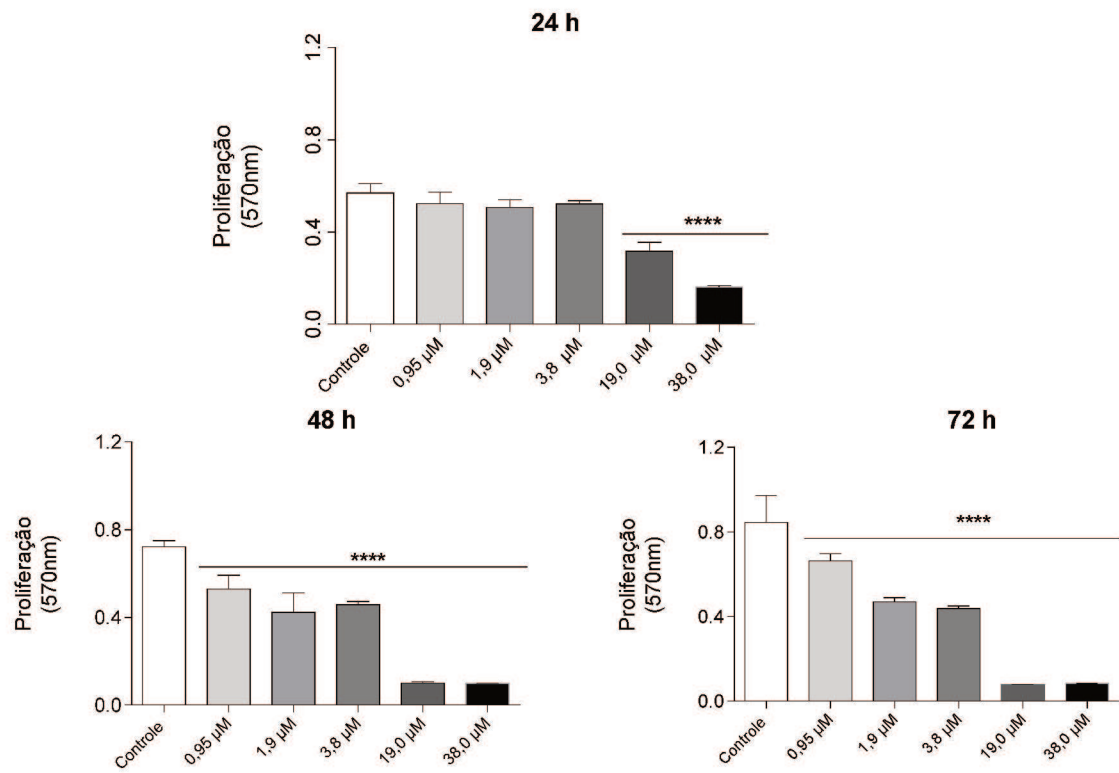
A



B



C



D

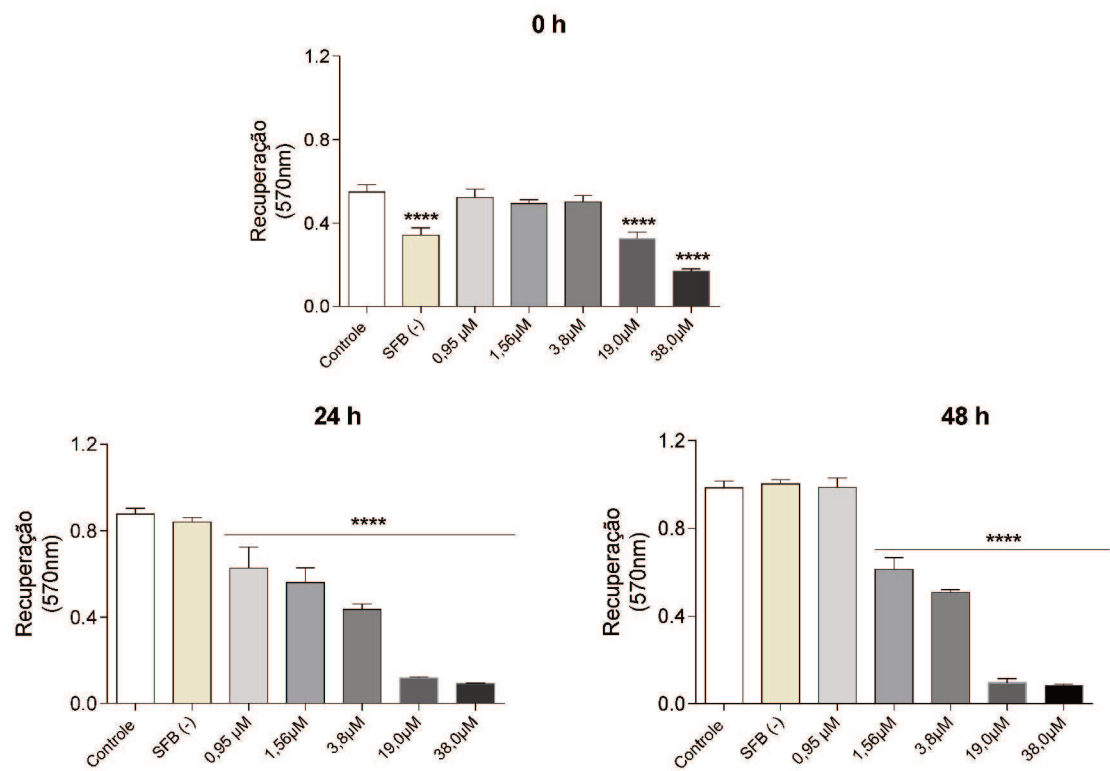


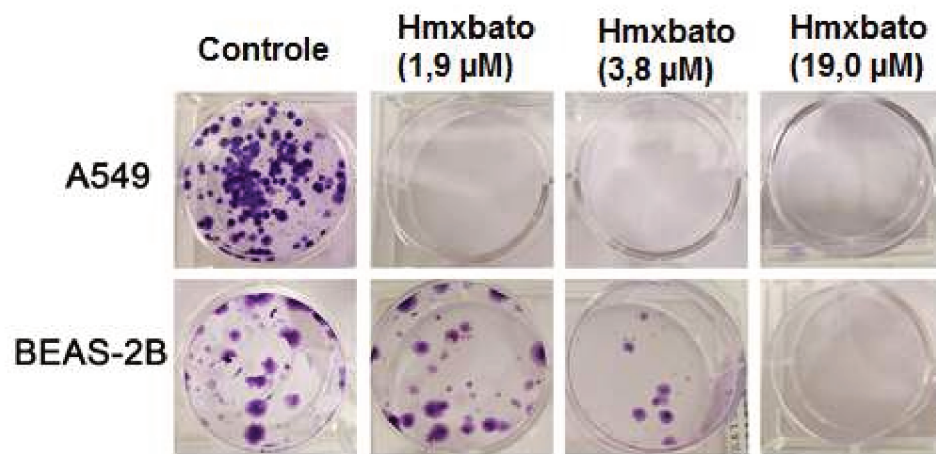
Figura 19: Efeito do hmxrato na proliferação e recuperação de células tumoral e normal de pulmão. Células tumoral (A549) e normal (BEAS-2B) de pulmão foram incubadas por 24h na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações de hmxrato (0,95 μ M, 1,9 μ M, 3,8 μ M, 19 μ M e 38 μ M). **(A)** A proliferação de A549 e **(C)** de BEAS foi avaliada após 24, 48 e 72h de tratamento. Alternativamente, a recuperação da proliferação celular frente ao tratamento com hmxrato foi realizada. Para tal, células A549 e BEAS-2B tratadas com meio completo (controle), meio na ausência de SFB (*FBS free*) e diferentes concentrações do hmxrato (0,95 μ M, 1,9 μ M, 3,8 μ M, 19 μ M e 38 μ M) por 24 h foram lavadas com PBS e incubadas com meio completo. A recuperação de A549 **(B)** e BEAS-2B **(D)** foi avaliada nos tempos 0, 24 e 48h. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Três experimentos independentes foram realizados. Diferenças significativas com relação ao controle foram determinadas utilizando o teste *one-way ANOVA*, *Turkey's* múltiplas comparações. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,1$ (*), $p < 0,01$ (**) e mais significativas quando $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Portanto, os resultados mostram que o hmxrato foi capaz de interferir significativamente tanto na proliferação quanto na recuperação da proliferação de células tumoral de pulmão. Entretanto, não foi observada interferência na proliferação da célula normal de pulmão nas concentrações de 0,95 μ M, 1,9 μ M e 3,8 μ M (valor de IC_{50} para célula tumoral A549) após 24h de tratamento.

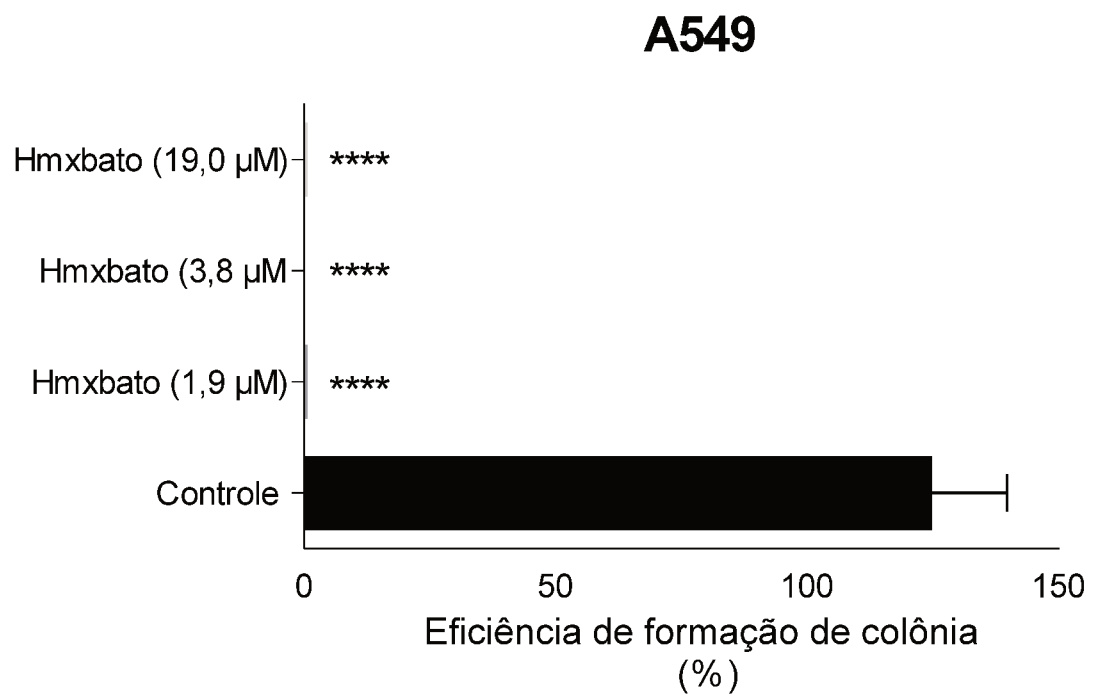
4.2.3. Hmxrato impede a capacidade clonogênica de células A549

Tendo em vista o efeito de hmxrato no ensaio de recuperação da proliferação celular e objetivando analisar o efeito do complexo na capacidade formadora de colônia das células foi realizado o ensaio clonogênico. Assim, células A549 e BEAS-2B incubadas na ausência (controle) e presença de hmxrato nas concentrações de metade do IC_{50} (1,9 μ M), IC_{50} (3,8 μ M) e 5 x IC_{50} (19 μ M) por 24h foram lavadas, incubadas com meio de cultura completo e analisadas quanto a capacidade formadora de colônias após 14 dias (Figura 20).

A



B



BEAS-2B

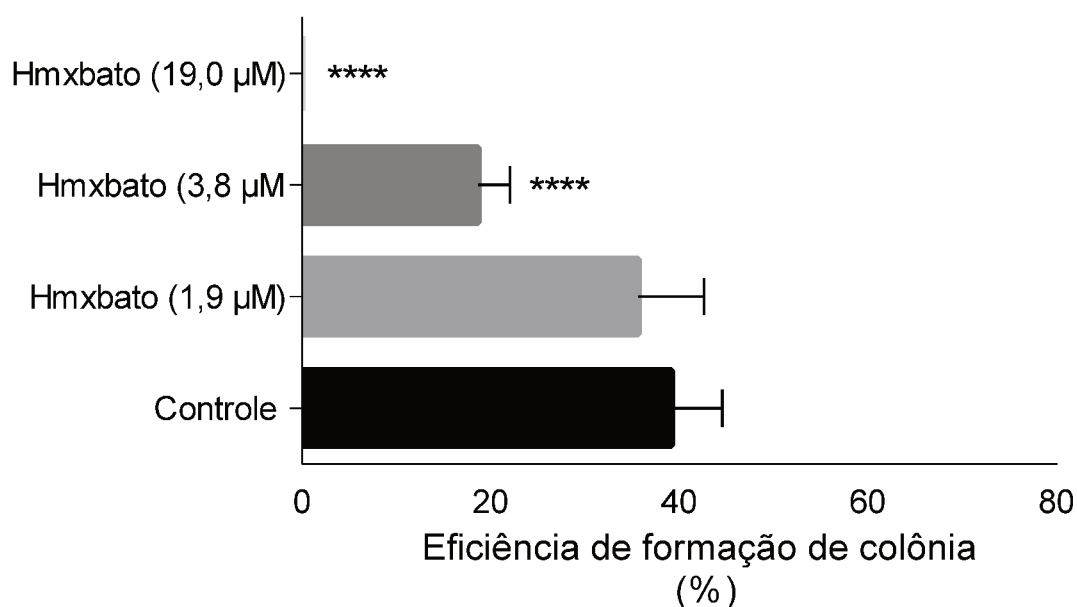


Figura 20: Hmxbato impede o crescimento clonogênico de células tumoral de pulmão. Células tumoral (A549) e normal (BEAS-2B) de pulmão foram tratadas ou não (controle) com hmxato em diferentes concentrações (1,9 μM, 3,8 μM e 19 μM) por 24 h. **(B)** Os gráficos de barra apresentam a eficiência de formação de colônias (%), calculada da razão entre o número de colônias formadas e o número de células semeadas, multiplicado por 100. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Três experimentos independentes foram realizados. Diferenças significativas com relação ao grupo controle foram determinadas utilizando o teste *one-way ANOVA*, *Turkey's* múltiplas comparações. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,1$ (*), $p < 0,01$ (**) e mais significativas quando $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

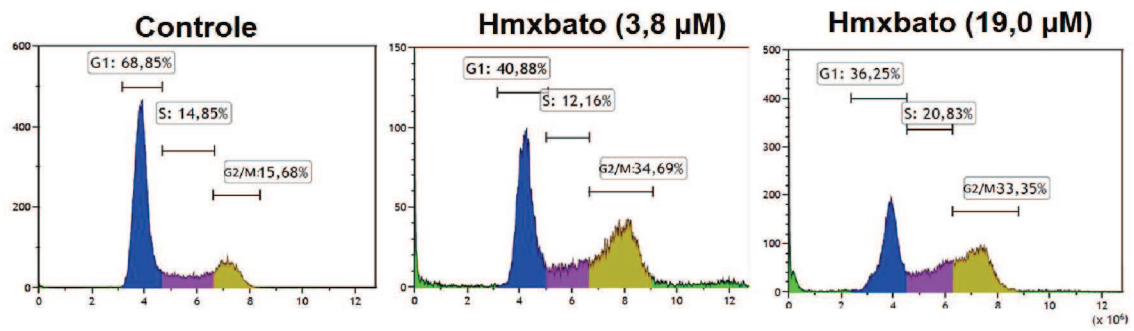
Células A549 não foram capazes de formar colônias em nenhuma das concentrações do complexo. Por outro lado, células BEAS-2B apresentaram formação de colônias mesmo após o tratamento com o complexo nas concentrações de 1,9 μM e 3,8 μM (Figura 20 A). Além disso, para a célula BEAS-2B não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a menor concentração de hmxato (1,9 μM) e a célula controle (Figura 20 B). Estes resultados mostram que o complexo, mesmo em baixas concentrações foi capaz de impedir a capacidade clonogênica da célula tumoral (A549), enquanto que para a célula BEAS-2B a capacidade formadora de colônias sofreu discreto efeito.

4.2.4. Hmxbato induz um arraste de células tumoral para a fase G2/M

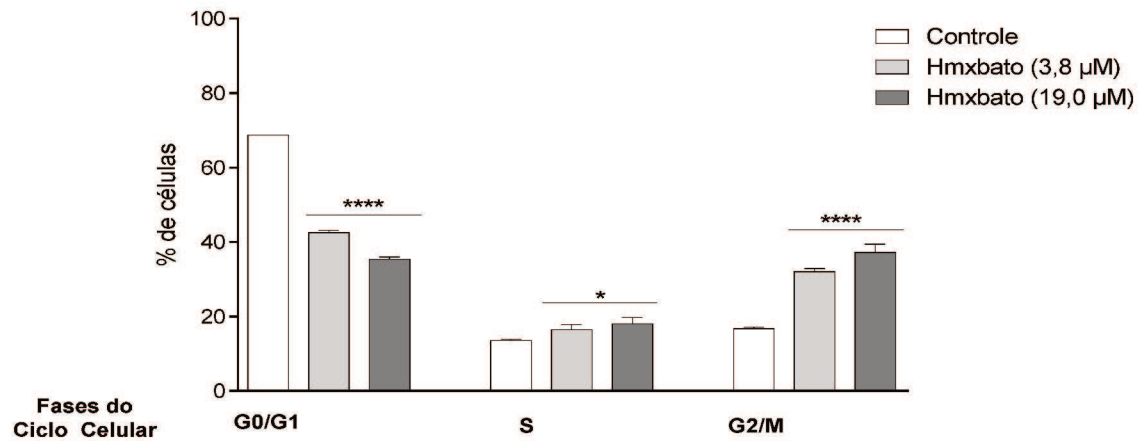
As células tumorais A549 após exposição ao hmxbato, em diferentes concentrações, apresentaram uma distribuição irregular nas diferentes fases do ciclo celular quando comparadas com a distribuição de células tumorais não tratadas (controle) (Figura 21 A). Foi observada uma redução de células na fase G1 de 68,85% (células controle) para 40,88% e 36,25% após tratamento com o complexo nas concentrações de 3,8 μM e 19 μM , respectivamente (Figura 21 B). A análise quantitativa, baseada em três experimentos independentes, mostrou que o tratamento com hmxbato, em ambas as concentrações, promoveu aumento da porcentagem de células A549 na fase G2/M, sendo observados 16,75% de células controle nesta fase, 32,00% e 37,24% de células tratadas com 3,8 μM e 19 μM de complexo, respectivamente. Ainda, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de hmxbato utilizadas.

