

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LETICIA HELENA PARREIRA

**EFICÁCIA ANTITUMORAL DE UM COMPLEXO DE RUTÊNIO CONTENDO ÁCIDO
TRANS-4-TRIFLUOROMETIL-CINÂMICO EM MELANOMA MURINO**

ALFENAS/MG

2024

LETICIA HELENA PARREIRA

**EFICÁCIA ANTITUMORAL DE UM COMPLEXO DE RUTÊNIO CONTENDO ÁCIDO
TRANS-4-TRIFLUOROMETIL-CINÂMICO EM MELANOMA MURINO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Saúde.

Linha de Pesquisa: Biologia Celular e Tumoral

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Pollyanna Francielli de Oliveira

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Parreira, Leticia Helena.

Eficácia antitumoral de um complexo de rutênio contendo ácido trans-4-trifluorometil-cinâmico em melanoma murino / Leticia Helena Parreira. - Alfenas, MG, 2024.

79 f. : il. -

Orientador(a): Pollyanna Francielli de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Carcinogênese. 2. Complexos metálicos. 3. Melanoma. 4. Quimioterapia. 5. Ru (II). I. de Oliveira, Pollyanna Francielli, orient. II. Título.

LETICIA HELENA PARREIRA

EFICÁCIA ANTITUMORAL DE UM COMPLEXO DE RUTÊNIO CONTENDO ÁCIDO TRANS-4-TRIFLUOROMETIL-CINÂMICO EM MELANOMA MURINO

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicada à Saúde

Aprovada em: 31 de outubro de 2024.

Profa. Dra. Pollyanna Francielli de Oliveira

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal Alfenas

UNIFAL-MG

Profa. Dra. Elaine Conceição de Oliveira

Instituição: Universidade Estadual de Campinas

UNICAMP

Profa. Dra. Mariane Gonçalves Santos

Instituição: Universidade Federal Alfenas

UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Pollyanna Francielli de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 01/11/2024, às 09:23, 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://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1375041** e o código CRC **ADBE8B8C**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo apoio e dedicação para que eu pudesse estar aqui. Aos meus irmãos, minha base e inspiração. À toda minha família e amigos que me auxiliaram a trilhar esse caminho, sem eles nada seria possível!

À Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), por todas as oportunidades aqui oferecidas, contribuindo diretamente para minha formação acadêmica. A todos os professores, antigos e novos, que me tornaram uma profissional crítica e apaixonada pela ciência.

Agradeço ao Laboratório de Genética Humana da UNIFAL-MG, seus integrantes atuais e egressos. Especialmente ao grupo de Genética Toxicológica que desde o início me recebeu, apoiou e faz parte desse trabalho. Aos meus colegas de trabalho, que eventualmente se tornaram amigos, meus sinceros agradecimentos!

Extremamente grata à Profa. Dra. Pollyanna Francielli de Oliveira, pela inspiração e companheirismo nesta caminhada. Admirável pessoa e cientista, agradeço pela confiança, conhecimento compartilhado e apoio. Foi um privilégio trilhar essa jornada sob sua orientação.

Aos colaboradores, sem os quais este trabalho não alcançaria qualidade científica e metodológica. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Código de Financiamento 13991) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (APQ-01683-23).

O presente trabalho intitulado “Eficácia antitumoral de um complexo de Rutênio contendo ácido trans-4-trifluorometil-cinâmico em melanoma murino” foi realizada com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Mesmo diante dos avanços promissores na terapia, a quimioterapia clássica não demonstra especificidade, além de apresentar efeitos adversos para os pacientes. No contexto das neoplasias mais agressivas, caracterizadas por uma alta taxa de mortalidade, apesar da baixa incidência, destaca-se o melanoma, um tumor de pele originado nos melanócitos. Diante de tal problemática, a busca por novos agentes que possam melhorar as propostas terapêuticas para o melanoma se mostra relevante. Neste sentido, os complexos metálicos com centro estrutural baseado no rutênio II (Ru (II)) têm demonstrado promissora atividade antitumoral. Sua geometria octaédrica, caracterizada por um número significativo de sítios de coordenação, permitiu a conjugação de um complexo de Ru (II) com um composto fenólico, o ácido trans-4-trifluorometil-cinâmico, produzindo o complexo denominado {[Ru(ácido trans-4-trifluorometil-cinâmico) (dppb)(bipy)]PF₆}, o qual foi chamado de Transcinam. Em estudos prévios envolvendo culturas celulares de melanoma, Transcinam foi capaz de inibir a progressão do ciclo celular na fase G1 e induzir a apoptose. Objetivamos neste estudo, avaliar a atividade antitumoral do Transcinam em modelo singênico de melanoma murino. Para indução tumoral, células B16-F10 foram inoculadas em camundongos C57BL/6 machos, os quais foram tratados por 5 dias consecutivos após o aparecimento do tumor, com três diferentes doses de Transcinam [2,5; 5 e 10 mg/kg peso corpóreo (p.c.)], subcutaneamente (s.c.) e com cisplatina (CDDP 7 mg/kg p.c. s.c.). Parâmetros genotóxicológicos e moleculares foram investigados. Os resultados demonstraram que Transcinam, nas três doses testadas (2,5; 5 e 10 mg/kg p.c.) reduziu o crescimento tumoral sem aumentar o consumo hídrico e reduzir o consumo alimentar. Na dose de 5 mg/kg p.c., Transcinam não causou redução no peso corpóreo e nas doses de 5 e 10 mg/kg p.c. foi possível observar a redução dos níveis séricos de creatinina e ureia, TGO e TGP quando comparados com CDDP. O tratamento com Transcinam não impactou significativamente no peso dos órgãos, principalmente na dose de 5 mg/kg p.c., diferente da CDDP. Na medula óssea e no sangue periférico, a razão EPC/EPC+ENC demonstrou que Transcinam não apresentou efeitos citotóxicos enquanto as análises de micronúcleos revelaram a presença desses biomarcadores, ainda que inferiores ao grupo CDDP. Transcinam demonstrou uma forte ligação com o DNA por interação com os sulcos e aumento de danos pelo ensaio cometa, mas

quando comparado ao grupo CDDP, tais lesões foram significativamente menores. A expressão de PCNA no tecido tumoral mostrou-se reduzida após o tratamento com Transcinam evidenciando redução da proliferação celular. Tais achados, indicam que Transcinam possui um efeito antitumoral promissor, capaz de reduzir a proliferação celular, sem induzir toxicidade sistêmica.

Palavras-chave: carcinogênese; complexos metálicos; melanoma; quimioterapia; Ru (II).

ABSTRACT

Despite the promising advances in therapy, classic chemotherapy is nonspecific, besides generating adverse effects for patients. In the context of the most aggressive neoplasms, characterized by a high mortality rate, although low incidence, melanoma stands out, a cutaneous tumor originating from melanocytes. In face of such a problem, the identification of new agents that can improve treatment proposals for melanoma is relevant. Therefore, metal complexes with a structural center based on ruthenium II (Ru (II)) have shown promising antitumor activity. Its octahedral geometry characterized by a significant number of coordination sites, allowed us to conjugate Ru (II) with a phenolic compound, trans-4-trifluoromethyl-cinnamic acid, generating a complex known as Transcinam {[Ru(trans-4-trifluoromethyl-cinnamic acid) (dppb)(bipy)]PF₆}. In previous studies involving melanoma cell cultures, Transcinam was able to inhibit cell cycle progression in the G1 phase and induce apoptosis. Thus, this study aimed to evaluate the antitumoral activity of Transcinam in murine melanoma syngeneic model. For tumor induction, B16-F10 cells were inoculated into male C57BL/6 mice, which were treated for 5 consecutive days after tumor growth, with three different doses of Transcinam [2.5; 5 and 10 mg/kg body weight (b.w.)], subcutaneously (s.c.) and cisplatin (CDDP 7 mg/kg b.w. s.c.). Genotoxicological and molecular parameters were investigated. The results demonstrated that Transcinam, in the three tested doses (2.5; 5 and 10 mg/kg b.w.), reduced tumor growth without increasing water consumption and reducing food consumption. In the dose of 5 mg/kg b.w., Transcinam did not cause significant weight reduction, and in doses of 5 and 10 mg/kg b.w. it was possible to observe a reduction in serum creatinine, urea, GOT and GPT levels, when compared to CDDP. Treatment with Transcinam did not impact significantly the organs weight, especially at 5 mg/kg b.w. dose, unlike CDDP. In bone marrow and peripheral blood, the EPC/EPC+ENC ratio demonstrated that Transcinam did not exhibit cytotoxic effects, while micronucleus analyses revealed the presence of these biomarkers, although at levels lower than those in the CDDP group. Transcinam showed strong DNA binding through groove interaction and increased damage in the comet assay; however, when compared to the CDDP group, such lesions were significantly reduced. PCNA expression in tumor tissue was decreased after treatment with Transcinam, indicating a reduction in cell proliferation. These findings suggest that Transcinam has

promising antitumor effects, capable of reducing cell proliferation without inducing systemic toxicity.

Keywords: carcinogenesis; chemotherapy; melanoma; metal complexes; Ru (II).

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura química da cisplatina. | 22 |
| Figura 2 - Estrutura química de um complexo de Ru (II). | 25 |
| Figura 3 - Estrutura química do ácido trans-4-trifluormetil-cinâmico. | 28 |
| Figura 4 - Estrutura química do Transcinam. | 28 |
| Figura 5 - Avaliação antitumoral em camundongos C57BL/6 tratados por 5 dias consecutivos. Em (A) dados de peso do tumor (g) e (B) imagem representativa dos tumores. | 41 |
| Figura 6 - Consumo hídrico (mL) (A), alimentar (g) (B) e ganho ou perda peso corpóreo (g) (C) em camundongos C57BL/6 tratados por 5 dias consecutivos. | 43 |
| Figura 7 - Peso dos órgãos (g) de camundongos C57BL/6 tratados por 5 dias consecutivos. | 45 |
| Figura 8 - Níveis séricos de (A) creatinina, (B) ureia em mg/dL e (C) TGO, TGP (D) em u/L no sangue de camundongos C57BL/6 tratados por 5 dias consecutivos. | 47 |
| Figura 9 - Citogenotoxicidade na medula óssea (A, C) e no sangue periférico (B, D) de camundongos C57BL/6 tratados por 5 dias consecutivos. | 50 |
| Figura 10 - Avaliação da genotoxicidade (A) e fotomicrografias do ensaio cometa (B) em hepatócitos de camundongos C57BL/6 após 5 dias de tratamentos consecutivos. | 51 |
| Figura 11 - Espectro de UV-Vis das titulações do Transcinam em <i>ct</i> -DNA. | 52 |
| Figura 12 - Quantificação imunohistoquímica de PCNA no tecido tumoral (A) e fotomicrografias do tecido tumoral parafinizado (B) de camundongos C57BL/6 após 5 dias de tratamentos consecutivos. | 53 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| ALT | <i>alanine aminotransferase</i> (alanina aminotransferase) |
| AST | <i>aspartate aminotransferase</i> (aspartato aminotransferase) |
| BALB/c | <i>mouse line - Mus musculus</i> (linhagem animal utilizada - <i>Mus musculus</i>) |
| BAX | <i>BCL-2 associated protein X, apoptosis regulator</i> (proteína associada a BCL-2, reguladora de apoptose) |
| BCL-2 | <i>BCL-2 apoptosis regulator</i> (reguladora de apoptose BCL-2) |
| B16F10 | <i>mouse fibroblast murine melanoma cell line</i> (linhagem celular de fibroblastos de camundongos derivada de melanoma murino) |
| <i>BRAF</i> | <i>B-Raf proto-oncogene</i> (B-Raf proto-oncogene) |
| CASP3 | <i>caspase 3</i> (caspase 3) |
| CASP9 | <i>caspase 9</i> (caspase 9) |
| °C | graus Celsius |
| C57BL/6 | <i>mouse line - Mus musculus</i> (linhagem animal utilizada - <i>Mus musculus</i>) |
| CDDP | <i>Cis-diaminodichloroplatinum II, cisplatin</i> (Cis-diaminodicloroplatina II, cisplatina) |
| <i>CDKN2A</i> | <i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i> (inibidor de quinase dependente de ciclina 2A) |
| CHL-1 | <i>melanoma human cell line</i> (linhagem celular melanoma humano) |
| CHO | <i>chinese hamster ovary cell line</i> (linhagem celular de ovário de hamster chinês) |
| cm | centímetros |
| ct-DNA | <i>Calf thymus DNA</i> (DNA de timo de bezerro) |
| CYP450 | <i>P-450 cytochrome</i> (citocromo P-450) |

| | |
|---------|--|
| DMSO | <i>dimethyl sulfoxide</i> (dimetilsulfóxido) |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico) |
| ECV-304 | <i>transformed cells derived from human umbilical vein endothelial cells</i> (células transformadas derivadas de células endoteliais da veia umbilical humana), |
| ELISA | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ensaio de imunoadsorção enzimática) |
| G | grama |
| GM | <i>gentamicin</i> (gentamicina) |
| i.p. | intraperitoneal |
| kg | quilograma |
| L | litro |
| MEK | <i>mitogen-activated protein kinase</i> (proteína quinase ativada por mitógeno) |
| mg | miligrama |
| min | minuto |
| MITF | <i>Microphthalmia-Associated Transcription Factor</i> (fator de transcrição associado à microftalmia) |
| mL | mililitro |
| mm | milímetro |
| MN | <i>micronuclei</i> (micronúcleo) |
| mRNA | <i>messenger ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico mensageiro) |
| n | número |

| | |
|----------------|---|
| NF- κ B | nuclear factor kappa B (fator nuclear kappa B) |
| nm | <i>nanometers</i> (nanômetros) |
| <i>NF1</i> | <i>neurofibromin 1</i> (neurofibromina 1) |
| <i>NRAS</i> | <i>N-Ras proto-oncogene</i> (N-Ras proto-oncogene) |
| ref | <i>reference</i> (referência) |
| PTEN | <i>phosphatase and tensin homologue</i> (fosfatase homóloga à tesina) |
| p21 | <i>protein 21</i> (proteína 21) |
| p27 | <i>protein 27</i> (proteína 27) |
| s.c. | subcutâneo |
| SCID | <i>Severe Combined Immunodeficiency</i> (Imunodeficiência Combinada Grave) |
| TMZ | <i>temozolomide</i> (temozolomida) |
| Tp53 | <i>tumor protein p53</i> (proteína tumoral) |
| Transcinam | <i>[Ru(ácido trans-4-trifluoromethyl-cinnamic) (dppb)(bipy)]PF₆</i> [Ru(trans-acid-4-trifluorometil-cinâmico) (dppb)(bipy)]PF ₆ |
| μ L | microliters (microlitros) |
| UV | <i>ultraviolet</i> (ultravioleta) |
| UV-vis | <i>ultraviolet-visible spectroscopy</i> (espectroscopia ultravioleta-visível) |
| v | volume |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|--------|--|
| AC | ácido cinâmico |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina) |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFAL-MG |
| CI | controle implante |
| CS | controle solvente |
| CN | controle negativo |
| CP | controle positivo |
| DMEM | <i>Eagle's minimal essential medium</i> (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) |
| HDM2 | <i>Human Double Minute 2 Protein</i> (Proteína Humana Duplo Minuto 2) |
| EDTA | <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético) |
| EPCs | <i>polychromatic erythrocytes</i> (eritrócitos policromáticos) |
| ENCs | <i>normochromatic erythrocytes</i> (eritrócitos normocromáticos) |
| EPCMNs | <i>micronucleated polychromatic erythrocytes</i> (eritrócitos policromáticos micronucleados) |
| EROs | <i>oxygen reactive species</i> (espécies reativas de oxigênio) |
| MAPK | <i>mitogen-activated protein kinase</i> (proteína quinase ativada por mitógeno) |
| MDM2 | <i>murine double minute 2, proto-oncogene</i> (proto-oncogene de minuto duplo de roedor 2) |
| NRF2 | <i>nuclear factor- erythroid 2-related factor 2</i> (fator nuclear 2 relacionado ao eritróide 2) |

| | |
|---------|--|
| PCNA | <i>proliferating cell nuclear antigen</i> (antígeno nuclear de proliferação celular) |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato salino) |
| p.c. | peso corpóreo |
| qRT-PCR | <i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription</i> (transcrição reversa quantitativa em tempo real) |
| rpm | <i>rotations per minute</i> (rotações por minuto) |
| SAC | <i>anorexia-cachexia syndrome</i> (síndrome da anorexia-caquexia) |
| SFB | <i>bovine fetal serum</i> (soro fetal bovino) |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TGO | <i>glutamic-oxaloacetic transaminase</i> (transaminase glutâmico-oxaloacética) |
| TGP | <i>glutamic-pyruvic transaminase</i> (transaminase glutâmico-pirúvica) |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 19 |
| 2.1 | A carcinogênese e o desafio dos tratamentos..... | 19 |
| 2.2 | Melanoma metastático | 22 |
| 2.3 | Complexos de Rutênio | 24 |
| 2.4 | Ácido cinâmico | 26 |
| 3 | OBJETIVOS | 29 |
| 3.1 | Objetivo Geral | 29 |
| 3.2 | Objetivos Específicos | 29 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 4.1 | Obtenção do Transcinam | 30 |
| 4.2 | Cisplatina..... | 30 |
| 4.3 | Animais..... | 30 |
| 4.4 | Linhagem celular e condições de cultivo | 31 |
| 4.5 | Indução tumoral..... | 32 |
| 4.6 | Protocolo experimental..... | 32 |
| 4.7 | Avaliação da atividade antitumoral | 34 |
| 4.8 | Quantificação dos níveis séricos de creatinina, ureia, TGO e TGP | 34 |
| 4.9 | Avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade | 35 |
| 4.10 | Avaliação da genotoxicidade..... | 35 |
| 4.11 | Ensaio imunohistoquímico..... | 36 |
| 4.12 | Ensaio de interação com <i>ct</i> -DNA | 37 |
| 5 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 39 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 6 | RESULTADOS..... | 40 |
| 6.1 | Efeito antitumoral do Transcinam..... | 40 |
| 6.4 | Níveis séricos de creatinina, ureia, TGO e TGP..... | 46 |
| 6.7 | Ensaio de interação com <i>ct</i> -DNA | 52 |
| 6.8 | Análise imunohistoquímica..... | 53 |
| 7 | DISCUSSÃO..... | 54 |
| 8 | CONCLUSÃO | 66 |
| | REFERÊNCIAS..... | 67 |
| | ANEXO I..... | 79 |

1 INTRODUÇÃO

Caracterizado pela proliferação descontrolada de células que acarreta o desenvolvimento de tumores com potencial metastático oriundo de mutações, o câncer é considerado uma doença multicausal crônica (Hausman, 2019; Ralph *et al.*, 2008). É uma das principais enfermidades que acometem a população, tendo sido diagnosticados 19,3 milhões de novos casos da doença no mundo em 2020 e quase 20 milhões em 2022, sendo destes, mais de 600 mil casos no Brasil (IARC, 2020; 2022; INCA, 2021; 2023; Ferlay, 2020; Sung *et al.*, 2021; WHO, 2020). Tal aumento tem sido apontado como decorrente do desenvolvimento urbano e mudanças no estilo de vida (IARC, 2020; WHO, 2020). De modo geral, em média 8 milhões de mortes por ano estão amplamente relacionadas ao diagnóstico tardio (Sung *et al.*, 2021; Kotecha; Takami; Espinoza, 2016).

Dentre os cânceres mais agressivos, apesar de sua baixa incidência, o melanoma, é um tipo de câncer cutâneo heterogêneo, originado a partir de melanócitos que sofreram alterações genéticas e epigenéticas (Chopra; Rao, 2020; Leonardi *et al.*, 2018). Em 2022, foi relatado mais de 330 mil casos da doença no mundo, cujo as causas estão relacionadas muitas vezes à exposição excessiva contínua ou ocasional à luz solar, onde os raios UV podem induzir alterações genéticas, resultando em uma alta taxa de mutação (IARC, 2022; Raimondi, 2020; Sample, 2018). O tratamento de diversos cânceres apresenta desafios, especialmente, a falta de interesse e conscientização sobre os benefícios da prevenção, bem como investimentos que permitam uma prevenção precoce e a continuidade do tratamento (Penny; Wallace, 2015). Mesmo diante dos avanços terapêuticos, as taxas de mortalidade por câncer de pele do tipo melanoma ainda são altas (Liu *et al.*, 2016). Ademais, a utilização de fármacos convencionais limita-se a baixas taxas de resposta e especificidade, culminando em um aumento da dose nos tratamentos, o que resulta na manifestação de efeitos adversos críticos aos pacientes (Dehelean *et al.*, 2021; Ijaz *et al.*, 2018). Desse modo, torna-se relevante a busca por novas substâncias que visem a melhora das propostas quimioterapêuticas atuais para o melanoma. Nesse cenário, substâncias encontradas na natureza têm sido amplamente estudadas por apresentarem uma variedade de propriedades farmacológicas desde a antiguidade (Ijaz *et al.*, 2018). Estudos demonstram o impacto de compostos naturais nas múltiplas vias de sinalização envolvidas no

processo de carcinogênese, aumentando as taxas de respostas e reduzindo os efeitos adversos dos tratamentos. O baixo custo e a alta biodisponibilidade também tem sido alvo desses estudos (Dehelean *et al.*, 2021; Kim; Kim; 2018; Sauter, 2020).

Em contrapartida, complexos de rutênio II (Ru (II)), são compostos que contém íons de rutênio que podem se ligar a outros íons ou átomos. Recentemente, tem sido considerados promissores agentes antitumorais visto sua seletividade, efeito antiproliferativo e atividade anti-metastática, benefícios os quais já foram comprovados em estudo (Lee; Kim; Nam, 2020). Do mesmo modo, o ácido cinâmico (AC) e seus derivados, pertencentes à classe dos fenóis, metabólitos especiais abundantes em plantas, apresentam eficácia como agentes antioxidantes e anticâncer (De Baltas; Bedos-Belval, 2011; Pontiki *et al.*, 2014; Ruwizhi; Anderibigbe, 2020). Ensaio *in vitro* utilizando derivados de ácido cinâmico complexado com Ru (II) demonstraram efetividade na inibição da migração e proliferação celular de linhagens tumorais, mesmo em baixas concentrações (Negreti *et al.*, 2022). As características físico-químicas desses complexos associadas aos dados promissores da literatura acerca de seu efeito antiproliferativo, diante da vasta demanda na busca de novos compostos seletivos, justificam uma investigação mais aprofundada dessas estruturas no tratamento do câncer. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi investigar o potencial antitumoral de um complexo de Ru (II) contendo um derivado do ácido cinâmico em modelo singênico de melanoma murino.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A carcinogênese e o desafio dos tratamentos

Eventos mutagênicos, sejam eles advindos de alterações genéticas ou epigenéticas, desencadeiam diferentes tipos de neoplasias. O câncer é uma doença heterogênea que, em geral, desenvolve-se em múltiplas etapas. É principalmente caracterizada pela agressividade e proliferação descontroladas de células com potencial metastático (Basu, 2018; Hausman, 2019). Isso acontece devido a uma perturbação nas relações celulares, em que distúrbios genéticos podem interferir no ciclo celular, resultando em uma proliferação anormal (Basu, 2018; Hausman, 2019; Hanssanpour; Dehghani, 2017). O complexo processo de metástase também é uma característica marcante do processo de carcinogênese. De forma resumida, a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) favorece a migração e invasão das células para diferentes órgãos (Basu, 2018; Suhail *et al.*, 2019).

Fatores extrínsecos como a exposição a carcinógenos ambientais relacionados ao estilo de vida, como exposição solar, tabagismo, alimentação, bem como fatores intrínsecos caracterizados como fatores genéticos e mutações espontâneas, podem levar a ativação de oncogenes ou inativação dos genes supressores de tumor e de reparo (Wu *et al.*, 2018). Desse modo, esse processo complexo resulta na transformação de células normais em células malignas com um crescimento anormal e alto poder de divisão, bem como de invasão e capacidade de sofrer metástases (Basu, 2018; Peters; Gonzalez, 2018; Sahu *et al.*, 2021; Senga; Grose, 2021). Logo, mutações nos supressores de tumor e oncogenes contribuem, inicialmente, para o processo de carcinogênese. Os genes supressores são responsáveis pela regulação do ciclo celular e quando mutados ou inativados, sejam por alterações genéticas (deleções ou quebras cromossômicas) ou epigenéticas (hipermetilação de ilhas CpG), promovem a iniciação do processo de carcinogênese (Bashyam *et al.*, 2019; Basu, 2018; Porta-Pardo; Valencia; Godzik, 2020). Em contrapartida, mutações podem ser desencadeadas pela hipometilação no proto-oncogene, estimulando assim a divisão celular. Como resultado, o mesmo é caracterizado como oncogene, o qual suscita a replicação desordenada e contribui para o início do processo de replicação descontrolada. O acúmulo de mutações

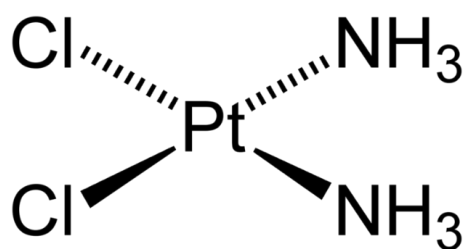
pode resultar em lesões em macromoléculas, sobretudo do DNA (Bashyam *et al.*, 2019; Basu, 2018; Porta-Pardo; Valencia; Godzik, 2020). A perda de estabilidade das células marca o processo de iniciação da oncogênese, seguida das fases de promoção e progressão tumoral. O primeiro estágio, apesar de uma divisão simétrica, é marcado por alterações genéticas e pela predisposição ou susceptibilidade das células normais em se tornarem malignas, sendo o agente iniciador considerado um carcinógeno completo, visto que uma exposição repetida em pequenas doses ou uma única elevada exposição a esses agentes desencadeia o processo de carcinogênese, uma vez que o efeito de um agente iniciador é irreversível e se soma aos demais. Na fase de promoção ocorrem novas mutações, sendo necessário um contato longo e contínuo com o agente cancerígeno. Alterações epigenéticas e genéticas continuam ocorrendo, mas há ainda um equilíbrio entre as taxas de proliferação e apoptose celular. Esse acúmulo de instabilidades leva à etapa subsequente, denominada progressão tumoral. Nessa fase final, as células multiplicam-se rapidamente, de forma que tal etapa se torna irreversível (Basu, 2018; Hanahan; Weinberg, 2011; Kotecha; Takami; Espinoza, 2016). Os aglomerados celulares já apresentam características malignas como instabilidade, crescimento descontrolado e metástase seguida de invasão que culminam ao processo de angiogênese, além de mudanças nas características bioquímicas, metabólicas e morfológicas (Oliveira *et al.*, 2007; Patterson *et al.*, 2018).

Somado a essas, novas marcas do câncer descritas apontam para uma sinalização proliferativa própria, visto que as células tumorais, por meio de fatores de crescimento, liberam sinais para que a proliferação e crescimento celular não cesse (Hanahan; Weinberg, 2011). Além disso, tais células contornam mecanismos celulares, evitando assim, os supressores de tumor. Nesse sentido, há uma resistência à morte celular, visto que há perda de função de Tp53, bem como aumento da expressão de reguladores antiapoptóticos ou de sinais de sobrevivência. Somado a isso, a maquinaria da inflamação utilizada a favor dessas células começa com a morte celular necrótica, visto que ao recrutar células do sistema imune, a angiogênese, proliferação e invasão podem ser um facilitador para as células cancerosas continuarem o processo (Hanahan; Weinberg, 2011). Recentemente, foram incluídas a desdiferenciação celular somada a plasticidade fenotípica, além do fato de que as células cancerosas também estão susceptíveis a

fatores epigenéticos que contribuem na reprogramação e evolução do câncer (Hanahan, 2022). A microbiota intestinal também foi apontada como envolvida no processo, uma vez que tem chamado atenção das novas pesquisas envolvendo saúde e doenças, principalmente o câncer colorretal. Isso porque o microbioma é bastante heterogêneo, envolvendo diferentes espécies bacterianas protetoras do câncer e promotores de tumores, além de envolverem também o sistema imunológico. De forma aditiva, foram reconhecidas microbiotas específicas presentes em tumores sólidos. Nesse sentido, em conjunto, tais marcas desafiam cada vez mais, os tratamentos oncológicos (Hanahan, 2022).

Constituindo um problema de saúde pública, estima-se o surgimento de 704 mil novos casos de câncer por ano no Brasil no triênio 2023-2025 (INCA, 2022; 2023). O aumento da incidência advém de processos como urbanização e com consequente mudança no estilo de vida, levando a uma maior exposição a fatores de risco (Bray *et al.*, 2018). Apesar dos avanços da ciência, as novas descobertas e estratégias para o tratamento de diversos tipos de cânceres não tem demonstrado uma melhora na cura e sobrevida da maioria dos pacientes. A baixa eficácia dos tratamentos clássicos está relacionada à resistência, baixa especificidade e toxicidade dos fármacos convencionais (Dehelean *et al.*, 2021; Ijaz *et al.*, 2018). Para a maioria dos pacientes oncológicos não são utilizados tratamentos com terapias alvo-específica, principalmente dentro Sistema de Saúde Único Brasileiro (SUS), uma vez que grande parte da população recebe tratamentos não específicos (Barrios *et al.*, 2023; Da-Silva; O'Dwyer; Osorio-de-Castro, 2019; Kaliks *et al.*, 2017). Nesse sentido, tais tratamentos podem ser constituídos por fármacos citotóxicos envolvidos na via das MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) quinases, sendo imunomoduladores e/ou inibidores de genes como o proto oncogene *BRAF* e a proteína quinase ativada por mitógeno (MEK), os quais têm um papel fundamental no crescimento celular (Rodríguez *et al.*, 2016; Ullah *et al.*, 2022). Dentre as propostas de tratamentos oncológicos, os complexos de platina (Pt) são comumente utilizados em 50% dos tratamentos, como a oxiplatina e a cisplatina (Cis-diaminodichloroplatina II, CDDP), um quimioterápico clássico cuja estrutura é formada por um átomo central de Pt ligado a dois átomos de cloro e a dois átomos de amônia (Figura 1) (Borges *et al.*, 2016; Ghosh, 2019; Zhang *et al.*, 2022).

Figura 1 - Estrutura química da cisplatina.



Fonte: Ghosh, 2019; Zhang *et al.*, 2022 (adaptado).
Legenda: Cisplatina - Cis-diaminodicloroplatina II, CDDP.

2.2 Melanoma metastático

Derivados da crista neural, os melanócitos são células produtoras de pigmentos (melanina) situadas na epiderme (Codero; Casadevall, 2019). A proteína do fator de transcrição da microftalmia (MITF) é um dos principais fatores da diferenciação, migração, proliferação e sobrevivência dos melanócitos. Estes, quando mutados, caracterizam o câncer de pele do tipo melanoma (Hou; Pavan, 2008). Em 2020, estudos revelaram 325 mil novos casos de melanoma e quase 60 mil mortes (Arnold, 2022; IARC, 2022; Sung *et al.*, 2021). Estima-se ainda um aumento mundial em 50% dos casos por ano até 2040 e cerca de 8 mil casos para o triênio 2023-2025 no Brasil (Arnold, 2022; IARC, 2022; INCA, 2023). A ocorrência desse tipo tumoral varia entre países e está correlacionada a fatores como cor da pele e exposição à radiação solar. Apesar da baixa incidência, o melanoma é caracterizado pela sua heterogeneidade e malignidade, sendo considerado uma das formas mais agressivas de câncer de pele devido ao seu alto potencial metastático a partir de pequenas massas tumorais, o que diminui a sobrevida dos pacientes a menos de 1 ano (Leiter *et al.*, 2004; Luo; Shen, 2017).

A característica heterogênea do tumor, a suscetibilidade genética e a história familiar desempenham um papel central no desenvolvimento do melanoma (Leonardi *et al.*, 2018). No entanto, a exposição à radiação ultravioleta (UV), mostra-se um dos principais fatores de risco para seu desenvolvimento (Leonardi *et al.*, 2018; Raimondi *et al.*, 2020; Sample; He, 2018). Tais fatores desencadeiam mutações em genes importantes nos processos de sinalização celular, estando

estes envolvidos na transformação e progressão maligna. Dentre estes, mostram-se frequentemente mutados os genes relacionados ao controle da proliferação celular como *BRAF*, *NRas* o proto-oncogene *NRas* e *NF1* (neurofibromina 1) e ao controle do ciclo celular como o inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (*CDKN2A*) e genes relacionados a resistência à morte por apoptose (*Tp53*) (Akbari *et al.*, 2015; Carr *et al.*, 2020; Hodis *et al.*, 2012; Wernberg, 2020). Devido a sua heterogeneidade, cada subtipo de melanoma pode evoluir a partir de diferentes lesões precursoras e envolver diferentes mutações gênicas e estágios de transformação (Shain; Bastian, 2016), tal qual como a inibição do fator de transcrição *p53*, estando este envolvido no desenvolvimento tumoral, onde o mesmo bloqueia o ciclo celular frente a danos no DNA (Hanahan; Weinber, 2011). Embora mutações relacionadas ao gene *Tp53* não sejam frequentes em melanoma, a compreensão dos mecanismos é relevante, pois tais mutações resultam na perda da função supressora de tumor e/ou aquisições de funções oncogênicas. Por outro lado, mutações em proteínas como a proteína humana duplo minuto 2 (*HDM2/MDM2*) são frequentemente encontradas nesse tipo de câncer, cujo aumento de sua expressão sugere uma desregulação na proliferação celular, devido à inibição de *p53*. Além disso, a superexpressão de *HDM2* em melanoma indica ser uma ocorrência essencial para a transformação maligna dos melanócitos (Leonardi *et al.*, 2018; Polsky *et al.*, 2001).

Assim como na maioria dos cânceres, a mortalidade no melanoma está amplamente relacionada ao diagnóstico tardio, pois quando detectado nos estágios iniciais, com exceção de tumores com alta taxa de prevalência, há maior efetividade do tratamento (Roy; Saikia, 2016). Em muitos casos, manifestações e desconfortos cutâneos são negligenciados, o que dificulta o diagnóstico precoce de lesões de pele logo nos estágios iniciais (Rastrelli, *et al.*, 2014). No entanto, pacientes com melanoma recém-diagnosticado apresentam doença em estágio inicial, cujo tratamento é possível. Nesse cenário é realizada a excisão cirúrgica com intuito curativo e, além da cirurgia, outras abordagens terapêuticas como radioterapia, imunoterapia e quimioterapia são utilizadas de acordo com a severidade e o estadiamento da doença (Batus *et al.*, 2013; Davis; Shalin; Tackett, 2019; Leonardi *et al.*, 2018; Mishra *et al.*, 2018). Dentre os quimioterápicos clássicos, a CDDP (Figura 1) é comumente utilizada de forma isolada ou combinada (com dacarbazina e tamoxifeno) (Ghosh, 2019; Gupta; Gomes; Lorigan, 2017; Testori; Ribero; Bataille,

2017). Derivada da Pt, seu mecanismo de ação envolve lesões no DNA por interações com bases purinas, levando à apoptose, além da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) com conseqüente ataque às mitocôndrias (Makovec, 2019; Zhang *et al.*, 2021). Na mesma vertente, a Dacarbazina, e seu análogo Temozolomida (TMZ) são fármacos recentemente utilizados no tratamento de melanomas avançados e em processo de metastização. Contudo, os resultados ainda não são satisfatórios e as taxas de respostas continuam baixas, embora a TMZ apresente a vantagem de ser administrada via oral e possui relativa seletividade (Batus *et al.*, 2013; Middleton *et al.*, 2000; Mishra *et al.*, 2018; Wilson; Schuchter, 2016). Em uma vertente complementar, a terapia combinada se mostra promissora, visto que estudos demonstram efeitos adversos diminuídos quando comparados à terapia convencional. São exemplos de fármacos combinados, inibidores de *BRAF* (dabrafenibe, vemurafenibe e encorafenibe) e inibidores de MEK (trametinibe, cobimetinibe e binimetinibe) (Batus *et al.*, 2013; Luke *et al.*, 2017). A diminuição dos efeitos adversos acontece devido à redução da ativação da via das MAPK em células não mutadas, reduzindo o desenvolvimento de lesões (Rodriguez *et al.*, 2016).

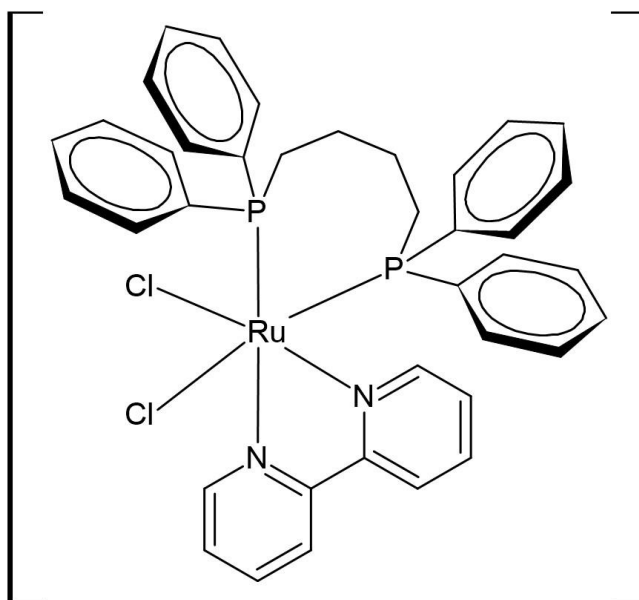
À vista disso, estudos que investiguem novas estratégias de tratamento e contornem tal problemática tornam-se necessários. Visto que, inúmeros compostos encontrados na natureza ou que tenham sua estrutura baseada em produtos naturais, demonstram nessa mesma vertente, resultados promissores, apresentando significativa contribuição na prevenção e no tratamento de diferentes tipos tumorais. Nesse sentido, mostra-se relevante a busca por substâncias inéditas, que de forma isolada ou combinada, apresentem potencial antimelanoma, ampliando dessa forma o arsenal terapêutico.

2.3 Complexos de Rutênio

Diversos resultados promissores têm sido obtidos com complexos metálicos relacionados ao combate do câncer, visto que compostos derivados de Pt já demonstram efetividade (Ghosh, 2019; Lee; Kim; Nam, 2020). Em uma vertente de modelagem de novos fármacos, a variedade de ligantes disponíveis de complexos de Ru (II) apresentam grande importância no quesito atividade biológica, aumentando sua eficácia e seletividade. Nesse sentido, estabilizantes como a

bipiridina (bipy) e difenilfosfina (dppb) estabilizam Ru em seu estado de oxidação II, sendo Ru (II) um dos complexos mais estáveis que juntamente a sua reatividade controlada, permite aplicações biológicas (Duan *et al.*, 2009; Zeng *et al.*, 2017). Por exibirem seletividade, complexos de Ru (II) (Figura 2) têm recebido atenção nos estudos e têm demonstrado efeitos antitumorais promissores (Andrade *et al.*, 2022; Bergamo *et al.*, 2012; Carnizello *et al.*, 2016; Ferreira-Silva *et al.*, 2017), visto que se destacam pela capacidade de mimetizar o ferro devido à sua similaridade química, ligando-se a biomoléculas transportadoras como a transferrina e albumina (proteínas transportadoras). Isso facilita sua entrada ao meio intracelular por utilizar as mesmas vias de transporte que o ferro, podendo diminuir a toxicidade em tecidos saudáveis, permitindo uma maior seletividade para os alvos de interesse (Andrade *et al.*, 2022; Benjamin-Rivera *et al.*, 2020; Coêlho *et al.*, 2023). Complexos de Ru (II) destacam-se pela versatilidade estrutural na troca de ligantes devido a sua geometria octaédrica, o que permite a formação de complexos com diferentes compostos, como o ácido cinâmico e seus derivados, além de possibilitar sua interação com alvos específicos (Bergamo *et al.*, 2021).

Figura 2 - Estrutura química de um complexo de Ru (II).



Fonte: Negreti *et al.*, 2022 (adaptado).

Legenda: Complexo de rutênio II (Ru (II)) - $[RuCl_2(dppb)(bipy)]$.

Nos últimos anos, estudos envolvendo complexos de Ru (II) demonstraram que estas moléculas apresentam menor toxicidade sistêmica em comparação com compostos de Pt, devido ao maior número de oxidação e à versatilidade estrutural em relação aos ligantes. Isso resulta em uma maior cinética, sendo essa referentes a uma maior taxa de reação com alvos biológicos (Andrade *et al.*, 2022; Lee; Kim; Nam, 2020). Ainda, tais complexos apresentam maior especificidade para células cancerosas, demonstrando menor citotoxicidade quando comparados à CDDP. Estudos disponíveis na literatura já demonstraram a atividade de interação de complexos de Ru com o DNA, o qual inibe a atividade da topoisomerase I e II e desta forma, implica a redução da transcrição e replicação celular (Han *et al.*, 2015). A provável ação mecanicista pode ser devido ao fato de que moléculas presentes em Ru (II) podem também intercalar-se entre os pares de bases de DNA e desencadear o processo de apoptose (Han *et al.*, 2015). Do mesmo modo, estudos *in vitro* demonstram que derivados de Ru (II) apresentam eficácia e citotoxicidade contra células tumorais, indicando seletividade. Testes *in vivo* demonstraram que animais tratados com o mesmo composto $\{(ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6)\}$, apresentaram redução significativa nas figuras de mitoses quando comparados ao grupo controle (Carnizello *et al.*, 2016). Negreti *et al.* (2022) também demonstraram resultados promissores para complexos de Ru (II) conjugados com derivados de ácido cinâmico em estudos *in vitro* com linhagens celulares derivadas de melanoma, cujos complexos inéditos foram capazes de inibir a migração e proliferação celular em baixas concentrações. Complexos de Ru (II) e ácido piperonílico também inibiram a proliferação celular e levaram à morte por apoptose células derivadas de adenocarcinoma pulmonar (Ferreira-Silva *et al.*, 2017).

De modo geral, complexos de Ru (II) mostram-se candidatos promissores para o desenvolvimento de novos protótipos de fármacos para o tratamento oncológico, visando alcançar maior atividade, tolerabilidade, seletividade e menor toxicidade (Andrade *et al.*, 2022).

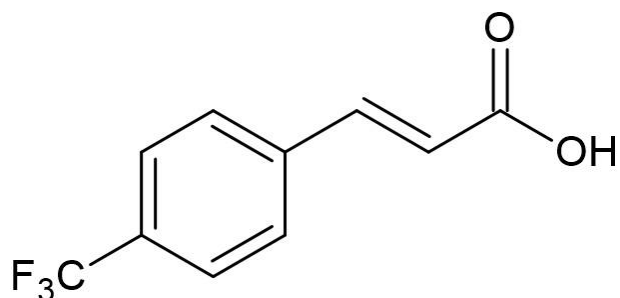
2.4 Ácido cinâmico

Os compostos fenólicos naturais vêm sendo bastante estudados na busca por novos fármacos que possam melhorar os efeitos adversos, a seletividade e consequentemente as propostas terapêuticas para o tratamento do câncer, (Hazafa

et al., 2020). O ácido cinâmico (AC) é um composto fenólico presente na natureza e que pertence a uma classe de hormônios vegetais que regulam o crescimento e a diferenciação celular (Sharma *et al.*, 2017). Consiste em um anel fenil seguido de um ácido acrílico, podendo ser preparado pela desaminação enzimática da fenilalanina e seus derivados resultam de modificações em seu anel benzênico (De; Baltas; Bedos-Belval, 2011; França *et al.*, 2021; Ruwizhi; Anderibigbe, 2020; Zhang *et al.*, 2019). Está presente em frutas cítricas, café, maçã e óleos, além de diversos vegetais, própolis e vinho. Tal composto tem sido amplamente investigado devido às suas propriedades antiproliferativa, antioxidante, antiangiogênica e anticâncer (De; Baltas; Bedos-Belval, 2011; Pontiki *et al.*, 2014; Ruwizhi; Anderibigbe, 2020).