Em célula normal BEAS-2B hmxbato promoveu somente uma discreta alteração na distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular (Figura 21 C). Neste caso, a análise quantitativa de três experimentos independentes (Figura 21 D) mostrou apenas uma discreta diminuição na porcentagem de células na fase G2/M em relação ao controle, passando de 31% (controle) para 29,4% (3,8 μM) e 23,9% (19,0 μM). Assim, os resultados revelam que o hmxbato é capaz de induzir uma expressiva “parada” de células A549 para a fase G2/M do ciclo celular.

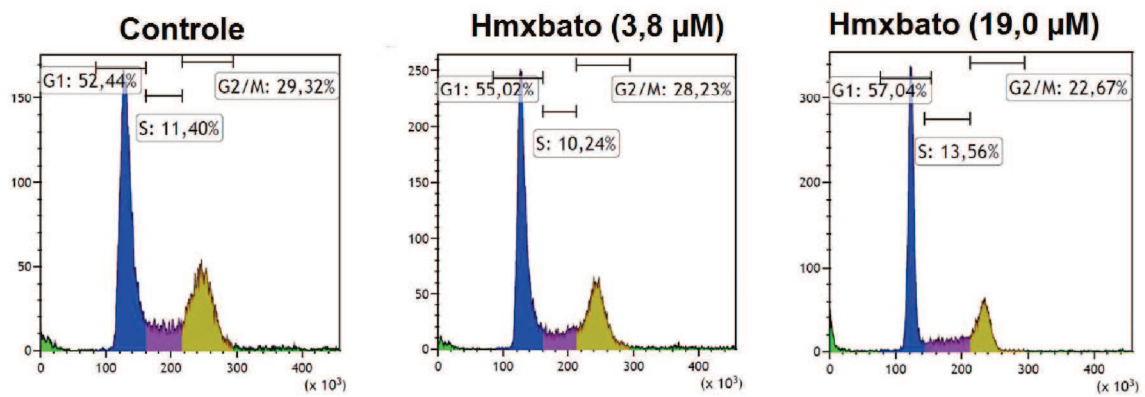
A



B



C



D

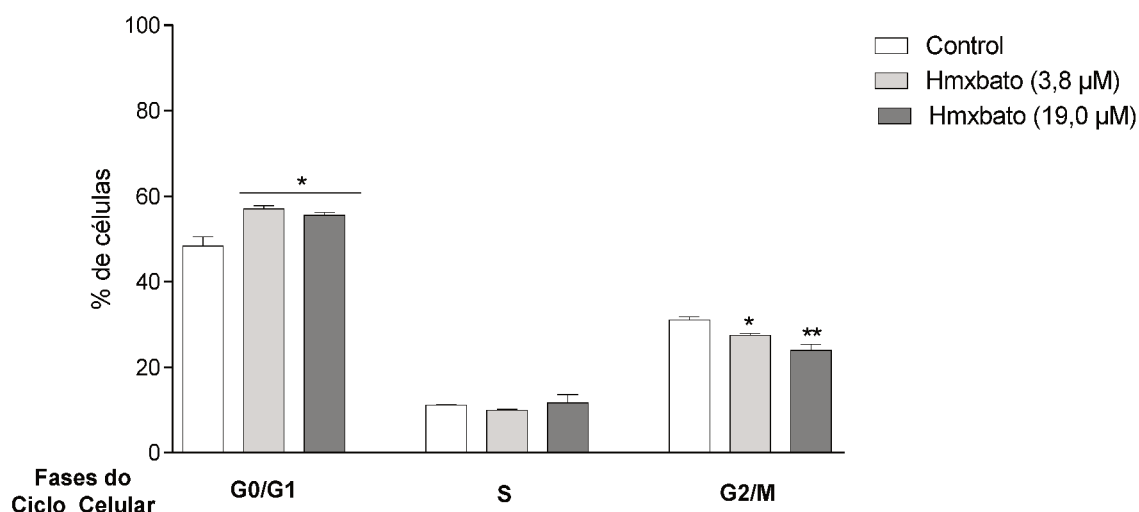


Figura 21: Hmxbato causou um arraste na fase G2/M do ciclo celular. Células tumoral (A549) e normal (BEAS-2B) de pulmão foram incubadas por 24 h na ausência (controle) ou presença do hmxbato (3,8 µM e 19 µM) e submetidas à análise do ciclo celular. **(A e C)** Histogramas representativos de um dos experimentos independentes realizado apresentando a distribuição de células nas fases do ciclo celular. Distribuição de células **(A)** A549 e **(C)** BEAS-2B, de acordo com o conteúdo de DNA após marcação com PI. A fluorescência foi mensurada em citômetro de fluxo. **(B e D)** Gráficos de barra representam as porcentagens de células **(B)** A549 e **(D)** BEAS-2B em cada subpopulação das fases do ciclo celular: G0/G1, S, G2/M. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Três experimentos independentes foram realizados e mais de 10.000 células foram analisadas em cada replicata. Diferenças significativas com relação ao grupo controle foram determinadas usando ANOVA unidirecional, teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,1$ (*), $p < 0,01$ (**) e mais significativas quando $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

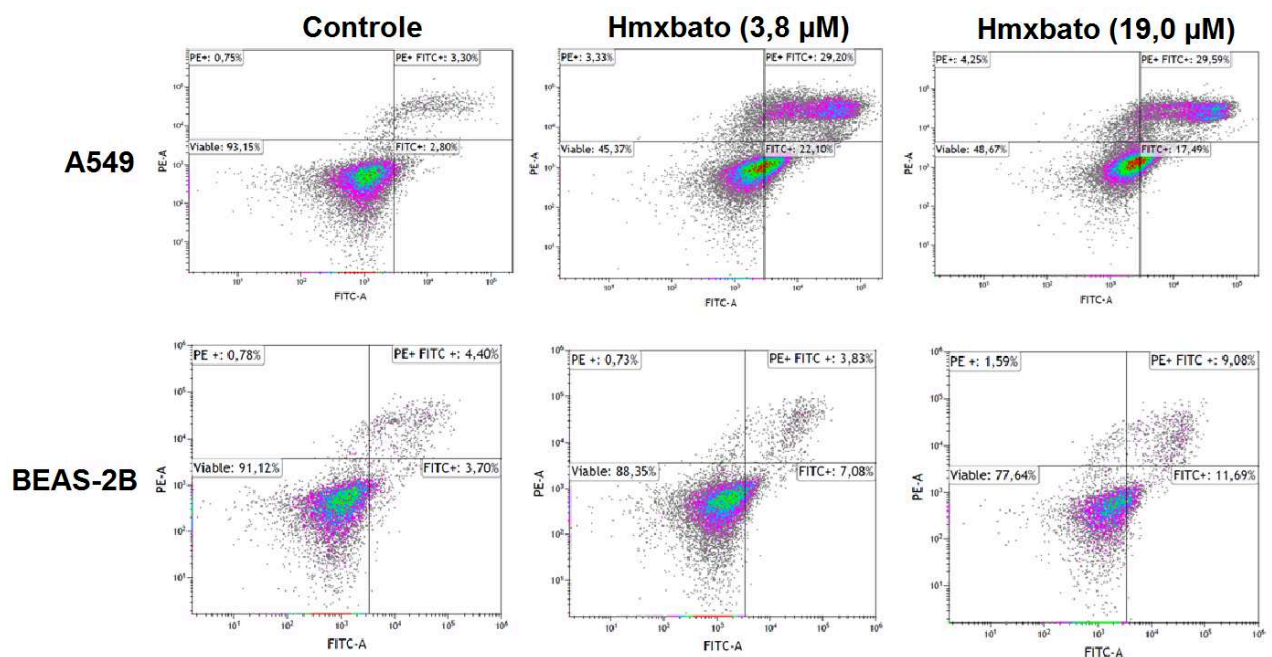
4.2.5. Hmxbato induz a apoptose em célula tumoral A549

Uma grande variedade de complexos de rutênio tem induzido a morte de diferentes linhagens tumorais por ativação de apoptose, após interação com a molécula de DNA, considerado muitas vezes seu alvo farmacológico (CHEN et al., 2019; DENG et al., 2017; DIAS et al., 2018; TANG et al., 2019). Neste sentido, para examinar se o hmxbato é capaz de induzir a apoptose de células tumoral A549 e normal BEAS-2B foi realizada a análise da externalização da fosfatidilserina, por meio da marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (PI). A análise dos *dot plots* (Figura 22 A) mostrou uma evidente alteração no perfil de distribuição de células A549 tratadas com ambas as concentrações de hmxbato, sendo observado um deslocamento de células para os quadrantes positivos referentes às células em apoptose (inicial e tardia). Diferentemente, as células BEAS-2B tratadas com

hmxrato não exibiram grandes mudanças no seu perfil de distribuição de células, permanecendo a maior parte no quadrante referente às células viáveis. Os valores mostrados nos *dot plots* obtidos em experimentos independentes foram analisados e utilizados para a quantificação de células em apoptose/necrose e estão mostrados na figura 22 B.

O tratamento de células A549 com hmxrato nas concentrações de 3,8 μ M e 19 μ M induziu a apoptose em 51,46% e 42,78% das células, respectivamente. Por outro lado, em células BEAS-2B o hmxrato induziu a apoptose em apenas 12,3 % e 23,6 % das células após tratamento com 3,8 μ M e 19 μ M, respectivamente. Estes resultados indicam que o hmxrato, na concentração de 3,8 μ M, induziu apoptose em uma significativa porcentagem de células tumorais de pulmão. Em contrapartida, esta mesma concentração de hmxrato induziu a apoptose em apenas uma reduzida porcentagem de células normais (BEAS-2B).

A



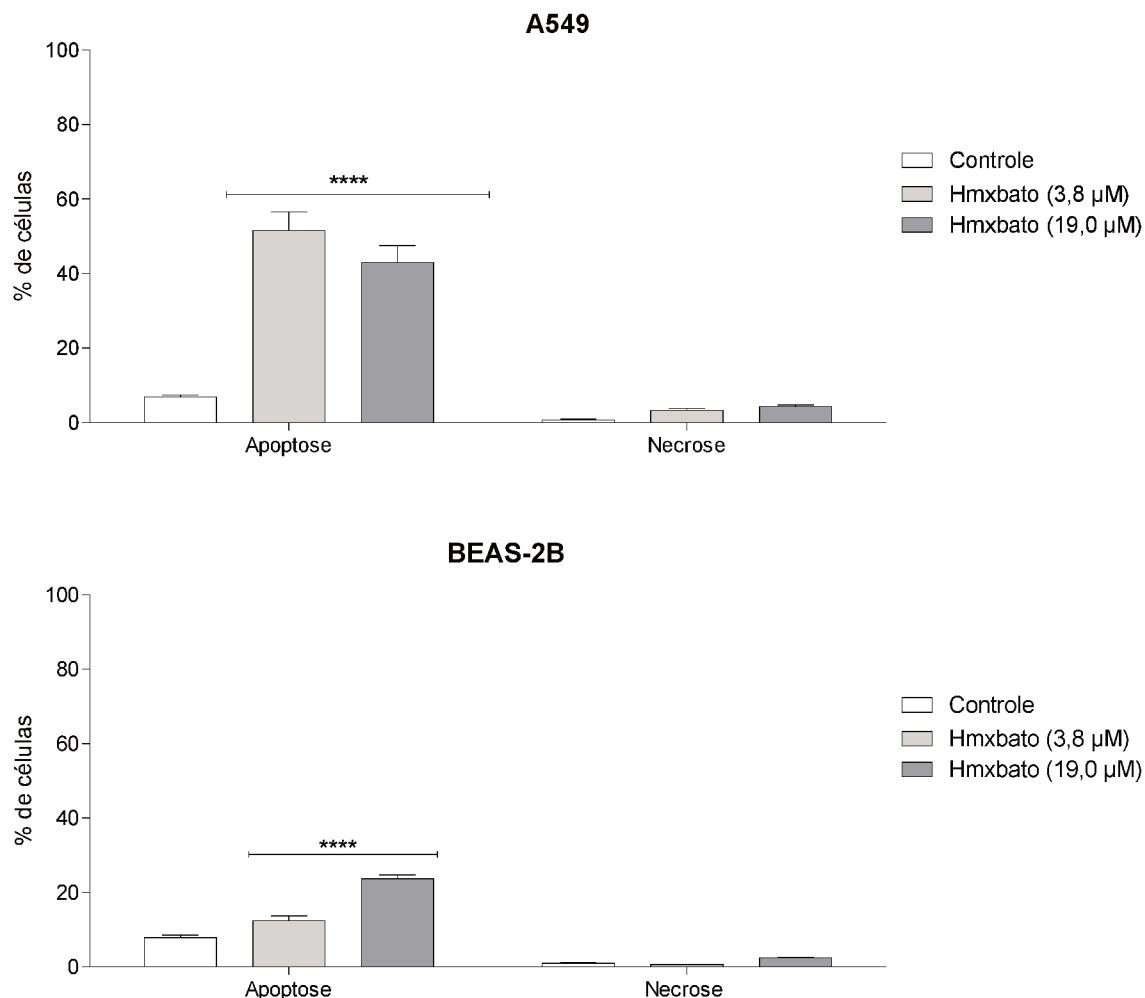
B

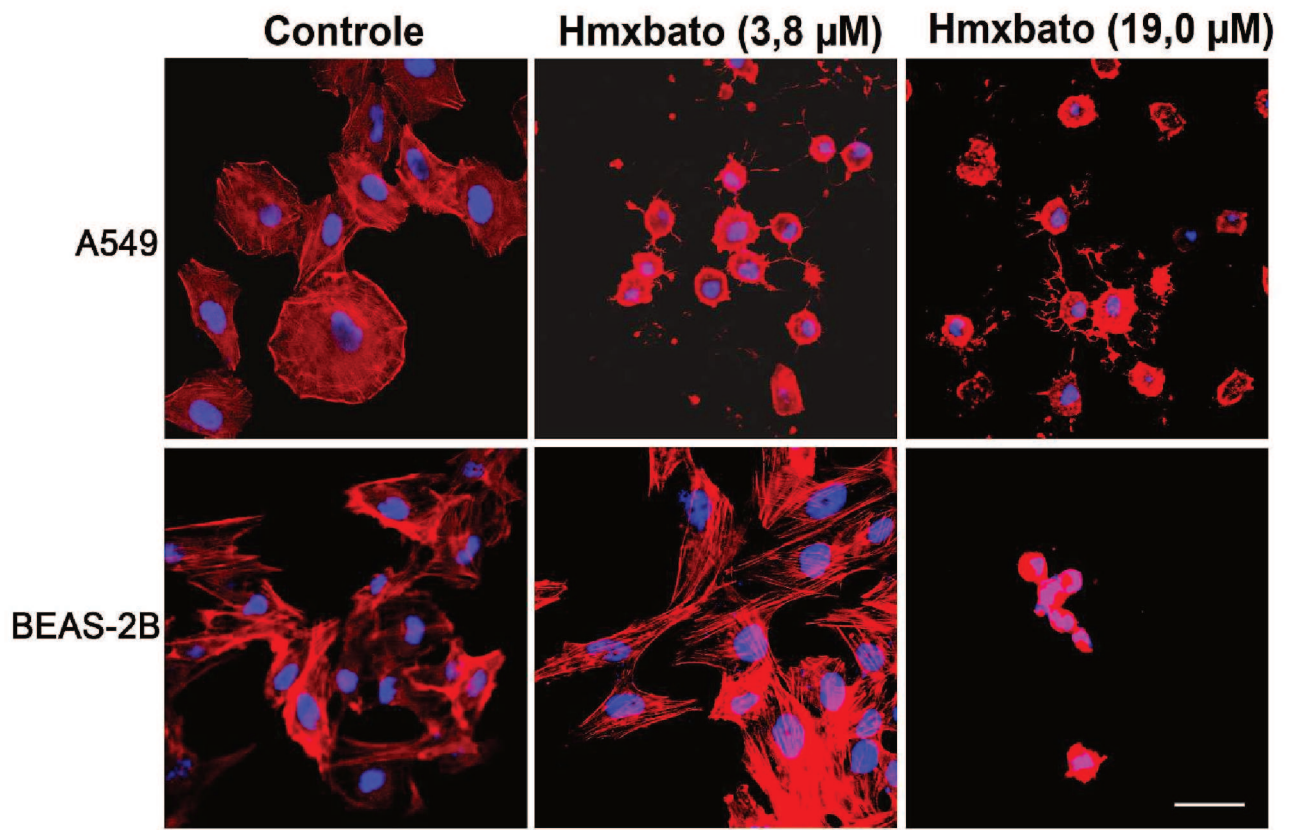
Figura 22: Hmxbato induz a apoptose em célula tumoral de pulmão. Células tumoral (A549) e normal (BEAS-2B) de pulmão foram incubadas por 24h na ausência (controle) ou presença do hmxrato (3,8 μM e 19 μM) e submetidas à marcação com anexina V-FITC e iodeto de propídeo. **(A)** Gráficos em *dot plot* apresentam a distribuição de células A549 e BEAS-2B, representativa de um dos experimentos independentes realizados, em diferentes quadrantes, de acordo com a incorporação ou não da anexina V-FITC / iodeto de propídeo (IP). Quadrante inferior esquerdo, células viáveis; quadrante inferior direito [AV (+)], apoptose inicial; quadrante superior direito [AV/PI (+)], apoptose tardia; quadrante superior esquerdo [PI (+)], necrose. **(B)** Gráficos de barra apresentam a quantificação de células A549 e BEAS-2B em apoptose (inicial + tardia) e necrose. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Três experimentos independentes foram realizados e mais de 10.000 células foram analisadas em cada triplicata. Diferenças significativas com relação ao grupo controle foram determinadas usando ANOVA unidirecional, teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,1$ (*), $p < 0,01$ (**) e mais significativas quando $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

4.2.6. Hmxbato promove mudanças na morfologia celular associada a alterações no citoesqueleto de células tumoral A549

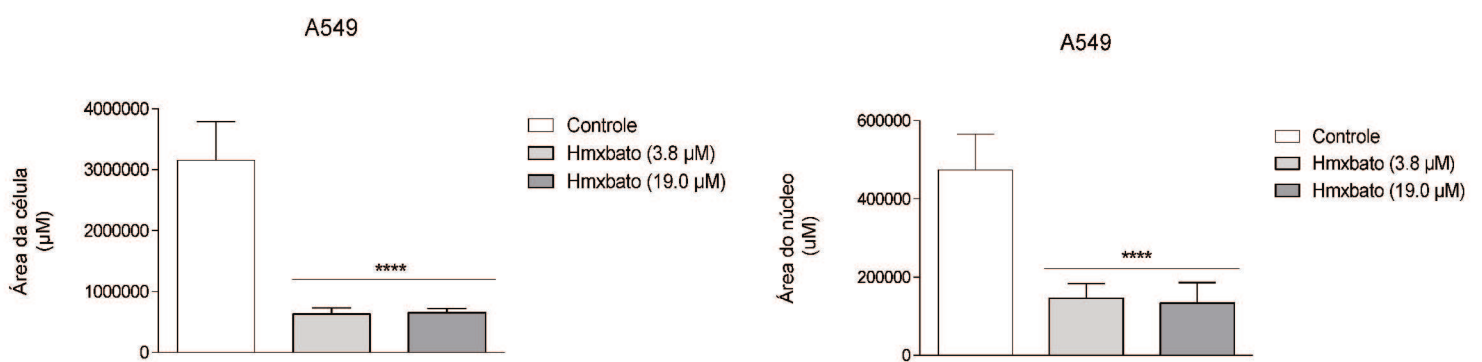
Para avaliar se hmxbato promove alterações na morfologia e no citoesqueleto, células A549 e BEAS-2B foram coradas com faloidina após o tratamento com o complexo em diferentes concentrações (Figura 23).