Estudos em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* demonstraram resultados positivos relacionados ao potencial de derivados de AC frente à atenuação das lesões induzidas por raios ultravioleta A e B (UVA/UVB), no que se diz respeito à indução de genes antioxidantes (Hseu *et al.*, 2018). Dados da literatura demonstraram a atividade antiproliferativa e antimetastática de um derivado do AC (ácido 3,4-metileno-cinâmico) conjugado ao Ru (II) sob linhagens celulares de melanoma. Entretanto, apesar de efetivo, o complexo com o derivado ácido trans-4-trifluorometil-cinâmico (Figura 3), teve maior atividade, seletividade e inibiu efetivamente a proliferação e migração de células de melanoma humano (CHL-1) mesmo em concentrações muito baixas (Negreti *et al.*, 2022). Os resultados podem ser justificados pelo fato de que a incorporação de ligantes bioativos em complexos metálicos, como Ru (II), acaba por aumentar a atividade antitumoral e/ou seletividade celular, sendo uma estratégia interessante para o desenho de novos fármacos antitumorais diante dos desafios dos tratamentos da carcinogênese (Bergamo *et al.*, 2021; Negreti *et al.*, 2022). Somado a isso, os autores apontaram a característica presença do grupo trifluorometil (CF₃) (Luzina; Popov, 2014; Negreti *et al.*, 2022). Isso porque a incorporação do CF₃ em moléculas aumenta a eficácia das interações com alvos celulares, melhorando sua permeabilidade e estabilidade. Diversos medicamentos antidepressivos, antimaláricos e anticâncer contém o CF₃, isso porque tal grupo facilita a administração e a eficácia destes fármacos, o que também implica na segurança do tratamento (Luzina; Popov, 2014).

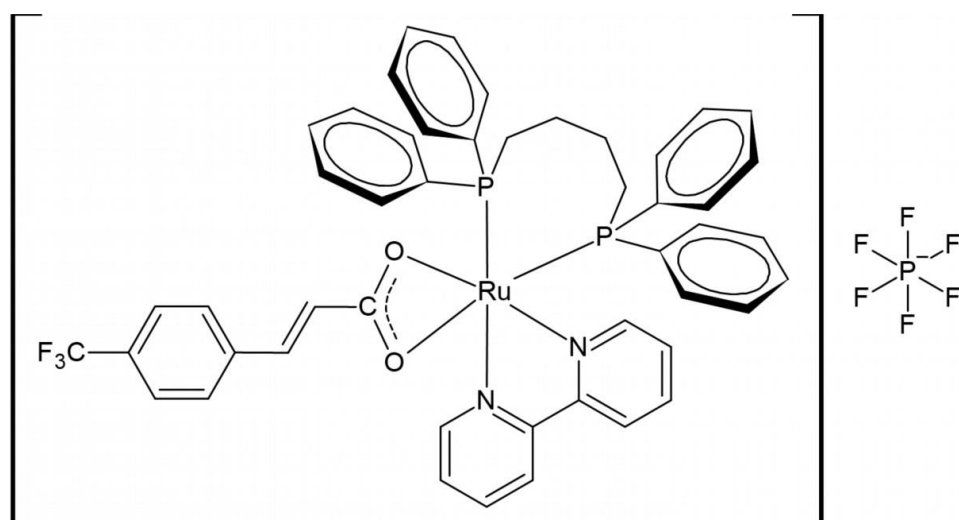
Figura 3 - Estrutura química do ácido trans-4-trifluorometil-cinâmico.



Fonte: França *et al.*, 2021; Negreti *et al.*, 2022 (adaptado).
 Legenda: Derivado do ácido cinâmico – ácido trans-4-(trifluorometil)-cinâmico.

À vista da versatilidade estrutural observada nos complexos de Ru (II) e, diante dos resultados promissores do AC e seus derivados já apresentados na literatura, a avaliação em modelos *in vivo* do complexo de Ru (II) contendo um derivado do AC, denominado Transcinam (Figura 4), faz-se necessária, e pode, inclusive, representar a obtenção de futuro protótipo de fármaco para o tratamento do melanoma cutâneo.

Figura 4 - Estrutura química do Transcinam.



Fonte: Negreti *et al.*, 2022 (adaptado).
 Legenda: Transcinam - [Ru (ácido trans-4-trifluorometil-cinâmico) (dppb)(bipy)]PF₆.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antitumoral do Transcinam, um complexo de Ru (II) contendo um derivado do ácido cinâmico, em melanoma induzido em roedores.

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram estabelecidos a fim de caracterizar uma primeira fase de ensaios pré-clínicos *in vivo* para avaliar a eficácia antitumoral do Transcinam:

- a) Avaliar a atividade antitumoral do tratamento monoquimioterapêutico;
- b) Investigar a segurança toxicológica, a toxicidade sistêmica e a seletividade dos tratamentos;
- c) Investigar vias e mecanismos de ação do Transcinam.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do Transcinam

O complexo testado no presente estudo {[Ru(ácido trans-4-trifluorometil-cinâmico) (dppb)(bipy)]PF₆} (Figura 4) foi gentilmente sintetizado e fornecido pelo professor Dr. Antônio Carlos Doriguetto e pela professora Dra. Marília Imaculada Frazão Barbosa do Instituto de Química da Universidade Federal de Alfenas (IQ) - UNIFAL, Minas Gerais, Brasil. Após resultados promissores *in vitro*, o complexo foi escolhido para a continuidade da pesquisa *in vivo*. Denominado Transcinam, foi obtido a partir da coordenação de seu precursor, um complexo de Ru (II) [RuCl₂(dppb)(bipy)], em que os estabilizantes dppb e bipy são 1,4-bis(difenilfosfina)butano e 2,2'-bipiridina, respectivamente, ao ligante, um derivado do ácido cinâmico (ácido trans-4-trifluorometil-cinâmico), envolvendo a substituição de dois cloros (Cl) (Negreti *et al.*, 2022).

4.2 Cisplatina

A cisplatina [CDDP, 7 mg/kg p.c. (peso corpóreo), Sigma Aldrich] foi obtida comercialmente e utilizada no estudo como controle positivo, a qual foi solubilizada em DMSO (dimetilsulfóxido, 5%) e água deionizada.

4.3 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com idade média de 5 semanas e peso médio de 23g. Os animais provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL, Minas Gerais, foram mantidos em caixas plásticas em uma sala experimental, sob condições controladas de temperatura (23 ± 2°C), umidade (50 ± 10%) e 12 horas de ciclo claro-escuro, com acesso *ad libitum* a ração padrão (Nuvilab CR-1 irradiada) e água. Todos os animais passaram por um período de 7 dias de aclimação anterior ao início do protocolo experimental. Cada grupo de tratamento foi constituído de 6 animais. O protocolo experimental realizado

neste trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas (nº 003/2022 – Anexo I).

4.4 Linhagem celular e condições de cultivo

A indução tumoral foi realizada utilizando a linhagem celular de melanoma murino (B16-F10), gentilmente cedida pela Profa. Dra. Denise Crispim Tavares, do Núcleo de Pesquisa em Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade de Franca - Unifran, São Paulo. Sendo características de experimentos com melanoma, B16-F10 apresenta mutações em BRAF, alterações em TP53, CDKN2A (inibidor de quinase dependente de ciclina 2^a), MITF e perda da função de PTEN (fosfatase homóloga a tesina) (Castellani *et al.*, 2023).

As alíquotas da linhagem foram armazenadas em nitrogênio líquido (-195°C), em solução de congelamento composta de 50% de meio de cultura Meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Gíbcó), 40% de soro fetal bovino (SFB, CultiLab) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Para realização dos experimentos as células foram descongeladas e colocadas em cultivo em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de SFB, 1,2 g/mL de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), 0,1 g/mL de estreptomicina (InLab) e 0,06 g/mL penicilina (InLab). O cultivo foi realizado em monocamada, em garrafas descartáveis de 25 cm² de área (Kasvi) a 36,5°C em estufa úmida 5% de CO₂ (Sanyo). A cada dois ou três dias, quando atingido 80% de confluência celular, as células foram subcultivadas em protocolo experimental padronizado pelo Laboratório de Genética Humana da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL, Alfenas-MG. Para o subcultivo, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com 2 mL de tampão fosfato salino (PBS), que foi também descartado. Para o desprendimento da linhagem aderente foi empregado 1 mL de tripsina 0,075% (InLab), seguido da manutenção em estufa por 3 minutos. Para inativação da tripsina foi utilizado 1 mL de meio de cultura DMEM suplementado com SFB e uma alíquota das células foi adicionada em uma nova garrafa contendo 5 mL de meio de cultura e incubada a 36,5°C em estufa 5% CO₂.

4.5 Indução tumoral

Para a indução tumoral células B16-F10 foram utilizadas entre a 5^o e a 6^o passagem. No dia anterior à administração das células, os animais foram tricotomizados na região do dorso direito com cortador de pelos. No dia do implante, antes da implantação das células tumorais nos camundongos, foi realizada a avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de tripan a fim de verificar a viabilidade celular. No método uma pequena alíquota de 10µL de células é misturada com 10 µL de azul de tripan 0,4% (Gibco 1:1) e as células são homogeneizadas e observadas em microscopia comum (Tsuboy *et al.*, 2007). Foram utilizadas células com viabilidade acima de 90%. Em seguida, as células foram transferidas para um tubo *falcon* e centrifugadas por 2 minutos a 2500 rotações por minuto (rpm) e ressuspensas em meio DMEM com SFB. Foram inoculadas 500.000 células em um volume de 100 µL por animal na região do dorso tricotomizado. Após a indução tumoral, os animais foram diariamente monitorados até o aparecimento do tumor (cerca de 8 dias).

4.6 Protocolo experimental

Após o tumor atingir o volume de 0,7 cm³ (aproximadamente 10 dias após a implantação das células) os tratamentos foram iniciados tendo sido administrados durante 5 dias consecutivos, 1x ao dia de forma subcutânea (s.c.) à aproximadamente 1 cm do tumor em um volume final de 100 µL na região do dorso do animal (Cruz *et al.*, 2022; Ferreira *et al.*, 2018; Heinrich *et al.*, 2011; Rinaldi-Neto *et al.*, 2021).

As diferentes doses de Transcinam utilizadas no presente estudo foram escolhidas com base em resultados significativos da literatura acerca de outros complexos de rutênio (Carnizello *et al.*, 2016; Gesef-Anvisa, 2013; Layla *et al.*, 2016; Negreti *et al.*, 2022) e com dados sobre o uso da CDDP como controle quimioterapêutico neste modelo de tratamento (Cruz *et al.*, 2022; Ferreira *et al.*, 2018; Heinrich *et al.*, 2011; Rinaldi-Neto *et al.*, 2021). Logo, as doses de Transcinam escolhidas foram 2,5; 5 e 10 mg/kg peso corpóreo (p.c.), diluídas em dimetilsulfóxido

(DMSO 5%) e água deionizada. Os seguintes grupos de tratamento (7), contendo 6 animais por grupo (n = 42), foram estabelecidos:

- a) controle negativo (CN): animais sem implante tumoral e sem tratamento;
- b) controle implante (CI): animais com implante tumoral e sem tratamento;
- c) controle solvente (CS): animais com implante tumoral e tratados com DMSO 5% s.c.;
- d) controle positivo (CP): animais com implante tumoral e tratados com o CDDP 7 mg/kg p.c s.c.;
- e) Transcinam 2,5 (2,5): animais com implante tumoral e tratados com Transcinam 2,5 mg/kg p.c. s.c.;
- f) Transcinam 5 (5): animais com implante tumoral e tratados com Transcinam 5 mg/kg p.c. s.c.;
- g) Transcinam 10 (10): animais com implante tumoral e tratados com Transcinam 10 mg/kg p.c. s.c..

Durante todo o período experimental, o peso corpóreo, o consumo hídrico e alimentar foram monitorados, bem como qualquer outro sinal indicativo de toxicidade. O consumo alimentar e hídrico foi avaliado com base na diferença entre o volume inicial ofertado e o volume final obtido após os 5 dias de tratamento.

Após 24 horas do último tratamento, o sangue periférico foi coletado por meio de um pequeno corte na ponta da cauda do animal previamente anestesiado com Lidocaína 50 mg/g. Em seguida, os animais foram anestesiados com 100 µL de Cetamina (100 mg/kg p.c.) e Xilazina (10 mg/kg p.c.) para a coleta do sangue por punção cardíaca utilizando uma seringa de 1 mL e agulha para avaliações bioquímicas de creatinina e ureia sérica, bem como os níveis de TGO (transaminase glutâmico-oxaloacética) também conhecido como AST (aspartato aminotransferase) e TGP (transaminase glutâmico-pirúvica) também conhecido como ALT (alanina aminotransferase). Em casos necessários (quando a punção cardíaca não foi suficiente para o óbito), foi realizada uma nova administração com 100 µL de Cetamina (100 mg/kg p.c.) e Xilazina (10 mg/kg p.c.) para eutanásia. Após a confirmação da morte do animal foi realizada a laparotomia, o tumor e os órgãos (baço, cérebro, coração, fígado, pulmão e rins) foram retirados, pesados em balança de precisão analítica para avaliações imuno-histoquímicas e futuros cortes

histológicos, tendo sido armazenados em paraformaldeído 4% por 24h e posteriormente em álcool 70%. A medula óssea de ambos os fêmures traseiros foi retirada e armazenada em tubo *falcon* de 15 mL contendo 2 mL de SFB. Além disso, uma pequena porção do fígado foi retirada para confecção de lâminas para avaliação genotóxica por meio do ensaio cometa. Também foi armazenada em biofreezer uma pequena porção do tumor para futuras análises de qRT-PCR.

4.7 Avaliação da atividade antitumoral

Conforme anteriormente mencionado, durante todo o período experimental e após eutanásia, o volume tumoral foi avaliado, com auxílio de um paquímetro utilizando a fórmula de volume de acordo com o protocolo experimental de Ferreira *et al.* (2018):

$$V \text{ (mm}^3\text{)} = \frac{[\text{comprimento (mm)} \times \text{largura (mm)}]^2}{2}$$

4.8 Quantificação dos níveis séricos de creatinina, ureia, TGO e TGP

Após punção cardíaca, em tubo de coleta de sangue contendo EDTA-K3 (*Labor Import*), as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a fim de separar a fração do soro sanguíneo. Até o momento das análises, as amostras foram mantidas em freezer a uma temperatura de -20 °C.

A dosagem no soro foi realizada utilizando kits da *GT Group* de reagentes Creatinina K (ref. 1108), Ureia enzimática (ref.1132), TGO (ref. 1117) e TGP (ref. 1118), seguindo as orientações do fabricante com algumas adaptações. A leitura foi realizada em leitor de microplacas automático (ELISA) em 510 nm para a quantificação de creatinina e em espectrofotômetro para quantificar ureia (580 nm), TGO e TGP (340 nm).

4.9 Avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade

A avaliação da citotoxicidade e da mutagenicidade foi realizada em células da medula óssea e do sangue periférico. O sangue coletado foi gotejado diretamente sobre a lâmina seca e previamente limpa, seguido do esfregaço sanguíneo. A medula óssea, após ser coletada, com um auxílio de uma seringa de 1 mL e agulha, movimentos de aspiração e expiração foram realizados até a retirada completa do conteúdo medular. Em seguida, o material foi centrifugado a 1000 rpm por 5 min, o sobrenadante descartado com uma pipeta *pasteur* e o pellet quebrado. Por fim, uma gota do material foi depositada sobre uma lâmina seca e previamente limpa, realizando a técnica de esfregaço.

Após secas, as lâminas foram fixadas em metanol por 5 minutos e coradas com *Giemsa* diluído em tampão fosfato pH 6,8 (1:10) por 20 minutos para sangue e (1:30) por 5 minutos para medula óssea (Hayashi *et al.*, 1990; 1994; 2000; Jain; Pandey, 2019; Kasamoto; Masumori; Hayashi, 2013; MacGregor *et al.*, 1987; Schmid 1975). As análises foram realizadas em microscópio de campo claro (Leica DM500) em aumento total de 100x.

A citotoxicidade foi determinada por meio da análise de 2000 eritrócitos por animal através do cálculo da razão entre eritrócitos policromáticos (EPC) e eritrócitos totais analisados [EPCs e normocromáticos (ENCs)] (EPC/EPC+ENC) (OECD, 2016). A mutagenicidade dos tratamentos foi determinada através da quantificação de micronúcleos (MNs) em 4000 EPCs por animal utilizando-se as mesmas lâminas para a avaliação da citotoxicidade (Hayashi *et al.*, 2000; OECD, 2016).

4.10 Avaliação da genotoxicidade

A avaliação da genotoxicidade foi realizada por meio do ensaio cometa alcalino em células do fígado. A obtenção dos hepatócitos foi realizada de acordo com Sasaki *et al.* (1997) e o ensaio seguiu o protocolo proposto por Tice *et al.* (2000) com modificações desenvolvidas por Burlinson *et al.* (2007) e revisadas pela OECD 489 (2016), além do protocolo de Collins *et al.* (2023). Após eutanásia, uma porção do fígado coletado foi macerada adicionando 1 mL de solução de DMSO e PBS 0,2 : 1,8 mL e filtrada em gase, obtendo-se assim células únicas (Sasaki *et al.*, 1997). Em seguida, pipetou-se 110 µL da porção celular com agarose de baixo

ponto de fusão em lâminas Olen recobertas com lamínula. Após 5 minutos no congelador, a lamínula foi retirada e as lâminas permaneceram por pelo menos 2 horas em solução de lise.

Em seguida, as lâminas lavadas com água destilada foram submetidas a uma corrida de eletroforese por 20 minutos, em que a extensão do DNA que migra reflete a quantidade e o tamanho dos fragmentos de DNA (OECD 489, 2016). Posteriormente utilizou-se um tampão de neutralização e as lâminas foram fixadas em álcool etílico. Após secas, no momento de análise, as lâminas foram coradas com 30 μL gel red diluído em água deionizada 1 μL /1100 μL e recobertas com uma lamínula. Os danos no DNA foram visualizados em microscópio de fluorescência BX53 (Olympus) em aumento total de 400x e as imagens capturadas e analisadas pelo software ImageJ (plugin OpenComet). Os danos foram quantificados em 100 nucleóides por animal, mensurados utilizando o parâmetro de porcentagem de DNA na cauda do cometa. A citotoxicidade dos tratamentos foi avaliada previamente à realização do ensaio utilizando o método de exclusão por *Trypan blue* (Tsuboy *et al.*, 2007).

4.11 Ensaio imunohistoquímico

Seguindo protocolo padronizado pelo Laboratório de Genética Humana, após o processo de parafinização, foram realizados cortes histológicos de 4 μm de espessura no material tumoral e esses foram transferidos para lâminas silanizadas. Em seguida, as lâminas foram submetidas à desparafinização em estufa 56-60 $^{\circ}\text{C}$ por uma hora, seguidos de banhos de xilol e reidratação. Na sequência, foi realizada a recuperação antigênica mantendo as lâminas em tampão citrato 10mM (pH 6,0) em uma panela elétrica com água por 20 minutos. A fim de se reduzir a marcação inespecífica, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por meio da incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio 3% por 10 min. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado também com a incubação por 10 min em solução de leite desnatado 5% preparada em TBST (1X tris-buffered saline with 0.05% Tween 2) em pH 7,6. Feito isso, as lâminas foram lavadas com TBST e incubadas *overnight* com anticorpo primário, o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (Abcam, Cambridge, UK, Cat.: ab29; monoclonal): diluição 1:2000.

No dia seguinte, realizou-se a incubação dos cortes com o anticorpo secundário IgG anti-coelho produzido em cabras conjugado com peroxidase (Dako EnVision™+ Dual Link System-HRP, Agilent, Santa Clara, CA, USA) por 1 h. Após esse período, os cortes foram corados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, 0,5%) por 30 minutos, e contra-corados com hematoxilina de Harry (100%) filtrada por 7 segundos, seguido de 3 lavagens com água destilada. Por fim, quando secas, as lâminas foram cobertas com resina Entellan e recobertas com lamínulas. A determinação semi-quantitativa da expressão proteica foi avaliada por imagens obtidas em microscopia comum no aumento de 400x, no software ImageJ Fiji® (versão 1.2; WS Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD), de acordo com os princípios descritos por Crowe e Yue (2019).

4.12 Ensaio de interação com *ct*-DNA

Para realização do protocolo, uma solução de DNA foi preparada adicionando-se 0,02 g de *ct*-DNA (timo de bezerro) em 10,0 mL de tampão Tris-HCl (4,50 mM de Tris HCl; 0,50 mM de Tris base e 50,0 mM de NaCl) pH 7,40. Posteriormente, foram adicionados em uma cubeta de quartzo 2000 μ L de tampão, 80 μ L da solução de *ct*-DNA. Determinou-se a concentração de DNA pela Equação de Lambert-Beer, uma vez que o *ct*-DNA absorve em 260 nm e possui uma absorvidade molar de 6600 L/mol/cm.

Para realização do experimento, utilizou-se duas cubetas para as titulações feitas, de modo que na cubeta 1 uma solução padrão foi preparada com 1800 μ L de tampão e 200 μ L de DMSO atuando, portanto, como referência, enquanto na cubeta 2 empregou-se 1800 μ L de tampão, 90 μ L de DMSO e 110 μ L da solução do complexo em DMSO (1 mmol). Em seguida sucessivas titulações foram realizadas adicionando-se 20 μ L de *ct*-DNA em ambas cubetas, sendo as soluções sempre homogeneizadas e a leitura adquirida. Por fim, a constante de ligação intrínseca de ligação dos complexos com o DNA (K_b) foi calculada utilizando-se a análise de regressão, considerando as alterações na intensidade de absorção de acordo com o aumento da concentração de *ct*-DNA. A constante intrínseca de ligação (K_b) foi calculada pelo modelo de Neighbor Exclusion, sendo que a intensidade da interação entre um complexo e o DNA pode ser conhecida através da equação de Benesi-Hildebrand (Barra; Netto, 2015):

$$[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F) = [\text{DNA}]/(\epsilon_B - \epsilon_F) + 1/K_b (\epsilon_B - \epsilon_F)$$

onde:

$[\text{DNA}]$ é a concentração adicionada de DNA;

$\epsilon_A = A_{\text{obs}}/[\text{Transcinam}]$

ϵ_F é o coeficiente de absorvidade molar do complexo livre

ϵ_B é o coeficiente de absorvidade molar do complexo-DNA

Assim, a constante K_b demonstra a razão entre os coeficientes angular e linear de um gráfico $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F)$ versus $[\text{DNA}]$. Já a porcentagem de hipocromismo (%H) é encontrada pelo valor da queda da absorbância.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

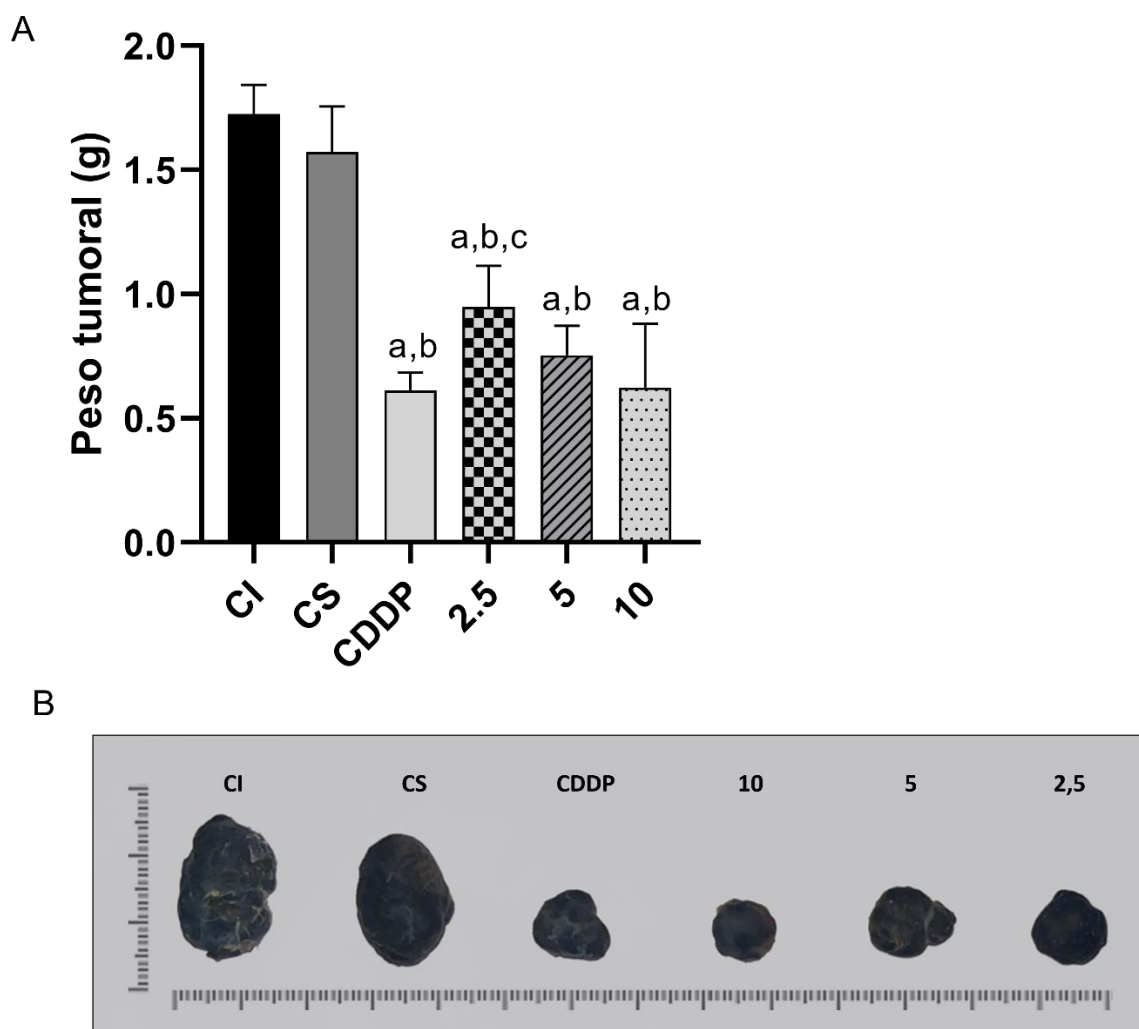
A análise estatística foi conduzida por meio *software GraphPad Prism®* versão 8.0.1. Foi realizada a análise de variância “*One-way ANOVA*” para experimentos inteiramente randômicos, seguida pelo teste F. Assim, as médias dos tratamentos são comparadas pelo teste de *Tukey* e os resultados apresentados no valor da média \pm desvio padrão. Foi considerado estatisticamente significativo os valores de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Efeito antitumoral do Transcinam

Com a finalidade de avaliar o efeito antimelanoma do Transcinam, o peso dos tumores foi avaliado e os resultados estão demonstrados na Figura 5. Como esperado, após os 5 dias de tratamentos consecutivos, foi possível observar uma redução significativa de 64,74% no peso do tumor no grupo tratado com CDDP evidenciando o clássico efeito antitumoral da CDDP na dose de 7 mg/kg p.c. s.c.. Os grupos tratados com Transcinam nas três diferentes doses (2,5, 5 e 10 mg/kg p.c.) demonstraram uma significativa redução no peso tumoral de 45,09; 56,65 e 64,16%; respectivamente, quando comparados com o grupo CI. Quando comparados a CDDP, os grupos tratados com Transcinam não apresentaram diferença estatística, exceto em sua menor dose (2,5 mg/kg p.c.). Não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo CI e CS indicando ausência de interferência do solvente no efeito apresentado pelo Transcinam (Figura 5 A e B). Além disso, foi possível observar um efeito antitumoral mais pronunciado nas duas maiores doses testadas (5 e 10 mg/kg p.c.) (Figura 5 A e B). Considerando que, apesar de induzir a redução da massa tumoral comparado com os grupos CI e CS, a dose de 2,5 mg/kg p.c., na análise estatística revelou uma diferença significativa quando comparado à CDDP, seguimos os demais testes utilizando apenas as doses de 5 e 10 mg/kg p.c.

Figura 5 - Avaliação antitumoral em camundongos C57BL/6 tratados por 5 dias consecutivos. Em (A) dados de peso do tumor (g) e (B) imagem representativa dos tumores.



Fonte: Do autor (2024).

Legenda: CI - controle implante; CS - controle solvente DMSO (Dimetilsulfóxido) 5%; CDDP - controle positivo cisplatina [7 mg/kg peso corpóreo (p.c.) subcutâneo (s.c.)]; Transcinam 2,5 mg/kg p.c., 5 mg/kg p.c. e 10 mg/kg p.c. s.c. Os valores são referentes a média \pm desvio padrão. Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey). ^aSignificativamente diferente do grupo CI; ^bSignificativamente diferente do grupo CS; ^cSignificativamente diferente do grupo CDDP.

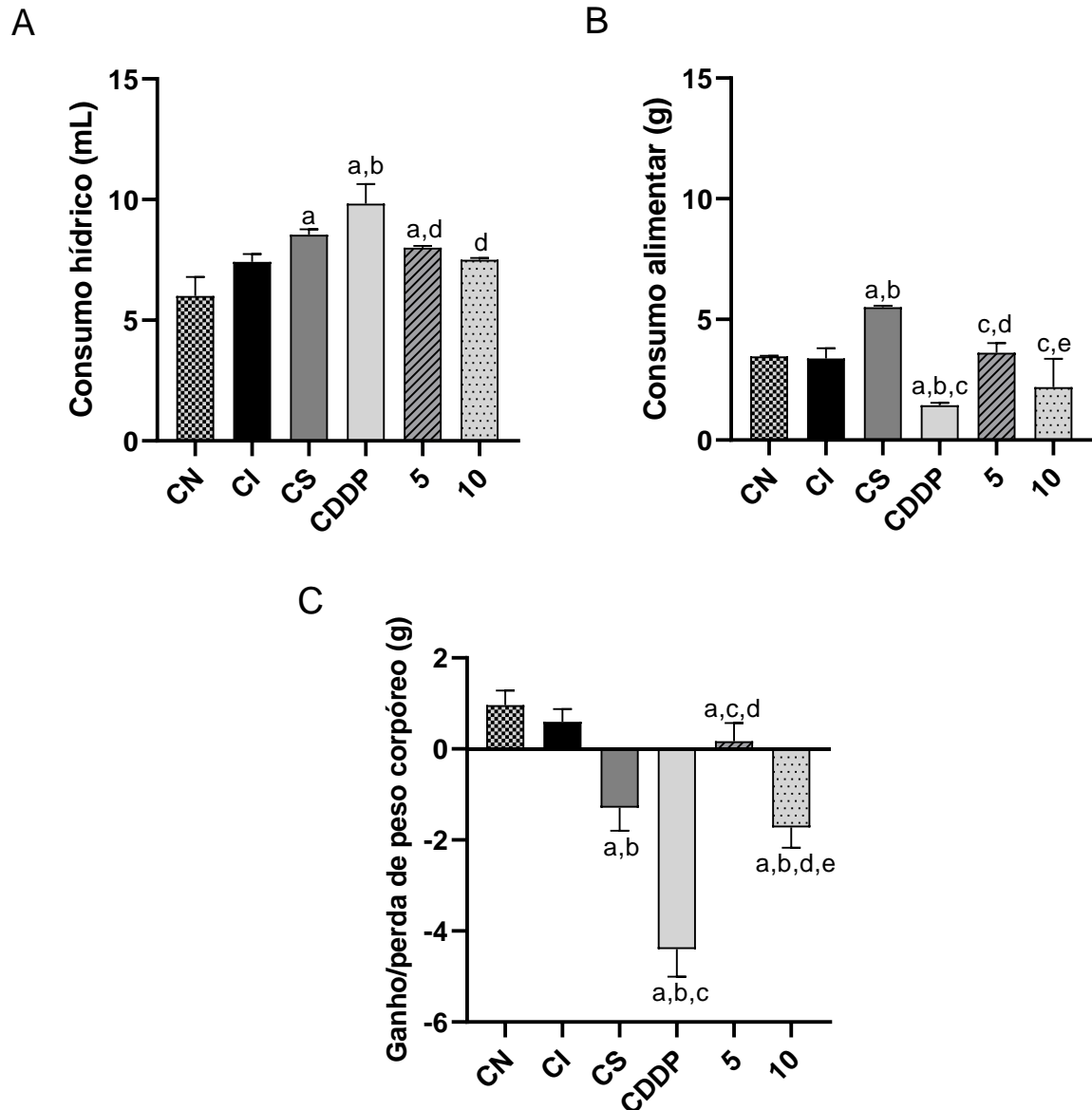
6.2. Consumo alimentar, hídrico e peso corpóreo

O consumo alimentar e hídrico e o peso corpóreo foram utilizados como parâmetros para avaliar sinais iniciais de toxicidade dos tratamentos e os resultados estão apresentados na Figura 6. Todos os grupos tratados demonstraram um aumento significativo no consumo hídrico em relação ao CN, sendo

significativamente maior no grupo tratado com CDDP. Quando comparados ao grupo CDDP, os grupos tratados com Transcinam (5 e 10 mg/kg p.c.) demonstraram uma redução no consumo hídrico (Figura 6 A). Em relação ao consumo alimentar médio, foi possível observar uma redução significativa no consumo do grupo tratado com CDDP quando comparado aos demais grupos (CN, CI, CS e Transcinam 5 mg/kg p.c.), exceto com Transcinam 10 mg/kg p.c.. Observou-se ainda, um aumento no consumo do grupo tratado com Transcinam 5 e 10 mg/kg p.c., embora neste último significativamente menor (Figura 6 B).

O ganho ou perda de peso dos animais foram avaliados levando em consideração o peso final após os 5 dias de tratamento, descontando-se o peso do tumor (Figura 6 C). Nesse sentido, valores acima de zero correspondem ao ganho de peso corpóreo, enquanto valores abaixo representam perda de peso durante o período experimental. Foi possível observar perda de peso corpóreo em todos os grupos onde algum tratamento foi administrado (CS, CDDP e 10 mg/kg p.c.), exceto nos grupos CN, CI e Transcinam 5. No entanto, o percentual de perda de peso corpóreo mais significativo quando comparado com os CN e CI foi demonstrado pelo grupo tratado com CDDP (em torno de 20% da massa corpóreo - média de 4 gramas). O grupo dos animais tratados com Transcinam 10 mg/kg p.c. embora tenha apresentado menor perda de peso (em torno de 9,5% - média de 2 gramas) comparado ao tratamento com CDDP, apresentaram diferenças significativas com os grupos CN e CI. O tratamento com Transcinam 5 mg/kg p.c. não apresentou diferença significativa do CI sendo estatisticamente diferente dos grupos CN, CS, CDDP e Transcinam 10. Cabe destacar que este último não demonstrou alteração no peso corpóreo dos animais, se mostrando a dose mais efetiva em preservar o peso dos animais quando comparado com o tratamento em dose mais elevada (10 mg/kg p.c.) (Figura 6 C).

Figura 6 - Consumo hídrico (mL) (A), alimentar (g) (B) e ganho ou perda peso corpóreo (g) (C) em camundongos C57BL/6 tratados por 5 dias consecutivos.



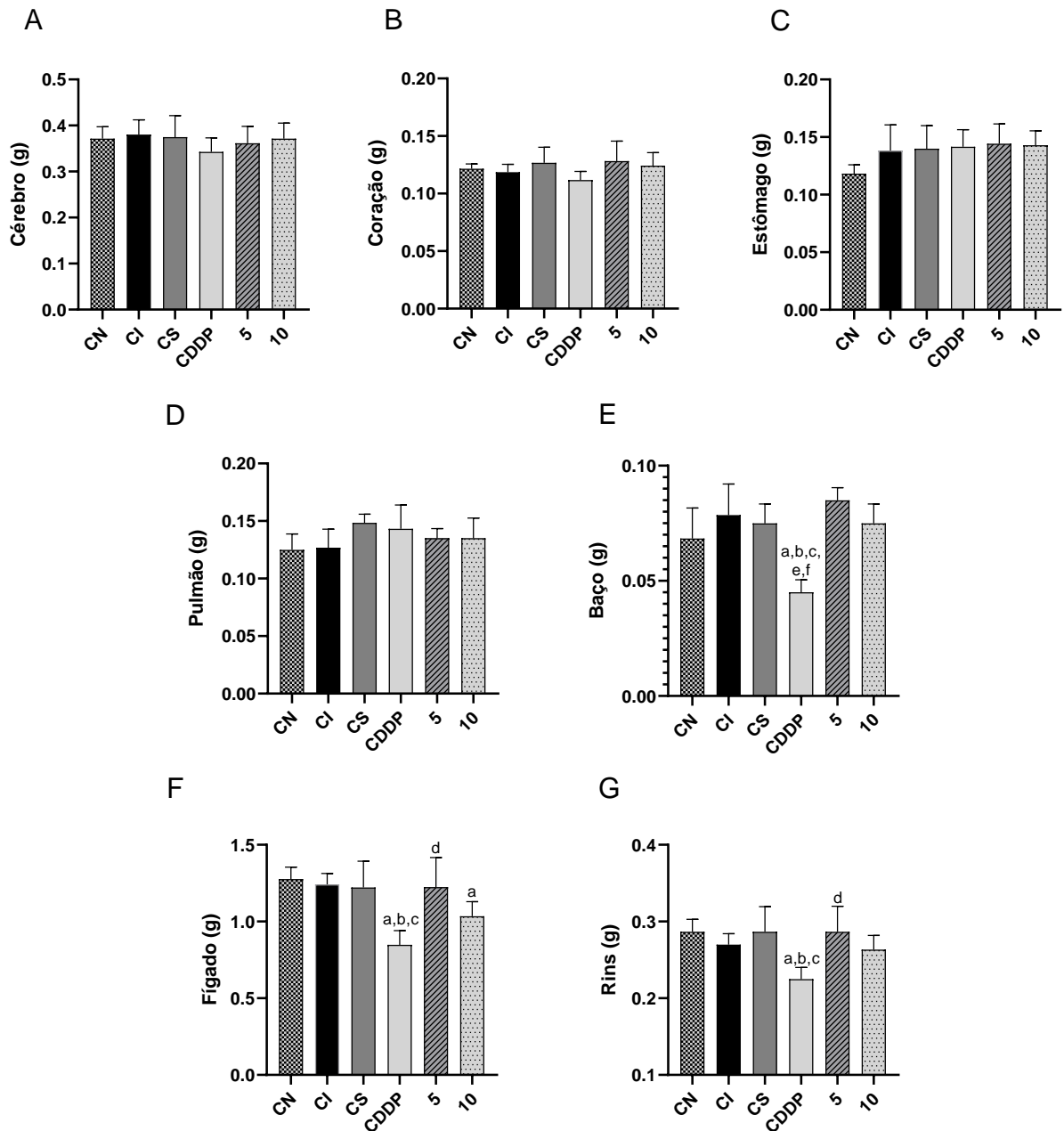
Fonte: Do autor (2024).

Legenda: CN - controle negativo; CI - controle implante; CS - controle solvente DMSO (Dimetilsulfóxido) 5%; CDDP - controle positivo Cisplatina [7 mg/kg peso corpóreo (p.c.) subcutâneo (s.c.)]; 5 - Transcinam 5 mg/kg p.c. s.c.; 10 - Transcinam 10 mg/kg p.c. s.c. Os valores são referentes a média \pm desvio padrão. Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey). ^aSignificativamente diferente do grupo CN; ^bSignificativamente diferente do grupo CI; ^cSignificativamente diferente do grupo CS, ^dSignificativamente diferente do grupo CDDP, ^eSignificativamente diferente do grupo Transcinam 5 mg/kg p.c.

6.3 Peso dos órgãos

O peso de diferentes órgãos também foi utilizado como parâmetro para observar possíveis sinais de toxicidade, visto que tais alterações têm importância na metabolização de fármacos e renovação celular e os resultados são apresentados na Figura 7. No que se refere ao peso do cérebro, coração, estômago e pulmão, não foram observadas diferenças estatísticas entre nenhum dos grupos de tratamento (Figura 7 A-D, respectivamente). O peso do baço dos animais tratados com CDDP foi significativamente menor quando comparado aos demais grupos (Figura 7 E) e, embora não tenha sido significativo, o tratamento com Transcinam 5 e 10 mg/kg p.c. manteve o peso do órgão. Em relação ao peso do fígado, os animais tratados com CDDP tiveram uma redução significativa no peso do órgão quando comparado dos demais grupos de tratamento, exceto com o grupo Transcinam 10 mg/kg p.c. que também apresentou uma redução no peso do fígado em relação ao grupo CN. O tratamento com Transcinam 10 mg/kg p.c. demonstrou um aumento significativo no peso do fígado quando comparado à CDDP (Figura 7 F). Em relação ao peso dos rins, os resultados demonstram uma redução significativa do peso desse órgão nos animais tratados com CDDP em relação a todos os outros grupos tratados, exceto Transcinam 10 mg/kg p.c.. O mesmo observado no fígado (aumento significativo em relação ao grupo CDDP) foi encontrado para o tratamento com Transcinam 5 mg/kg/p.c. quanto ao peso dos rins (Figura 7 G).

Figura 7 - Peso dos órgãos (g) de camundongos C57BL/6 tratados por 5 dias consecutivos.