As imagens mostram que o hmxbato promoveu significativas alterações na morfologia, bem como no citoesqueleto de células A549 (Figura 23 A). As alterações mais evidentes na célula tumoral foram: (1) redução da densidade celular; (2) aumento na condensação de filamentos de actina e (3) arredondamento das células. Adicionalmente foi verificada uma redução estatisticamente significativa (Figura 23 B) no tamanho da célula (representado pela área celular) e no tamanho do núcleo para ambas as concentrações testadas. Em contrapartida, o tratamento de células BEAS-2B com o complexo na concentração de 3,8 μM parece não resultar em grandes alterações no citoesqueleto e na morfologia da célula. Apesar do complexo nesta concentração não interferir de forma estatisticamente significativa no tamanho da célula BEAS-2B é possível verificar um aumento na área nuclear, conforme representado na Figura 24C. O tratamento com hmxbato na maior concentração (19 μM) promoveu expressivas mudanças na morfologia e no padrão de polimerização da actina das células BEAS-2B, diminuindo de forma estatisticamente significativa o tamanho da célula e do núcleo desta linhagem celular.

A



B



C

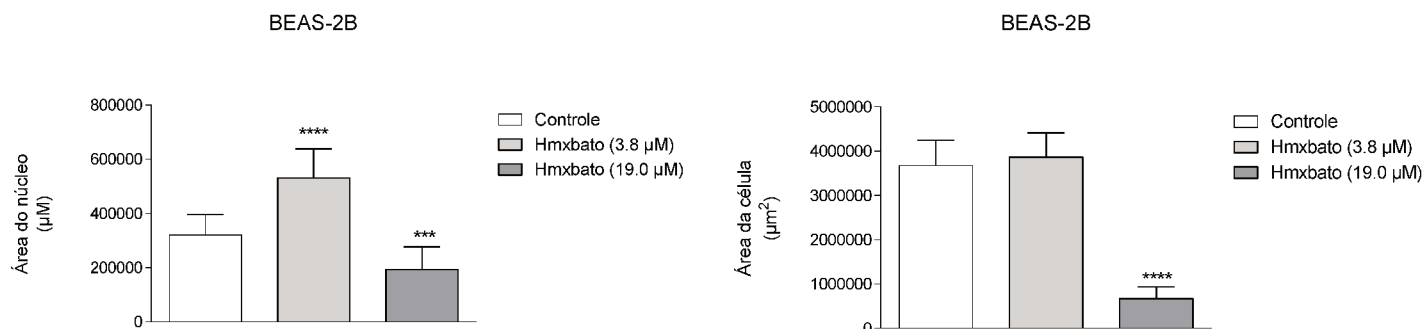


Figura 23: Hmxbato induziu alterações na morfologia e no citoesqueleto de células tumorais de pulmão. (A) Células tumoral (A549) e normal (BEAS-2B) de pulmão foram cultivadas por 24 h na ausência (controle) ou presença de hmxato (3,8 µM e 19 µM) e submetidas à análise por microscopia confocal. Os painéis mostram as células marcadas por faloidina-Atto 565 (vermelho) e To-Pro (azul). As imagens são representativas de três experimentos independentes. Barra: 20 µM. Adicionalmente, a área (tamanho) e o núcleo das células. (B) A549 e (C) BEAS-2B foram manualmente mensuradas através do *software ImageJ* (National Institutes of Health, USA). Os resultados foram transferidos para o *software GraphPad Prism Software version 6.01*, onde foram construídos os gráficos e realizadas as análises estatísticas. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Três experimentos independentes foram realizados em cada triplicata. Diferenças significativas com relação ao grupo controle foram determinadas usando ANOVA unidirecional, teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,1$ (*), $p < 0,01$ (**) e mais significativas quando $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Nossos resultados mostram que hmxato na concentração de 3,8 µM promove alterações significativas na morfologia das células tumorais de pulmão e danos ao citoesqueleto, enquanto que a mesma concentração do complexo não foi capaz de causar grandes alterações na morfologia ou no citoesqueleto de célula normal de pulmão.

4.2.7. Hmxbato causa aumento significativo na geração de ROS em células tumoral de pulmão

Em concentrações moderadas, o ROS apresenta importante papel na regulação de funções fisiológicas normais das células. Entretanto, em elevadas concentrações pode causar efeitos deletérios, tal como, a morte celular (COVARRUBIAS et al., 2008; HALLIWELL, 2011). A fim de verificar se a morte celular por apoptose induzida pelo complexo hmxato está relacionada com o aumento da geração de ROS, células tumoral e normal de pulmão foram incubadas

com a sonda fluorescente CM-H₂DCFDA e processadas no citômetro de fluxo. O complexo, em ambas as concentrações, foi capaz de aumentar fortemente a produção de ROS em células A549. Conforme ilustra a figura 24, quando comparados ao controle, o tratamento da célula tumoral com 3,8 µM do complexo foi capaz de aumentar 25 vezes a intensidade de fluorescência e o tratamento com de 19 µM aumentou 33 vezes a intensidade de fluorescência.

Por outro lado, o tratamento de células BEAS-2B com o complexo, em ambas as concentrações, produziu efeitos bem menos significativos na geração de ROS. Comparados ao controle, os tratamentos com 3,8 µM e 19 µM do hmxrato induziram aumentos na intensidade de fluorescência iguais a 1,3 vezes e 1,8 vezes, respectivamente.

A fim de confirmarmos a capacidade do hmxrato em induzir a célula tumoral a uma superprodução de ERO's, as células A549 foram incubadas com 3,8 µM do complexo em presença do NAC, uma molécula antioxidante capaz de induzir a síntese de glutathione, diminuindo assim a produção de ERO's. Conforme ilustra a figura 24 C, as células tratadas sem o NAC foram capazes de aumentar em 100% a concentração de ERO's enquanto que as células tratadas em presença de NAC aumentaram somente 16,5%. Estes dados mostram que o NAC foi capaz de reduzir a produção de ERO's induzida pelo complexo hmxrato em 83,5%. Esse dado confirma a ação oxidante que este complexo apresenta sob as células tumorais de pulmão e seu importante papel na produção do estresse celular.

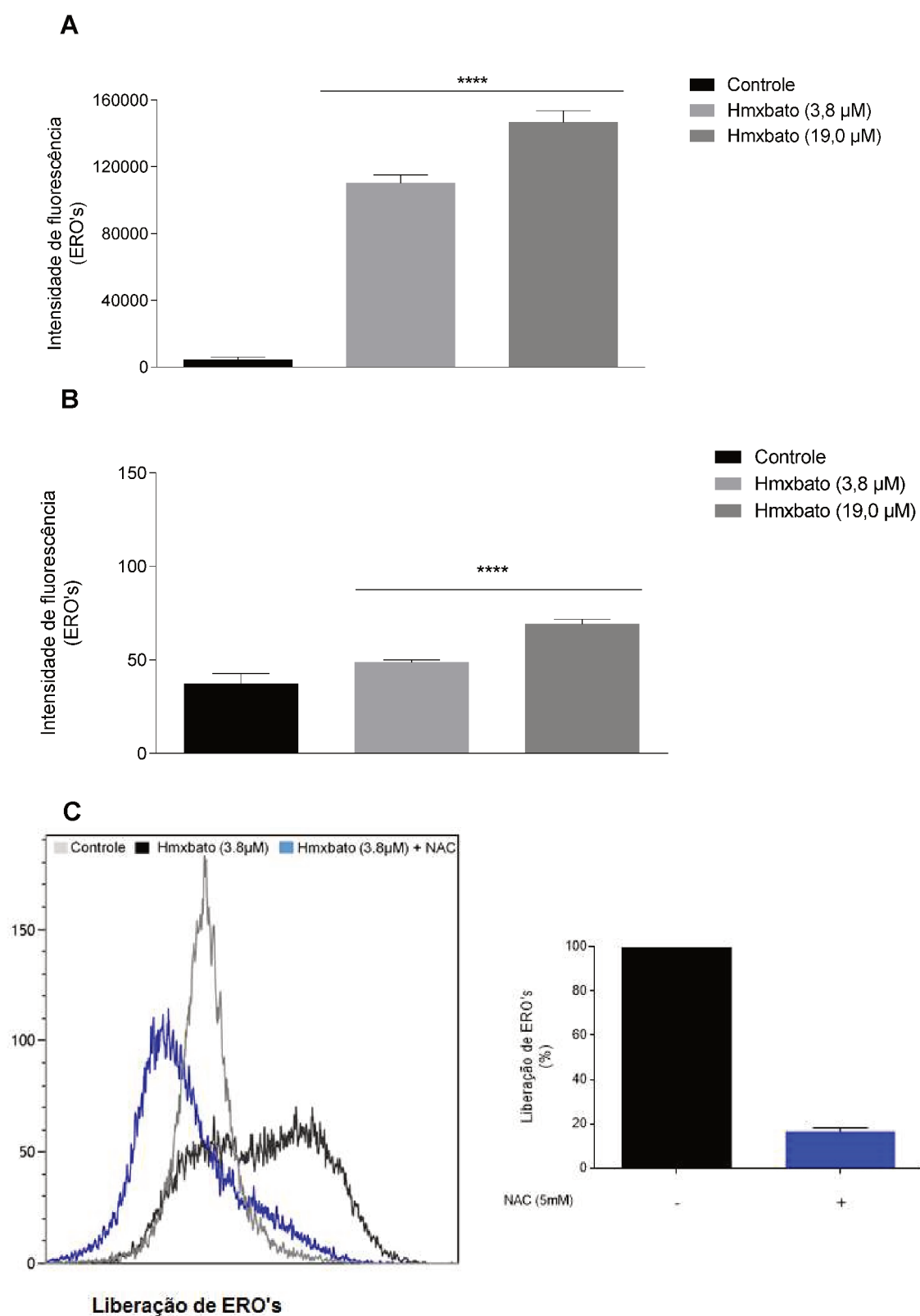


Figura 24: Hmxbato promove aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células tumorais de pulmão. Células tumoral (A549) e normal (BEAS-2B) de pulmão foram cultivadas por 4 h na ausência (controle) ou presença de hmxato (3,8 µM e 19 µM) e submetidas ao ensaio de incorporação de CM-H₂DCFDA. Os gráficos de barra apresentam a quantificação da

intensidade de fluorescência (células positivas para ROS) de células **(A)** A549 e **(B)** BEAS-2B nas diferentes concentrações testadas. Alternativamente, as células foram incubadas com o hmxrato na presença do NAC e foram avaliadas em citômetro de fluxo. **(C)** O histograma mostra a liberação de ERO's em células controle (linha cinza), células tratadas somente com 3,8 μ M de hmxrato (linha preta) e células tratadas com 3,8 μ M de hmxrato em presença de NAC (linha azul). As mediadas obtidas por citometria de fluxo foram utilizadas para quantificação dos dados mostrados no gráfico. O gráfico apresenta a porcentagem de liberação de ERO's que foram calculadas considerando o tratamento com hmxrato na ausência de NAC como 100% de liberação de ERO's. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Três experimentos independentes foram realizados e mais de 10.000 células foram analisadas em cada replicata. Diferenças significativas com relação ao grupo controle foram determinadas usando ANOVA unidirecional, teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,1$ (*), $p < 0,01$ (**) e mais significativas quando $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

4.2.8. Hmxrato causa uma acentuada alteração no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células A549

A mitocôndria apresenta um papel essencial no *triggering* e na regulação da apoptose (ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2015). Neste sentido, para verificar se hmxrato promove alterações no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), células A549 e BEAS-2B tratadas com diferentes concentrações do complexo foram coradas com rodamina 123, uma sonda fluorescente que se acumula no interior de mitocôndrias com membrana polarizada. O tratamento com o complexo, em ambas as concentrações, foi capaz de inibir significativamente a intensidade de fluorescência das células A549, demonstrando sua habilidade em induzir a despolarização no $\Delta\Psi_m$. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações testadas (3,8 μ M e 19 μ M) (Figura 25).

Interessantemente, as células BEAS-2B tratadas com 3,8 μ M de complexo exibiram aumento na intensidade de fluorescência, ou seja, apresentaram hiperpolarização no $\Delta\Psi_m$ em relação às células controle. Por outro lado, células BEAS-2B tratadas com 19 μ M mostraram redução na intensidade de fluorescência, apresentando, portanto, despolarização no $\Delta\Psi_m$.

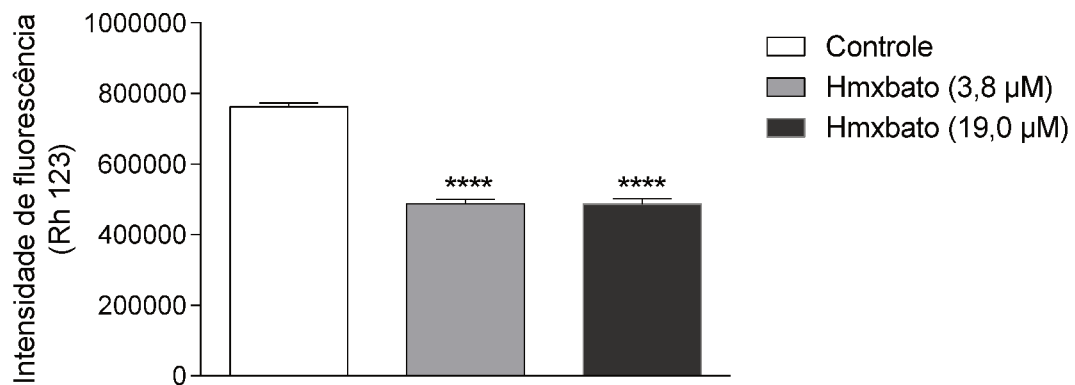
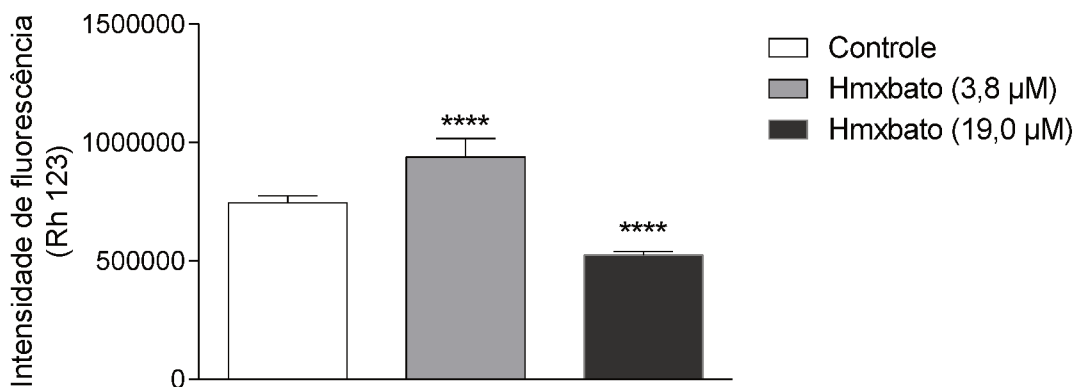
A**B**

Figura 25: Dano mitocondrial induzido pelo hmxato em células tumorais de pulmão. Células tumoral (A549) e normal (BEAS-2B) de pulmão foram incubadas por 24h na ausência (controle) ou presença do hmxato (3,8 µM e 19 µM) e coradas com rodamina 123 para detecção de alterações no potencial mitocondrial de membrana ($\Delta\Psi_m$). A intensidade de fluorescência em células **(A)** A549 e **(B)** BEAS-2B foram quantificadas por citometria de fluxo e apresentadas por meio de gráfico de barra. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Três experimentos independentes foram realizados e mais de 10.000 células foram analisadas em cada triplicata. Diferenças significativas com relação ao grupo controle foram determinadas usando ANOVA unidirecional, teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,1$ (*), $p < 0,01$ (**) e mais significativas quando $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Estes resultados mostram que o hmxato na concentração de 3,8 µM foi capaz de induzir uma despolarização no $\Delta\Psi_m$ de células tumorais e um efeito oposto no $\Delta\Psi_m$ de células não tumorais, quando expostas a concentração mais elevada de complexo.

4.2.9. Hmxbato induz genotoxicidade em células tumoral

Alguns estudos têm demonstrado que o aumento nos níveis de ROS podem causar danos ao DNA e produzir um efeito genotóxico sobre o mesmo (FAN et al., 2013; LEE et al., 2012). Para investigar se o hmxbato promove efeito genotóxico, o ensaio de cometa foi realizado em células A549 e BEAS-2B após tratamento com o complexo por 4h (Figura 26).