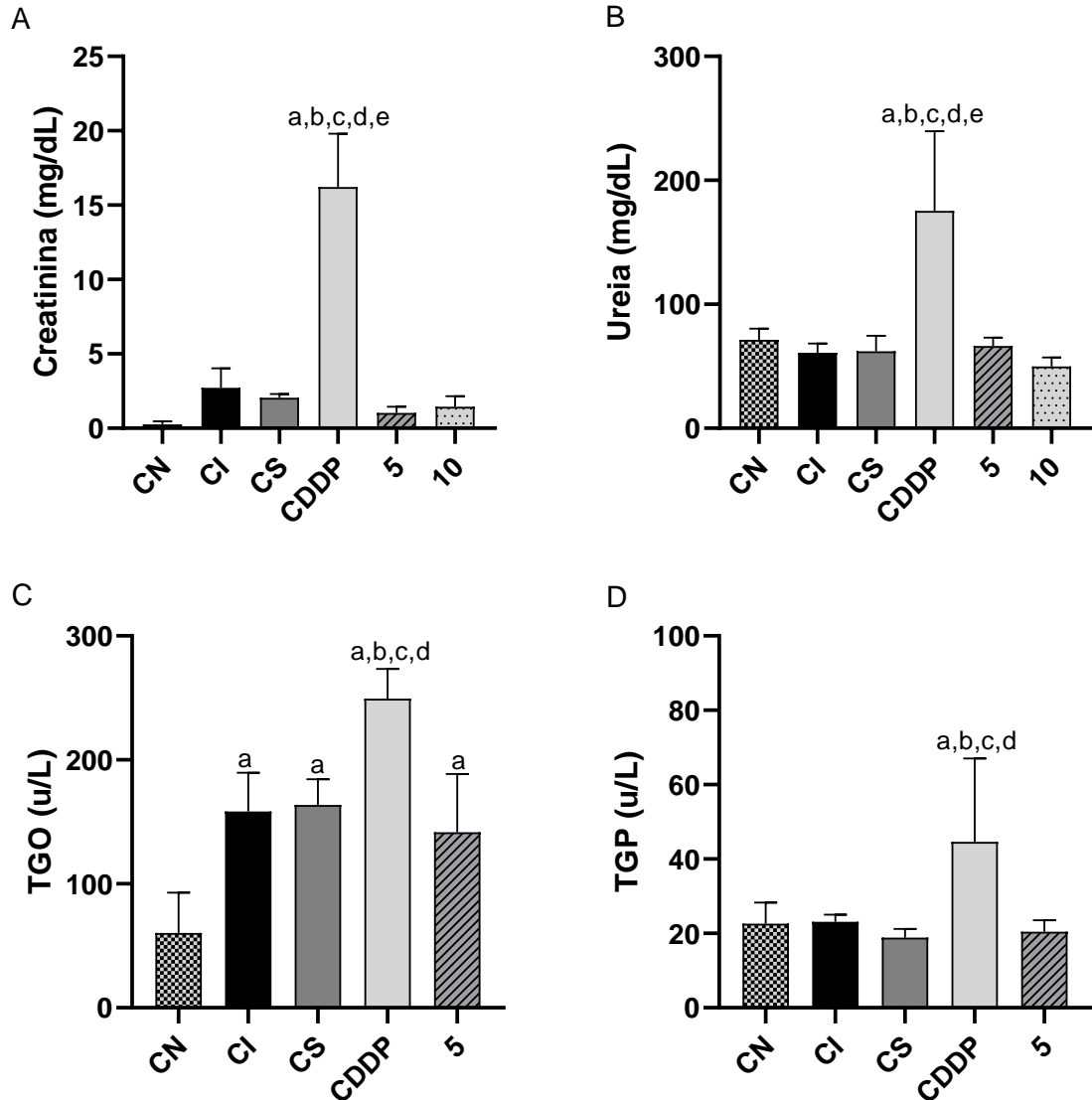
Fonte: Do autor (2024).

Legenda: CN - controle negativo; CI - controle implante; CS - controle solvente DMSO (Dimetilsulfóxido) 5%; CDDP - controle positivo Cisplatina [7 mg/kg peso corpóreo (p.c.) subcutâneo (s.c.)]; 5 - Transcinam 5 mg/kg p.c.; e 10 - Transcinam 10 mg/kg p.c. (10) s.c. Os valores são referentes a média \pm desvio padrão. Os valores são referentes a média \pm desvio padrão Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey). ^aSignificativamente diferente do grupo CN; ^bSignificativamente diferente do grupo CI; ^cSignificativamente diferente do grupo CS, ^dSignificativamente diferente do grupo CDDP, ^eSignificativamente diferente do grupo Transcinam 5 mg/kg p.c., ^fSignificativamente diferente do grupo Transcinam 10 mg/kg p.c.

6.4 Níveis séricos de creatinina, ureia, TGO e TGP

Níveis de creatinina, ureia TGO e TGP no soro dos roedores foram quantificados e os dados estão apresentados na Figura 8. Foi demonstrado um aumento significativo (aproximadamente 5 vezes) nos níveis séricos de creatinina e ureia no grupo de animais tratados com CDDP quando comparado a todos os grupos CN, CI, CS, Transcinam 5 e 10 mg/kg p.c.. De maneira oposta, os animais tratados com Transcinam em ambas as doses (5 e 10 mg/kg p.c.) apresentaram redução significativa desses níveis quando comparado ao grupo de animais tratados com CDDP, não apresentando diferenças estatísticas em relação aos demais grupos de tratamento (Figura 8 A e B). Um aumento significativo nos níveis de TGO e TGP no grupo tratado com CDDP foi observado quando comparado aos demais grupos (CN, CS, CDDP e Transcinam 5) (Figura 8 C e D). Em contrapartida, os animais tratados com Transcinam 5 mg/kg p.c. não apresentaram diferenças significativas nos níveis de TGO com os demais grupos de tratamento, exceto com CN (Figura 8 C).

Figura 8 - Níveis séricos de (A) creatinina, (B) ureia em mg/dL e (C) TGO, TGP (D) em u/L no sangue de camundongos C57BL/6 tratados por 5 dias consecutivos.



Fonte: Do autor (2024).

Legenda: TGO - transaminase glutâmico-oxaloacética; TGP - transaminase glutâmico-pirúvica. CN - controle negativo; CI - controle implante; CS - controle solvente DMSO (Dimetilsulfóxido) 5%; CDDP - controle positivo Cisplatina [7 mg/kg peso corpóreo (p.c.) subcutâneo (s.c.)]; 5 - Transcinam 5 mg/kg p.c. s.c.; e 10 - Transcinam 10 mg/kg p.c. s.c. Os valores são referentes a média \pm desvio padrão. Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey). ^aSignificativamente diferente do grupo CN, ^bSignificativamente diferente do grupo CI, ^cSignificativamente diferente do grupo CS, ^dSignificativamente diferente do grupo Transcinam 5 mg/kg p.c., ^eSignificativamente diferente do grupo Transcinam 10 mg/kg p.c.

6.5 Investigação da citotoxicidade e mutagenicidade

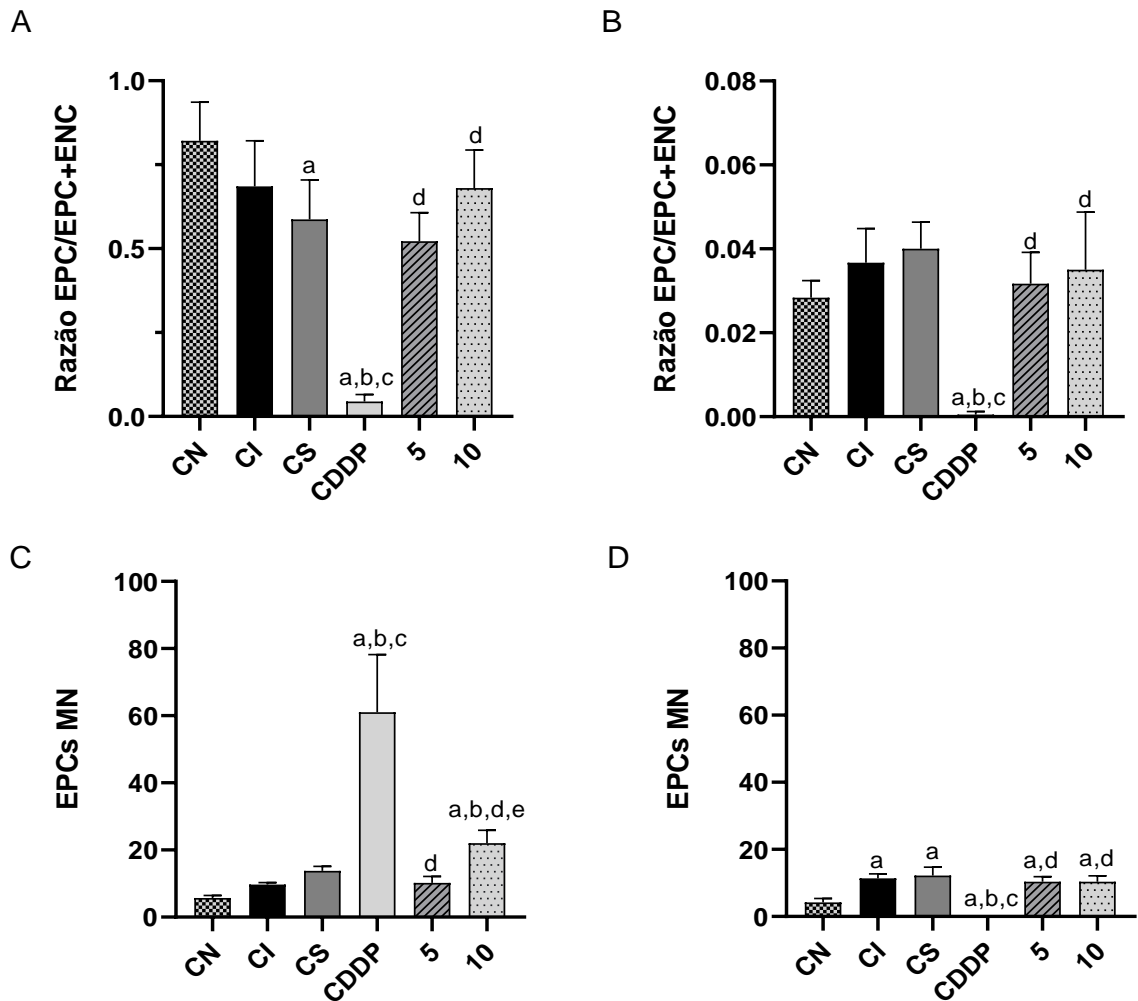
Embora avaliação isolada da citotoxicidade e mutagenicidade esteja diretamente relacionada à estimativa de risco de exposição, esses parâmetros interpretados juntos e, concomitantes às outras avaliações também podem ser interessantes para a confirmação de efeito e até permitir se iniciar uma linha de estudo mecanicista. No modelo experimental estudado, realizamos a avaliação da citotoxicidade e da mutagenicidade na medula óssea e no sangue periférico dos animais tratados com Transcinam e seus controles (Figura 9). Os resultados de citotoxicidade tanto na medula óssea (Figura 9 A) quanto no sangue periférico (Figura 9 B) demonstraram que os animais tratados com CDDP quase não apresentaram células para a contagem e, a partir da razão de EPC/EPC+ENC, uma diferença significativa em relação aos grupos CN, CI e CS foi observada (Figura 9 A e B). Nos grupos tratados com Transcinam 5 e 10 mg/kg p.c. um quantitativo adequado de células foram encontrados para a análise não havendo diferenças em relação ao CN, CI e CS. A razão EPC/EPC+ENC demonstrou diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com CDDP (Figura 9 A e B).

A mutagenicidade foi avaliada utilizando o biomarcador de danos no DNA mais recomendado pela literatura, o MN, cujo objetivo principal foi a validação da mutagenicidade dos tratamentos. Como no teste do MN são utilizadas as mesmas lâminas para avaliação da citotoxicidade, no sangue periférico os dados de MN do grupo tratado com CDDP não puderam ser adequadamente quantificados dado a ausência de células para análise. Logo, diferenças significativas em relação ao CN, CI e CS são expressas por falta de células para a contagem. O mesmo não ocorreu com a medula óssea, embora uma quantidade reduzida de células tenha sido observada nos esfregaços, a quantificação dos MN nos EPCs pode ser realizada. O fato de ser o local de produção das células da linhagem vermelha, o quantitativo de células ainda permitiu a análise da citotoxicidade e posteriormente da mutagenicidade e, como na sequência do processo de hematopoiese, células da medula compõem o tecido sanguíneo, perdas sucessivas de células ocorrem dificultando a quantificação no sangue. Assim, na medula óssea, os camundongos tratados com CDDP obtiveram alta frequência de danos (Figura 9 C) comparado aos demais grupos, mesmo diante de uma razão EPC/EPC+ENC baixa. O grupo tratado

com Transcinam 10 mg/kg p.c. demonstrou um aumento na frequência de MNs quando comparado aos grupos CN e CI, porém uma menor frequência de MNs foi observada quando comparado ao tratamento com CDDP. No tratamento com Transcinam 5 mg/kg p.c., uma menor frequência de MN foi observada não só em relação à CDDP, mas também no tratamento com Transcinam 10 mg/kg/p.c. (Figura 9 C).

Nas células sanguíneas (Figura 9 D), todos os grupos CI, CS, Transcinam 5 e 10 mg/kg p.c. tiveram um aumento significativo de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) em relação ao grupo CN. Essa variável significativa pode ser devido à ausência de dados para o grupo de CDDP, uma vez que os valores de MN para esses grupos (CI, CS, por exemplo) no sangue não são muito diferentes dos observados na medula óssea (Figura 9 D). Entretanto, ambos os grupos tratados com Transcinam diferiram estatisticamente na frequência de MN quando comparados aos grupos CN e CDDP.

Figura 9 - Citogenotoxicidade na medula óssea (A, C) e no sangue periférico (B, D) de camundongos C57BL/6 tratados por 5 dias consecutivos.



Fonte: Do autor (2024).

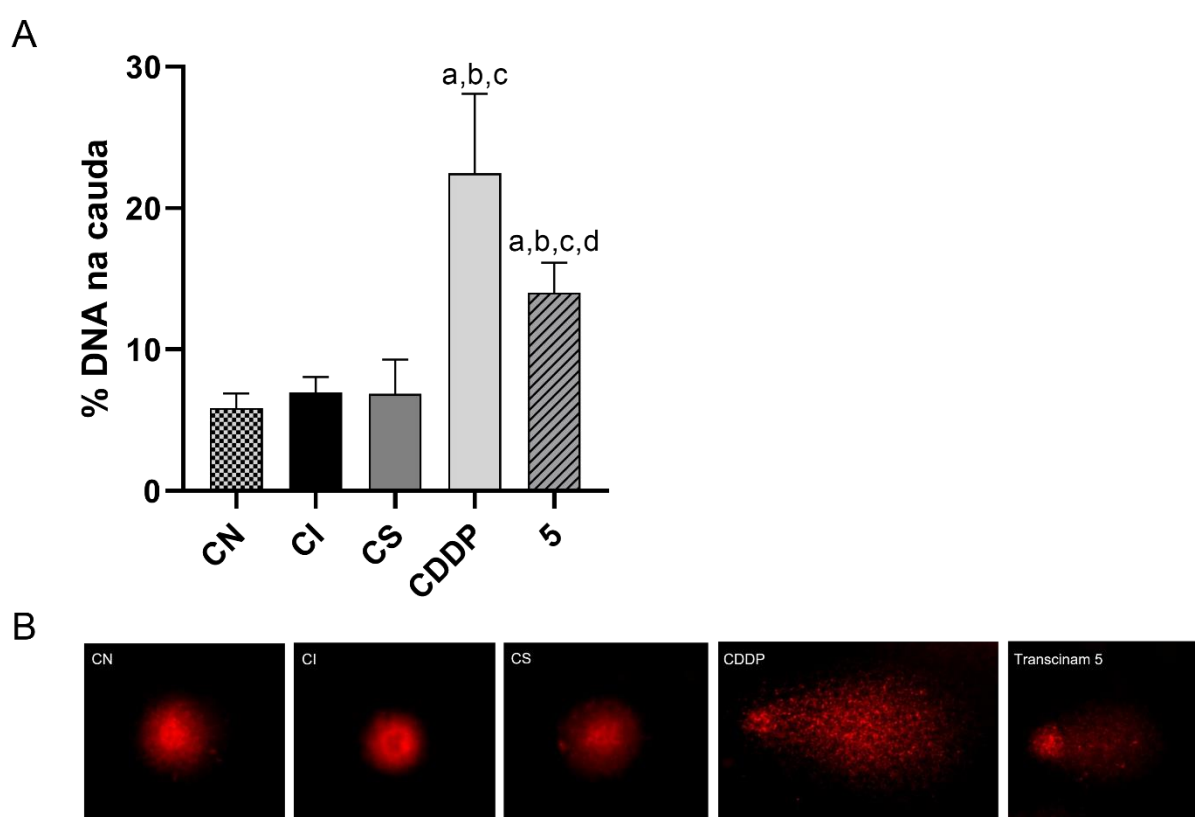
Legenda: EPC - eritrócitos policromáticos; ENC - eritrócitos normocromáticos; EPCs MN - eritrócitos policromáticos micronucleados; CN - controle negativo; CI - controle implante; CS - controle solvente DMSO (Dimetilsulfóxido) 5%; CDDP - controle positivo Cisplatina [7 mg/kg peso corpóreo (p.c.) subcutâneo (s.c.)]; 5 - Transcinam 5 mg/kg p.c. s.c.; 10 - Transcinam 10 mg/kg p.c. s.c. Os valores são referentes a média \pm desvio padrão. Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey). ^aSignificativamente diferente do grupo CN; ^bSignificativamente diferente do grupo CI; ^cSignificativamente diferente do grupo CS; ^dSignificativamente diferente do grupo CDDP; ^eSignificativamente diferente do grupo Transcinam 5 mg/kg p.c.

6.6 Avaliação da genotoxicidade

A fim de avaliar a genotoxicidade dos tratamentos (Figura 10), o ensaio cometa foi realizado em células do fígado e os dados revelam que CDDP e Transcinam 5 demonstraram um aumento significativo na porcentagem de danos ao

DNA na cauda do cometa quando comparado aos grupos CN, CI e CS. Animais tratados com Transcinam 5 apresentaram aumento de lesões no DNA (201%) comparado ao CI. Entretanto, tal aumento foi menor que o grupo CDDP (323%), tendo o grupo Transcinam apresentado 38% de redução de danos quando comparado a CDDP (Figura 10).

Figura 10 – Avaliação da genotoxicidade (A) e fotomicrografias do ensaio cometa (B) em hepatócitos de camundongos C57BL/6 após 5 dias de tratamentos consecutivos.



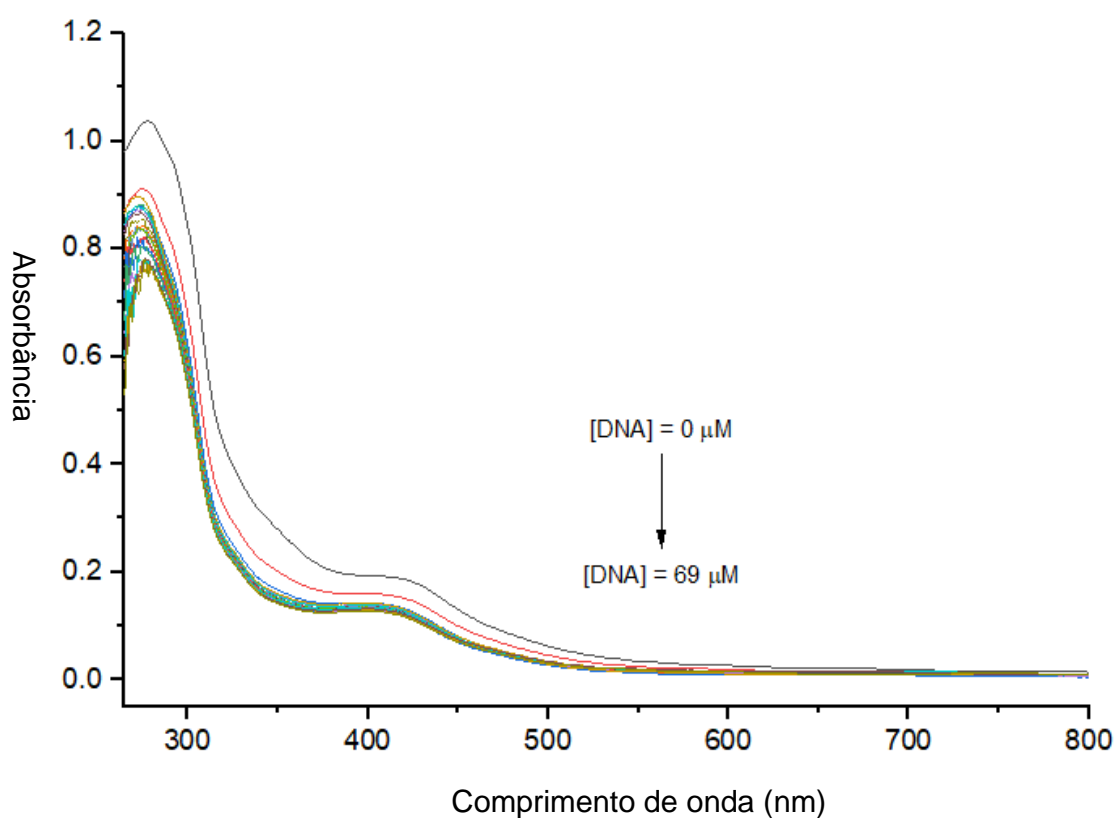
Fonte: Do autor (2024).

Legenda: Aumento total de 400x. CN - controle negativo; CI - controle implante; CS - controle solvente DMSO (Dimetilsulfóxido) 5%; CDDP - controle positivo Cisplatina [7 mg/kg peso corpóreo (p.c.) subcutâneo (s.c.)]; 5 - Transcinam 5 mg/kg p.c. s.c. Os valores são referentes a média \pm desvio padrão. Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey). ^aSignificativamente diferente do grupo CN; ^bSignificativamente diferente do grupo CI; ^cSignificativamente diferente do grupo CS; ^dSignificativamente diferente do grupo CDDP.

6.7 Ensaio de interação com *ct*-DNA

Por meio de titulações, o estudo da interação do Transcinam com DNA foi avaliado (Figura 11). Deslocamentos no espectro são indicativos de interação com DNA (Hajian, 2013). O espectro inicial do Transcinam é representado em preto. Os resultados demonstraram que após a adição do *ct*-DNA na solução foi observado hipocromismo, ou seja, houve diminuição do valor de absorbância (Figura 11). O valor para a constante K_b foi de $6.39 \pm 0.67 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ e o valor do hipocromismo foi de 13.5%.

Figura 11 - Espectro de UV-Vis das titulações do Transcinam em *ct*-DNA



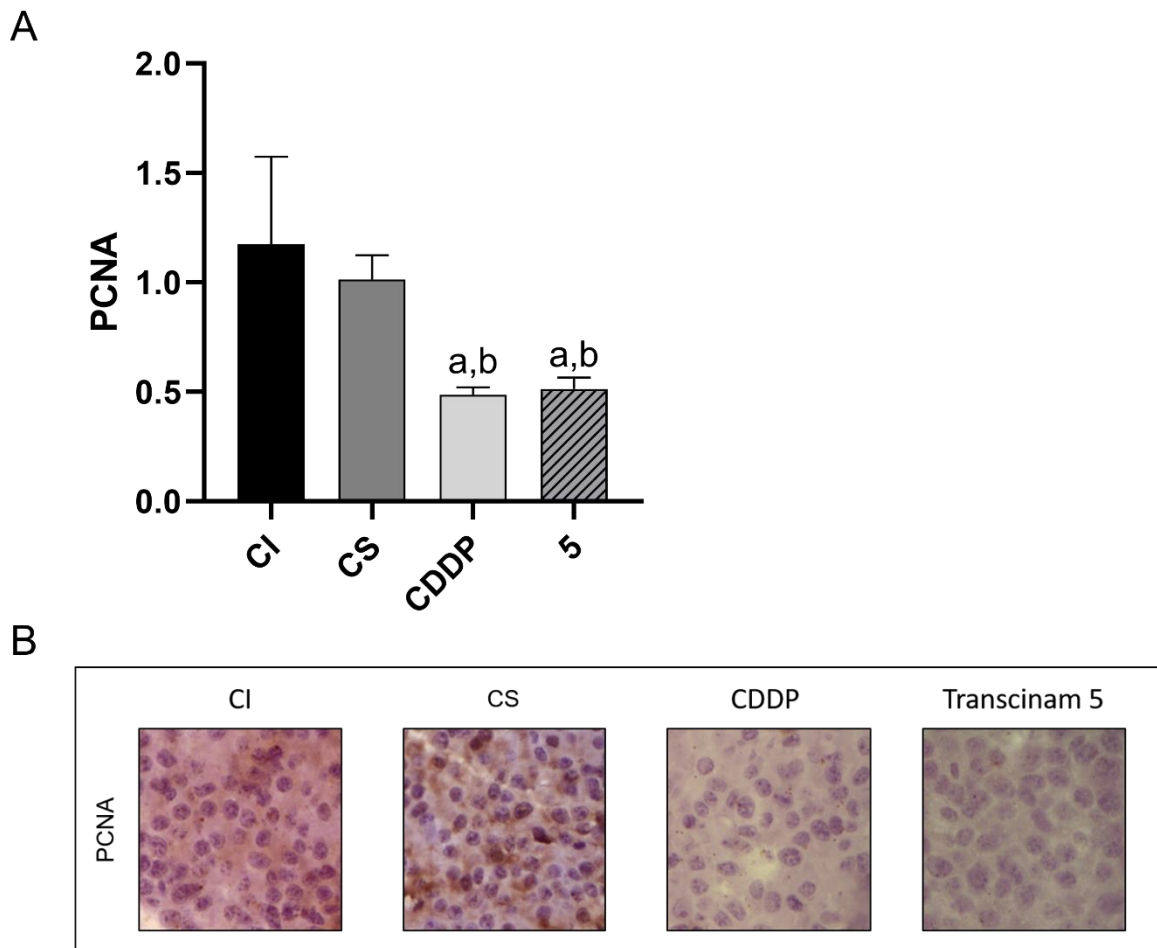
Fonte: Do autor (2024).

Legenda: Espectros de absorção eletrônica do Transcinam em tampão Tris-HCl após a adição de DNA de timo de bezerro (*ct*-DNA), [composto] = 0,1 mM. A seta mostra a alterações de absorbância com o aumento da concentração de *ct*-DNA.

6.8 Análise imunohistoquímica

A expressão do marcador PCNA (a antígeno nuclear de proliferação celular) foi avaliada através da deconvolução das imagens capturadas, provenientes dos cortes do tecido tumoral parafinizado (Figura 12). Após a quantificação imunohistoquímica, os resultados demonstraram uma redução na expressão de PCNA de 58,5 e 56,8% nos grupos tratados com CDDP e Transcinam 5 mg/kg p.c., respectivamente, quando comparados ao grupo CI (Figura 12).

Figura 12 - Quantificação imunohistoquímica de PCNA no tecido tumoral (A) e fotomicrografias do tecido tumoral parafinizado (B) de camundongos C57BL/6 após 5 dias de tratamentos consecutivos.



Fonte: Do autor (2024).

Legenda: Aumento total 400x. Positividade da reação imunohistoquímica evidenciada pela marcação por diaminobenzidina (de coloração marrom). PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular; CI - controle implante; CS - controle solvente DMSO (Dimetilsulfóxido) 5%; CDDP - controle positivo Cisplatina [7 mg/kg peso corpóreo (p.c.) subcutâneo (s.c.)]; 5 - Transcinam 5 mg/kg p.c. s.c. Os valores são referentes a média \pm desvio padrão. Referência para $p < 0,05$ (ANOVA one-way e teste de Tukey). ^aSignificativamente diferente do grupo CI; ^bSignificativamente diferente do grupo CS.

7 DISCUSSÃO

Diversos estudos envolvendo complexos de Ru (II) relatam suas propriedades antitumorais baseadas na capacidade de inibir a proliferação celular (Andrade *et al.*, 2022; Carnizello *et al.*, 2016; Lee; Kim; Nam, 2020; Negreti *et al.*, 2022). Do mesmo modo, diversos estudos relatam sobre o AC quanto a sua ação antiproliferativa, antioxidante, antiangiogênica e anticâncer (De Baltas; Bedos-Belval, 2011; Pontiki *et al.*, 2014; Ruwizhi; Anderibigbe, 2020). Logo, apoiado por achados promissores da literatura, investigamos a atividade antitumoral *in vivo* do complexo Transcinam.

A taxa de sobrevivência dos animais no presente estudo foi de 100% em todos os grupos de tratamento, inclusive no grupo tratado com CDDP na dose de 7 mg/kg p.c. s.c.. Da mesma forma, Cruz *et al.* (2022), utilizando CDDP (5 mg/kg p.c. s.c.) por 5 dias consecutivos em camundongos C57BL/6 portadores de melanoma, também observaram uma taxa de sobrevivência de 100%. Em contrapartida, Yang *et al.* (2014) utilizaram como estratégia quimioterapêutica para melanoma em camundongos Balb/C, a dose máxima de CDDP permitida para tratamento (10 mg/kg p.c.), como recomendado por Feleszko (2014), e demonstraram que a maioria dos animais não sobreviveram ao tratamento mesmo diante de uma menor frequência de administrações (3 aplicações semanais durante o período experimental de 3 semanas). Dados da literatura trazem resultados semelhantes ao presente trabalho em que a CDDP, mesmo diante de menores doses, demonstrou eficácia na redução tumoral em camundongos machos C57BL/6 portadores de tumor do tipo melanoma quando tratados com doses 0,5 mg/kg p.c. em dias alternados por 6 semanas e 5 mg/kg p.c. por 5 dias consecutivos (Borges *et al.*, 2016; Carnizello *et al.*, 2016; Cruz *et al.*, 2022; Ferreira *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2020). Tais achados colaboram com o estudo, visto o uso correto da dose de CDDP.

A formação da massa consistente, gelatinosa, parecida com uma esfera e característica do da indução celular de melanoma com células B16-F10, observada nos animais (Figura 5 B), foi similar à encontrada em outros trabalhos e foi significativamente reduzida pelo tratamento com Transcinam em todas as doses testadas (2,5; 5 e 10 mg/kg p.c.), especialmente nas duas maiores doses, revelando um efeito antitumoral tão efetivo quanto ao encontrado para o grupo tratado com CDDP (Figura 5 A) (Alves-Fernandes *et al.*, 2020; Borges *et al.*, 2016; Carnizello *et*

al., 2016). Em relação aos mecanismos e alvos celulares do Transcinam, na literatura, seu precursor e ligante demonstram possíveis vias relacionadas à atividade antitumoral. Carnizello *et al.* (2016) investigaram o efeito antitumoral de um composto derivado de Ru (II), o $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$, e relacionaram sua atividade à inibição de mitoses, o que impe a progressão tumoral. Segundo os autores, o efeito antitumoral pode estar relacionado com interações com a albumina, uma proteína abundante no sangue que desempenha um papel importante no transporte de metabólitos e fármacos para diferentes partes do corpo. Tal transporte é essencial para a eficácia de muitos fármacos, sendo sua interação com Ru (II), um facilitador para o transporte para as células tumorais (Carnizello *et al.*, 2016; Coêlho *et al.*, 2023; Hoogenboezem; Duvall, 2018; Larsen *et al.*, 2016; Spada *et al.*, 2021). Além deste, outros mecanismos de ação como a interação com DNA topoisomerase, inibição do ciclo celular e a disfunção mitocondrial foram demonstrados (Coêlho *et al.*, 2023; Negreti *et al.*, 2022). No que se refere ao AC, seu potencial antitumoral relaciona-se a mecanismos de inibição do ciclo celular e apoptose (Ge *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2018; Ruwizhi; Aderibigbe, 2020). Ge *et al.* (2019) demonstraram em linhagens tumorais a capacidade de híbridos de AC regularem de forma positiva, proteínas pró apoptóticas como BAX e negativamente a proteína anti-apoptose BCL-2. Lima *et al.* (2018) também relataram efeito promissor de derivados do AC na atividade antimetastática de células B16-F10. De forma aditiva, Negreti *et al.*, (2022), em células CHL-1, elucidaram o possível mecanismo de ação antitumoral do Transcinam, o qual pode estar relacionado a indução da parada do ciclo celular e consequentemente, a apoptose.

Cabe destacar ainda que, a presença do grupo CF_3 no complexo tem por finalidade aumentar capacidade do Transcinam de adentrar na célula, atravessando membranas celulares lipídicas. Tal permeabilidade celular é crucial para que fármacos entrem e exerçam seu efeito nas células (Landelle; Panossian; Leroux, 2014; Luzina; Popov, 2014; Negreti *et al.*, 2022). Dessa forma, os resultados apresentados neste estudo e a literatura citada não só justificam o potencial anti-melanoma do Transcinam, mas também traçam brevemente possíveis mecanismos de ação do complexo.

Observou-se que o efeito antitumoral da CDDP, embora característico, foi acompanhado de uma redução significativa do consumo alimentar, no peso corpóreo e dos órgãos. Além do aumento no consumo hídrico, nos níveis séricos de

creatinina, ureia, TGO e TGP e redução no quantitativo de células da medula óssea e do sangue periférico dos roedores, a custo de uma alta toxicidade sistêmica, genotoxicidade e mutagenicidade. Conhecida como um dos fármacos mais amplamente utilizados com potencial quimioterapêutico, a CDDP está presente no tratamento de tumores sólidos, por agir covalentemente na molécula de DNA, interferindo dessa forma nos processos de transcrição e replicação celular (Florea; Busselberg, 2011; Ghosh, 2019; Neves; Vargas, 2011; Zhang *et al.*, 2021). Apesar do alvo principal da CDDP ser o DNA, alvos secundários essenciais para a sobrevivência celular também são impactados por esse fármaco, como a destruição de lisossomos, ataque às mitocôndrias e também a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Makovec, 2019). Em conjunto, esses eventos convergem para que a eficácia de tal quimioterápico na promoção do dano e destruição celular não seja específica, levando à toxicidade e efeitos adversos, o que muitas vezes implica o aumento da dose dos tratamentos e na consequente manifestação dos efeitos adversos críticos aos pacientes (Dehelean *et al.*, 2021; Ghosh, 2019; Ijaz *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2022).

Um consumo hídrico não alterado, o aumento no consumo alimentar e no peso corpóreo foi observado nos grupos tratados com Transcinam quando comparado à CDDP (Figura 6 A, B e C). Consoante com este resultado, dois compostos de rutênio avaliados em modelo de ratos BALB/c inoculados com células HeLa foram capazes de manter o peso dos animais, ao contrário da cisplatina (Wang *et al.*, 2015). Da Silva *et al.* (2021) demonstraram que um complexo de rutênio e ligantes inibidores de topoisomerase também foi capaz de manter o peso dos animais tratados semelhante ao grupo CI, em modelo de melanoma em camundongos C57BL/6. Segundo Van Oort *et al.* (2018) durante o tratamento quimioterapêutico com fármacos de alta toxicidade sistêmica, como é o caso da CDDP, as papilas gustativas da língua podem ficar com as suas funções diminuídas e, conseqüentemente, a produção de saliva é reduzida.

Tais achados também foram demonstrados em roedores onde fatores neurotróficos derivados do cérebro nas papilas gustativas diminuem a perda de sabor induzida pela quimioterapia (Nosrat *et al.*, 2022). Somada a toxicidade sistêmica a qual refere-se à desidratação e nefrotoxicidade, efeitos adversos gastrointestinais, além da perda de paladar, como o gosto metálico, diarreia e recorrente perda de peso são observados no tratamento com CDDP (Perse, 2021;

Qi *et al.*, 2019; Schiessel *et al.*, 2023). Cerca de 70% dos pacientes demonstram tais efeitos adversos durante o tratamento (Qi *et al.*, 2019). Embora os mecanismos da toxicidade gastrointestinal não estejam claramente descritos, acredita-se que estejam relacionados ao mecanismo de estresse oxidativo mediado por EROs, visto que tais radicais podem induzir lesões na mucosa (Qi *et al.*, 2019). Essas alterações na fisiologia do paladar podem ter impactado nas preferências alimentares ao longo do tratamento e justificam preferências alimentares específicas não ofertadas durante o período. Conseqüentemente, houve necessidade de aumento de ingesta hídrica no grupo tratado com CDDP a fim de otimizar a produção de saliva, condições não observadas naqueles animais tratados com Transcinam.

Outro parâmetro frequentemente alterado durante os tratamentos com quimioterápicos convencionais é o peso corpóreo (Nishikawa *et al.*, 2021). Durante o processo de carcinogênese há alterações no metabolismo celular com a finalidade de suprir as necessidades energéticas do tumor, além de muitos pacientes oncológicos apresentarem estado de caquexia desencadeada a partir de tratamentos oncológicos (Argilés *et al.*, 2014; Baracos *et al.*, 2018; Hanahan; Weinber, 2011; Nishikawa *et al.*, 2021) como a CDDP já demonstrado também em modelos experimentais com roedores (Lee *et al.*, 2023; Patel; Damle, 2013). A caquexia é uma síndrome caracterizada pelas mudanças metabólicas e redução da ingestão de alimentos, podendo levar à desnutrição e por consequência, a perda de peso (Arends *et al.*, 2017; Schiessel *et al.*, 2023). O fato de não ter sido observado redução no peso corpóreo dos animais tratados com Transcinam nos leva a apontar que isso ocorreu devido à não redução no consumo alimentar proveniente de um tratamento com menor toxicidade sistêmica que, conseqüentemente, também não causou a necessidade do aumento de ingesta hídrica.

Observou-se uma redução significativa no peso de alguns órgãos (baço, fígado e rins) e no quantitativo de células do sangue periférico no grupo de animais tratados com CDDP, o que não aconteceu nos animais tratados com Transcinam. Em concordância, Park *et al.* (2020) observaram que camundongos C57BL/6 tratados por 20 dias com CDDP (6 doses de 3 mg/kg p.c.), diminuíram significativamente em 18,98% e 17,87% o peso do fígado e dos rins, respectivamente, quando comparados aos controles, mostrando também uma elevação nos níveis séricos de Creatinina. De modo oposto, um estudo *in sílico* de Motta; Pinto; Araujo (2023) demonstrou que derivados de AC não inibiram enzimas do

complexo CYP450, o que significa que não causariam danos ao fígado. Ainda, dados na literatura demonstram experimentalmente ausência de alterações histopatológicas nos rins e fígado em decorrência de tratamentos com AC, não acarretando danos funcionais ao órgão (Anderibigbe, 2020; Babaeenezhad *et al.*, 2021; De; Baltas; Bedos-Belval, 2011; Lee; Kim; Nam, 2020; Pontiki *et al.*, 2014; Ruwizhi; Hseu *et al.*, 2018; Savic *et al.*, 2020; Tohamy, 2016).

A redução do peso corpóreo no grupo tratado com CDDP pode estar relacionada à redução do peso dos órgãos. A CDDP pode afetar as mitocôndrias, possivelmente levando a lesões, apoptose e necrose das células intestinais, hepáticas e renais (Babaeenezhad *et al.*, 2021; Qi *et al.*, 2019; Tohamy, 2016). Além disso, dentre os diversos efeitos adversos causados pela CDDP está a imunossupressão e a nefrotoxicidade (Galluzzi *et al.*, 2015; Tixier *et al.*, 2017; Pabla; Dong, 2008; Wang *et al.*, 2021). Em decorrência da redução da produção de células sanguíneas (hematopoiese medular) advindo de uma toxicidade na medula óssea (mielotoxicidade), há uma diminuição significativa ou nenhuma produção celular (Johns; Christopher, 2012). Ainda, o baço e o fígado, além de serem responsáveis pela hematopoiese extramedular também são órgãos com grande deposição e acúmulo de CDDP, o que muitas vezes acarreta danos agudos aos mesmos (Johns; Christopher, 2012; Wu *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2021). O baço é um órgão que apresenta importante papel na função de retenção de células mortas, o qual consiste na filtragem do sangue, realizando dessa forma, a captura e eliminação de células velhas, contribuindo assim para uma reciclagem eficiente do tecido sanguíneo (Johns; Cristóvão, 2012; Lewis *et al.*, 2019). O fígado, por sua vez, é responsável pela filtragem do sangue, liberando tais enzimas para inativação dos fármacos, sendo estes levados aos rins e excretados, sendo um importante órgão de metabolização de medicamentos. Logo, a lesão hepática pode se agravar com aumento observado nas concentrações de aminotransferases TGO e TGP (enzimas responsáveis pela metabolização de proteínas) (Wu *et al.*, 2023). Nesse sentido, a imunossupressão e mielotoxicidade discutidas acima, podem levar a insuficiência do baço, fígado e rins. Isso porque a produção celular do baço e fígado não ocorre como o padrão, acarretando a atrofia dos órgãos devido ao fluxo inadequado de filtragem e consequente perda de função (Ghosh, 2019; Makovec, 2019; Wu *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2021). Do mesmo modo, ocorre insuficiência renal e atrofia dos rins, uma vez que estes por também apresentarem alta deposição de CDDP são

frequentemente afetados pela produção de EROs, não excretando adequadamente metabólitos dos fármacos advindos do fígado (Ghosh, 2019; Makovec, 2019; Wu *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2021).

A avaliação da função renal é fundamental na prática clínica para o monitoramento diante dos diferentes tipos de tratamentos antineoplásicos. Entre os parâmetros mais amplamente utilizados estão a avaliação de creatinina e ureia (Wang; Ran; Jiang, 2014). A creatinina é um metabólito da creatina produzida pelos músculos, fígado, rins e pâncreas para fins energéticos. A ureia é um resíduo nitrogenado que está presente de forma predominante no fígado. De maneira geral, a creatinina tende a ser mais específica, devido as diversas alterações que podem alterar os resultados de ureia. Ambas são filtradas e eliminadas pelo sistema renal, sendo que as taxas dessas substâncias avaliadas no sangue, determinam, consequentemente, a saúde renal (Ferreira *et al.*, 2018; Moore; Sharer, 2017; Wang; Ran; Jiang, 2014). Isso porque diante de um comprometimento dos rins a creatinina não é eliminada corretamente devido a uma filtragem irregular, tendendo a acumular na corrente sanguínea, levando a níveis superiores ao padrão. Os resultados demonstram que animais tratados com Transcinam não apresentaram níveis elevados de creatinina e ureia sérica (Figura 8 A e B), indicando ausência de nefrotoxicidade, enquanto que, no tratamento com CDDP, esse marcador aumentou consideravelmente. De forma semelhante, Cruz *et al.* (2022) observaram que a CDDP (5 mg/kg p.c.) também foi capaz de reduzir o peso corpóreo, do baço, fígado e rins de camundongos machos C57BL/6, bem como elevar os níveis séricos de Creatinina e Ureia. Ferreira *et al.* (2018) também observaram redução do consumo hídrico, perda de peso corpóreo (13%) e do fígado (44%), altos níveis de creatinina e ureia em animais C57BL/6 tratados com CDDP (5 mg/kg p.c.). De forma oposta, camundongos Swiss com carcinoma de *Ehrlich* tratados por 7 dias com CDDP (1 mg/kg p.c.) não demonstraram diferenças estatísticas quando comparados aos controles. Isso, no entanto, pode ser explicado pela baixa dosagem do fármaco utilizado (Andrade *et al.*, 2022).