Foram utilizadas as seguintes concentrações: $\frac{1}{4} \times IC_{50}$ (0,95 μM), $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ (1,9 μM) e IC_{50} (3,8 μM). Metil-metanosulfonato (MMS - 200 μM) foi utilizado como controle positivo de dano genotóxico. Após 4 h de tratamento o hmxbato induziu aumento estatisticamente significativo de dano ao DNA de células A549 para todas as concentrações testadas. Em BEAS-2B, o hmxbato, em todos os tempos de tratamento e concentrações de complexo, não promoveu danos ao DNA das células. Como esperado, MMS promoveu efeito genotóxico no DNA, tanto de células A549 quanto de BEAS-2B. Esses resultados corroboram com os achados anteriores, os quais mostram que o hmxbato apresenta maior seletividade de ação em células tumorais do que em células normais de pulmão.

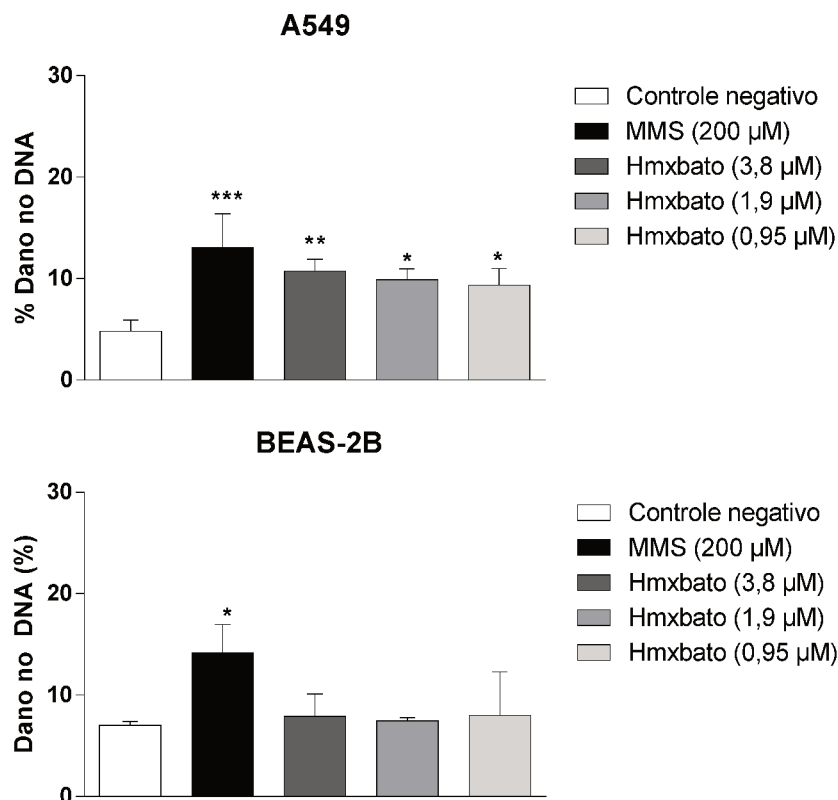


Figura 26: Efeito genotóxico de hmxrato em células tumoral e normal de pulmão. Células tumoral (A549) e normal (BEAS-2B) de pulmão foram incubadas por 4h com meio completo (controle negativo), presença de hmxrato (3,8 µM e 19 µM) ou MMS (controle positivo) e submetidas ao ensaio de cometa. Os gráficos de barra apresentam a quantificação da porcentagem de DNA na cauda em células (A) A549 e (B) BEAS-2B. A porcentagem de DNA na cauda foi usada como parâmetro para dano no DNA. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Três experimentos independentes foram realizados e no mínimo 100 nucleóides foram analisados por amostra em cada triplicata. Diferenças significativas com relação ao grupo controle foram determinadas usando ANOVA unidirecional, teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,1$ (*), $p < 0,01$ (**) e mais significativas quando $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

4.2.10. Hmxrato aumenta a atividade de caspase-9 em células tumorais de pulmão

Diante dos diferentes resultados relacionando o potencial antitumoral do complexo hmxrato com a indução da apoptose em células A549, bem como com alterações no potencial da membrana mitocondrial, resolvemos investigar a influência do complexo na via intrínseca da caspase. Para isto o Kit *Caspase-Glo*®

9 Assay (Promega) foi utilizado. Conforme mostra a Figura 27, o complexo hmxrato promoveu indução estatisticamente significativa na atividade da caspase-9 em células A549, sendo observado um aumento de 1,96 vezes na atividade desta caspase quando comparado ao controle. Este resultado corrobora com a hipótese do envolvimento do hmxrato na ativação da apoptose de células tumorais de pulmão por meio da via intrínseca.

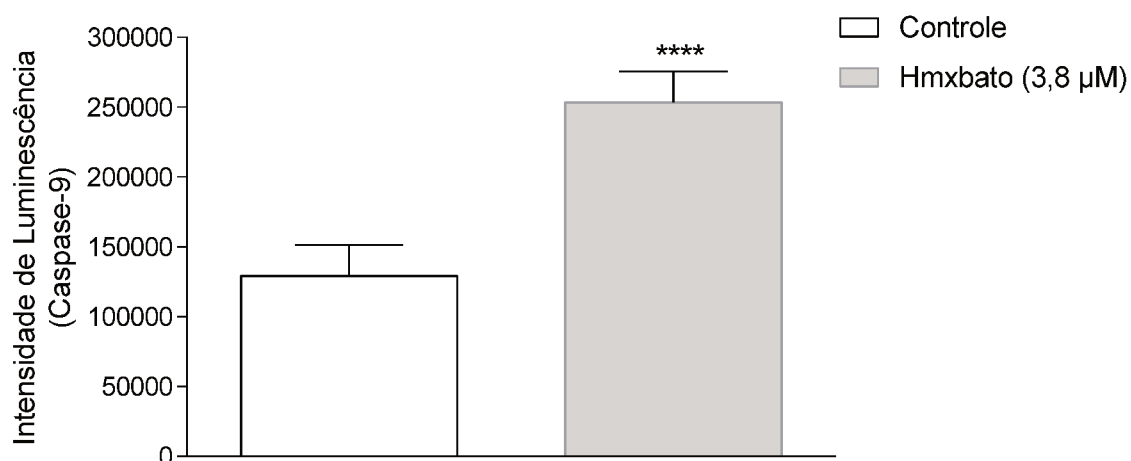


Figura 27: Efeito de hmxrato na atividade da caspase-9 em células tumorais de pulmão. Células A549 foram tratadas com 3,8 µM de hmxrato e submetidas ao ensaio para detecção da atividade da caspase-9 por meio do kit de *Caspase-Glo® 9 Assay* (Promega). O gráfico apresenta os valores das luminescências obtidas em leitor de microplacas, processadas e analisadas no software *GraphPad Prism Software version 6.01*. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão de experimentos realizados em quadruplicata. Dois experimentos independentes foram conduzidos. Diferenças significativas com relação ao grupo controle foram determinadas usando ANOVA unidirecional, teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,1$ (*), $p < 0,01$ (**) e mais significativas quando $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

4.2.11. Hmxrato aumenta a expressão da caspase 3 e PARP-1

Com o intuito de confirmar o envolvimento do complexo hmxrato na via das caspases e consequente ativação da apoptose, a expressão da caspase executora 3 foi avaliada por meio do *Kit Cyto Fix/Cyto Perm* (BD Pharmingen TM). Conforme ilustra a figura 28 A o complexo hmxrato foi capaz de aumentar de forma estatisticamente significativa a expressão da caspase-3, sendo observado um aumento de 1,92 vezes na expressão da caspase executora quando comparado ao grupo controle.

Ainda, vale ressaltar que a caspase-3 foi capaz de clivar e ativar PARP-1, uma enzima nuclear que desempenha um papel central no reparo de DNA. Na Figura 28 B é possível observar o aumento na expressão da enzima PARP-1 em células A549 tratadas com o complexo hmxrato. A quantificação mostrou que este aumento também foi estatisticamente significativo, sendo verificado um aumento na indução da expressão de PARP-1 de 1,59 vezes em relação ao controle (figura 28 B).

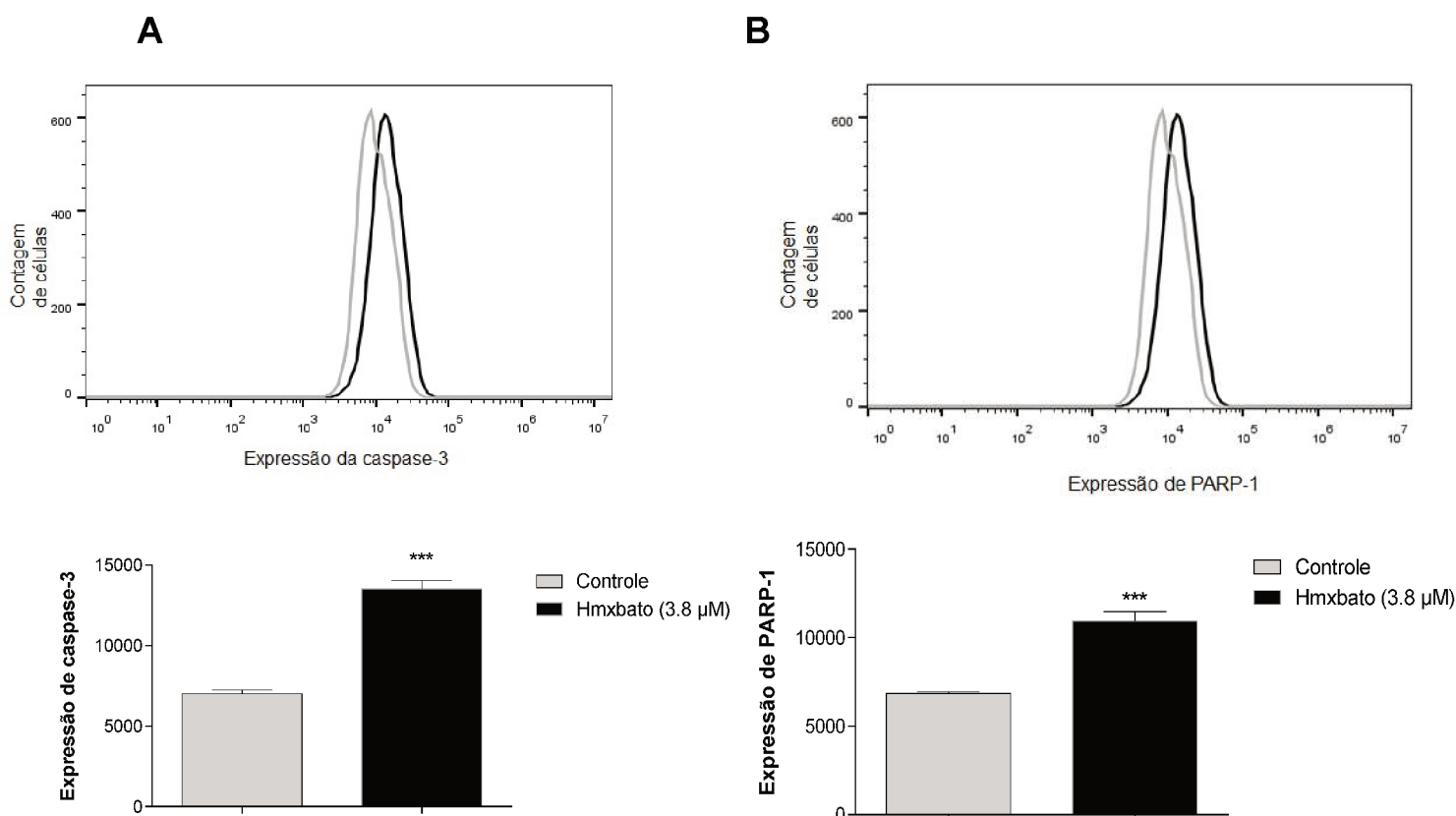


Figura 28: Efeito do hmxrato na expressão da caspase-3 e PARP-1 em células tumorais de pulmão. Células A549 foram tratadas com 3,8 µM de hmxrato e submetidas ao teste para detecção da expressão caspase-3 e PARP-1 por meio do kit *CytoFix/Cyto Perm* (BD Pharmingen TM). Os histogramas apresentam a expressão de (A) caspase-3 e (B) PARP-1 em células A549. Os gráficos de barra apresentam os valores das medianas referentes à expressão de (A) caspase-3 e (B) PARP-1 coletados e analisados por meio do software *GraphPad Prism Software version 6.01*. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de experimentos realizados em quadruplicata. Dois experimentos independentes foram conduzidos. Diferenças significativas com relação ao grupo controle foram determinadas usando ANOVA unidirecional, teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,1$ (*), $p < 0,01$ (**) e mais significativas quando $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Em conjunto, estes resultados reforçam ainda mais a hipótese de que o complexo hmxrato é capaz de promover a apoptose, por meio da ativação da via de caspases, sobretudo através da via intrínseca, sendo também capaz de induzir danos no DNA da célula por meio da ativação da enzima PARP-1.

4.2.10. Estudos do *Docking* de DNA do *Hmxrato*

A partir dos estudos teóricos de docking molecular realizado no programa AutoDock 4.0, para o DNA (PDB ID: 6G8S), as dez conformações que tiveram as melhores energias de ligação foram avaliadas para ambos complexos estudados. A conformação escolhida foi aquela que apresentou menor valor de RMSD (Root Mean Square Deviation), energia livre de ligação ($\Delta G_{binding}$), energia livre torsional ($\Delta G_{torsional}$) e constante de inibição (K_i) mais favoráveis (Tabela 4).

Tabela 4: Estimativas de energia livre de ligação, torsional e respectivas constantes de inibição para ambos complexos com DNA, código 6G8S.

Ligantes	DNA		
	$\Delta G_{de\ ligação}$	$\Delta G_{de\ torção}$	K_i
	(kcal mol ⁻¹)	(kcal mol ⁻¹)	(μ M)
[Ru(TAP) ₂ (11,12-CN ₂ -dppz)] ²⁺	-10,17	+0,55	0,035
Hmxrato	-6,96	+3,02	7,850

Cabe salientar que o primeiro sistema analisado foi utilizado no procedimento de re-docking, que consiste em validar se a metodologia docking utilizada é capaz de calcular a energia de ligação entre complexos de rutênio e o DNA. Considerando a Tabela 2, o ligante [Ru(TAP)₂(11,12-CN₂-dppz)]²⁺ mostrou uma energia de ligação de -10,17 kcal.mol⁻¹ e uma constante de inibição na ordem nanomolar, que são valores esperados para fármacos com elevada eficiência de interação com seu alvo (CARUSO et al., 2012; GOPALAKRISHNAN et al., 2017; GUPTA et al., 2013; KARAMI et al., 2018; K.S. et al., 2019). Dessa forma, considerando que o complexo ligante-DNA possui a raiz do desvio quadrático médio de 0,499 Å em comparação com sua estrutura complexada encontrada por cristalografia de raios-X, pode-se dizer que a metodologia está validada para a caracterização da interação de complexos de Ru + DNA (MCQUAID et al., 2018).

Em relação ao composto hmxrato, foi observado uma energia de interação e uma constante de inibição favorável à formação do complexo ligante-alvo. Isto sugere que o composto em questão possui grande probabilidade de possuir atividade. Entretanto, a diferença energética entre as energias livres de ligação dos ligantes analisados foi 35 kcal.mol⁻¹ menos favorável para o hmxrato em relação ao ligante de referência ([Ru(TAP)₂(11,12-CN₂-dppz)]²⁺). Essa diferença é esperada devido ao fato do composto de referência ser extremamente mais planar do que o composto hmxrato (Figura 29).

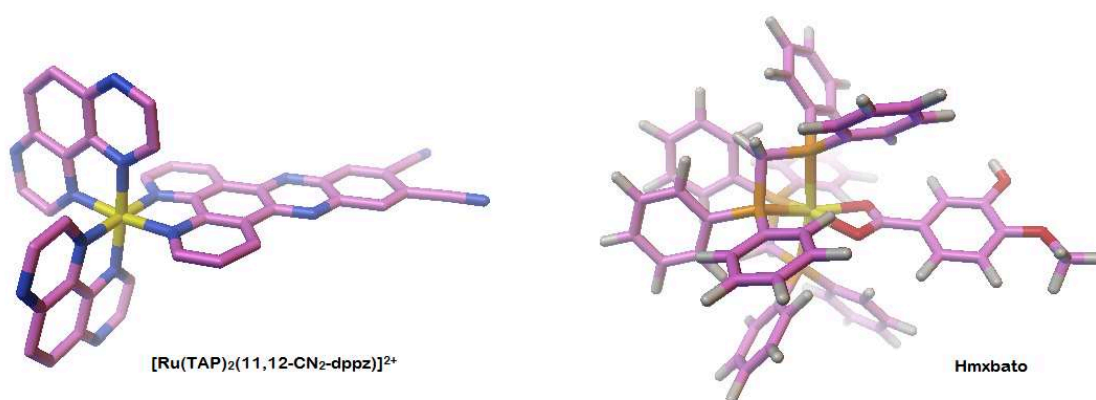


Figura 29: Estrutura dos ligantes [Ru(TAP)₂(11,12-CN₂-dppz)]²⁺ (esquerda) e hmxrato (direita), utilizando o programa *AutoDock 4.0*.

Isto pode ser evidenciado na diferença na energia torsional entre os dois compostos, de 2,47 kcal.mol⁻¹ (Tabela 4). Assim, a energia torsional do hmxrato de 3,02 kcal.mol⁻¹ se justifica ao maior grau de liberdade desse composto, o que resultou em uma diminuição na energia de ligação nesta magnitude e consequentemente em um valor de constante de inibição de aproximadamente 224 vezes mais alta, quando comparada ao ligante de referência, o qual possui uma energia livre de interação mais favorável por apresentar um melhor encaixe entre as duplas hélices do DNA e a estrutura plana do composto [Ru(TAP)₂(11,12-CN₂-dppz)]²⁺ (KARAMI et al., 2018; MISERACHS et al., 2015). Para compreender quais as principais interações existentes entre o ligante hmxrato e o DNA, o programa LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995) foi utilizado e os resultados mostraram que o ligante hmxrato se mantém unido ao DNA por meio da ligação de hidrogênio entre o átomo de hidrogênio do grupo -OH (hmxrato) e o oxigênio do

grupo fosfato de uma das guaninas da estrutura (Figura 30) (CARUSO et al., 2012; CHEN et al., 2002). Esse fato evidencia o que é descrito na literatura sobre a importância da polaridade do composto (COSTA et al., 2017).

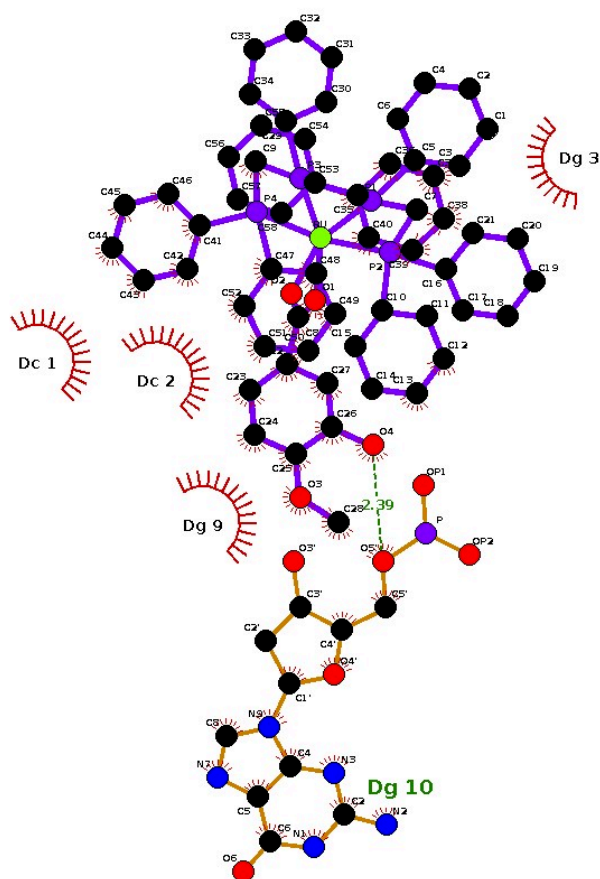


Figura 30: Identificação das interações intermoleculares presentes entre o ligante hmxrato e o DNA, utilizando o programa LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).

5.0 Discussão

A leishmaniose é uma doença negligenciada na qual o tratamento atual envolve uma série de desvantagens. Vários estudos têm sido realizados a fim de investigar novos candidatos anti-*Leishmania* que possam contribuir para o tratamento desta doença (COIMBRA et al., 2016; FANDZLOCH et al., 2017; MACHADO et al., 2017). Neste sentido, os complexos metálicos têm sido

extensivamente explorados, principalmente devido sua atividade antitumoral e antiparasitária.

Nosso grupo tem investigado algumas alternativas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose (COSTA et al., 2017; MIRANDA et al., 2018; NUNES et al., 2017). Nós reportamos em estudos anteriores a ação anti-*Leishmania* de três novos complexos de rutênio: cis-[Ru^{II}(η²-O₂CR)(dppm)₂]PF₆ (precursor), com dppm= *bis(diphenylphosphino) methane* e R = *4-butylbenzoate* (bbato) – complexo **1**; *4-(methylthio)benzoate* (mtbato) – complexo **2** e *3-hydroxy-4 methoxybenzoate* (hmxato), que promoveram um destacado efeito citotóxico contra promastigotas de *L.(L.) amazonensis*, *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) infantum*, apresentando valores de IC₅₀ que variaram entre 12,59 à 0,52 μM, dependendo da espécie analisada. Em adição, todos os complexos de rutênio inibiram significativamente a infecção do parasito em macrófagos RAW 264.7, produzindo uma redução de até 85% (COSTA et al., 2017). Estes resultados nos motivaram a investigarmos os mecanismos de morte envolvidos no efeito anti-*Leishmania* do complexo hmxato contra promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.

Com relação aos resultados apresentados neste trabalho, a curva de crescimento dos promastigotas indicou que tanto o hmxato quanto o precursor causaram um forte efeito antiproliferativo, com inibições estatisticamente significativas sobre o crescimento do parasito após 6h de incubação com os complexos. Tal efeito foi estendendo até 72h de tratamento. Recentemente Verçoza et al. (2017) demonstrou um efeito antiproliferativo similar em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* com o uso de 5 μM de KH-TFMDI, um novo inibidor de histona desacetilase (VERÇOZA et al., 2017). Outro estudo usando seis novos complexos metálicos de transição com uma molécula bioativa (*5,7-dimethyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine* - dmtp) atuando contra promastigotas de *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* também revelou um efeito antiproliferativo. Ainda neste trabalho, após 72h de incubação, o IC₅₀ foi calculado e apresentou os valores variando de 27,7 – 97,7μM e 10,0 – 45,1μM para *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*, respectivamente (CABALLERO et al., 2014). Estes resultados reforçam a ideia que nossos complexos podem ser considerados potenciais alvos para o tratamento da leishmaniose, uma vez que baixas concentrações (precursor:

IC₅₀ = 15,48 µM e complexo **3** - hmxrato: IC₅₀ = 0,52 µM) foram suficientes para produzir um efeito anti-*Leishmania* expressivo.

Com o intuito de investigar se a ação antiproliferativa estava relacionada com o efeito dos complexos na divisão celular do parasito foi realizada a análise do ciclo celular. Nossos resultados indicam mudanças no perfil do ciclo celular, uma vez que foi verificada uma diminuição na porcentagem de células na fase S e consequentemente na fase G2/M. Essas alterações corroboram com o efeito antiproliferativo visto através da curva de crescimento. Interessantemente, a análise do ciclo celular também revelou que uma porcentagem expressiva de promastigotas estava localizada à esquerda da fase G1 (pico sub-G1). Em outras palavras, uma porcentagem significativa de parasitos não entrou na fase mitótica. O aumento da porcentagem de células na fase sub-G1 e a diminuição na fase S podem indicar que a fragmentação do DNA genômico de promastigotas ocorreu tão fortemente a ponto de prejudicar sua replicação e, portanto, levar a morte celular (CHOWDHURY et al., 2012).

Alterações similares no perfil do ciclo celular foram observadas em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após sua exposição, não somente aos complexos de rutênio-clotrimazol (AM160 e AM162) por 24h, mas também à situações que promovam estresse celular. Nestes estudos, ambas as condições promoveram um aumento e uma diminuição na porcentagem de células nas fases sub G0/G1 e S, respectivamente (DA SILVA et al., 2017; INIGUEZ et al., 2016). Mais recentemente, parasitos da mesma espécie tratados com complexos de vanádio (VOSalophen), também por um período de 24h, apresentaram o mesmo perfil no ciclo celular (MACHADO et al., 2017, p. 201).

A fragmentação do DNA é considerada por alguns autores como um marcador usado para indicar morte por apoptose (REECE et al., 2011; SHADAB et al., 2017; SMIRLIS et al., 2010). Neste sentido, a hipótese de fragmentação do DNA de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* demonstradas aqui nos motivou a elucidar o tipo de morte celular envolvido na ação dos complexos de rutênio.

Na tentativa de esclarecer e compreender melhor o tipo de morte envolvido na ação dos complexos de rutênio(II) sobre o parasito do gênero *Leishmania*, outros ensaios foram desenvolvidos. A fragmentação do DNA analisada através do teste de TUNEL mostrou que tanto o precursor quanto o hmxrato causaram

fragmentação do DNA após 24h de tratamento. O dano no DNA foi tão expressivo que, conforme dito anteriormente, não foi possível realizar a quantificação de células danificadas, uma vez que a maioria dos parasitos apresentou fragmentação do DNA. Este efeito também foi produzido por fração bioativa obtida do extrato da planta *Azadirachta* contra promastigotas de *L. donovani* após tratamento por 72h. Em adição, outros resultados indicaram a morte dos parasitos através do processo de apoptose (Chouhan et al., 2015). Efeitos similares também foram observados em *L. amazonensis* após o tratamento com peróxido de hidrogênio (DA SILVA et al., 2017)

Parasitos do gênero *Leishmania* apresentam uma grande e única mitocôndria. Esta organela é responsável pela maior parte do suprimento de energia, desempenhando assim um papel crítico na sobrevivência do parasito. Este papel essencial da mitocôndria torna-a um potencial alvo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (DE SOUZA; ATTIAS; RODRIGUES, 2009; JELK et al., 2019, 2019). Disfunções mitocondriais produzidas devido a alterações no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$) podem ser vistas como uma das consequências da apoptose ou ainda, como um requisito inicial para que esta ocorra (GOTTLIEB et al., 2003; JELK et al., 2019).

Alguns tipos de drogas ou situações que geram estresse em *tripanosomatídeos* têm sido associados com a ocorrência de alterações no $\Delta\Psi m$ (ALZATE et al., 2007; RIBEIRO et al., 2013). Nossos resultados indicam que tanto o precursor quanto o hmxato foram capazes de induzir alterações mitocondriais no parasito, sendo observada a despolarização do $\Delta\Psi m$ nos tempos analisados (24h e 48h). No entanto, alterações mais significativas foram observadas após o tratamento com os complexos de rutênio por 48h, quando ambos apresentaram uma diminuição no $\Delta\Psi m$ superior a 75%. Luque-Ortega e colaboradores (2010) mostraram que formas promastigotas de *L. infantum* expostas a sais de fosfônio derivados de benzofenona exibiram dissipação no $\Delta\Psi m$. Tal efeito foi atribuído a ação dos compostos no complexo II da cadeia respiratória (LUQUE-ORTEGA et al., 2010). Além disso, alterações no $\Delta\Psi m$ de parasitos do gênero *Leishmania* estão associados à geração aumentada de espécies reativas de oxigênio (ERO's), que podem resultar na morte do parasito (ANTINARELLI et al., 2015; SHADAB et al., 2017). Isto poderia acontecer devido a geração de estresse na célula e a

consequente formação de ERO's que promoveria a peroxidação lipídica a qual, consequentemente, poderia influenciar na fluidez da membrana mitocondrial e a perda do $\Delta\Psi_m$ (SMIRLIS et al., 2010). Além disso, foi previamente demonstrado que inibidores da cadeia respiratória (complexo I e III) estão associados com a ocorrência de apoptose em promastigotas de *L. donovani* (MEHTA; SHAHA, 2004). Neste trabalho nós demonstramos que tanto o precursor quanto o hmxrato aumentaram significativamente a geração de ERO's após 24h de tratamento. Estes resultados sustentam a hipótese de que os complexos de rutênio causam morte do tipo apoptótica em promastigotas de *L. amazonensis*.

Considerando que a morte celular por apoptose pode envolver alterações bioquímicas e morfológicas, o próximo passo foi analisar se o tratamento com os complexos de rutênio(II) poderiam induzir a mudanças morfológicas no parasito. Algumas alterações morfológicas incluindo arredondamento e perda no volume celular, assim como a preservação na integridade da membrana plasmática são descritas como marcadores do processo apoptótico em metazoários (GANNAVARAM; DEBRABANT, 2012; KROEMER et al., 2009). Através da análise morfológica, nossos resultados mostraram que os complexos de rutênio(II) em baixas concentrações, especialmente o hmxrato, causaram o arredondamento do parasito, bem como perda no volume celular. Adicionalmente, a forma arredondada apresentada pelos parasitos tratados e a intensa marcação com a faloidina, sobretudo nos parasitos tratados com o hmxrato, indicaram que a alteração no padrão de polimerização da actina pode estar relacionada ao arredondamento das células.

A análise ultraestrutural revelou um intenso inchaço mitocondrial, além de um aumento no número de acidocalcisomas, vacúolos e corpos lipídicos, bem como um padrão alterado de condensação da cromatina. No entanto, a membrana plasmática e o cinetoplasto permaneceram intactos. Alterações nucleares e mitocondriais são provavelmente os principais fatores subjacentes ao potente efeito antiproliferativo e a perda da viabilidade em espécies do gênero *Leishmania* (LEDEZMA et al., 2002). Mudanças similares foram observadas em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com 5 ou 10 μM do composto KH-TFMDI por 48h (VERÇOZA et al., 2017).

Além da apoptose, outro tipo de morte celular encontrada é a autofagia, que pode ser ativada principalmente em situações que envolvam estresse celular (SMIRLIS et al., 2010). O processo de autofagia é marcado pela formação de estruturas denominadas de vacúolos autofágicos, as quais podem ser detectadas por coloração através do reagente MDC. Baixas concentrações dos complexos de rutênio(II) causaram um aumento na formação de vacúolos autofágicos no parasito após 24h de tratamento, indicando que o processo de autofagia foi estimulado pelos complexos. Este tipo de morte celular em promastigotas do gênero *Leishmania* tem sido observado também para outros compostos, conforme demonstrado em um estudo utilizando uma molécula inovadora de tiosemicarbazona (BZTS) com miltefosina, uma droga utilizada no tratamento da leishmaniose (SCARIOT et al., 2017). Resultados similares também foram relatados para o composto C5 (*n-benzyl 1-(4-methoxy)phenyl-9H-β-carboline-3-carboxamide*) em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. O C5 causou elevação na produção de ERO's, despolarização da membrana mitocondrial, fragmentação no DNA e uma intensa formação de vacúolos autofágicos, indicando que o parasito pode morrer por meio de diferentes vias de morte (MENDES et al., 2016).

Neste trabalho, baixas concentrações, tanto do hmxrato quanto do precursor, foram usadas nos ensaios para avaliar a ação do complexo na indução da morte do parasito. Assim, a citotoxicidade também foi investigada em BMDM. Interessantemente, a toxicidade gerada por hmxrato e precursor foi muito menor em macrófagos do que em promastigotas. Os valores de IC₅₀ definidos para o precursor (15,48μM) e hmxrato (0,52μM) em promastigotas causaram baixa ou mesmo nenhuma toxicidade em BMDM, respectivamente. Em adição, o índice de seletividade revelou que o hmxrato é mais seletivo do que o precursor. Um estudo recente, utilizando quatro complexos de *cyclopalladated* em promastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos murinos apresentou valores de IC₅₀ variando entre 13,53 – 32,12 μM, para promastigotas; valores de CC₅₀ entre 59,18 – 134,44 μM, para macrófagos; e índice de seletividade entre 3,06 – 9,83 (VELÁSQUEZ et al., 2015). O complexo de rutênio hmxrato apresentou maior seletividade quando comparado com os compostos de *cyclopalladated*.

De fato, os complexos de rutênio hmxrato e seu precursor demonstraram citotoxicidade seletiva para promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Por este motivo

e para investigar a efetividade de hmxrato no processo de infecção de macrófagos, o ensaio de infectividade *in vitro* foi realizado utilizando macrófagos BMDM. Nossos resultados demonstraram que tanto o precursor quanto o hmxrato foram capazes de reduzir de forma expressiva o índice de infectividade em macrófagos, uma vez que o complexo reduziu até 82% da infectividade *in vitro*. Estes resultados reforçam a hipótese de que este complexo pode ser considerado uma potente ferramenta para o tratamento da leishmaniose.

Vários estudos tem demonstrado que a ação dos complexos de rutênio contra células tumoral envolve a indução da morte celular por apoptose (HUANG et al., 2018; JIANG et al., 2019a; PETTINARI et al., 2014; TANG et al., 2019; YU et al., 2014). Han e colaboradores (2015) demonstraram que complexos de rutênio de polipiridilo induziram a apoptose em células BEL-7402 (hepatocarcinoma humano) através da disfunção mitocondrial mediada via ERO's e expressão de proteínas da família Bcl-2 (HAN et al., 2015). Além disso, algumas similaridades envolvendo o metabolismo de tripanosomatídeos e células tumorais têm sido observadas, já que ambas exibem uma alta taxa replicativa, necessitando assim de uma elevada demanda energética (BORST, 1977).

A atividade pro-apoptótica relatada por compostos organometálicos foi previamente demonstrada para complexos de rutênio(II) contendo clotrimazol em promastigotas de *L. amazonensis* através de experimentos que demonstraram despolarização mitocondrial, fragmentação no DNA, alteração no perfil do ciclo celular e externalização de fosfolípidos de membrana (INIGUEZ et al., 2016). Portanto, os resultados aqui demonstrados confirmam o envolvimento da morte do tipo apoptótica na ação de complexos de rutênio(II) em parasitos do gênero *Leishmania*. Adicionalmente, nós demonstramos que a ação dos complexos de rutênio(II) sobre os parasitos também envolve a produção de ERO's, que provavelmente induzem a morte por apoptose.

Considerando que existem poucos estudos na literatura os quais objetivam elucidar os mecanismos citotóxicos envolvidos na ação antiparasitária de complexos de rutênio, os resultados aqui apresentados fornecerão conhecimentos importantes sobre o mecanismo de ação desse tipo de droga. Nós descrevemos, em um estudo de pesquisa original, um provável mecanismo de morte pelo qual o hmxrato e o precursor estariam atuando contra promastigotas de *L. amazonensis*.

Além disso, deve-se enfatizar que os efeitos do hmxrato foram produzidos utilizando-se uma baixa concentração (0,52µM), a qual não causou nenhuma citotoxicidade em macrófagos produzindo, desta forma, uma condição ideal para tratamento. Estudos *in vivo* serão necessários para avaliar a ação anti-*Leishmania* dos complexos de rutênio(II) em modelo animal. Contudo, nossos resultados *in vitro* reforçam a hipótese de que os complexos de rutênio(II) são moléculas potenciais para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a leishmaniose.

Os complexos de rutênio vêm sendo extensivamente explorados nos últimos anos, sobretudo devido as suas atividades antitumorais (CARNIZELLO et al., 2016; DE SOUZA OLIVEIRA et al., 2018; DÖMÖTÖR et al., 2017; QIN et al., 2019; SILVA et al., 2018) e antiparasitárias (COSTA et al., 2017, 2019; MIRANDA et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2019). Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado o potencial citotóxico de diferentes complexos de rutênio contra parasitos do gênero *Leishmania* (COSTA et al., 2017; MIRANDA et al., 2018). Além disso, recentemente, demonstramos o provável mecanismo de morte celular causado pelo complexo *cis*-[Ru^{II}((η²-O₂CC₇H₇O₂)(dppm)₂)]PF₆ – hmxrato em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (COSTA et al., 2019). Assim como os tripanossomatídeos, as células tumorais também apresentam uma elevada taxa de replicabilidade celular, associada, conseqüentemente, a uma maior demanda de oxigênio e nutrientes. Dessa forma, destaca-se a existência de semelhanças quanto às características metabólicas de tripanossomatídeos e de células tumorais (SÁNCHEZ-DELGADO, 2004; WILLIAMSON; SCOTT-FINNIGAN, 1978). Nesse sentido e, tendo em vista a excelente atividade anti-*Leishmania* do hmxrato, nosso grupo prosseguiu com as investigações quanto ao potencial citotóxico deste complexo também em células tumorais.

Assim, este trabalho também descreve o excelente potencial citotóxico do hmxrato, bem como sua toxicidade seletiva para célula tumoral de pulmão – linhagem celular A549. Trabalhos anteriores demonstraram a atividade citotóxica de complexos de rutênio contendo derivados de *phtpy* (*phtpy* = *phenylterpyridine*) contra diferentes linhagens tumorais. No caso, os complexos 1b e 2b apresentaram maior citotoxicidade contra células A549 após 72h de tratamento, exibindo valores de IC₅₀ iguais a 31,7 µM e 29,8 µM, respectivamente (DENG et al., 2017). Mais recentemente, três complexos de rutênio contendo o ligante salicilato

$\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{SA})$] (*phen*=1,10-phenanthroline, *SA*=salicylate, **1**), $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{SA})]$ (*dmb*=4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine), **2**) and $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{SA})]$ (*bpy*=2,2'-bipyridine, **3**) foram analisados quanto ao seu potencial citotóxico contra células tumoral e normal de pulmão. Os complexos **1**, **2** e **3** exibiram atividade citotóxica contra células A549 após 48h de tratamento, apresentando valores de IC_{50} iguais a 17,7 μM , 28,1 μM e 40,5 μM , respectivamente. Já o tratamento de células BEAS-2B com os mesmos complexos revelou valores de IC_{50} iguais a 62,5 μM (complexo **1**), 50,1 μM (complexo **2**) e 64,3 μM (hmxrato) (CHEN et al., 2019). Dessa forma, os resultados apresentados em nosso trabalho demonstram o excelente potencial citotóxico de hmxrato contra células tumorais de pulmão, uma vez que o ensaio de citotoxicidade mostrou um valor de IC_{50} de 3,8 μM , mesmo após somente 24h de tratamento com o complexo.

Uma propriedade de alta importância e que deve ser levada em consideração para o desenvolvimento de um novo fármaco antitumoral é a sua seletividade de ação, ou seja, a capacidade do fármaco em promover toxicidade preferencialmente em células tumorais. Esta propriedade pode ser avaliada através do índice de citotoxicidade seletiva (ICS), mensurado a partir da razão entre o IC_{50} para célula tumoral e o IC_{50} para célula normal. Como resultado, valores de $\text{ICS} \leq 1$ indicam falta de citotoxicidade seletiva, enquanto que valores >1 indicam citotoxicidade seletiva. O hmxrato apresentou um excelente ICS (> 10), indicando que este complexo apresenta ação citotóxica preferencialmente em células tumorais de pulmão. Visando seu potencial antitumoral, esta característica torna o complexo hmxrato ainda mais interessante.

Reforçando a ideia de seletividade, foi também demonstrado que o hmxrato inibe de maneira significativa a proliferação e a recuperação de células A549 em todas as concentrações testadas, com exceção da recuperação de células tratadas com 0,95 μM do hmxrato após 48h de incubação. Ao mesmo tempo, este efeito não foi observado em algumas condições de tratamento das células normais BEAS-2B, visto que as concentrações de 0,95 μM , 1,9 μM e 3,8 μM não interferem na proliferação da célula normal nos tempos iniciais. Em conjunto, estes resultados demonstram que o hmxrato na concentração de 3,8 μM é altamente seletivo e citotóxico para a célula tumoral de pulmão. Ainda, o complexo hmxrato exerceu efeito negativo na sobrevivência e proliferação de células A549, conforme mostrado

no teste clonogênio, onde nenhuma célula foi capaz de crescer e formar colônias, mesmo na presença das concentrações mais baixas do complexo. Diferentemente, as células BEAS-2B foram capazes de sobreviver e posteriormente formar colônias, com exceção das células tratadas com a maior concentração (19 μ M) do complexo. Outros estudos utilizando complexos de rutênio e células A549 também demonstraram a capacidade destes em interferir na habilidade de formação de colônias (DIAS et al., 2018; SILVA et al., 2018), porém as concentrações necessárias para tal efeito foram superiores a observada para o complexo hmxtrato.

O desenvolvimento de drogas antitumorais está vinculado a compreensão dos mecanismos de ação produzidos pelas moléculas candidatas. Neste sentido, o conhecimento dos mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos em suas ações é de grande relevância (BRABEC; KASPARKOVA, 2018). Os prováveis mecanismos de ação de muitos complexos de rutênio, descritos recentemente, envolvem a apoptose (CHEN et al., 2019; DABIRI et al., 2018; DE SOUZA OLIVEIRA et al., 2018; LU et al., 2016; WAN et al., 2017).

A maioria das vias apoptóticas depende da ativação de caspases, podendo o citoesqueleto ser um alvo da atividade proteolítica de algumas caspases efetoras. Desta forma, mudanças morfológicas e na organização do citoesqueleto de actina podem ser detectadas em células que sofreram apoptose (CRAWFORD; WELLS, 2011; GREEN; LLAMBI, 2015b; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). O hmxtrato induziu significativas mudanças na morfologia de células A549 e também causou danos no citoesqueleto. Por outro lado, não houve grandes alterações na morfologia de células BEAS-2B após o tratamento com a concentração de 3,8 μ M. Outra alteração, que também pode estar associada com a morte de células por apoptose, é o arraste no ciclo celular, como uma tentativa de reparo na célula. (ALGHAMIAN et al., 2017; JIANG et al., 2019a). Nós demonstramos que o hmxtrato foi capaz de promover um forte arraste de células A549 na fase G2/M. Chen e colaboradores (2016) descreveram este mesmo efeito no ciclo celular de células A549 tratadas com o complexo *polypyridyl [Ru(bpy)₂(pytp)]²⁺* (RU2) (CHEN et al., 2016). Adicionalmente, nós demonstramos também neste trabalho que o hmxtrato não promove alterações significativas no ciclo celular de célula normal de pulmão.

Algumas quimioterapias, tais como doxorubicina e cisplatina, utilizadas para o tratamento de certos tipos de cânceres, são capazes de promover um aumento

nos níveis de ERO's, o qual contribuiria para a toxicidade nas células (CONKLIN, 2004; MARULLO et al., 2013). O hmxrato foi capaz de induzir alteração nos níveis de ERO's, aumentando de forma expressiva a intensidade de fluorescência das células A549 tratadas com diferentes concentrações do complexo. Um estudo recente, utilizando dois novos complexos de rutênio(II) *polypyridyl*, denominados de Ru(II)-1 ($[\text{Ru}(\text{dmp})_2(\text{CAPIP})](\text{ClO}_4)_2$) e Ru(II)-2 ($[\text{Ru}(\text{dmp})_2(\text{CFPIP})](\text{ClO}_4)_2$), também demonstrou o aumento dos níveis de ERO's em células A549. Neste caso, os complexos, em diferentes concentrações, causaram aumento de 40,3 (4,0 μM do Ru(II)-1), 17,4 (2,0 μM do Ru(II)-1), 44,7 (6,0 μM do Ru(II)-2) e 20,3 (3,0 μM do Ru(II)-2) vezes a intensidade de fluorescência das células tumorais (JIANG et al., 2019b). De forma complementar, demonstramos aqui que o hmxrato promove aumento discreto nos níveis de ERO's de célula normal. Ainda, convém ressaltar que o aumento da intensidade de fluorescência das células BEAS-2B tratadas com 3,8 μM do complexo foi significativamente menor quando comparado ao aumento da intensidade de fluorescência detectada para a célula tumoral. Além disso, a habilidade do hmxrato em atuar como uma molécula oxidante, induzindo a superprodução de ERO's em célula tumoral foi confirmada através da incubação concomitante do complexo e inibidor NAC. Como resultado, uma expressiva diminuição da formação de ERO's nas células foi observada.

As ERO's são consideradas essenciais na homeostasia da célula, podendo desempenhar importantes funções, tais como: (1) regulação da progressão e proliferação do ciclo celular; (2) regulação na diferenciação, migração e morte celular; (3) manutenção do balanço redox e (4) interferência na resposta imunológica. No entanto, níveis elevados podem induzir a um estresse celular, causando efeitos nocivos que podem culminar com a morte celular (COVARRUBIAS et al., 2008; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016; ZHANG et al., 2016). Nós demonstramos que o hmxrato induz a morte de células A549 por apoptose, levando a morte de aproximadamente metade das células tratadas. Mais uma vez nossos resultados corroboram com outros estudos descritos na literatura que também demonstram morte por apoptose de células A549 tratadas com diferentes complexos de rutênio (CHEN et al., 2019; DIAS et al., 2018; MOHAMED SUBARKHAN et al., 2019; SILVA et al., 2018). Entretanto, além disso, nós ainda demonstramos que o hmxrato na concentração de 3,8 μM induziu

uma porcentagem reduzida de células normais para a morte celular, mantendo mais de 85% das células em condições viáveis. Esta diferença na sobrevivência, entre células tumoral e normal, promovida por hmxrato pode ser explicada pelo fato da célula tumoral apresentar níveis basais de produção de ERO's maiores do que os níveis basais de célula normal. Assim, as células tumorais apresentariam um limiar de tolerância de homeostase redox menor do que as células não tumorais, ficando, desse modo, as células tumorais, mais propícias à ocorrência da morte celular (TANG et al., 2019; TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009). Este achado justifica o resultado encontrado para hmxrato (3,8 μ M) e o discreto aumento na produção de ERO's em BEAS-2B, associado com a sobrevivência desta célula.

A mitocôndria é a organela que produz maior quantidade de ERO's e um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas de oxigênio pode causar danos celulares. Neste contexto, a mitocôndria desempenha um papel fundamental na morte celular programada (ABATE et al., 2019; OTERA; MIHARA, 2012; RIGOLET; YOBUE; DEVIN, 2011). Alterações que induzem o aumento ou a diminuição do potencial mitocondrial podem provocar uma diminuição na viabilidade celular (ZOROV; JUHASZOVA; SOLLITT, 2006; ZOROVA et al., 2018). O hmxrato promoveu despolarização no potencial da membrana mitocondrial de células A549 tratadas com ambas as concentrações do complexo. Ainda, hmxrato (3,8 μ M) induziu uma hiperpolarização mitocondrial em células BEAS-2B. Entretanto, a hiperpolarização não acompanhada de uma geração excessiva de ERO's pode apresentar uma função sinalizadora capaz de suavizar os danos que poderiam ser produzidos por uma liberação intensa de ERO's subsequentemente (ZOROV; JUHASZOVA; SOLLITT, 2006; ZOROVA et al., 2018), justificando assim, a hiperpolarização mitocondrial detectada em BEAS-2B, após tratamento com hmxrato (3,8 μ M), sem promover prejuízo para a sobrevivência da célula.

Estudos têm demonstrado que a despolarização mitocondrial pode levar a liberação do citocromo C, ativando algumas caspases e induzindo o processo de apoptose (RIGOLET; YOBUE; DEVIN, 2011; ZOROVA et al., 2018). O hmxrato foi capaz de promover, em células A549, o aumento da atividade da caspase-9. Esta caspase iniciadora está envolvida no processo de ativação da apoptose intrínseca que ocorre via mitocondrial. Além disso, demonstramos também que o

hmxrato foi capaz de aumentar a expressão da caspase executora 3 em célula tumoral. Em conjunto, estes resultados sugerem que o hmxrato induz uma superprodução de ERO's, gerando um desequilíbrio na homeostasia *redox* da célula e consequente alteração no potencial da membrana mitocondrial. Uma vez lesada, a membrana mitocondrial promove a ativação da caspase iniciadora 9 e esta por sua vez ativa a caspase executora 3, promovendo assim a morte celular programada por apoptose.

O estresse celular pode promover a ativação de moléculas reguladoras como uma tentativa de reparo. Dentre elas podemos destacar a enzima nuclear PARP-1 que desempenha papel central no reparo do DNA, através da transferência de grupo ADP (ribose) por meio da ligação com o DNA. Esta enzima nuclear pode ser ativada por algumas caspases executoras tais como caspase-3 e caspase-7 (BOICE; BOUCHIER-HAYES, 2020; CHAITANYA; ALEXANDER; BABU, 2010; GERMAIN et al., 1999; NING; WAKIMOTO, 2020). O complexo hmxrato foi capaz de aumentar a expressão da enzima PARP-1 em células A549, indicando sua possível interferência no DNA da célula. Ainda, conforme demonstrado pelo ensaio de cometa, o hmxrato causou danos no DNA de células A549 após 4 h de tratamento. Entretanto, nenhum efeito genotóxico foi detectado para células normais BEAS-2B, reforçando a seletividade do hmxrato para a célula tumoral.

Finalmente, a interação do complexo com o DNA foi vista através dos estudos de *docking* molecular os quais revelaram que o modo de interação do complexo com o DNA pode ocorrer por meio de uma ligação de hidrogênio existente entre o átomo de hidrogênio do grupo -OH (hmxrato) e o átomo de oxigênio do grupo fosfato da guanina DG10 presente na estrutura de DNA analisada (CARUSO et al., 2012; K.S. et al., 2019). Essa interação pode ser responsável pela sinalização do dano no DNA, o qual provocaria um estresse oxidativo na célula e posterior aumento significativo nos níveis de ERO's levando a danos como alteração do potencial mitocondrial arraste no ciclo celular, alterações morfológicas, inibição da proliferação celular, dano no DNA e por fim a consumação da apoptose. Diante desses fatos, propomos que o complexo hmxrato atua de modo similar a um gatilho para dar início ao processo apoptótico, como um “efeito dominó” (Figura 31).

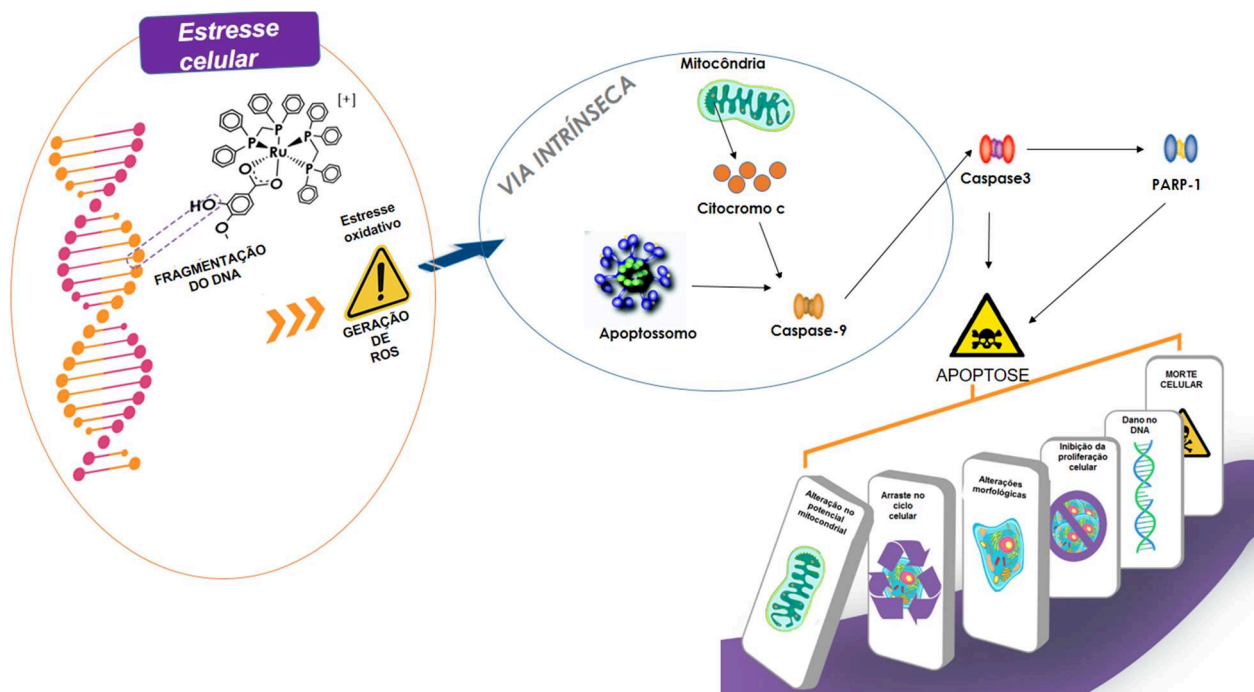


Figura 31: Mecanismo de ação proposto para a atividade antitumoral do hmxrato contra células tumorais – A549 de pulmão. A interação do hmxrato com o DNA da célula causa um estresse oxidativo o qual culmina com o aumento da produção de ERO's. A superprodução de ERO's induzem a ativação da apoptose intrínseca por meio da alteração no potencial mitocondrial da célula. Uma vez lesada, a mitocôndria induz a liberação do citocromo C no citosol, com posterior ativação da caspase-9. Esta por sua vez promove a ativação da caspase-3 á qual irá ativar a enzima PARP-1 e finalmente induzir a morte celular programada por apoptose, justificando as alterações celulares vistas: (1) alterações no potencial mitocondrial; (2) arraste no ciclo celular; (3) alterações morfológicas; (4) inibição da proliferação celular e (5) danos no DNA.

Nosso estudo descreve, em uma pesquisa original, o excelente potencial citotóxico de um complexo de rutênio (hmxrato), bem como sua seletividade de ação para células tumorais de pulmão. Adicionalmente, verificamos que o complexo na concentração de 3,8 μM é capaz de induzir de maneira expressiva os níveis de ERO's em células tumorais, gerando um estresse oxidativo que pode culminar com: (1) alterações no potencial mitocondrial; (2) arraste no ciclo celular; (3) alterações morfológicas; (4) inibição da proliferação celular; (5) danos no DNA e finalmente (5) apoptose. Além disso, demonstramos que o hmxrato, nesta mesma concentração, garante a sobrevivência da maioria das células normais de pulmão. Ainda, demonstramos que a ativação da morte celular programada por apoptose pode ocorrer por meio da ativação das caspases através da via intrínseca. É necessário destacar que a predileção de ação do hmxrato na célula tumoral é uma propriedade pouco comum para a maioria dos quimioterápicos existentes, uma vez que a

maioria deles apresenta elevada toxicidade também para células normais. Esta importante característica torna este complexo de rutênio um interessante candidato para o *design* de novos fármacos contra o câncer de pulmão. O estudo detalhado dos genes envolvidos na via apoptótica, além das propriedades farmacocinéticas de hmxrato, serão alvos de investigação futura por nosso grupo de pesquisa.

5.0 Conclusão

- O hmxrato e seu precursor foram capazes de induzir a formação de ERO's, provocando a despolarização do potencial mitocondrial, significativas alterações no ciclo celular, danos no DNA, expressivas alterações na morfologia do parasito e aumento da formação de vacúolos autofágicos, induzindo a morte de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* através da apoptose e autofagia, contemplando assim o provável mecanismo de morte induzido pelos complexos de rutênio hmxrato e seu precursor.
- Os efeitos do hmxrato em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram produzidos por baixa concentração do complexo (0,52µM), a qual não causou nenhuma citotoxicidade em macrófagos BMDM e ainda reduziu em 82% da infectividade *in vitro*.
- O hmxrato foi capaz de induzir a citotoxicidade seletiva em células tumoral de pulmão, apresentando um baixo valor de IC₅₀ (3,8µM).
- Hmxrato foi capaz de interagir com o DNA por meio de uma ligação de hidrogênio existente entre o átomo de hidrogênio do grupo -OH (hmxrato) e o átomo de oxigênio do grupo fosfato da guanina DG10 presente na estrutura de DNA analisada, promovendo um estresse celular.
- O estresse celular promovido pela interação do hmxrato com o DNA da célula promoveu aumento na produção de ERO's, causando alterações no potencial mitocondrial e consequente ativação da caspase-9, caspase-3 e

PARP-1. Em conjunto, essas alterações culminaram com a morte celular programada por apoptose da célula tumoral de pulmão (A549).

- A apoptose causada pelo hmxrato em células A549 promoveu alterações no potencial mitocondrial; arraste no ciclo celular; alterações morfológicas; inibição da proliferação celular e danos ao DNA .
- Além dos mecanismos de morte envolvidos na atividade do hmxrato, ainda demonstramos a predileção de ação do complexo para célula tumoral, propriedade pouco comum para a maioria dos quimioterápicos existentes.
- Por fim, demonstramos os prováveis mecanismos de morte envolvidos na atividade anti-*Leishmania* e antitumoral do complexo de rutênio hmxrato os quais tornam esta molécula uma interessante candidata para o *design* de novos fármacos contra as leishmanioses e o câncer de pulmão.

6.0 Referências Bibliográficas

ABATE, M. et al. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, p. S1084952118301873, jun. 2019.

ALDERDEN, R. A.; HALL, M. D.; HAMBLEY, T. W. The Discovery and Development of Cisplatin. *Journal of Chemical Education*, v. 83, n. 5, p. 728, maio 2006.
<https://doi.org/10.1021/ed083p728>

ALESSIO, E.; MESSORI, L. NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry. *Molecules*, v. 24, n. 10, p. 1995, 24 maio 2019.
<https://doi.org/10.3390/molecules24101995>

ALGHAMIAN, Y. et al. Effects of γ -radiation on cell growth, cell cycle and promoter methylation of 22 cell cycle genes in the 1321NI astrocytoma cell line. *Advances in Medical Sciences*, v. 62, n. 2, p. 330-337, set. 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.03.004>

ALZATE, J. F. et al. Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 152, n. 2, p. 192-202, abr. 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.01.006>

ANTINARELLI, L. M. R. et al. 4-Aminoquinoline Derivatives as Potential Antileishmanial Agents. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 86, n. 4, p. 704-714, out. 2015.
<https://doi.org/10.1111/cbdd.12540>

BADE, B. C.; DELA CRUZ, C. S. Lung Cancer 2020. *Clinics in Chest Medicine*, v. 41, n. 1, p. 1-24, mar. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>

BAI, M. et al. Chiral ruthenium(II) complex Δ -[Ru(bpy)₂(o-FMPIP)] (bpy = bipyridine, o-FMPIP = 2-(2'-trifluoromethylphenyl)imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline) as potential apoptosis inducer via DNA damage. *European Journal of Pharmacology*, v. 853, p. 49-55, jun. 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.03.009>

BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *British Medical Bulletin*, v. 104, n. 1, p. 175-196, 1 dez. 2012.
<https://doi.org/10.1093/bmb/lds031>

BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, ago. 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>

BATES, P.; ROGERS, M. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of Leishmania. *Current Molecular Medicine*, v. 4, n. 6, p. 601-609, 1 set. 2004.
<https://doi.org/10.2174/1566524043360285>

BHATTI, M. Z. et al. Anticancer activity and mechanism of bis-pyrimidine based dimetallic Ru(II)(η^6 -p-cymene) complex in human non-small cell lung cancer via p53-dependent pathway. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 194, p. 52-64, maio 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.01.019>

BOICE, A.; BOUCHIER-HAYES, L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1867, n. 6, p. 118688, jun. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118688>

BORST, P. Metabolism and chemotherapy of African trypanosomes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 71, n. 1, p. 3-4, 1977.

BRABEC, V.; KASPARKOVA, J. Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agents. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 376, p. 75-94, dez. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.07.012>

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394-424, nov. 2018.
<https://doi.org/10.3322/caac.21492>

BRINGMANN, G. et al. A Novel Leishmania major Amastigote Assay in 96-Well Format for Rapid Drug Screening and Its Use for Discovery and Evaluation of a New Class of Leishmanicidal Quinolinium Salts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 7, p. 3003-3011, jul. 2013.
<https://doi.org/10.1128/AAC.02201-12>

BURRIS, H. A. et al. Safety and activity of IT-139, a ruthenium-based compound, in patients with advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, dose-escalation phase I study with expansion cohort. *ESMO Open*, v. 1, n. 6, p. e000154, fev. 2017.
<https://doi.org/10.1136/esmoopen-2016-000154>

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. *The Lancet*, v. 392, n. 10151, p. 951-970, set. 2018.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)

CABALLERO, A. B. et al. Triazolopyrimidine compounds containing first-row transition metals and their activity against the neglected infectious Chagas disease and leishmaniasis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 85, p. 526-534, out. 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.026>

CARNIZELLO, A. P. et al. In vitro and in vivo antitumor activity of a novel carbonyl ruthenium compound, the $\text{ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF}_6$ [dppb = 1,4-bis(diphenylphosphine)butane and bipy = 2,2'-bipyridine]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 164, p. 42-48, nov. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.08.010>

CARUSO, F. et al. Ruthenium-Arene Complexes of Curcumin: X-Ray and Density Functional Theory Structure, Synthesis, and Spectroscopic Characterization, in Vitro Antitumor Activity, and DNA Docking Studies of (p - Cymene)Ru(curcuminato)chloro. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 55, n. 3, p. 1072-1081, 9 fev. 2012.
<https://doi.org/10.1021/jm200912j>

CASINI, A. Exploring the mechanisms of metalbased pharmacological agents via an integrated approach. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 109, p. 97-106, abr. 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.12.007>

CHAITANYA, G.; ALEXANDER, J. S.; BABU, P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*, v. 8, n. 1, p. 31, 2010.
<https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-31>

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 20, n. 10, p. 1251-1265, 3 jul. 2019.
<https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1609940>

CHANG, Y.-T. et al. Sinularin induces oxidative stress-mediated G2/M arrest and apoptosis in oral cancer cells: Chang et al. *Environmental Toxicology*, v. 32, n. 9, p. 2124-2132, set. 2017.
<https://doi.org/10.1002/tox.22425>

CHEN, H. et al. Organometallic Ruthenium(II) Diamine Anticancer Complexes: Arene-Nucleobase Stacking and Stereospecific Hydrogen-Bonding in Guanine

Adducts. Journal of the American Chemical Society, v. 124, n. 12, p. 3064-3082, mar. 2002.

<https://doi.org/10.1021/ja017482e>

CHEN, J. et al. Investigation of inducing apoptosis in human lung cancer A549 cells and related mechanism of a ruthenium(II) polypyridyl complex. Inorganic Chemistry Communications, v. 69, p. 35-39, jul. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.inoche.2016.04.025>

CHEN, J. et al. Ruthenium(II) salicylate complexes inducing ROS-mediated apoptosis by targeting thioredoxin reductase. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 193, p. 112-123, abr. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.01.011>

CHEN, Y. et al. Synthesis, characterization, and anticancer activity of ruthenium(II)- β -carboline complex. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 70, p. 120-129, dez. 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.051>

CHOWDHURY, S. et al. The lignan niranthin poisons Leishmania donovani topoisomerase IB and favours a Th1 immune response in mice. EMBO Molecular Medicine, v. 4, n. 10, p. 1126-1143, out. 2012.

<https://doi.org/10.1002/emmm.201201316>

CLARKE, M. J. The Potential of Ruthenium in Anticancer Pharmaceuticals. In: MARTELL, A. E. (Ed.). Inorganic Chemistry in Biology and Medicine. ACS Symposium Series. WASHINGTON, D.C.: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1980. v. 140p. 157-180.

<https://doi.org/10.1021/bk-1980-0140.ch010>

COIMBRA, E. S. et al. Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action.

Chemico-Biological Interactions, v. 260, p. 50-57, dez. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.10.017>

CONKLIN, K. A. Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. Integrative Cancer Therapies, v. 3, n. 4, p. 294-300, dez. 2004.

<https://doi.org/10.1177/1534735404270335>

COSTA, M. S. et al. Anti- Leishmania activity of new ruthenium(II) complexes: Effect on parasite-host interaction. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 175, p. 225-231, out. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.07.023>

COVARRUBIAS, L. et al. Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental Biology*, v. 320, n. 1, p. 1-11, ago. 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.041>

CRAWFORD, E. D.; WELLS, J. A. Caspase Substrates and Cellular Remodeling. *Annual Review of Biochemistry*, v. 80, n. 1, p. 1055-1087, 7 jul. 2011.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061809-121639>

CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death & Differentiation*, v. 16, n. 7, p. 935-938, jul. 2009.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2009.59>

CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 15, n. 1, p. 49-63, jan. 2014.
<https://doi.org/10.1038/nrm3722>

DA SILVA, M. S. et al. Consequences of acute oxidative stress in *Leishmania amazonensis*: From telomere shortening to the selection of the fittest parasites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1864, n. 1, p. 138-150, jan. 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.001>

DABIRI, Y. et al. A Ruthenium(II) N-Heterocyclic Carbene (NHC) Complex with Naphthalimide Ligand Triggers Apoptosis in Colorectal Cancer Cells via Activating the ROS-p38 MAPK Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 12, p. 3964, 9 dez. 2018.
<https://doi.org/10.3390/ijms19123964>

DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, v. 740, p. 364-378, out. 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; DA ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 264, dez. 2016.
<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1540-3>

DE SOUZA OLIVEIRA, M. et al. Ru(II)-Thymine Complex Causes Cell Growth Inhibition and Induction of Caspase-Mediated Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 6, p. 1609, 30 maio 2018.
<https://doi.org/10.3390/ijms19061609>

DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. F. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 41, n. 10, p. 2069-2080, out. 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.04.007>

DEBRABANT, A. et al. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. International Journal for Parasitology, v. 33, n. 3, p. 257-267, mar. 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00008-0)

DENG, Z. et al. Ruthenium complexes with phenylterpyridine derivatives target cell membrane and trigger death receptors-mediated apoptosis in cancer cells. Biomaterials, v. 129, p. 111-126, jun. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.017>

DIAS, J. S. M. et al. Pro-apoptotic activity of ruthenium 1-methylimidazole complex on non-small cell lung cancer. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 187, p. 1-13, out. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.06.008>

DÖMÖTÖR, O. et al. Studies on the mechanism of action of antitumor bis(aminophenolate) ruthenium(III) complexes. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 168, p. 27-37, mar. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.12.008>

DOS ANJOS, D. O. et al. Effects of a novel β -lapachone derivative on *Trypanosoma cruzi*: Parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 6, n. 3, p. 207-219, dez. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.10.003>

DUSZENKO, M. et al. Death of a trypanosome: a selfish altruism. Trends in Parasitology, v. 22, n. 11, p. 536-542, nov. 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.08.010>

FAN, C. et al. Selenocystine potentiates cancer cell apoptosis induced by 5-fluorouracil by triggering reactive oxygen species-mediated DNA damage and inactivation of the ERK pathway. Free Radical Biology and Medicine, v. 65, p. 305-316, dez. 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.002>

FANDZLOCH, M. et al. Strategies for overcoming tropical disease by ruthenium complexes with purine analog: Application against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*. Journal of Inorganic Biochemistry, v. 176, p. 144-155, nov. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.018>

FARRELL, N. P.; WILLIAMSON, J.; MCLAREN, D. J. M. Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal and platinum-metal-drug dual-function complexes. *Biochemical Pharmacology*, v. 33, n. 7, p. 961-971, abr. 1984.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90501-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90501-X)

FATHI KARKAN, S. et al. Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis and treatment: a review. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 45, n. 1, p. 1-5, 2 jan. 2017.
<https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1153483>

FUEREDER, T.; BERGER, W. Metal drugs go targeted. *ESMO Open*, v. 2, n. 3, p. e000239, ago. 2017.
<https://doi.org/10.1136/esmoopen-2017-000239>

FUERTES, M. et al. Novel Concepts in the Development of Platinum Antitumor Drugs. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, v. 2, n. 4, p. 539-551, 1 jul. 2002.
<https://doi.org/10.2174/1568011023353958>

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, v. 25, n. 3, p. 486-541, mar. 2018.

GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Necroptosis: A Specialized Pathway of Programmed Necrosis. *Cell*, v. 135, n. 7, p. 1161-1163, dez. 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.004>

GANNAVARAM, S.; DEBRABANT, A. Programmed cell death in Leishmania: biochemical evidence and role in parasite infectivity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 2, 2012.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00095>

GATELY, D.; HOWELL, S. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review. *British Journal of Cancer*, v. 67, n. 6, p. 1171-1176, jun. 1993.
<https://doi.org/10.1038/bjc.1993.221>

GERMAIN, M. et al. Cleavage of Automodified Poly(ADP-ribose) Polymerase during Apoptosis: EVIDENCE FOR INVOLVEMENT OF CASPASE-7. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 40, p. 28379-28384, 1 out. 1999.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28379>

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*, v. 88, p. 102925, jul. 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>

GILLISSEN, A. et al. Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence in vitro. *Respiratory Medicine*, v. 91, n. 3, p. 159-168, mar. 1997.
[https://doi.org/10.1016/S0954-6111\(97\)90052-4](https://doi.org/10.1016/S0954-6111(97)90052-4)

GOLDAR, S. et al. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 16, n. 6, p. 2129-2144, 3 abr. 2015.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.6.2129>

GONZALEZ, V. M. et al. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis? *Molecular Pharmacology*, v. 59, n. 4, p. 657-663, 1 abr. 2001.
<https://doi.org/10.1124/mol.59.4.657>

GOPALAKRISHNAN, D. et al. Water soluble Ru(II)-arene complexes of the antidiabetic drug metformin: DNA and protein binding, molecular docking, cytotoxicity and apoptosis-inducing activity. *RSC Advances*, v. 7, n. 60, p. 37706-37719, 2017.
<https://doi.org/10.1039/C7RA06514K>

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 8, n. 4, p. 419-433, abr. 2010.
<https://doi.org/10.1586/eri.10.19>

GOTTLIEB, E. et al. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, v. 10, n. 6, p. 709-717, jun. 2003.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401231>

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 7, n. 12, p. a006080, dez. 2015a.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 7, n. 12, p. a006080, dez. 2015b.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>

GUPTA, R. K. et al. DNA/Protein Binding, Molecular Docking, and in Vitro Anticancer Activity of Some Thioether-Dipyrrinato Complexes. *Inorganic Chemistry*, v. 52, n. 24, p. 13984-13996, 16 dez. 2013.
<https://doi.org/10.1021/ic401662d>

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. *Molecular Biology*

International, v. 2011, p. 1-23, 2011.
<https://doi.org/10.4061/2011/571242>

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? Trends in Pharmacological Sciences, v. 32, n. 3, p. 125-130, mar. 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002>

HAN, B.-J. et al. DNA interaction, antioxidant activity, and bioactivity studies of two ruthenium(II) complexes. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 135, p. 840-849, jan. 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.07.075>

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, v. 144, n. 5, p. 646-674, mar. 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HARTINGER, C. G. et al. KP1019, A New Redox-Active Anticancer Agent - Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients. Chemistry & Biodiversity, v. 5, n. 10, p. 2140-2155, out. 2008.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.200890195>

HELMS, M. J. Bloodstream form Trypanosoma brucei depend upon multiple metacaspases associated with RAB11-positive endosomes. Journal of Cell Science, v. 119, n. 6, p. 1105-1117, 21 fev. 2006.
<https://doi.org/10.1242/jcs.02809>

HENKE, M. M. et al. Pharmacokinetic study of sodium trans[tetrachlorobis(1H-indazole)-ruthenate (III)]-indazole hydrochloride (1:1.1) (FFC14A) in patients with solid tumors. Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, v. 47, n. 01, p. 58-60, 1 jan. 2009.
<https://doi.org/10.5414/CP47058>

HO, G. Y.; WOODWARD, N.; COWARD, J. I. G. Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies. Critical Reviews in Oncology/Hematology, v. 102, p. 37-46, jun. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.03.014>

HUANG, H.-W. et al. Sinularin Selectively Kills Breast Cancer Cells Showing G2/M Arrest, Apoptosis, and Oxidative DNA Damage. Molecules, v. 23, n. 4, p. 849, 8 abr. 2018.
<https://doi.org/10.3390/molecules23040849>

INIGUEZ, E. et al. Metal-drug synergy: new ruthenium(II) complexes of ketoconazole are highly active against Leishmania major and Trypanosoma cruzi and nontoxic to human or murine normal cells. JBIC Journal of Biological

Inorganic Chemistry, v. 18, n. 7, p. 779-790, out. 2013.
<https://doi.org/10.1007/s00775-013-1024-2>

INIGUEZ, E. et al. Ruthenium-Clotrimazole complex has significant efficacy in the murine model of cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, v. 164, p. 402-410, dez. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.029>

IRACE, C. et al. Antiproliferative effects of ruthenium-based nucleolipidic nanoaggregates in human models of breast cancer in vitro: insights into their mode of action. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 45236, maio 2017.
<https://doi.org/10.1038/srep45236>

ISHIDA, S. et al. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 22, p. 14298-14302, 29 out. 2002.
<https://doi.org/10.1073/pnas.162491399>

JAYAKUMAR, T. et al. Possible Molecular Targets of Novel Ruthenium Complexes in Antiplatelet Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 6, p. 1818, 20 jun. 2018.
<https://doi.org/10.3390/ijms19061818>

JEFFERS, J. R. et al. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell*, v. 4, n. 4, p. 321-328, out. 2003.
[https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00244-7](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00244-7)

JELK, J. et al. Anti-parasitic dinuclear thiolato-bridged arene ruthenium complexes alter the mitochondrial ultrastructure and membrane potential in *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Experimental Parasitology*, v. 205, p. 107753, out. 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107753>

JIANG, G.-B. et al. Design and synthesis of new ruthenium polypyridyl complexes with potent antitumor activity in vitro. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 220, p. 117132, set. 2019a.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.05.037>

JIANG, G.-B. et al. New ruthenium polypyridyl complexes functionalized with fluorine atom or furan: Synthesis, DNA-binding, cytotoxicity and antitumor mechanism studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, p. 117534, out. 2019b.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117534>

JOHNSTONE, T. C.; SUNTHARALINGAM, K.; LIPPARD, S. J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and

Pt(IV) Prodrugs. Chemical Reviews, v. 116, n. 5, p. 3436-3486, 9 mar. 2016.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00597>

KARAMI, K. et al. Synthesis and characterization of two new trans palladium (II) complexes containing benzylamine ligand: DNA/BSA interactions, molecular docking and in vitro cytotoxic activity. Inorganica Chimica Acta, v. 471, p. 797-807, fev. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.02.027>

KORGAONKAR, N.; YADAV, K. S. Understanding the biology and advent of physics of cancer with perspicacity in current treatment therapy. Life Sciences, v. 239, p. 117060, dez. 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117060>

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death & Differentiation, v. 16, n. 1, p. 3-11, jan. 2009.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>

KROEMER, G.; ZAMZAMI, N.; SUSIN, S. A. Mitochondrial control of apoptosis. p. 8, [s.d.].

K.S., N. et al. Organoruthenium (II) complexes featuring pyrazole-linked Schiff base ligands: Crystal structure, DNA/BSA interactions, cytotoxicity and molecular docking: Half-sandwiched ruthenium complexes Pyrazole schiff base ligand. Applied Organometallic Chemistry, v. 33, n. 3, p. e4751, mar. 2019.
<https://doi.org/10.1002/aoc.4751>

LEDEZMA, E. et al. Antiproliferative and leishmanicidal effect of ajoene on various Leishmania species: ultrastructural study. Parasitology Research, v. 88, n. 8, p. 748-753, 1 ago. 2002.
<https://doi.org/10.1007/s00436-002-0649-9>

LEE, S. W. et al. SUMOylation of hnRNP-K is required for p53-mediated cell-cycle arrest in response to DNA damage: hnRNP-K SUMOylation for cell-cycle arrest. The EMBO Journal, v. 31, n. 23, p. 4441-4452, 28 nov. 2012.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2012.293>

LEIJEN, S. et al. Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. Investigational New Drugs, v. 33, n. 1, p. 201-214, fev. 2015.
<https://doi.org/10.1007/s10637-014-0179-1>

LI, Y. et al. Polypyridyl Ruthenium(II) complex-induced mitochondrial membrane potential dissipation activates DNA damage-mediated apoptosis to inhibit liver

cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 164, p. 282-291, fev. 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.041>

LIU, J. et al. Functionalization and Cancer-targeting Design of Ruthenium Complexes for Precise Cancer Therapy. *Chemical Communications*, v. 55, 20 jul. 2019.
<https://doi.org/10.1039/C9CC04098F>

LU, Y. et al. Ruthenium Complexes Induce HepG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cell Apoptosis and Inhibit Cell Migration and Invasion through Regulation of the Nrf2 Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 5, p. 775, 19 maio 2016.
<https://doi.org/10.3390/ijms17050775>

LUQUE-ORTEGA, J. R. et al. New Benzophenone-Derived Bisphosphonium Salts as Leishmanicidal Leads Targeting Mitochondria through Inhibition of Respiratory Complex II. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 4, p. 1788-1798, 25 fev. 2010.
<https://doi.org/10.1021/jm901677h>

MACHADO, P. DE A. et al. High selective antileishmanial activity of vanadium complex with stilbene derivative. *Acta Tropica*, v. 148, p. 120-127, ago. 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.018>

MACHADO, P. DE A. et al. VOSalophen: a vanadium complex with a stilbene derivative-induction of apoptosis, autophagy, and efficiency in experimental cutaneous leishmaniasis. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 22, n. 6, p. 929-939, ago. 2017.
<https://doi.org/10.1007/s00775-017-1471-2>

MAKIN, G. W. J. Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate. *The EMBO Journal*, v. 20, n. 22, p. 6306-6315, 15 nov. 2001.
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.22.6306>

MARTÍNEZ, A. et al. Searching for New Chemotherapies for Tropical Diseases: Ruthenium-Clotrimazole Complexes Display High in Vitro Activity against *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* and Low Toxicity toward Normal Mammalian Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 55, n. 8, p. 3867-3877, 26 abr. 2012.
<https://doi.org/10.1021/jm300070h>

MARULLO, R. et al. Cisplatin Induces a Mitochondrial-ROS Response That Contributes to Cytotoxicity Depending on Mitochondrial Redox Status and Bioenergetic Functions. *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, p. e81162, 19 nov. 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081162>

MATSUMURA, H. et al. Necrotic Death Pathway in FAS Receptor Signaling. *The Journal of Cell Biology*, v. 151, n. 6, p. 1247-1256, 11 dez. 2000.
<https://doi.org/10.1083/jcb.151.6.1247>

MAXFIELD, L.; CRANE, J. S. Leishmaniasis. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.

MCQUAID, K. et al. X-ray Crystal Structures Show DNA Stacking Advantage of Terminal Nitrile Substitution in Ru-dppz Complexes. *Chemistry - A European Journal*, v. 24, n. 59, p. 15859-15867, 22 out. 2018.
<https://doi.org/10.1002/chem.201803021>

MEGGERS, E. Exploring biologically relevant chemical space with metal complexes. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 11, n. 3, p. 287-292, jun. 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.05.013>

MEHTA, A.; SHAHA, C. Apoptotic Death in *Leishmania donovani* Promastigotes in Response to Respiratory Chain Inhibition: COMPLEX II INHIBITION RESULTS IN INCREASED PENTAMIDINE CYTOTOXICITY. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 12, p. 11798-11813, 19 mar. 2004.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M309341200>

MENDES, E. A. et al. C5 induces different cell death pathways in promastigotes of *Leishmania amazonensis*. *Chemico-Biological Interactions*, v. 256, p. 16-24, ago. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.018>

MENNA-BARRETO, R. F. S. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. *Cell Death & Disease*, v. 10, n. 2, p. 93, fev. 2019.
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1370-2>

MESLIN, B. et al. Are protozoan metacaspases potential parasite killers? *Parasites & Vectors*, v. 4, n. 1, p. 26, 2011.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-26>

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 69, n. 5, p. 363-385, set. 2019.
<https://doi.org/10.3322/caac.21565>

MIRANDA, V. M. et al. In vitro leishmanicidal activity and theoretical insights into biological action of ruthenium(II) organometallic complexes containing anti-inflammatories. *BioMetals*, v. 31, n. 6, p. 1003-1017, dez. 2018.
<https://doi.org/10.1007/s10534-018-0145-z>

MISERACHS, H. G. et al. Antitumor and antiparasitic activity of novel ruthenium compounds with polycyclic aromatic ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 150, p. 38-47, set. 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.06.007>

MOHAMED SUBARKHAN, M. K. et al. Novel tetranuclear ruthenium(II) arene complexes showing potent cytotoxic and antimetastatic activity as well as low toxicity in vivo. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 179, p. 246-256, out. 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.061>

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez. 1983.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

MULLER, P. A. J.; VOUSDEN, K. H. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell*, v. 25, n. 3, p. 304-317, mar. 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.021>

MURRAY, B. S.; DYSON, P. J. Recent progress in the development of organometallics for the treatment of cancer. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 56, p. 28-34, jun. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.11.001>

NAGAI, N. et al. Decomposition Kinetics of Cisplatin in Human Biological Fluids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 48, n. 9, p. 918-924, set. 1996.
<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1996.tb06002.x>

NASCIMENTO, N. R. F. DO et al. In vitro and in vivo leishmanicidal activity of a ruthenium nitrosyl complex against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Tropica*, v. 192, p. 61-65, abr. 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.021>

NAVES, M. A. et al. Transport of the Ruthenium Complex [Ru(GA)(dppe)₂]PF₆ into Triple-Negative Breast Cancer Cells Is Facilitated by Transferrin Receptors. *Molecular Pharmaceutics*, v. 16, n. 3, p. 1167-1183, 4 mar. 2019.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01154>

NEWTON, K. et al. Activity of Protein Kinase RIPK3 Determines Whether Cells Die by Necroptosis or Apoptosis. *Science*, v. 343, n. 6177, p. 1357-1360, 21 mar. 2014.
<https://doi.org/10.1126/science.1249361>

NGUEWA, P. A. et al. Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness? Trends in Parasitology, v. 20, n. 8, p. 375-380, ago. 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.05.006>

NING, J.; WAKIMOTO, H. Therapeutic Application of PARP Inhibitors in Neuro-Oncology. Trends in Cancer, v. 6, n. 2, p. 147-159, fev. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.12.004>

NUNES, D. C. DE O. et al. In vitro additive interaction between ketoconazole and antimony against intramacrophage Leishmania (Leishmania) amazonensis amastigotes. PLOS ONE, v. 12, n. 6, p. e0180530, 29 jun. 2017.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180530>

ODA, E. Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. Science, v. 288, n. 5468, p. 1053-1058, 12 maio 2000.
<https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1053>

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 460, n. 1, p. 72-81, abr. 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.137>

OTERA, H.; MIHARA, K. Mitochondrial Dynamics: Functional Link with Apoptosis. International Journal of Cell Biology, v. 2012, p. 1-10, 2012.
<https://doi.org/10.1155/2012/821676>

OUN, R.; MOUSSA, Y. E.; WHEATE, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. Dalton Transactions, v. 47, n. 19, p. 6645-6653, 2018.
<https://doi.org/10.1039/C8DT00838H>

PETROVIĆ, M.; TODOROVIĆ, D. BIOCHEMICAL AND MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION OF CISPLATIN IN CANCER CELLS. p. 7, [s.d.].

PETTINARI, R. et al. Arene-Ruthenium(II) Acylpyrazolonato Complexes: Apoptosis-Promoting Effects on Human Cancer Cells. Journal of Medicinal Chemistry, v. 57, n. 11, p. 4532-4542, 12 jun. 2014.
<https://doi.org/10.1021/jm500458c>

PONGRATZ, M. et al. Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, v. 19, n. 1, p. 46, 2004.
<https://doi.org/10.1039/b309160k>

PROTO, W. R.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 58-66, jan. 2013.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2929>

QIN, Q.-P. et al. High in Vitro and in Vivo Tumor-Selective Novel Ruthenium(II) Complexes with 3-(2'-Benzimidazolyl)-7-fluoro-coumarin. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, v. 10, n. 6, p. 936-940, 13 jun. 2019.
<https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00098>

RABIK, C. A.; DOLAN, M. E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*, v. 33, n. 1, p. 9-23, fev. 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2006.09.006>

RADEMAKER-LAKHALI, J. M. A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent. *Clinical Cancer Research*, v. 10, n. 11, p. 3717-3727, 1 jun. 2004.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0746>

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, dez. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>

REECE, S. E. et al. The Meaning of Death: Evolution and Ecology of Apoptosis in Protozoan Parasites. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 12, p. e1002320, 8 dez. 2011.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002320>

RIBEIRO, G. A. et al. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, n. 4, p. 789-799, 1 abr. 2013.
<https://doi.org/10.1093/jac/dks498>

RICCARDI, C. et al. Anticancer Ruthenium(III) Complexes and Ru(III)-Containing Nanoformulations: An Update on the Mechanism of Action and Biological Activity. *Pharmaceuticals*, v. 12, n. 4, p. 146, 26 set. 2019.
<https://doi.org/10.3390/ph12040146>

RIGOLET, M.; YOBOUE, E. D.; DEVIN, A. Mitochondrial ROS Generation and Its Regulation: Mechanisms Involved in H₂O₂ Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 14, n. 3, p. 459-468, fev. 2011.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3363>

RILAK SIMOVIĆ, A. et al. Chemistry and reactivity of ruthenium(II) complexes: DNA/protein binding mode and anticancer activity are related to the complex structure. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 398, p. 113011, nov. 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.07.008>

SADHASIVAM, J.; SUGUMARAN, A. Magnetic nanocarriers: Emerging tool for the effective targeted treatment of lung cancer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 55, p. 101493, fev. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101493>

SANCHEZ-DELGADO, R. A. et al. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 1. Enhancement of the efficacy of clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by complexation to ruthenium in RuCl₂(clotrimazole)₂. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 36, n. 14, p. 2041-2043, jul. 1993.
<https://doi.org/10.1021/jm00066a014>

SÁNCHEZ-DELGADO, R. A. et al. Toward a novel metal based chemotherapy against tropical diseases 4. Synthesis and characterization of new metal-clotrimazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. *Inorganica Chimica Acta*, v. 275-276, p. 528-540, jul. 1998.
[https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(98\)00114-5](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(98)00114-5)

SÁNCHEZ-DELGADO, R. A. Metal Complexes as Chemotherapeutic Agents Against Tropical Diseases: Trypanosomiasis, Malaria and Leishmaniasis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 4, n. 1, p. 23-30, 1 jan. 2004.
<https://doi.org/10.2174/1389557043487493>

SAVA, G. et al. Treatment of metastases of solid mouse tumours by NAMI-A: comparison with cisplatin, cyclophosphamide and dacarbazine. *Anticancer Research*, v. 19, n. 2A, p. 969-972, abr. 1999.

SCARIOT, D. B. et al. Induction of Early Autophagic Process on *Leishmania amazonensis* by Synergistic Effect of Miltefosine and Innovative Semi-synthetic Thiosemicarbazone. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, 21 fev. 2017.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00255>

SHADAB, MD. et al. Apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani* treated with KalsomeTM10, a new liposomal amphotericin B. *PLOS ONE*, v. 12, n. 2, p. e0171306, 7 fev. 2017.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171306>

SHALINI, S. et al. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death & Differentiation*, v. 22, n. 4, p. 526-539, abr. 2015.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>

SILVA, H. V. R. et al. Phosphine/diimine ruthenium complexes with Cl⁻, CO, NO⁺, NO₂⁻, NO₃⁻ and pyridine ligands: Pro-apoptotic activity on triple-negative breast cancer cells and DNA/HSA interactions. *Polyhedron*, v. 144, p. 55-65, abr. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.poly.2018.01.005>

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v. 175, n. 1, p. 184-191, mar. 1988.

[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

SMIRLIS, D. et al. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. *Parasites & Vectors*, v. 3, n. 1, p. 107, 2010.

<https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-107>

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, v. 10, n. 1, p. 82, dez. 2017.

<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>

STEWART, B. W.; WILD, C. World cancer report 2014, 2014.

<https://doi.org/10.12968/nuwa.2014.10.2.1142051>

TANG, J.-Y. et al. Oxidative stress-modulating drugs have preferential anticancer effects - involving the regulation of apoptosis, DNA damage, endoplasmic reticulum stress, autophagy, metabolism, and migration. *Seminars in Cancer Biology*, v. 58, p. 109-117, out. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.08.010>

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. p. 16, [s.d.].

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 8, n. 7, p. 579-591, jul. 2009.

<https://doi.org/10.1038/nrd2803>

TRONDL, R. et al. NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. *Chem. Sci.*, v. 5, n. 8, p. 2925-2932, 4 abr. 2014.

<https://doi.org/10.1039/C3SC53243G>

TSUCHIDA, N.; MURUGAN, A. K.; GRIECO, M. Kirsten Ras* oncogene: Significance of its discovery in human cancer research. *Oncotarget*, v. 7, n. 29, p. 46717-46733, 19 jul. 2016.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.8773>

VELÁSQUEZ, A. M. A. et al. Antiprotozoal Activity of the Cyclopalladated Complexes Against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2015.
<https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150360>

VERCAMMEN, D. et al. Are metacaspases caspases? *Journal of Cell Biology*, v. 179, n. 3, p. 375-380, 5 nov. 2007.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200705193>

VERÇOZA, B. R. F. et al. KH-TFMDI, a novel sirtuin inhibitor, alters the cytoskeleton and mitochondrial metabolism promoting cell death in *Leishmania amazonensis*. *Apoptosis*, v. 22, n. 9, p. 1169-1188, set. 2017.
<https://doi.org/10.1007/s10495-017-1397-8>

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering, Design and Selection*, v. 8, n. 2, p. 127-134, 1995.
<https://doi.org/10.1093/protein/8.2.127>

WAN, D. et al. Synthesis and anticancer properties of ruthenium (II) complexes as potent apoptosis inducers through mitochondrial disruption. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 139, p. 180-190, out. 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.066>

WILLIAMSON, J.; SCOTT-FINNIGAN, T. J. Trypanocidal Activity of Antitumor Antibiotics and Other Metabolic Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 13, n. 5, p. 735-744, 1 maio 1978.
<https://doi.org/10.1128/AAC.13.5.735>

XIONG, W. et al. Adverse effects of chemoradiotherapy on invasion and metastasis of tumor cells. *Genes & Diseases*, p. S2352304220300568, abr. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.04.004>

YAMADA, K.; YOSHIDA, K. Mechanical insights into the regulation of programmed cell death by p53 via mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1866, n. 5, p. 839-848, maio 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.02.009>

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 9, n. 1, p. 47-59, jan. 2008.
<https://doi.org/10.1038/nrm2308>

YU, Q. et al. Ruthenium(II) polypyridyl complexes: Cellular uptake, cell image and apoptosis of HeLa cancer cells induced by double targets. *European Journal*

of Medicinal Chemistry, v. 82, p. 82-95, jul. 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.05.040>

YUAN, J.; KROEMER, G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes & Development*, v. 24, n. 23, p. 2592-2602, 1 dez. 2010.
<https://doi.org/10.1101/gad.1984410>

ZARIĆ, R. Ž.; PIRKOVIĆ, M. S.; HAMZAGIĆ, N. Ruthenium(II) Complexes as Potential Apoptosis Inducers in Cancer Therapy. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, v. 0, n. 0, 15 jul. 2019.
<https://doi.org/10.2478/sjocr-2019-0016>

ZHANG, J. et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, p. 1-18, 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/4350965>

ZORBAS, H.; KEPPLER, B. K. Cisplatin Damage: Are DNA Repair Proteins Saviors or Traitors to the Cell? *ChemBioChem*, v. 6, n. 7, p. 1157-1166, 4 jul. 2005.
<https://doi.org/10.1002/cbic.200400427>

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLITT, S. J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v. 1757, n. 5-6, p. 509-517, maio 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.04.029>

ZOROVA, L. D. et al. Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*, v. 552, p. 50-59, jul. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>