Considerando que o maior acúmulo de CDDP acontece nos rins acarretando toxicidade aguda (Ghosh, 2019) relacionada ao estresse oxidativo gerado pelo aumento de EROs e óxido nítrico (ON) (Babaeenezhad *et al.*, 2021; Tohamy, 2016), a manutenção dos níveis adequados de creatinina e ureia sérica nos grupos tratados com Transcinam pode estar relacionada à atividade do seu ligante. Derivados do AC

são considerados bons antioxidantes, eliminando radicais livres, EROs e ainda apresentam atividade antiproliferativa contra células tumorais, associada à presença dos radicais fenil presentes na molécula (Ruwizhi; Anderibigbe, 2020) e eficaz atividade antimicrobiana (De; Baltas; Bedos-Belval, 2011; Pontiki *et al.*, 2014; Ruwizhi; Anderibigbe, 2020). Nessa vertente, camundongos Swiss tratados com AC 20 mg/kg p.c. por 5 dias (Tohamy, 2016) e com complexos de rutênio 5 mg/kg p.c. por 7 dias (Andrade *et al.*, 2022) apresentaram ganho de peso, indicando ausência de toxicidade quando comparados ao tratamento com CDDP (1 mg/kg p.c.) (Andrade *et al.*, 2022). Segundo Tohamy (2016), o tratamento com AC combinado à CDDP (5 mg/kg p.c.) reduziu a toxicidade sistêmica do tratamento. Tohamy (2016) e Babaeenezhad *et al.* (2021) também demonstraram redução de alterações histopatológicas renais e níveis séricos de creatinina e ureia no tratamento com AC isolado ou combinado à CDDP. Em ambos os estudos, os autores atribuíram tais resultados ao potencial antioxidante do AC, dada a detoxificação de radicais livres gerados por EROs como consequência a redução de ON pela inativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), responsável por regular a expressão de diversos genes e pela ativação do fator nuclear 2 relacionado ao eritróide 2 (NRF-2) responsável pela expressão de genes envolvendo respostas antioxidantes endógenas (Babaeenezhad *et al.*, 2021; Tohamy, 2016). Da mesma forma, Savic *et al.* (2020), em camundongos BALB/c portadores de carcinoma de cólon tratados por 18 dias com complexos de terpiridina e Ru (II) 2 mg/kg/p.c., relatam uma diminuição nos níveis de creatinina e danos renais histológicos quando comparados ao derivado de Pt oxaliplatina.

Assim como nos rins, a avaliação da função hepática também é crucial na prática clínica para o monitoramento diante dos diferentes tipos de tratamentos antineoplásicos (Ricart, 2017). Nesse contexto TGO e TGP são transaminases, ou seja, enzimas aspartato (AST) e alanina (ALT) produzidas no fígado e dosadas no sangue para indicar o funcionamento do órgão, sendo excretadas pelo sistema renal. Desse modo, a dosagem dessas enzimas no sangue nos informa sobre a saúde hepática, visto que altas taxas podem decorrer de lesões nas células do fígado, causadas por exemplo, por medicamentos (Contreras-Zentella; Hernández-Muñoz, 2015; Ricart, 2017). No presente trabalho, os dados demonstraram valores elevados de TGO e TGP no grupo tratado com CDDP, enquanto Transcinam não alterou tais parâmetros (Figura 8 C e D). De modo geral, TGP é mais específico visto que, diferente de TGO, atua mais no fígado do que outros órgãos (Contreras-

Zentella; Hernández-Muñoz, 2015, Ricart, 2017). Isso também explica as diferenças entre todos grupos e o CN na avaliação do biomarcador TGO, visto que esse também pode estar alterado na presença de tumores (Chen *et al.*, 2022; Kubek; Jenne, 2018). Tais resultados complementam também os achados no peso dos órgãos, visto que como demonstrado no grupo tratado com CDDP, o peso do fígado foi reduzido nesses animais. A hepatotoxicidade da cisplatina já é bem descrita na literatura, sendo o fígado o principal local onde a maioria das reações metabólicas ocorrem, sendo também o local onde CDDP sofre biotransformação (Dasari; Tchounwou, 2014; Luyu *et al.*, 2019). Acredita-se que a hepatotoxicidade da CDDP esteja relacionada com a produção de EROs, o que conseqüentemente se relaciona aos níveis de CYP450 (Luyu *et al.*, 2019; Quintanilha *et al.*, 2017).

Indo ao encontro com os achados do trabalho, trabalhos na literatura também observaram toxicidade hepática pelo aumento de TGO e TGP em camundongos C57BL/6 que foram tratados com CDDP 5 mg/kg p.c. por três dias e 3 mg/kg p.c. com 6 doses por 20 dias, sendo esse último referente a animais portadores de melanoma (Park *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2023). De modo oposto, em um estudo *in silico* de Motta; Pinto; Araújo, (2023) demonstraram que derivados de AC não inibiram enzimas do complexo CYP450, o que significa que não causariam danos ao fígado.

A avaliação de citotoxicidade e mutagenicidade no sangue periférico e na medula óssea são importantes para estimar os riscos e/ou os danos de determinadas substâncias no organismo (Gesef-Anvisa, 2013; OECD, 1997; OECD 489, 2016). A medula óssea é responsável pela produção de células sanguíneas imaturas a partir de células troncos, sendo esta produção regulada por fatores de crescimento, de acordo com as necessidades do organismo. Após se dividirem, as células amadurecem na corrente sanguínea. Nesse sentido a análise de células da medula óssea refletem danos agudos, enquanto o acúmulo destes danos é observado nas células sanguíneas. Neste trabalho, naqueles grupos tratados com Transcinam, a razão EPC/EPC+ENC foi significativamente maior quando comparado com o grupo tratado com CDDP, revelando ausência de citotoxicidade (Figura 8 A). De modo contrário, a CDDP influenciou na hematopoiese, desencadeando dessa forma mielotoxicidade e imunossupressão na medula óssea e conseqüentemente nas hemácias no sangue, induzindo à anemia, o que justifica a reduzida contagem de EPC no sangue periférico (Figura 9 B) (Ghosh, 2021; Schiessel *et al.*, 2023). Os resultados também demonstraram que tanto na medula óssea como no sangue

periférico de animais tratados com Transcinam, uma menor frequência de MN foi observada quando comparados ao grupo CDDP (Figura 8 C e D).

Nesse sentido, acredita-se que o mecanismo de ação do Transcinam difere da CDDP. Visto que os MN são biomarcadores robustos oriundos de fragmentos decorrentes de quebras ou da não fusão do fuso mitótico, os quais são encapsulados no citoplasma da célula, a alta frequência observada no grupo CDDP é justificada pelo fato de que a CDDP também é considerada um fármaco altamente mutagênico, sendo um dos principais mecanismos de ação a interação com DNA e promoção de lesões não específicas (Ghosh, 2019, Krupina; Goginashvili; Cleveland, 2021; Makovec, 2019; Zhang *et al.*, 2021). Divergindo em parte dos resultados, Valenzuela-Salas *et al.* (2019) demonstram que animais C57BL/6 portadores de melanoma apresentaram células para contagem no sangue periférico quando tratados com 7 aplicações CDDP (2 mg/kg p.c.) no período de 21 dias, a custo de uma alta mutagenicidade. Cruz *et al.* (2022) e Ferreira *et al.* (2018) demonstraram que nos tratamentos de camundongos C57BL/6 com CDDP (5 mg/kg p.c.), células da medula óssea não foram obtidas para análise, o que confirma a baixa produção de hemácias e a citotoxicidade aguda. Mello-Andrade *et al.* (2018) avaliaram a frequência de danos na medula óssea de camundongos Swiss após 14 dias de tratamento de complexos de Ru (II) nas doses de 2 e 6 mg/kg p.c., e demonstraram uma baixa taxa de danos no DNA quando comparado ao grupo CDDP (2 mg/kg p.c.). Os autores propõem que os danos ao DNA causados pelo complexo de Ru (II) advém de danos indiretos, envolvendo as mitocôndrias das células cancerosas. Na mesma vertente do presente trabalho, Rinaldi-Neto *et al.* (2021) obtiveram resultados semelhantes, visto a redução de células para contagem na medula óssea em animais C57BL/6 portadores de melanoma tratados com CDDP 5 mg/kg/p.c., o que não ocorreu no grupo de animais tratados com complexos de Ru (II).

Embora os resultados tenham demonstrado que o tratamento com Transcinam nas doses antitumorais mais efetivas (5 e 10 mg/kg p.c.) não tenha impactado significativamente nos parâmetros toxicológicos e no quantitativo de células, a dose de 5 mg/kg p.c. parece ser mais seletiva, uma vez que para alguns parâmetros avaliados (peso corpóreo, dos órgãos e EPCMNs) as alterações foram menores quando comparados ao tratamento com 10 mg/kg p.c. mantendo-se a mesma eficácia antitumoral. Isso pode ser explicado visto que uma dose mais

elevada pode trazer efeitos adversos (Dehelean *et al.*, 2021; Ijaz *et al.*, 2018). Logo demais mecanismos foram investigados na dose de 5 mg/kg p.c.

Neste trabalho, a genotoxicidade em células do fígado foi avaliada pelo ensaio cometa alcalino. Tal ensaio toxicológico é amplamente utilizado para avaliar lesões passíveis de reparo no material genético (Collins *et al.*, 2023; OECD 489, 2014; 2016). Dentre os parâmetros avaliados, o conteúdo de DNA na cauda (% DNA na cauda) é um dos parâmetros recomendados e utilizados na literatura (Carnizello *et al.*, 2018; Collins *et al.*, 2023; OECD 489, 2016; Rinaldi-Neto *et al.*, 2021). Carnizello *et al.* (2018) também observaram resultados semelhantes em camundongos Swiss tratados com um complexo de Ru (II), sendo a porcentagem de danos ao DNA na cauda reduzida quando comparada ao grupo CDDP, mesmo diante menor dose do que a utilizada no presente trabalho (1,5 mg/kg p.c.). Da mesma forma, um estudo envolvendo camundongos C57BL/6 portadores de melanoma também relatou achados semelhantes ao presente estudo, visto que animais com tumor apresentaram uma taxa de danos no DNA maior que o CN, e o grupo tratado com CDDP (5 mg/kg p.c.) apresentou alta porcentagem de lesões ao material genético comparado aos complexos de Ru (II) testados (Rinaldi-Neto *et al.*, 2021).

Além dos resultados obtidos no ensaio cometa, é evidente que a interação de compostos com o DNA pode ser um possível mecanismo de ação frente ao câncer, sendo característico de diversos fármacos (Sirajuddin *et al.*, 2013; Gill; Thomas, 2012). Através do ensaio utilizando *ct*-DNA, Transcinam demonstrou afinidade e interação pelo material genético, visto que a K_b (10^7) está em maior ordem de grandeza quando comparado a complexos de Ru que também interagem com o DNA via sulcos, bem como quando se compara a um intercalador de DNA clássico utilizado como parâmetro, como brometo de etídio ($K_b = 10^6$), sendo que, quanto mais próximo a esse K_b , maior a força de interação e a afinidade com o DNA (Mi *et al.*, 2019; Skehan *et al.*, 1990).

A presença de hipocromismo observada, aliado com a ausência de batocromismo (deslocamento para a direita) são aspectos indicativos de interação com DNA via sulcos (REHMAN, 2015). As ligações via sulcos são ligações não covalentes, ou seja, causam menos danos ao material genético, sendo característico as ligações de hidrogênio (fracas, transitórias e reversíveis) (Andrezálová; Országhová, 2021). Por outro lado, é bem estabelecido na literatura que a CDDP

apresenta ligações covalentes com o DNA, sendo um de seus principais mecanismo de ação antitumoral, o que acarreta uma maior taxa de danos devido a formação de adutos covalentes entre complexos de platina e DNA, além de alterações permanentes no material genético (Andrezálová; Országhová, 2021; Ghosh, 2019; Makovec, 2019). O fato de ocorrer uma ligação não covalente Transcinam-DNA também pode gerar uma menor taxa de danos no grupo Transcinam do que o observado na CDDP (Andrezálová; Országhová, 2021). Do mesmo modo, em um estudo, os autores descreveram a ligação de complexos de Ru (II) e *ct*-DNA como moderadas, seja via sulcos ou intercalação (Kanyora *et al.*, 2024). Divergindo de tais achados, Carnizello *et al.* (2016) demonstrou por meio do ensaio *ct*-DNA uma fraca ligação de um complexo de Ru (II) com o DNA, devido a uma baixa K_b observada, o que pode estar relacionado aos diferentes ligantes.

Diversas vias estão envolvidas na atividade antitumoral e estando o melanoma relacionado com uma proliferação celular descontrolada, logo o PCNA é uma proteína crucial para os processos de regulação da proliferação celular, estando em abundância durante a fase S do ciclo celular (Choe; Moldovan, 2017; González-Magaña; Blanco, 2020; Kestler; Kuhl, 2011). Desse modo, a análise imuno-histoquímica buscou investigar quais mecanismos estão envolvidos na redução tumoral, sendo que quanto menor a expressão de PCNA, menor a taxa de proliferação celular no tecido tumoral, o que indica eficácia na redução tumoral por meio desse mecanismo de ação (Choe; Moldovan, 2017; González-Magaña; Blanco, 2020). Com a imunomarcagem de PCNA, os resultados mostraram uma redução na expressão desse marcador para os grupos Transcinam 5 e CDDP quando comparado aos controles (Figura 12 A).

De modo geral, a ativação da via MAPK por meio de fatores de crescimento está associada a regulação positiva de PCNA. Isso acontece porque a ativação da via BRAF/MEK/ERK além de interagirem com outras vias como a MITF, regulam positivamente a ciclina D1 e demais fatores de transcrição relacionados com o crescimento e proliferação celular, incluindo o PCNA (Essers *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2016; Sanches; Almeida; Freitas, 2017; Ullah *et al.*, 2022). Dessa forma, Transcinam pode também ser responsável por inibir a função de PCNA e, conseqüentemente, interromper o ciclo celular das células cancerosas. Isso porque os dados obtidos neste trabalho corroboram o potencial antitumoral do Transcinam, impulsionado em parte, pela inibição da proteína relacionada à

proliferação celular (PCNA), da mesma forma que atua a CDDP (Søgaard *et al.*, 2018). Corroborando com tais achados, Cabelo *et al.* (2009) trataram por via oral camundongos SCID (com imunodeficiência combinada grave) portadores de melanoma com um derivado de AC (120 mg/kg p.c.) por 10 dias, observando também uma redução na expressão proteica de PCNA quando comparado ao Cl. Pintus *et al.* (2002) demonstrou por imunoblot *in vitro* que um composto contendo Ru reduziu a proliferação celular de células ECV304 transformada (derivada de células endoteliais da veia umbilical humana), envolvendo vias MERK/ERK e também o PCNA. Ademais, um trabalho *in vitro* também demonstrou resultados de diversos complexos de Ru (II), inclusive do Transcinam, cuja atividade antiproliferativa contra células CHL-1 foi associada à sua capacidade de reduzir a fosforilação de ERK, uma das vias envolvidas na regulação do PCNA (Negreti *et al.*, 2022).

De forma geral, como já esperado, CDDP não demonstrou nenhuma seletividade, diferente do que foi observado nos grupos tratados com Transcinam. Muito possivelmente, sua eficácia antitumoral e seletividade advém de seus precursores, seja pela presença do CF₃ no AC e/ou pela estabilidade, similaridade com ferro e versatilidade estrutural do complexo de Ru (II). Ainda, a ligação não covalente do Transcinam com o DNA leva a uma menor taxa de lesões ao material genético. Já a CDDP, em ambiente aquoso (como no plasma), se mantém estável devido à presença de alta concentração de cloro, mas ao adentrar no meio intracelular, suas duas moléculas de cloro são substituídas por grupos hidroxila. Dessa forma, o quimioterápico em sua forma ativa pode ligar-se covalentemente a macromoléculas como o DNA, ácidos nucleicos e proteínas (Alderden; Hall; Hambley, 2006; Moon *et al.*, 2021). Embora essa maquinaria potencialize sua atividade e seja seu principal mecanismo de ação, tais ligações não são seletivas, o que acaba por afetar também células saudáveis (Ghosh, 2019; Qi *et al.*, 2019).

8 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que o Transcinam exerceu eficácia anti-melanoma no modelo experimental utilizado, não apresentando diferenças significativas em relação ao efeito antitumoral do tratamento com CDDP. Além disso, Transcinam foi capaz de exercer seu efeito sem induzir a toxicidade sistêmica na dose de 5 mg/kg p.c., demonstrando segurança. De forma complementar, Transcinam 5 não apresentou sinais de citotoxicidade, tampouco mutagenicidade. Ainda, os dados, embora preliminares, sugerem que o Transcinam pode exercer seu efeito característico através da interação com o DNA do tipo não covalente via sulcos e também pela redução das taxas de proliferação celular por redução de PCNA. Diante destes achados, Transcinam pode ser um novo complexo de Ru (II) promissor para aplicações futuras na terapia do câncer.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília: ANVISA, 2013. Versão 2.
- ALDERDEN, R. A.; HALL, M. D.; HAMBLEY, T. W. The discovery and development of Cisplatin. **Journal of Chemical Education**, Sidney, v. 83, n. 5, 2006.
- AKBANI, R. *et al.* Cancer genome atlas network: genomic classification of cutaneous melanoma. **Cell**, Bethesda, v. 161, n. 7, 2015.
- ALVES-FERNANDES, D. K. *et al.* *In vivo* antitumoral effect of 4-nerolidylcatechol (4-NC) in NRAS-mutant human melanoma. **Food and Chemical Toxicology**, São Paulo, v. 141, 2020.
- ANDRADE, M. H. P. S. de *et al.* Estudo da atividade antitumoral de um novo complexo de Ru^{3+} : uma proposta para o design de metalofármacos de baixa toxicidade. **Química Nova**, Recife, v. 45, 2022.
- ANDREZÁLOVÁ, L.; ORSZÁGHOVÁ, Z. Covalent and noncovalent interactions of coordination compounds with DNA: An overview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 225, 2021.
- ARENDS, J. *et al.* ESPEN expert group recommendations for action against cancer-related malnutrition. **Clinical Nutrition**, Bratislava, v. 36, n. 5, 2017.
- ARGILÉS, J. M. *et al.* Cancer cachexia: understanding the molecular basis. **Nature Reviews Cancer**, Barcelona, v. 14, n. 11, 2014.
- ARNOLD, M. *et al.* Global burden of cutaneous melanoma in 2020 and projections to 2040. **JAMA Dermatology**, Lyon, v. 158, n. 5, 2022.
- BASU, A. K. DNA Damage, Mutagenesis and cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, Storrs, v. 23, n. 19, 2018.
- BABAEENEZHAD, E. *et al.* Cinnamic acid ameliorate gentamicin-induced liver dysfunctions and nephrotoxicity in rats through induction of antioxidant activities. **Heliyon**, Tehran, Iran, v. 7, n. 7, 2021.
- BARACOS, V. E. *et al.* Cancer-associated cachexia. **Nature Reviews Disease Primers**, Alberta, Canada, v. 18, n. 4, 2018.
- BARRA, C. V.; NETTO, A.V.G. Interações de complexos antitumorais e o DNA e suas ferramentas de análise: um enfoque nos metalintercaladores. **Revista Virtual de Química**, Brasil, v. 7, 2015.
- BARRIOS, C. *et al.* Barriers in access to oncology drugs - a global crisis. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 20, n. 1, 2023.

BASHYAM, M. D. *et al.* The yin and yang of cancer genes. **Gene**, Telangana, India, v. 704, 2019.

BATUS, M. *et al.* Optimal management of metastatic melanoma: current strategies and future directions. **American Journal of Clinical Dermatology**, Chicago, v. 14, n. 3, 2013.

BENJAMIN-RIVERA, J. A. *et al.* Exploring serum transferrin regulation of nonferric metal therapeutic function and toxicity. **Inorganics**, Rio Piedras, v. 8, n. 9, 2020.

BERGAMO, A. *et al.* Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Trieste, v. 106, n. 1, 2012.

BORGES, L. J. H. *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies of the antineoplastic activity of copper (II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Rio de Janeiro, v. 123, 2016.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer Journal for Clinicians**, Lyon, v. 68, n. 6, 2018.

BURLINSON, B. *et al.* *In vivo* comet assay workgroup, part of the fourth International workgroup on genotoxicity testing. Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the *in vivo* comet assay workgroup. **Mutation Research**, Huntington, v. 627, n. 1, 2007.

CABELLO, C. M. *et al.* The cinnamon-derived michael acceptor cinnamic aldehyde impairs melanoma cell proliferation, invasiveness, and tumor growth. **Free Radical Biology and Medicine**, Tucson, v. 46, n. 2, 2009.

CARNIZELLO, A. P. *et al.* *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of a novel carbonyl ruthenium compound, the ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF₆ [dppb= 1,4-bis(diphenylphosphine) butane and bipy= 2,2'-bipyridine]. **Journal of Inorganic Biochemistry**, São Paulo, v. 164, 2016.

CARNIZELLO, A. P., *et al.* Study of the cytotoxic and genotoxic potential of the carbonyl ruthenium (II) compound, ct- [RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF₆ [dppb = 1,4-bis(diphenylphosphino)butane and bipy = 2,2'-bipyridine], by *in vitro* and *in vivo* assays. **Journal of Applied Toxicology**, São Paulo, 2018.

CARR, S; SMITH, C; WERNBER, J. Epidemiology and risk factors of melanoma. **Surgical Clinics of North America**, Marshfield, v. 100, n. 1, 2020.

CASTELLANI, G. *et al.* BRAF Mutations in Melanoma: Biological Aspects, Therapeutic Implications, and Circulating Biomarkers. **Cancers**, Rome, Italy, v. 15, n. 4026, 2023.

CHEN, W. *et al.* Elevated AST/ALT ratio is associated with all-cause mortality and cancer incident. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, Taizhou Zhejiang Province, v. 36, n. 5, 2022.

CHOE, K. N.; MOLDOVAN, G. Forging ahead through darkness: PCNA, still the

principal conductor at the replication fork. **Molecular Cell**, Hershey, v. 65, n. 3, 2017.

CHOPRA, A.; RAO, U., N., M. Pathology of Melanoma. **Surgical Clinics of North America**, Pittsburgh, v. 100, n. 1, 2020.

COÊLHO, N. C. F. *et al.*, Metalofármacos à base de Rutênio: uma busca por complexos metálicos bioativos de baixa toxicidade. **Revista Virtual de Química**, Pernambuco, v. 15, n. 3, 2023.

COLLINS, A. *et al.* Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. **Nature Protocols**, Oslo, v. 18, n. 3, 2023.

CROWE, A. R.; YUE, W. Semi-quantitative determination of protein expression using immunohistochemistry staining and analysis: an integrated protocol. **Bio-Protocol**, Oklahoma, v. 9, n. 24, 2019.

CRUZ, R. C. R., *et al.* Watermelon reduces the toxicity of Cisplatin treatment in C57BL/6 mice with induced melanoma. **Nutrition and Cancer**, São Paulo, v. 74, n.3, 2022.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, Mississippi, v. 740, 2014.

DA SILVA, M. *et al.* Ruthenium (II) diphosphine complexes with mercapto ligands that inhibit topoisomerase IB and suppress tumor growth *in vivo*. **Inorganic Chemistry**, São Paulo, v. 60, n. 18, 2021.

DA SILVA, M. J. S.; O'DWYER, G.; OSORIO-DE-CASTRO, C. G. S. Cancer care in Brazil: structure and geographical distribution. **BMC Cancer**, Brazil, v. 19, n. 987, 2019.

DAVIS, L., E.; SHALIN, S., C.; TACKETT, A., J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. **Cancer Biology & Therapy**, Arkansas, v. 20, n. 11, 2019.

DE P.; BALTAS. M.; BEDOS-BELVAL, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agentes: a review. **Current Medicinal Chemistry**, France, v. 18, n. 11, 2011.

DEHELEAN, C. A. *et al.* Plant-derived anticancer compounds as new perspectives in drug discovery and alternative therapy. **Molecules**, Timisoara, v. 26, n. 4, 2021.

DUAN, L. *et al.* Isolated seven-coordinate Ru(IV) dimer complex with [HOHOH]-bridging ligand as an intermediate for catalytic water oxidation. **Journal of the American Chemical Society**, Stockholm, v. 131, n. 30, 2009.

EMSLEY, J. Nature's building blocks: an a-z guide to the elements. **Oxford University Press**, United Kingdom, 2001.

ESSERS, J. *et al.* Nuclear dynamics of PCNA in dna replication and repair. **Molecular and Cellular biology**, Rotterdam, v. 25, n. 21, 2005.

FELESZKO, W. *et al.* Potentiated antitumor effects of cisplatin and lovastatin against MmB16 melanoma in mice. **European Journal of Cancer**, Warsaw, v. 34, n. 3, 1998.

FERLAY J. *et al.* Global cancer observatory: cancer today. **International Agency for Research on Cancer**, France, 2020.

FERREIRA-SILVA, G. A. *et al.* [Ru (tubo) (dppb) (bipy)] PF₆: A novel ruthenium complex that effectively inhibits ERK activation and cyclin D1 expression in A549 cells. **Toxicology In Vitro**, Brazil, v. 44, 2017.

FERREIRA, N. H. *et al.* Europium(III)-doped yttrium vanadate nanoparticles reduce the toxicity of cisplatin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Brazil, v. 182, 2018.

FRANÇA, S. B. *et al.* Synthesis, applications, and structure-activity relationship (SAR) of cinnamic acid derivatives: a review. **Research, Society and Development**, Brazil, v. 10, n. 1, 2021.

GALLUZZI, L. *et al.* Effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. **Cancer Cell**, France, v.28, n. 6, 2015.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, India, v. 88, 2019.

GILL, M. R., THOMAS, J.A., Ruthenium (II) polypyridyl complex and dna-from structural probes to cellular imaging and therapeutics. **Chemical Society Reviews**, Sheffield, v. 41, 2012.

GONZÁLEZ-MAGAÑA, A.; BLANCO, F. J. Human PCNA structure, function and interactions. **Biomolecules**, Bizkaia, v. 10, n. 4, 2020.

GUPTA, A.; GOMES, F.; LORIGAN, P. The role for chemotherapy in the modern management of melanoma. **Melanoma Management**, United Kingdom, v. 4, n. 2, 2017.

HAJIAN, R., HUAT, T.G., Spectrophotometric studies on the thermodynamics of the ds-dna interaction with irinotecan for a better understanding of anticancer drug-dna interactions. **Journal of Spectroscopy**, Gachsaran, 2013.

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**, China, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBER, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cells**, Switzerland, v. 144, n. 5, 2011.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, Switzerland v. 12, n.1, 2022.

HANSSANPOUR, S., H.; DEGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, Iran, v. 4, n. 4, 2017.

HAUSMAN, D. M. "What is cancer?". **Perspectives in Biology and Medicine**, United States of America v. 62, n. 4, 2019.

HAYASHI, M. *et al.* The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research Letters**, Tokyo, 1990.

HAYASHI, M. *et al.* *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research Letters**, Tokyo, v. 312, 1994.

HAYASHI, M. *et al.* *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Tokyo, v. 35, 2000.

HAZAFI, A.; REHMAN, K. U., JAHAN, N.; JABEEN, Z. The role of polyphenol (flavonoids) compounds in the treatment of cancer cells. **Nutrition and Cancer**, Faisalabad, v. 72, n. 3, 2020.

HEINRICH, T. A. *et al.* A new nitrosyl ruthenium complex: synthesis, chemical characterization, *in vitro* and *in vivo* antitumor activities probable mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Brazil, v. 46, n. 9, 2011.

HODIS, E. *et al.* A landscape of driver mutations in melanoma. **Cell**, United States of America, v. 150, 2012.

HOOGENBOEZE, E. N., DUVALL, C. L. Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Nashville, v. 130, 2018.

HOU, L.; PAVAN, W. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to Mitf? **Cell Research**, China, 2008.

HSEU, Y. C. *et al.* Trans-cinnamic acid attenuates UVA-induced photoaging through inhibition of AP-1 activation and induction of Nrf2-mediated antioxidant genes in human skin fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**, Taiwan, v. 90, n. 2, 2018.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer tomorrow**. France: IARC, 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer tomorrow**. France: IARC, 2022.

IJAZ, S. *et al.* Plant derived anticancer agents: A green approach towards skin cancers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Dublin, v. 103, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Ambiente, trabalho e câncer**: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2023**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2022.

JAIN, A. K.; PANDEY, A. K. *In vivo* micronucleus assay in mouse bone marrow. In: Dhawan, A., Bajpayee, M. (eds) genotoxicity assessment. **Methods in Molecular Biology**, Pradash, v. 2031, 2019.

JOHNS, J. L.; CHRISTOPHER, M. M. Extramedullary hematopoiesis: a new look at the underlying stem cell niche, theories of development, and occurrence in animals. **Veterinary Pathology**, California, v. 49, n. 3, 2012.

KALIKS, R. A. *et al.* Differences in systemic cancer treatment in Brazil: my public health system is different from your public health system. **Brazilian Journal of Oncology**, Brazil, v. 13, 2017.

KANYORA, A. K. *et al.* Mononuclear η^6 -arene ruthenium (II) complexes with pyrazolyl-pyridazine ligands: synthesis, CT-DNA binding, reactivity towards glutathione, and cytotoxicity. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, Egerton, v. 29, 2024.

KASAMOTO, S.; MASUMORI, S.; HAYASHI, M. *In Vivo* Micronucleus Assay in mouse bone marrow and peripheral blood. In: Dhawan, A., Bajpayee, M. (eds) Genotoxicity Assessment. **Methods in Molecular Biology**, Iwata, v. 1044, 2013.

KESTLER, H. A.; KÜHL, M. Generating a Wnt switch: it's all about the right dosage. **Journal of Cell Biology**, Ulm, v. 193, n. 3, 2011.

KIM, C.; KIM, B. Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress-mediated apoptosis: a review. **Nutrients**, Korea, v. 10 n. 8, 2018.

KOTECHA, R.; TAKAMI, A.; ESPINOZA, J.L. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. **Oncotarget**, United States of America, v. 7, n. 32, 2016.

KRUPINA, K.; GOGINASHVILI, A.; CLEVELAND, D. W. Causes and consequences of micronuclei. **Current Opinion in Cell Biology**, California, v. 70, 2021.

KUBES, P.; JENNE, C. Immune responses in the liver. **Annual Review of Immunology**, Calgary, v.36, 2018.

LANDELLE, G.; PANOSSIAN, A.; LEROUX, F. R. Trifluoromethyl ethers and -thioethers as tools for medicinal chemistry and drug discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, France, v. 14, n. 7, 2014.

LARSEN, M. T. *et al.* Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. **Molecular and Cellular Therapies**, Aarhus, v. 4, n. 3, 2016.

LAYLA, J. H. B. *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies of the antineoplastic activity of copper (II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Brazil, v. 123, 2016.

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

LEE, B. Y. *et al.* GDNF family receptor alpha-like antagonist antibody alleviates chemotherapy-induced cachexia in melanoma-bearing mice. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, Korea, v. 14, n. 3, 2023.

LEITER, U.; MEIER, F.; SCHITTEK, B.; CLAUS, GARBE, C. The natural course of cutaneous melanoma. **Journal of Surgical Oncology**, Tuebingen, v. 86, 2004.

LEONARDI, G. C. *et al.* Cutaneous melanoma: from pathogenesis to therapy. **International Journal of Oncology**, Catania, v. 52, 2018.

LEWIS, S. M.; WILLIAMS, A.; EISENBARTH, S. C. Structure and function of the immune system in the spleen. **Science Immunology**, United States of America, v. 4, n. 33, 2019.

LIMA, G. D. A. *et al.* Synthesis and antimetastatic activity evaluation of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions. **Toxicology In Vitro**, Brazil, v. 53, 2018.

LUKE, J. *et al.* Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. **Nature Reviews Clinical Oncology**, United States of America, v. 14, 2017.

LUO, C.; SHEN, J. Research progress in advanced melanoma. **Cancer Letters**, Zhejiang, v. 397, 2017.

LUYU Qi, *et al.* Advances in toxicological research of the anticancer drug Cisplatin. **Chemical Research in Toxicology**, China, v. 32, n. 8, 2019.

LUZINA, E. L.; POPOV, A. V. Synthesis and anticancer activity evaluation of 3,4-mono- and bicyclosubstituted N-(het)aryl trifluoromethyl succinimides. **Journal of Fluorine Chemistry**, Philadelphia, v. 168, 2014.

MACGREGOR, J. T. *et al.* Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, California, v. 189, n. 2, 1987.

MAKOVEC, T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. **Radiol Oncology**, Ljubljana, v.28, n. 53, 2019.

MELLO-ANDRADE, F. *et al.* Acute toxic effects of ruthenium (II)/amino acid/diphosphine complexes on swiss mice and zebrafish embryos. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Goiania, v. 107, 2018.

MI, Y. *et al.*, A promising DNA groove binder and photocleaver based on a dinuclear ruthenium (II) complex. **Journal of the Chilean Chemical Society**, China, v. 64, n. 1, 2019.

MIDDLETON, M. R. *et al.* Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, Manchester, v. 18, 2000.

MISHRA, H. *et al.* Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, India, v.144, n. 12, 2018.

MOON, H. M. *et al.* Cisplatin fastens chromatin irreversibly even at a high chloride concentration. **Nucleic Acids Research**, Korea, v. 49, n. 21, 2021.

MOORE, J. F.; SHARER, J. D. Methods for quantitative creatinine determination. **Current Protocols Human Genetics**, Birmingham, n. 93, 2017.

MOTTA, L. F.; PINTO, C. H. S.; ARAUJO, L. F. Análise farmacocinética e toxicológica *in silico* para derivados do ácido cinâmico. **Open Science Research X**, Brasil, v. 10, 2023.

NEGRETI, A. A., *et al.* Ruthenium (II) complex containing cinnamic acid derivative inhibits cell cycle progression at G0/G1 and induces apoptosis in melanoma cells. **New Journal of Chemistry**, Brazil, v. 46, 2022.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de platina (II) na terapia do câncer. **Revista Virtual de Química**, Brasil, v. 3, n. 3, 2011.

NISHIKAWA, H. *et al.* Cancer cachexia: its mechanism and clinical significance. **International Journal of Molecular Sciences**, Japan, v. 22, n. 16, 2021.

NOSRAT, I. V. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor overexpression in taste buds diminishes chemotherapy induced taste loss. **European Journal of Neuroscience**, California, v. 56, n. 7, 2022.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **Test guideline 489: *in vivo* mammalian alkaline comet assay**. France: OECD, 2014.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **Test guideline 489: *in vivo* mammalian alkaline comet assay**. France: OECD, 2016.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**. France: OECD, 2016. Section 4: health effects.

OLIVEIRA, P. A. *et al.* Chemical carcinogenesis. **Biomedical and Medical Sciences**, Portugal, v. 79, n. 4, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals**. Geneva: WHO, 2020. v. 3.

PABLA, N.; DONG, Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. **Kidney International**, Georgia, v. 73, n. 9, 2008.

PARK, H. R. *et al.* Synergistic anti-cancer activity of MH-30 in a Murine melanoma model treated with cisplatin and its alleviated effects against cisplatin-induced toxicity in mice. **In Vivo**, Korea, v. 34, n. 4, 2020.

PATEL, B. M.; DAMLE, D. Combination of telmisartan with Cisplatin controls oral cancer cachexia in rats. **Biochemistry Research International**, India, v. 2013, n. 642848, 2013.

PATTERSON, A. D. *et al.* Molecular regulation of carcinogenesis: friend and foe. **Toxicological Sciences**, Pennsylvania, v. 165, n. 2, 2018.

PENNY, L. K.; WALLACE, H. M. The challenges for cancer chemoprevention. **Chemical Society Reviews**, United Kingdom, v. 44, n. 24, 2015.

PERSE, M. Cisplatin mouse models: treatment, toxicity and translatability. **Biomedicines**, Ljubljana, v. 9, n. 10, 2021.

PETERS, J., M.; GONZALEZ, F., J. The evolution of carcinogenesis. **Toxicological Sciences**, Pennsylvania, n. 165, v. 2, 2018.

PINTUS, G. *et al.* Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway by the novel antimetastatic agent NAMI-A down regulates c-myc gene expression and endothelial cell proliferation. **European Journal of Biochemistry**, Italy, v. 269, n. 23, 2022.

POLSKY, D. *et al.* HDM2 Protein Overexpression, but not Gene Amplification, is Related to Tumorigenesis of Cutaneous Melanoma. **Cancer Research**, New York, v. 61, 2001.

PONTIKI, E. *et al.* Novel cinnamic acid derivatives as antioxidant and anticancer agents: design, synthesis and modeling studies. **Molecules**, Greece, v. 19, 2014.

PORTA-PARDO, E.; VALENCIA, A.; GODZIK, A. Understanding oncogenicity of cancer driver genes and mutations in the cancer genomics era. **FEBS Letters**, Barcelona, v. 594, n. 24, 2020.

QI *et al.* Advances in toxicological research of the anticancer drug Cisplatin. **Chemical Research in Toxicology**, China, v. 32, n. 8, 2019.

QUINTANILHA, J. C. F. *et al.* Involvement of cytochrome P450 in cisplatin treatment: implications for toxicity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, São Paulo, 2017.

RAIMONDI, S. *et al.* Melanoma epidemiology and sun exposure. **Acta Dermato Venereologica**, Milan, v. 100, n. 11, 2020.

RASTRELLI, M. *et al.* Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. **In Vivo**, Padova, v. 28, n. 6, 2014.

REHMAN, S. U. *et al.* Studying non-covalent drug-dna interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, India, v. 576, 2015.

RICART, A. D. Drug-induced liver injury in oncology. **Annals of Oncology**, United States of America, v. 28, n. 8, 2017.

RINALDI-NETO, F. *et al.* Antimelanoma effect of ruthenium(II)-diphosphine complexes containing naphthoquinone ligand. **Journal of Inorganic Biochemistry**, São Paulo, v. 222, n. 111497, 2021.

RODRIGUEZ, R. *et al.* Understanding current therapies in metastatic melanoma. **Revista Médica de Chile**, Santiago, v. 144, n. 11, 2016.

ROY, P. S.; SAIKIA, B. J. Cancer and cure: a critical analysis. **Indian Journal of Cancer**, Assam, v. 53, n. 3, 2016.

RUWIZHI, N.; ADERIBIGBE, B. A. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. **International Journal of Molecular Sciences**, Eastern Cape, v. 21, n.16, 2020.

SAHU, B. *et al.* Human cell transformation by combined lineage conversion and oncogene expression. **Oncogene**, Helsinki, v. 40, n. 36, 2021.

SAMPLE, A.; HE, Y.Y. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, Chicago, v. 34, n. 1, 2018.

SANCHES, M. M.; ALMEIDA, L. S.; FREITAS, J. P. Genes and melanoma. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, Lisboa, v. 75, n. 3, 2018.

SASAKI, Y. F. *et al.* Detection of chemically induced dna lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay. **Mutation Research**, Aomori, v. 388, n. 1, 1997.

SAUTER, E. R. *et al.* Cancer prevention and treatment using combination therapy with natural compounds. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, United states of America, v. 13, n. 3, 2020.

SAVIC, M. *et al.* Antitumor activity of Ruthenium(II) terpyridine complexes towards colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Molecules**, Kragujevac, v. 14, 2020.

SCHIESSEL, D. L. *et al.* Perda de peso em pacientes oncológicos: prevalência e prognóstico relacionados a sexo, idade, localização do tumor e sintomas de impacto nutricional. **Braspen Journal**, Paraná, v. 35, n. 1, 2020.

SCHMID, W. The Micronucleus test. **Mutation Research**, Zürich, 1975.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, California, v. 16, n. 6, 2016.

SHARMA, P. *et al.* Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. **Cell**, Houston, v. 168, 2017.

SENGA, S. S.; GROSE, R. P. Hallmarks of cancer—the new testament. **Open Biology**, London, v. 11, n. 1, 2021.

SIRAJUDDIN, M., ALI, S., BADSHAH, A., Drug-dna interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Pakistan, v. 124, 2013.

SKEHAN, P. *et al.*, New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, United States of America, v. 82, n. 13, 1990.

SOGAARD, C. K. *et al.* "Two hits - one stone"; increased efficacy of cisplatin-based therapies by targeting PCNA's role in both dna repair and cellular signaling, **Oncotarget**, Trondheim, v. 9, n. 65, 2018.

SUHAIL, Y. *et al.* Systems biology of cancer metastasis. **Cell Systems**, United States of America, v. 9, n. 2, 2019.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Georgia, v. 71, n. 3, 2021.

SPADA, A. *et al.* The uniqueness of albumin as a carrier in nanodrug delivery. **Molecular Pharmaceutics**, Canada, v. 3, n. 18, 2021.

TESTORI, A.; RIBERO, S.; BATAILLE, V. Diagnosis and treatment of in-transit melanoma metastases. **European Journal of Surgical Oncology**, Milano, v. 43, n. 3, 2017.

TICE, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, United States of America, v. 35, n. 3, 2000.

TIXIER, F. *et al.* Comparative toxicities of 3 platinum-containing chemotherapy regimens in relapsed/refractory lymphoma patients. **Hematological Oncology**., Pierre-Bénite, v. 35, n. 4, 2017.

TOHAMY, A. A. *et al.*, Cinnamic acid attenuates cisplatin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. **Journal of Basic and Environmental Sciences**, Egypt, v. 3, 2016.

TSUBOY, M. S. *et al.* Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI disperse blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**, São Paulo, v. 21, n. 8, 2007.

ULLAH, R. *et al.* RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment. **Seminars in Cancer Biology**, Tampa, v. 85, 2022.

VALENZUELA-SALAS, Lucía M. *et al.* Antiproliferative and antitumour effect of nongenotoxic silver nanoparticles on melanoma models. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Baja California, 2019.

VAN OORT, S. *et al.* Taste alterations and cancer treatment. **Current Opinion in Supportive Palliative Care**, Zwolle, v. 12, n. 2, 2018.

WANG, H.; RAN, J.; JIANG, T. Urea. **Subcellular Biochemistry**, China, n. 73, 2014.

WANG, Jin-Quan *et al.* A ruthenium (II) complex inhibits tumor growth *in vivo* with fewer side-effects compared with cisplatin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, China, v. 146, 2015.

WANG, W. *et al.* Identification of an immune-related signature for predicting prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. **Frontiers in Oncology**, Beijing, v. 10, n. 618215, 2021.

WILSON; M, A; SCHUCHTER, L, M. Chemotherapy for melanoma. **Cancer Treatment and Research**, Philadelphia, v. 167, 2016.

WU, P. *et al.* Chemotherapeutic-caused liver toxicity hinders nanomedicine development. **RSC advances**, China, n. 13, v. 11, 2023.

WU, S. *et al.* Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature communications**, New York, v. 9, 2018.

YANG, Q. *et al.* *In vivo* efficacy of nano hyaluronan-conjugated cisplatin for treatment of murine melanoma. **Journal of Drugs in Dermatology**, Kansas, v. 13, n. 3, 2014.

ZENG, L. *et al.* The development of anticancer ruthenium(ii) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials. **Chemical Society reviews**, New York, v. 46, n. 19, 2017.

ZHANG, Wen-Xi. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of cinnamic acid derivatives with synergetic neuroprotection and angiogenesis effect. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Beijing, v. 183, 2019.

ZHANG, C. *et al.* Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. **Theranostics**, Shandong, v. 12, n. 5, 2022.

ZHANG, J. *et al.* Cisplatin chemotherapy and renal function. **Advances in Cancer Research**, United States of America, v. 152, 2021.

ANEXO I – Certificado de aprovação da Comissão de ética no uso de animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **ESTUDO DOS MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS À ATIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPOSTOS SINTÉTICOS EM MELANOMA**, registrada com o nº **0003/2022**, sob a responsabilidade de **Pollyanna Francielli de Oliveira**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **20/03/2022 a 20/03/2026**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

| Espécie/linhagem/raça | Total de animais | Total de machos | Total de fêmeas | Origem |
|-----------------------|------------------|-----------------|-----------------|---|
| Camundongo / C57bl6 | 274 | 274 | 0 | Centro de bioterismo da universidade federal de alfenas |

Alfenas, 06 de Novembro de 2023

Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira

Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG