

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Análise da Atividade Antitumoral,
Bactericida e Interação com o DNA do
Cloreto de *cis*-tetraaminodiclororutênio (III)**

Carla da Silva Rodrigues de Menezes

Orientadora: Prof^a Dra. Amélia Hamaguchi

Co-Orientadora: Prof^a Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

SISBI/UFU



1000220650

Uberlândia-MG

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MON
616-006.6-085.28

M543a

TES/MEM

**Análise da Atividade Antitumoral,
Bactericida e Interação com o DNA do
Cloreto de *cis*-tetraaminodiclororutênio (III)**

Carla da Silva Rodrigues de Menezes

Orientadora: Prof. ^a Dra. Amélia Hamaguchi

Co-Orientadora: Prof. ^a Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área de concentração Bioquímica)

Uberlândia-MG

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Análise da Atividade Antitumoral,
Bactericida e Interação com o DNA do
Cloreto de *cis*-tetraaminodiclororutênio (III)**

Carla da Silva Rodrigues de Menezes

Orientadora: Prof^a Dra. Amélia Hamaguchi

Co-Orientadora: Prof^a Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Uberlândia-MG

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Análise da Atividade Antitumoral,
Bactericida e Interação com o DNA do
Cloreto de *cis*-tetraaminodichlororutênio (III)**

Carla da Silva Rodrigues de Menezes

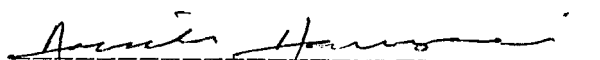
COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^a Dra. Amélia Hamaguchi (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. Szulim Ber Zyngier
Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Data da Defesa: 28/02/2005

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas



Dra. Amélia Hamaguchi
(Orientadora)

Uberlândia, __/__/__

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais **José Maria e Umbelina.**

Queridos pais,

A luta diária de vocês para proporcionarem os meus estudos e dos meus irmãos é o motor para eu perseverar em qualquer coisa na minha vida.

Graças a vocês tenho como irmãos o Dinamérico, a Jaqueline e a Helena Maria. E graças ao Dinamérico, hoje há a Joelma, a Ana Laura e o Pedro Henrique. Mais vida, mais amor.

Basta apenas me lembrar do casal-fortaleza para meus medos acabarem, um sorriso eu exibir, alegria me invadir e os meus sonhos e planos ganharem cores.

Cada erro cometido por vocês é humildemente assumido e compartilhado. Erro transformado em exemplo de que é certo e ético. Exemplo de generosidade ao dividir experiências, de grandeza ao confessar fraquezas humanas e, sobretudo, exemplo de beleza ao se recompor para continuar.

É com empenho, amor, defeitos e dedicação que vocês indicam um caminho cheio de oportunidade, honestidade e respeito para com os próximos.

Enfim, agradeço por darem sentido a minha existência a cada raiar do sol.

EU AMO VOCÊS.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar o presente da vida.

À orientadora Amélia Hamaguchi, pela oportunidade e confiança depositada em mim neste período. Obrigada por estimular o meu crescimento profissional e pela paciência.

À coorientadora Elisângela de Paula Silveira Lacerda, por caminhar ao meu lado desde os primeiros minutos de convivência. Você me ensinou muito, principalmente, a ser organizada e a não ter medo do desconhecido. Elis, obrigada pela cumplicidade e por transformar minha teimosia em persistência de forma tão amável.

À professora Maria Inês Homsí-Brandeburgo, pela contribuição na minha formação profissional. Obrigada pela empolgação e credibilidade depositadas em meu trabalho.

À professora Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, pela contribuição essencial neste estudo e por me fazer sentir parte de uma equipe. Por tornar possível o trabalho com os animais isogênicos, a microscopia de luz e pelas discussões tão proveitosas. Obrigada.

Ao Prof. Luis Alfredo Pavanin, pelo fornecimento do composto para a realização deste estudo e pela oportunidade de integração entre os Laboratórios dos Institutos de Química e Genética e Bioquímica.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, do Laboratório de Imunologia do ICBIM/UFU, por ceder a linhagem celular tumoral S180.

À Prof^a. Ana Maria Bonetti, por disponibilizar o laboratório de Genética para realização dos experimentos com o pUC18.

À Prof^a. Tânia Machado Alcântara, da FAMED/UFU, pela análise criteriosa dos cortes histológicos.

À Dra Heloísa Vieira Ferro, do Laboratório de Histologia do ICBIM/UFU, pela importante colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo, pela estada em seu laboratório de Imunologia da Faculdade de Farmácia da USP de Ribeirão Preto.

Ao Prof. Dr. Foued, pela confiança em ceder o laboratório de Biologia Molecular para a realização dos ensaios de citotoxicidade,

Ao Luiz Carlos (o inútil mais útil que eu conheço!), obrigada por me agüentar com tanta paciência, sempre com o sorriso maroto. Saiba que a mão de obra foi grande, mas estar ao seu lado vai além de realizar protocolos. Eu sei que crescemos, buscamos, ganhamos, perdemos, erramos e (ainda bem) acertamos juntos, sempre juntos. Luiz você é um grande amigo, valeu!

Ao Marcio, pela valiosa contribuição neste estudo. As lâminas da microscopia de luz são perfeitas, fruto de um trabalho certo, de um profissional capaz. Obrigada.

À Cris (Cristiani Baldo), pela presença indispensável na minha vida. Pelo apoio incondicional em todos os momentos que passamos juntas e que foi fundamental na realização deste trabalho e na minha vida pessoal (rs). Cresci muito ouvindo você e, às vezes, me sinto menina quando fala comigo. A nossa amizade está eternamente selada pelo amor.

À Greice Ayra, minha irmã e amiga, sem você a minha vida não teria graça. Obrigada por me abraçar nos momentos de alegria, de tristeza, por aprender tudo o que eu faço só para poder me entender e ajudar, por não ter me deixado desanimar, por tornar os meus problemas em soluções, enfim, por estar sempre comigo. Greice, sem você eu não seria quem sou. Obrigada.

À Helena Maria, pela luz que me conduz. Lê, minha irmã, mais uma vez você esteve ao meu lado, em mais uma etapa da minha vida, fazendo-se presente em cada lágrima ou sorriso que expressei. Hoje, os retalhos costurados e os frutos colhidos me dizem que valeu à pena. Eu te amo.

Ao Sebastião e á Cynthia, pelo fácil acesso e confiança em usar o laboratório de Patologia da ESTES/UFU para realização dos hemogramas. Mais uma vez, obrigada!

À Renatinha, pela alegria (risadas), pelas fotos, pela disposição, pelas baladas e, claro, pela rã cantora. Sem o Frog, o meu trabalho não teria graça. Obrigada.

Ao Robson pela parceria. Sua organização, cuidado, disposição, tranqüilidade me inspiram. Seus esforços e estudos contínuos fazem de você um grande parceiro. É bom confiar em você. Obrigada.

Ao Carlos Ueira, grande Carlinhos, o aventureiro, que encara tudo o que eu proponho, sem receios, só pela descoberta. Pena não termos começado antes, mas valeu o que fizemos. Considero você sinônimo de conhecimento e capacidade. Eu te admiro muito. Obrigada!

À Mirian, minha amiguinha. Mirex, conviver contigo só me fez crescer. Descobrir que por traz desta menina quieta e séria existe uma pessoa especial foi o maior presente que você me deu. Obrigada por tornar os dias no laboratório em dias agradáveis, e na minha casa em noites de família. Eu torcerei sempre pela sua felicidade.

À Daiana e Carol pelo carinho, pela super ajuda, pela responsabilidade em tudo que se comprometem. Obrigada.

Ao Junão, por me ensinar o repique das células S180, pela disposição em me ajudar, pelo sorriso amigo diante de tantos pedidos. Obrigadão!

À Flávia e à Tininha, do laboratório de Genética, pela mão de obra eficaz e valiosas sugestões.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica sempre solícitos e divertidos: Rodrigo, Luiz Fernando, Luiz Antônio, Danilo, André, Luiz Henrique, Fábio, Marília e Johara.

Ao Cleuber pela paciência em nos ajudar e ensinar.

À Tianinha e à Dona Nenzinha sempre atentas e dispostas a nos ajudar.

À Marlene, à luz da passarela, pelo apoio constante, por nos tratar como parte da família. Pagar dez reais sempre foi pouco. Obrigada.

Ao Laboratório de Experimentação Animal pela infra-estrutura para realização dos ensaios com camundongos.

À Pentapharm do Brasil por fornecer os camundongos Swiss.

Ao CNPq, a CAPES e a UFU pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	viii
<u>LISTA DE TABELAS E FIGURAS</u>	ix
<u>01- INTRODUÇÃO GERAL</u>	1
1.1 – Câncer e Agentes Antineoplásicos.....	2
1.2 - Câncer e Metal.....	4
1.3 - Complexos de Rutênio e seu Mecanismo de Ação.....	6
1.4 - Efeito Genotóxico dos Antineoplásicos.....	1
<u>02 - JUSTIFICATIVA</u>	13
<u>03 - OBJETIVOS</u>	14
3.1 - Objetivo Geral	15
3.2 - Objetivos Específicos.....	15
<u>CAPÍTULO ÚNICO: Análise da Atividade Antitumoral, Bactericida e Interação com o DNA do Cloreto de <i>cis</i>-tetraaminodiclororutênio (III)</u>	
<u>RESUMO</u>	17
<u>ABSTRACT</u>	18
<u>I – INTRODUÇÃO</u>	19
<u>II - MATERIAL E MÉTODOS</u>	22
01- Síntese do Cloreto de <i>cis</i> -tetraaminodiclororutênio (III)	22
02- Animais Experimentais.....	23
03- Manutenção da Célula Tumoral	23
04- DL ₅₀ (Dose Letal 50%).....	23
05- Determinação da atividade antitumoral.....	24
05.1 – Obtenção e Contagem das células S180.....	24
05.2 – Atividade antitumoral em animais.....	24
05.3 – Avaliação Física.....	26
05.4 – Avaliação Hematológica e Bioquímica.....	26

05.5 - Análise histológica dos Tecidos por Microscopia de Luz (M.L.)	26
06 - Efeito Genotóxico do <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NH ₃) ₄]Cl – Teste do Micronúcleo (MN)...	27
07- Ensaio de Citotoxicidade.....	28
08- Atividade Bacteriolítica do <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NH ₃) ₄]Cl.....	29
09- Estudo <i>In vitro</i> da Interação DNA- <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NH ₃) ₄]Cl.....	30
09.1 - Extração de plasmídeo pUC18.....	30
09.2 - Interação Ru - DNA plasmideal.....	31
10- Procedimentos estatísticos.....	31
III - RESULTADOS	32
01- Determinação da DL ₅₀ do <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NH ₃) ₄]Cl.....	32
02- Atividade Antitumoral do <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NH ₃) ₄]Cl em Animais com S180.....	32
2.1. Análise Física.....	32
2.2. Testes Bioquímicos.....	35
2.3. Avaliação Hematológica.....	37
2.4. Avaliação Histológica.....	39
2.4.1 – Efeito do <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NH ₃) ₄]Cl sobre a morfologia hepática de camundongos normais e com o tumor sólido S180.....	39
2.4.2. Efeito do <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NH ₃) ₄]Cl sobre a morfologia renal de Balb/c normal e com o miosarcoma 180.....	42
2.4.3. Efeito do <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NH ₃) ₄]Cl sobre a morfologia do pulmão de Balb/c normal e com o miosarcoma 180.....	45
2.4.4. Efeito do <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NH ₃) ₄]Cl sobre a morfologia do miosarcoma 180 de Balb/c comparados ao músculo normal de Balb/c.....	47
03- Efeito Genotóxico do Cloreto de <i>cis</i> -tetraminodichlorutênio.....	55
04- Citotoxicidade do <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NH ₃) ₄]Cl sobre linhagem Tumoral S180.....	57
05- Atividade Bacteriolítica do <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NH ₃) ₄]Cl sobre <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	58
06- Interação Ru-DNA plasmideal.....	60
IV - DISCUSSÃO	62

<u>V - CONCLUSÕES</u>	75
<u>VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	76

LISTA DE ABREVIATURAS

- BHI:** Brain Heart Infusion-Broth
- Cis-PT:** Cisplatina
- D.O.:** Densidade Óptica
- DL₅₀:** Dose Letal 50%
- DMSO:** Dimetil-sulfóxido
- DNA:** Ácido Desoxirribonucleotídeo
- EDTA:** Ácido Etilenodiaminotetracético, sal dissódico
- IC₅₀:** Concentração da droga estabelecida para inibir crescimento celular em 50%
- Im:** Imidazol
- LDH:** Lactato Desidrogenase
- ML:** Microscopia de Luz
- MN:** Micronúcleo
- MTT:** 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium
- NAMI:** *Natrans*-[Ru(Im)(Me₂SO)Cl₄]
- NAMI-A:** (ImH)*trans*- -[Ru(Im)(Me₂SO)Cl₄]
- NCE:** Eritrócitos Normocromáticos
- PBS:** Tampão Fosfato Salina
- PCE:** Eritrócitos Policromáticos
- RNAse:** Ribonuclease
- Ru:** Rutênio
- S180:** Sarcoma 180
- SFB:** Soro Fetal Bovino
- TAE:** Tris-acetato-EDTA
- Tf:** Transferrina

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Introdução Geral:

Tabela 01: Destaques são metais conhecidos por formarem compostos que exibem atividade antitumoral. (pág.06)

Capítulo Único:

Tabela 01: Atividade antitumoral do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl em Animais com S180. (pág.34)

Tabela 02: Análises bioquímicas do efeito do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl no plasma de camundongos com tumor sólido S180. (pág.36)

Tabela 03: Frequência de eritrócitos normocromáticos (NCE) e policromático (PCE) com e sem micronúcleo (MN) de células da medula óssea de Balb/c tratados com *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl. (pág.56)

Figura 01: Análise hematológica do soro dos animais experimentais. (pág.38)

Figura 02: Fotomicrografia do fígado de Balb/c normais e com miosarcoma 180 tratados com *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl. (pág.40)

Figura 03: Fotomicrografia do rim de Balb/c normais e com miosarcoma 180 tratados com *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl. (pág.43)

Figura 04: Fotomicrografia do pulmão de Balb/c normais e com miosarcoma 180 tratados com *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl. (pág.46)

Figura 05: Fotomicrografia de músculo normal e do miosarcoma 180 de Balb/c com e sem tratamento de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl. (pág.48-53)

Figura 06: Efeito Genotóxico do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl sobre células de medula óssea de Swiss. (pág.55)

Figura 07: Efeito antitumoral do composto *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl *in vitro* sobre célula tumoral S180 de camundongo. (pág.57)

Figura 08: Atividade bacteriolítica do composto de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl sobre *S. aureus* (A) e *E. coli* (B). (págs.59)

Figura 09: Eletroforese em gel de agarose mostrando a mobilidade eletroforética (A) e da clivagem do DNA do pUC18 (B) incubado com o complexo de rutênio. (págs.61)

INTRODUÇÃO GERAL

1- Introdução Geral

1.1 – Câncer e Agentes Antineoplásicos

O Câncer envolve a perda do controle de vários processos, sobretudo, a multiplicação descontrolada das células. A via de sinalização por citocinas e fatores de crescimento controla o processo de replicação quando ele é necessário para todo o organismo. A proliferação da célula cancerígena acontece sem o sinal apropriado e o requerimento da proliferação por outras células (Diffley e Evan, 1999).

Há diferentes tipos de câncer com distintas causas moleculares. As alterações oncogênicas podem ser divididas em dois grandes grupos: por aquisição (introduzidos por infecção viral) e desenvolvimento (mutações em protooncogenes) de oncogenes; ou por alterações genéticas que contribuem para o desenvolvimento do câncer devido à perda da funcionalidade dos genes supressores de tumor, que protegem as células contra a divisão celular descontrolada (Diffley e Evan, 1999).

Os termos câncer, neoplasia maligna e tumor maligno são sinônimos e distinguem-se dos tumores benignos pelas suas propriedades de desdiferenciação, poder de invasão e capacidade de metastatizar-se, isto é, disseminar-se para outras partes do corpo (Lodish et al., 2000). As neoplasias são separadas em benignas e malignas. As primeiras possuem limites bem definidos com o tecido adjacente e não produzem tumores secundários distantes do principal, isto é, não produzem metástases como os cânceres malignos.

De acordo com estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2002, cerca de 337.535 novos casos de neoplasias foram registrados no Brasil, causando a morte de aproximadamente 122.600 indivíduos. Essas estatísticas colocam o

câncer como a terceira principal causa de morte no Brasil, superado apenas por doenças cardiovasculares e por morte acidental - relacionada tanto a acidentes de trânsito quanto a violência urbana (INCA, 2002).

O principal objetivo do tratamento das neoplasias é obter a completa erradicação das células tumorais. Tal resultado pode ser obtido por meio de procedimentos como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, isoladas ou em associação.

A quimioterapia, tratamento que envolve drogas citotóxicas, tem sido considerada como uma das principais ferramentas sistêmicas contra o câncer. Pode ser aplicada em diferentes situações clínicas, como no tratamento primário de neoplasias avançadas, sendo denominada, neste caso, de quimioterapia de indução. Pode também ser utilizada como tratamento sistêmico após o controle do tumor primário por cirurgia ou radioterapia (El-Deiry, 1997). Sempre, no entanto, deve ser considerada a eficácia da droga em relação ao tipo de tumor.

Dentre as principais formas de tratamento do câncer, para os quimioterápicos há as seguintes classificações: (1) agentes alquilantes que atuam por meio da formação de ligações covalentes com o DNA, impedindo sua replicação, (2) antimetabólicos que bloqueiam ou subvertem uma ou mais vias metabólicas envolvidas na síntese do DNA, (3) medicamentos obtidos por produção natural ou alcalóides, (4) hormônios, dos quais os mais importantes são os esteróides, isto é, glicocorticóides, estrogênios e androgênios e fármacos que suprimem a secreção de hormônios ou antagonizam sua ação, e (5) a imunoterapia, embora ainda incipiente (Goodman e Gilman, 2002).

Há disponível uma grande variedade de drogas citotóxicas. Muitas das mais potentes atuam em fases específicas do ciclo celular e, por esta razão, apenas exercem sua atividade contra células que se encontram em processo de divisão. Os tumores com alta taxa de crescimento, ou seja, com um alto percentual de células em processo

de divisão é o mais susceptível ao tratamento quimioterápico (Buchi, 2002).

Na prática tem sido difícil estabelecer uma dose efetiva para destruir o máximo de células tumorais, induzindo, no hospedeiro, uma toxicidade reversível e tolerável. Para a maioria desses quimioterápicos a margem entre a dose efetiva e a tóxica é estreita, o que parece estar relacionado ao metabolismo da droga, rota e protocolo de administração, além da sensibilidade intrínseca do tumor à droga.

A erradicação completa das células tumorais é conseqüência de múltiplos fatores que refletem as interações entre o tumor e o hospedeiro, a toxicidade cumulativa do medicamento, limitando seu uso, presença de tumor em locais de difícil acesso ao quimioterápico, estado geral debilitado do paciente, não permitindo doses adequadas, alterações na velocidade de crescimento do tumor e desenvolvimento de resistência adquirida pelo tumor ao quimioterápico, entre outros (Gaffey et al., 1993).

1.2 - Câncer e Metal

Desde 1969, tornou-se formal o uso de complexos metálicos na quimioterapia do câncer, quando foi comprovada a propriedade antitumoral do *cis*-diaminodicloroplatina(II), a *cis*-platina [*cis*-Pt (II)] (Lippard e Pil., 1997). Embora a cisplatina não seja eficiente contra todos os tipos de câncer, ela tem sido utilizada eficazmente no tratamento de carcinomas testicular e de ovário, câncer de cabeça e pescoço, de bexiga e pulmão (Hardman e Limbird, 1996).

Depois de administrada intravenosamente e absorvida por difusão passiva para dentro das células, a *cis*-Pt (II) adquire carga positiva durante uma reação de ativação e reage rapidamente com bases púricas de nucleotídeos di- e trifosfatos, formando ligações cruzadas com GpG e ApG. A posição do N7 das guaninas é mais reativa do que da adenina e provém um forte sítio na fita de DNA

para ataques nucleofílicos pelos produtos de hidrólise do complexo de platina (Bakhtiar e Ochiai, 1999).

Vários análogos de cisplatina, como a *cis*-diamina (ciclobutano-1,1-dicarboxilato)-platina (II), ou carboplatina, a lactato 1,2-di(aminometil)ciclobutanoplatina (II), ou lobaplatina, e seus derivados têm sido estudados em tumores que exibiram resistência a cisplatina. Estes compostos são chamados de “geração secundária” dos compostos de platina. A carboplatina entrou em triagem clínica em 1980, e tem sido eficaz contra câncer de ovário. Embora seu mecanismo de ação seja similar ao da cisplatina, ao formar ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína, e interferir com a replicação e a transcrição do DNA, sua toxicidade e cinética são bastante diferentes (Calamai et al., 1998).

Entretanto, a eficácia dessas drogas derivadas da platina é limitada pelos mecanismos de resistência adquirida e inata. O uso da cisplatina na clínica é também reduzido por apresentar significativa neuro e nefrotoxicidade, enquanto a carboplatina é associada com a supressão de células da medula óssea (Lokich e Anderson, 1998).

Essas descobertas têm estimulado a síntese de alguns complexos baseados em metais do grupo da platina, como drogas potencialmente antitumorais, e que demonstrem menor toxicidade em relação aos compostos de platina (Clarke, 2003).

Segundo Katsaros e Anagnostopoulou (2002), as possíveis vantagens em se utilizar metais de transição diferente de platina devem envolver: (a) mudanças no estado de oxidação, (b) sítios adicionais de coordenação, (c) mudanças na geometria, (d) alterações nas cinéticas de afinidade de ligante e substituição, (e) aumento da solubilidade e (f) propriedades fotodinâmicas para terapia.

Alguns resultados promissores foram obtidos com derivados de diferentes metais, como Pt, Ti, Rh, Au e Ru (Cabrera et al., 2004), tabela 01.

Tabela 01: Destaques são metais conhecidos por formarem compostos que exibem atividade antitumoral (Bakhtiar e Ochiai, 1999).

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac															

1.3 - Complexos de Rutênio e seu Mecanismo de Ação

A exploração de complexos de Rutênio para o uso como agente anti-câncer foi iniciada na tentativa de se obter uma droga menos tóxica e mais específica.

Um exemplo de especificidade proposto para complexos de Ru (III), sugere que eles se liguem a transferrina e, conseqüentemente, podem ser alvos de células neoplásicas e regular positivamente a expressão de receptores de transferrina na membrana celular, devido a um aumento do requerimento de ferro (Huxham et al., 2003).

A Transferrina (Tf), uma glicoproteína de aproximadamente 80kDa, é o modo primário de transporte de ferro para células de mamíferos e está relacionada com a liberação de íons metálicos anti-câncer em sítios tumorais (Frasca et al., 2001).

Srivastava et al. (1981) mostraram que rutênio radioativo como o $^{103}\text{RuCl}_3$ liga-se à soroalbumina humana e à Tf na corrente sanguínea de animais experimentais. Contudo, o $^{103}\text{Ru-Tf}$ foi

preferencialmente encontrado em áreas de tumor, provavelmente por causa do grande número de receptores para transferrinas na superfície da célula tumoral.

Desde que a Tf humana está somente 30% saturada com o Fe^{+3} em condições fisiológicas, é possível que a Tf seja o veículo para outros íons metálicos trivalentes. Isto é relevante, porque as células tumorais apresentam um requerimento nutricional elevado, o qual é favorecido pela angiogênese, que promove o aumento do fluxo sanguíneo, e pelo aumento da permeabilidade das membranas, resultando numa maior captação de nutrientes (Frasca et al., 2001).

Em muitos casos, a molécula alvo para agentes anti-câncer baseados em metal parece ser o DNA, mas outras interações moleculares também são importantes (Barca et al., 1999).

Especialmente para a cisplatina, sua interação com o DNA ocorre via N7 da base purina adjacente a sua ligação, preferencialmente em sítios d(GpG) (Cauci et al., 1987). Estas ligações cruzadas permitem a inibição da replicação do DNA e a apoptose. Isto é importante no contexto das neoplasias malignas, porque atua como defesa de primeira linha contra mutações, removendo as células com DNA anormal que poderiam se tornar malignas (Rudin e Thompson, 1997). Reações similares são esperadas para compostos de Ru.

Os possíveis mecanismos moleculares de ligação ao DNA têm sido pesquisados. Os resultados sugerem que os complexos de rutênio promovem "crosslinks" entre as duas fitas de DNA, possivelmente favorecido pelas restrições impostas pela geometria octaédrica destes compostos. Este mecanismo difere da formação de "crosslinks" intrafita induzida pela cisplatina e, conseqüentemente, as linhagens de células tumorais que têm desenvolvido resistência à cisplatina, pela aceleração da taxa de reparo de "crosslinks" intrafita, são ainda susceptíveis aos complexos de rutênio (Claire e Dyson, 2001).

Mestroni et al. (1989) sugeriram que o *cis* e *trans*- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ interagem com o DNA *in vivo*. Estudos de interação *in vitro* com nucleotídeos resultaram na ligação entre rutênio e DNA, que ocorre principalmente no N7 da guanina entre “clusters” na dupla hélice (Küng et al., 2001).

A redução do Ru (III) para Ru (II) pode ser um mecanismo fundamental da ativação celular de drogas de rutênio (Depenbrock et al., 1997). Os compostos de Ru (III) podem ser reduzidos em áreas tumorais com hipóxia em espécie ativa, a qual é capaz de ligar-se rapidamente e causar dano ao DNA. Nestas condições, complexos de aminorutênio podem ser ativados *in vivo* para coordenar uma nucleobase em uma forma similar aos experimentos *in vitro* (Grguric-Sipka et al., 2003).

O *Cis* e *trans*- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ são conhecidos por exibirem atividade anti-câncer, enquanto o *cis*- $[\text{Ru}(\text{acac})_2(\text{L})_2](\text{CF}_3\text{SO}_3)$ (L=Im=Imidazol ou N-Met-Im) mostrou toxicidade seletiva à hipóxia em alguns carcinomas de camundongo (Wu et al., 2003).

Muitos complexos de rutênio com estado de oxidação II ou III exibem atividade antitumoral, especialmente contra cânceres metastáticos.

O complexo Ru (III) *trans*- $[\text{Ru}(\text{Im})(\text{Me}_2\text{SO})\text{Cl}_4]$ (NAMI) já está em triagem clínica. Para os compostos de Ru (III), a redução *in vivo* para o Ru (II) pode ser necessária para sua atividade. A captura celular deste rutênio também parece ser mediada pela proteína transportadora de ferro, transferrina. Em geral, a citotoxicidade dos complexos de rutênio está correlacionada com sua habilidade de se ligar ao DNA. Porém, uma exceção é a atividade antimetastática do NAMI e seu análogo (ImH)*trans*- $[\text{Ru}(\text{Im})(\text{Me}_2\text{SO})\text{Cl}_4]$ que inibe a atividade colanogenolítica tipo IV e reduz o crescimento do tumor (Zhang e Lippard, 2003).

Outro resultado importante foi obtido com o complexo de Ru (II)-DMSO com ligantes imidazólicos, o qual desenvolveu atividade

anti-metastática contra alguns modelos tumorais em camundongos (Cabrera et al., 2004).

Estudos iniciais com isômeros de Ru complexado, o *cis* e *trans*- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ sugerem que os mesmos têm propriedades anti-câncer, especificamente anti-metástase em doses relativamente não tóxicas (Huxham et al., 2003).

A química sintética de metais de transição é bem desenvolvida, particularmente com ligantes amino e imino, favorecendo para muitos pesquisadores a inovação na formulação de novos metalofarmacêuticos.

Devido à estabilização por um forte campo de ligação, a maioria dos estados de oxidação do rutênio [Ru (II), Ru (III) e Ru (IV)] em solução aquosa são usualmente octaédrico e, freqüentemente, inertes a substituição de seus ligantes. As vantagens da utilização dos complexos de rutênioamino no desenvolvimento de drogas são: (1) métodos seguro de sintetizar complexos estáveis com estruturas previstas, (2) a habilidade e afinidade entre os ligantes, na transferência de elétrons e na razão de substituição e (3) um conhecimento prévio dos efeitos biológicos dos complexos de Ru (Clarke, 2003).

Evidentemente, todos os compostos exibem diferentes mecanismos de ação baseados na acidez do metal, dos ligantes e do seu estado de oxidação (Meléndez et al., 2002).

Atualmente, os complexos de metais têm sido sintetizados para muitos propósitos terapêuticos. Eles são testados por causa da noção geral que os compostos de metal são tóxicos e o seu uso controlado poderia suprimir alguns processos biológicos. Assim, inúmeros compostos inorgânicos e organometálicos têm sido produzidos e avaliados quanto a seus efeitos terapêuticos, na esperança de descobrir cura efetiva para uma série de doenças (Bakhtiar e Ochiai, 1999).

A diversidade de compostos inorgânicos e suas aplicações na medicina abarcam a quimioterapia do câncer, artrite, agentes

antimicrobianos, inibidores de metaloenzimas, agentes antidepressivos, entre outros (Berg et al., 1998)

Muitos destes compostos farmacêuticos contendo metal são desenvolvidos em laboratórios acadêmicos ou por pequenas empresas da área, como no Laboratório de Química Supramolecular do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia/MG.

No Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais do INGEB/UFU, Silveira-Lacerda (2003) estudou o efeito antitumoral *in vitro* do composto *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III) sobre linhagens tumorais humanas e de camundongo. Os resultados indicaram que este composto teve atividade citotóxica sobre as células estudadas em concentrações da ordem de 0,1mg.mL⁻¹, com conseqüente fragmentação do material genético.

O cloreto *cis* e *trans*-tetraaminodiclororutênio são utilizados como precursores na síntese de outros compostos mais complexos de tetraaminorutênio (II) e (III). Isto deve-se à configuração octaédrica do composto do tetraaminodiclororutênio, que expõe os ligantes e aceita a substituição de outros íons com alta estereoespecificidade (Boggs et al., 1996).

Esse complexo de rutênio atua como droga citostática ao impedir a progressão do ciclo celular das células tumorais e induzir a morte celular por apoptose (Silveira-Lacerda, 2003).

A diversidade no mecanismo de ação e aplicação que estes compostos podem alcançar é de grande interesse clínico.

Com o intuito de expandir a aplicação dos metalofarmacêuticos derivados de rutênio, alguns estudos têm demonstrado a atividade bacteriolítica de muitos compostos de Ru (III) e Ru (II) doadores de oxigênio e nitrogênio de ligantes de base Schiff (agente quelante), por exemplo, o naftol (Kumar e Ramesh, 2004; Venkatachalam e Ramesh, 2004).

Segundo Karvembu e Natarajan (2002), estudos da atividade bactericida de complexos de rutênio (II) contendo tiobis (β-dicetonas)

e trifenilfosfina mostraram maior eficiência quando comparados aos complexos de Ru com seus ligantes livres.

Lemes (2004) sintetizou e testou a atividade bactericida de vários compostos de Ru (II/III), tais compostos: $[\text{RuCl}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_2$; $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{py}](\text{BF}_4)_2$; $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{-4acpy}](\text{BF}_4)_2$; $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{-4pic}](\text{BF}_4)_2$ e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{isn}](\text{BF}_4)_2$, sobre bactérias gram negativas e gram positivas. Houve atividade inibitória dos complexos de rutênio (II/III) para todas as bactérias gram positivas estudadas em concentrações inferiores a $0,04\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, o que não foi observado para as demais bactérias.

Desta forma, a descoberta de rutênio (III) apresentar atividade antitumoral induz várias investigações dos efeitos das propriedades químicas e biológicas destes complexos, tanto na área dos antineoplásicos quanto para detectar diferentes atividades para os mesmos compostos.

1.4 – Efeito Genotóxico dos Antineoplásicos

O tratamento com quimioterápicos antineoplásicos é traumático para os pacientes, devido a uma gama de efeitos adversos provocados por este tipo de medicamento, assim como o aumento do risco de indução de cânceres secundários. Pode também acarretar alterações na estabilidade genômica (mutações gênicas) nos pacientes tratados, assim como induzir um novo câncer e má formação congênita nos conceptos (Ferguson e Pearson, 1996).

A radiação e muitas drogas anti-câncer como agentes alquilantes, inibidores de topoisomerase II e tiopurinas podem provocar mutações no DNA. Esta mutagênese pode permitir a morte celular como consequência do tratamento, mas pode também causar mutações sub-letais em células somáticas normais, algumas vezes aumentando o número de cânceres secundários (Jemal et al., 2004).

É sabido que os íons metálicos são essenciais para a manutenção de todos os sistemas vivos, e também medeiam todos os estágios de disseminação da informação genética carregada pelo

código genético. Concomitantemente, os mesmos metais podem, quando presentes em excesso ou sobre condições e locais inapropriados, produzir erros no sistema de informação gênica. Estes efeitos podem ser manifestados como alterações na estrutura e no número dos cromossomos, distúrbios durante a formação dos fusos mitóticos e na seqüência da divisão celular (Sharma e Talukder, 1987).

A maioria dos estudos para avaliação da genotoxicidade dos metais é realizada em sistema animal ou em bactérias. O efeito genotóxico depende do estado de oxidação do metal, sua concentração e da duração da exposição do agente ao hospedeiro (Patra et al., 2004).

Muito das propriedades e efeitos biológicos da cisplatina tem sido bem documentado. Entretanto, a eficácia terapêutica da cisplatina é limitada por causa do desenvolvimento de resistência à droga e efeitos colaterais, como nefrotoxicidade. Um aumento no risco carcinogênico com o desenvolvimento de cânceres secundários em animais e pacientes tratados com cisplatina tem sido relatados (Giri et al., 1998).

A genotoxicidade da platina é determinada pela valência, configuração e estrutura quadrada planar dos compostos *cis*-, como da droga citostática cisplatina, sendo mais genotóxico do que seus respectivos *trans* - isômeros (Gebel et al., 1997).

Diferentemente da platina, os Ru (II) e Ru (III) possuem estrutura octaédricas em solução aquosa. Porém, há poucas informações sobre os efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos que estes compostos poderiam causar ao serem utilizados na terapêutica do câncer.

2 - Justificativa

O uso dos medicamentos antineoplásicos atuais requer o seu conhecimento profundo e adequado, a fim de se evitar tratamentos insuficientes ou tóxicos.

Portanto, quando comprovada a ação antitumoral *in vitro* e *in vivo* de um complexo de rutênio, ou outra droga promissora, é de fundamental importância avaliar os seus possíveis efeitos biológicos, toxicológicos, na estabilidade genômica, seu mecanismo de ação, etc., já que a avaliação profunda da droga candidata pode contribuir e definir a real utilização no tratamento de inúmeras doenças, assim como no tratamento e/ou na prevenção do câncer.

Atualmente, os pesquisadores buscam aperfeiçoar a síntese dos compostos de rutênio e, conseqüentemente, aumentar seu efeito antitumoral ao mudar os ligantes de Ru da molécula de origem. Apesar dos grandes avanços obtidos nesta última década sobre os complexos derivados de rutênio, pouco se sabe sobre as atividades biológicas e seus efeitos *in vivo*. Desta forma, baseado nos dados apresentados, faz-se necessário um estudo mais aprofundado do composto *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III), principalmente em relação ao efeito *in vivo* que esta droga pode causar.

OBJETIVOS

3 - OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é investigar o efeito do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl no tratamento do câncer *in vitro* e *in vivo*, seu efeito genotóxico, sua atividade bactericida e sua interação com o DNA.

3.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Determinar a DL₅₀ do composto *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (III) em camundongos;
- b) Avaliar a atividade antitumoral do composto *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (III) sobre a linhagem tumoral Sarcoma 180 de camundongos *in vivo* e *in vitro*;
- c) Estudar o efeito genotóxico do composto *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl sobre células da medula óssea de camundongos;
- d) Avaliar a atividade bactericida do composto de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
- e) Analisar a interação e atividade do composto de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl sobre o plasmídeo pUC18.

Capítulo Único

Análise da Atividade Antitumoral, Bactericida e Interação com o DNA do Cloreto de *cis*- tetraaminodiclororutênio (III)

RESUMO

Reconhecidos como potentes agentes antitumorais, diversos compostos metálicos têm sido desenvolvidos e testados *in vitro* e *in vivo*. O presente trabalho estuda as propriedades tóxica, terapêutica, citotóxica e genotóxica do cloreto de *cis*-tetraaminodichlororutênio (III). Animais Balb/c machos foram transplantados sc. com células do Sarcoma 180. O complexo de rutênio (III) foi dissolvido em PBS estéril e injetado i.p. nas doses de 10 e 30mg/kg de animal (inferior a DL₅₀ de 100mg/kg), em diferentes intervalos de tratamento. Após o 15º dia pós-implante tumoral, os animais foram sacrificados e o pulmão, rins, fígado e tumores foram processados para análise histopatológica e o sangue retirado para análise hematológica e bioquímica. A citotoxicidade foi testada sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, células S180 e o efeito genotóxico *in vivo* sobre células da medula óssea de camundongos Swiss. A interação do complexo de rutênio com DNA também foi investigada. O composto metálico provocou redução do volume e peso tumoral e aumentou a sobrevivência dos animais tratados. Os níveis séricos de LDH, creatinina e bilirrubina foram elevados, mas nenhuma alteração histopatológica grave e irreversível foi observada nos tecidos analisados. O composto não causou anemia, mas reduziu a quantidade de leucócitos nos animais tratados. Ausência de células S180 viáveis, células necróticas e presença de tecido de granulação foram observadas no tecido tumoral dos animais tratados. Nas concentrações testadas, o *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III) não foi genotóxico, embora citotóxico para as bactérias e para as células S180. O complexo de Ru (III) se ligou ao DNA e na presença do agente redutor, causou fragmentação da DNA plasmideal. Os dados indicam que o *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl é um potente agente antitumoral *in vitro* e *in vivo*, cujo mecanismo de ação parece envolver a molécula de DNA.

Palavras chaves: complexos de rutênio, atividade antitumoral, atividade bactericida, genotoxicidade, DNA.

ABSTRACT

Several metallic compounds, regarded as powerful antitumoral agents, have been synthesized and tested *in vivo* and *in vitro*. In the present study toxicity, therapeutics and cytotoxicity properties of the *cis*-tetraamminedichlororuthenium (III) chloride were analyzed. Balb/c mice were sc. inoculated with murine sarcoma 180 cells. The ruthenium (III) compound was dissolved in sterile PBS and 10 and 30mg/kg (lower than LD₅₀ of 99,76mg/kg) then injected intraperitoneally in the mice at set intervals of treatment. On day 15 post-tumor transplant, the animals were sacrificed and their lungs, kidneys, livers and tumor tissues processed for histopathological analysis and the blood for hematological and biochemical analysis. Cytotoxicity was assessed for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, S180 cells and *in vivo* genotoxic effect on bone marrow cells of Swiss mice. The interaction between the ruthenium compound with the DNA was also analyzed. The metallic compound resulted in tumoral volume and weight reduction and increased survival in treated animal. There were increases in plasma LDH, creatinine and bilirubin levels, but no serious or irreversible histopathological alteration was observed in the analyzed tissues. The Ru compound was found not to cause anemia, but reduced the level of leukocytes. Absence of viable S180 cells and presence of necrotic cells and granulation tissue were observed in treated animal tumoral tissue. For the tested doses, the *cis*-RuCl₂(NH₃)₄Cl(III) was not genotoxic, nonetheless it was cytotoxic on bacteria and S180 cells. The Ru (III) compound interacts to DNA and when in presence of a reductor agent, it caused plasmidial DNA to fragment. These results point out that the *cis*-RuCl₂(NH₃)₄Cl compound is a potent antitumoral drug *in vitro* and *in vivo*, which action mechanism seem to involve binding to DNA molecule.

Key words: ruthenium complex, antitumoral activity, bactericidal activity, genotoxicity, DNA.

I - INTRODUÇÃO

O complexo $cis\text{-PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$ (cisplatina), cuja atividade antitumoral foi descoberta em 1960 por Rosenberg et al., tem sido largamente investigada em diferentes campos da ciência, desde a química sintética inorgânica clássica à química bioinorgânica moderna, com ênfase na prática clínica (Mestroni et al., 1989).

Atualmente, a cisplatina é utilizada no tratamento de uma variedade de neoplasias, especialmente, o câncer testicular, com probabilidade de cura de 90% dos casos. Porém, o sucesso clínico da cisplatina é limitado pelos efeitos colaterais significantes causados nos pacientes e pela resistência adquirida ou intrínseca de vários tumores (Zhang e Lippard, 2003).

Estudos de síntese e avaliação farmacológica de compostos contendo íons metálicos diferentes de platina têm despertado grandes interesses na terapêutica do câncer.

Complexos baseados em rutênio, um metal do grupo da platina, têm demonstrado potencial antitumoral, com menor toxicidade sistêmica comparados aos de platina (Gruric-Sipka et al., 2003).

Visando o DNA como molécula alvo, diversos complexos de Ru (II), Ru (III) e Ru (IV) contendo grupos amina, imina, aquilsulfóxido, poliaminocarboxilato e ligantes N-heterocíclicos foram desenvolvidos e testados quanto à propriedade de ligação aos poldesoxinucleotídeos. Estudos realizados *in vitro* têm comprovado a ligação dos complexos de Ru com o DNA, e testes de atividade citotóxica em cultura de células indicam uma correlação direta entre esta atividade e ligação ao DNA (Clarke, 2003; Van Vliet et al., 1995; Nováková et al., 1995; Farrell, 1989; Sava et al., 1984).

Em contraste com a visão de que o DNA é o principal alvo para drogas contendo rutênio, outros autores propõem mecanismos independentes do DNA como a inibição de metaloproteases, interferência com o processo de adesão celular e a liberação de

óxido nítrico sendo responsáveis pela atividade antitumoral e antimetastática destes compostos (Gallori et al., 2000).

Atualmente, dois complexos de rutênio; *Na*trans-[Ru(Im)(Me₂SO)Cl₄] (NAMI) e [ImH]trans(Me₂SO)(Im)Cl₄Ru(III)] (NAMI-A), estão em triagem clínica (Katsaros e Anagnostopoulou, 2002) e muitos outros compostos contendo centros de Ru têm sido desenvolvidos e testados em laboratórios acadêmicos ou por pequenas empresas da área.

Um exemplo é o complexo de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl, o qual demonstrou possuir efeito antitumoral *in vitro* sobre linhagens tumorais humanas e de camundongo, em concentrações relativamente baixas e, adicionalmente, promoveu a proliferação de células mononucleares do sangue periférico humano. Este complexo de rutênio atua como droga citostática ao impedir a progressão do ciclo celular das células tumorais e induzindo a morte por apoptose (Silveira-Lacerda, 2003).

Porém, o uso de novos medicamentos antineoplásicos requer o seu conhecimento profundo e adequado, a fim de se evitar tratamentos insuficientes ou tóxicos.

Na prática, a acumulação de íons metálicos no organismo pode causar efeitos deletérios. A biodistribuição e a liberação dos complexos de metal, sua especificidade farmacológica, as respostas fisiológicas favoráveis das drogas candidatas precisam ser demonstradas em estudos *in vitro* com tecidos e biomoléculas alvos e com investigações *in vivo* em modelos animais antes de iniciar sua triagem clínica (Zhang e Lippard, 2003).

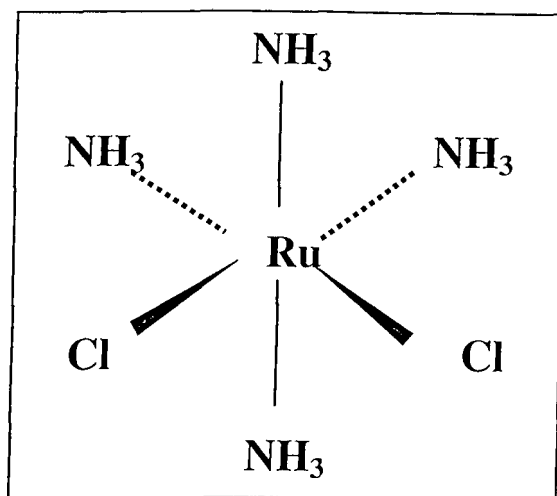
O conhecimento do mecanismo de como estes complexos de metal alcançam suas atividades é crucial para seu sucesso clínico e também para o desenho racional de novos compostos potencialmente melhorados.

Para o melhor entendimento da atividade biológica do complexo de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl, o objetivo do presente estudo é analisar a

atividade antitumoral deste complexo, *in vitro* e *in vivo*, seu efeito genotóxico, sua atividade bactericida e sua interação com o DNA.

II - MATERIAL E MÉTODOS

01- Síntese do Cloreto de *cis*-tetraaminodiclororutênio (III)/*cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (III)



Cloreto de *cis*-tetraaminodiclororutênio (III)

O composto de Cloreto de *cis*-tetraaminodiclororutênio (III) foi sintetizado no Laboratório de Química Supramolecular do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, seguindo os procedimentos de Gleu e Breuel (1938), com algumas modificações adaptadas por Pavanin (1989). Cerca de 1g de [RuCl(NH₃)₅]Cl₂ foi adicionado a 25mL de NH₄OH a 33% em NH₃, previamente desaerados em argônio, com a mistura sendo refluxada até a dissolução do sólido e aparecimento de coloração rosada, seguido da adição de 0,7g de ditonato de sódio à solução quente, que foi resfriada em banho de gelo, com a precipitação de sólido creme pela adição de excesso de etanol, havendo a filtração e a lavagem do sólido com éter; o filtrado foi dissolvido em 11,0mL de solução saturada de ácido oxálico sob refluxo até o aparecimento de um sólido amarelo, que foi coletado por filtração e lavado com etanol e éter, com posterior recristalização em HCL5mol.L⁻¹. O composto de rutênio foi liofilizado, pesado e dissolvido em meio de cultura RPMI para o teste de citotoxicidade sobre a célula tumoral, em meio BHI

para atividade bacteriolítica ou em PBS estéril para o tratamento dos animais experimentais. A solução de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (III) foi submetida à agitação vigorosa para dissolução completa e, em seguida, centrifugada à 2.500rpm/10 min. para remover a parte não dissolvida, o precipitado.

02- Animais Experimentais

Camundongos BALB/c machos provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto/SP e camundongos Swiss fornecidos gentilmente pela Pentapharm do Brasil, com aproximadamente 3 semanas de idade e com massas entre 20 e 30g foram mantidos no biotério do Laboratório de Experimentação Animal, da Universidade Federal de Uberlândia/ MG com ração e água filtrada fornecidos *ad libitum*, à temperatura ambiente. Antes de cada experimento, os animais eram pesados e divididos em grupo ao acaso.

03- Manutenção da Célula Tumoral

O tumor líquido ascítico do Sarcoma 180 (ATCC-TIB66) foi proveniente do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia/MG. As células S180 do tumor ascítico foram mantidas em camundongos Swiss por repiques em intervalos de 10 dias por inoculação intraperitoneal (i.p.) de 10⁵ células/0,1mL/camundongo.

04- DL₅₀ (Dose Letal 50%)

Para determinação da DL₅₀, seis concentrações do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (5, 10, 25, 50, 100 e 200mg/kg/animal) foram injetadas intraperitonealmente (i.p.) em grupos de camundongos Swiss (n = 6, machos, 25g). O período de observação foi de 48 horas e a DL₅₀ foi determinada pelo método de probito.

05- Determinação da atividade antitumoral

05.1 – Obtenção e Contagem das células S180

O animal com tumor ascítico S180 do repique, após 7 dias da inoculação das células, foi sacrificado por deslocamento cervical e o líquido peritoneal aspirado, sendo depositado num tubo plástico com PBS estéril para procedimento de lavagem. As células foram lavadas três vezes por meio da centrifugação a 1000 rpm por 10 min. Ao final da última lavagem, as células foram ressuspendidas em meio RPMI completo para experimentos *in vitro* ou em PBS estéril para teste em camundongo.

Uma alíquota de 10 μ L da suspensão celular foi colocada em 90 μ L de Azul de Trypan 1% (m:v) (Sigma, EUA) e contadas em Câmara de Neubauer. Utilizou-se apenas diluições celulares com >95% de células viáveis.

05.2 – Atividade antitumoral em animais

Grupos de animais Balb/c (n=5) em duplicata foram destinados aos testes (animais sacrificados no 15^o dia) e a observação da sobrevida até o 60^o dia pós-implante tumoral. Os animais receberam injeção intramuscular na virilha esquerda com 1×10^6 de células viáveis de sarcoma 180 ressuspendidas em 0,2mL de PBS estéril. Para cada grupo (G) de animais foi determinado o seguinte tratamento, sendo o volume administrado de 0,2mL para todos os camundongos;

GA: animais normais receberam, durante 5 dias, injeções i.p. diárias de 10mg/kg/animal do composto de rutênio (controle da droga);

GB: animais normais receberam, durante 5 dias, injeções i.p. diárias de 30mg/kg/animal do composto de rutênio (controle droga);

GC: animais com S180 receberam, durante 5 dias, injeções i.p. diárias de 10mg/kg/animal do composto de rutênio após 24 horas da implantação das células tumorais;

GD: animais com S180 receberam, durante 5 dias, injeções i.p. diárias de 30mg/kg/animal do composto de rutênio após 24 horas da implantação das células tumorais;

GE: animais com S180 receberam injeções i.p. de 30mg/kg/animal do composto de rutênio nos dias 4, 8 e 12 após a inoculação das células tumorais;

GF: animais com S180 receberam injeções i.p. de 30mg/kg/animal do composto de rutênio nos dias 7, 11 e 15 após a inoculação das células tumorais;

GG: animais com S180 receberam injeções i.p. de 10mg/kg/animal do composto de rutênio entre os dias 4 e 8 após a inoculação das células tumorais;

GH: animais normais receberam, durante 5 dias, injeções i.p. diárias de PBS estéril (controle negativo);

GI: animais com implante tumoral de S180 receberam, durante 5 dias, injeções i.p. diárias de PBS estéril, após 24 horas da inoculação das células tumorais (controle positivo);

As concentrações para 10 e 30mg/kg de peso do animal do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl foram dissolvidas em 0,2mL de PBS estéril e injetadas de acordo com o tratamento determinado para cada grupo. O grupo controle negativo recebeu apenas PBS estéril.

No 15^o dia após a implantação do tumor, os animais dos grupos testes foram anestesiados com éter de petróleo e, posteriormente, foi realizado o deslocamento cervical dos mesmos. Os órgãos e tumores sólidos foram retirados e pesados. O tumor, os rins, o pulmão e o fígado foram colocados em solução fixadora para análises morfológicas por microscopia de luz.

05.3 – Avaliação Física

Para avaliar a progressão do tumor S180, o volume do tumor sólido (V) dos grupos experimentais testes foi medido com paquímetro digital e os camundongos pesados duas vezes por semana até o 15^o dia experimental. Os valores obtidos foram calculados segundo as equações utilizadas por Morinaga et al. (2002), Marzano et al. (2004), descritas abaixo, onde T é igual a tratado e C a controle:

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

$$T/C \text{ (\%)} = (V \text{ médio do grupo T} / V \text{ médio do grupo C}) \times 100;$$

Mudança da massa corporal (g): média da massa dos animais no último dia experimental – média da massa dos animais no primeiro dia da administração da droga ou PBS.

05.4 – Avaliação Hematológica e Bioquímica

Posteriormente a anestesia profunda dos camundongos, foi feita a punção cardíaca de todos os animais utilizando seringas de 1mL com anticoagulante EDTA. Uma alíquota de 100 µL de sangue total foi destinada ao hemocitômetro (Celm) para contagem de células brancas (WBC), células vermelhas (RBC) e hemoglobina (Hb). O sangue restante foi acondicionado em tubos plásticos de 2mL e centrifugados à 2.500rpm/10minutos, e o plasma separado para dosagem de bilirrubina, creatinina e lactato desidrogenase (LDH), seguindo as instruções do fabricante (Bioclin®).

05.5 - Análise histológica dos Tecidos por Microscopia de Luz (ML)

Para a realização da ML, o tumor, os rins, o pulmão e o fígado provenientes dos animais experimentais descrito no item 5, foram previamente fixados numa solução de etanol 95%, formol 30%, ácido

acético glacial e água deionizada na proporção de 3:1:1:5 em volume durante 24 horas. Após a fixação, ocorreu a desidratação em álcoois em concentrações crescentes (de 50 a 100%), após o que os tecidos foram pré-infiltrados em uma mistura 1:1 de glicol metacrilato e etanol absoluto por 24 horas à temperatura ambiente, sendo então imersos em solução infiltradora, que consiste de 50 mL de resina básica (glicol metacrilato) e 5g de ativador (peróxido de benzoila), por 24 horas. Em seguida, foram incluídos em uma mistura de 15mL da solução infiltradora anterior e 1mL de endurecedor (derivado de ácido barbitúrico - Dimetil Sulfóxido) à temperatura ambiente. Cortes de 5µm de espessura dos blocos obtidos foram realizados em micrótomo (Leica Instruments), corados com azul de toluidina a 0,25% em água destilada à 40°C, montados entre lâmina e lamínula e examinados ao microscópio de luz, sendo posteriormente fotografados.

06 - Efeito Genotóxico do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl – Teste do Micronúcleo (MN)

O efeito genotóxico do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl *in vivo* foi avaliado segundo o método de Schmid (1975) e as normas da SMCTA (Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, 2004), com modificações. Camundongos Swiss em grupo (n=5, 25g), receberam os seguintes tratamentos (0,2mL/animal):

G1: animais receberam duas injeções de 30mg/kg de Ciclofosfamida® em intervalos de 24 horas (controle positivo);

G2: animais receberam duas injeções de PBS estéril em intervalos de 24 horas (controle negativo);

G3: animais receberam duas injeções de 10mg/kg de rutênio em intervalos de 24 horas;

G4: animais receberam duas injeções de 30mg/kg de rutênio em intervalos de 24 horas.

Colchicina a 0,025%, na proporção de 1mL/100g de massa do animal foi injetado intraperitonealmente (ip) e após 4 horas os animais foram sacrificados, o fêmur foi retirado e as epífises cortadas para a remoção da medula óssea com 1mL de SFB estéril (Soro Fetal Bovino, Cultilab) a 37°C. O conteúdo foi transferido para um tubo cônico de centrífuga e homogeneizado com uma pipeta Pasteur, e centrifugado a 1000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as lâminas foram montadas com o pellet celular e fixadas com metanol 70% por 5 min. Corou-se com Giemsa 1:20 em tampão fostato (Sörensem), pH 6,8; durante 20 min.

As lâminas foram examinadas em aumento de 100x ao microscópio óptico (Carl Zeiss, Germany). Contou-se 2.000 células por grupo, sendo 1.000 PCE (eritrócito policromático, células jovens com RNA, basófilo, coloração azul escuro em Giemsa) e 1000 NCE (eritrócitos normocromáticos, células maduras, acidófilos, coloração rosa ou alaranjado claro em Giemsa), para determinar a indução do micronúcleo.

07- Ensaio de Citotoxicidade

A linhagem tumoral S180, após o procedimento de lavagem foi mantida em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 20mM de L-glutamina, 7,5% de bicarbonato de sódio e 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de gentamicina (meio completo), em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO_2 , seguindo o protocolo do ATCC.

Para o teste de citotoxicidade, 1×10^5 células tumorais foram plaqueadas em microplacas de 96 poços, na presença ou na ausência do *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ em concentrações de 1 a $0,01\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ ou do controle Paclitaxel® ($0,1\text{mg}.\text{mL}^{-1}$) e incubadas por 24h em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO_2 e 95% de ar. Logo após, foram adicionados aos poços de cultivo celular 10 μL de MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium] na concentração de 5mg/mL (5mg de MTT em 1 mL de PBS estéril).

A placa foi novamente incubada por mais 4 horas. Após este período, acrescentou-se 50µL de solução a 10% de dodecil sulfato de sódio/HCl 0,01N, para dissolver os sais de formazan. As placas de cultivo celular foram incubadas por uma noite a 37°C em câmara escura. A quantificação da densidade óptica foi feita em espectrofotômetro (Leitor de microplacas Camberra-Packard) utilizando-se o filtro de interferência de 540nm. O cálculo da percentagem de citotoxicidade tumoral do composto de rutênio foi obtido conforme a seguinte fórmula:

$$\text{(A) \% de Crescimento} = \frac{[\text{D.O Tumor (na presença da droga)} - \text{D.O Basal MTT/ SDS}]}{[\text{D.O Tumor (controle/meio de cultura)} - \text{D.O Basal MTT/SDS}]} \times 100$$

$$\text{\% de citotoxicidade da droga} = 100 - \text{\% de crescimento celular (A)}$$

O valor do IC₅₀ (concentração da droga que reduz a média da absorbância em 570nm em 50% em relação à média do controle celular não tratado) foi determinado, segundo Cabrera *et al.* (2004).

08- Atividade Bacteriolítica do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl

Staphylococcus aureus, cepa ATCC-25923 e *Escherichia coli*, cepa ATCC – 25922 foram adquiridas junto ao Laboratório Central do Hospital de Clínicas da UFU.

As bactérias individuais, *S.aureus* e *E.coli*, foram inicialmente inoculadas em meio de cultura estéril BHI (Brain Heart Infusion-Broth – infusão desidratada de coração e cérebro 1,75% (m/v), Triptose 0,1% (m/v), glicose 0,2% (m/v), NaCl 0,5% (m/v), Na₂HPO₄ 0,25% (m/v), pH 7,4 ± 0,2 a 25°C da Diagnolab, Espanha) e ativadas por 16 horas a 37°C em repouso. As culturas foram diluídas 100 vezes em meio BHI estéril. Retirou-se 2mL para o plaqueamento da microplaca de 96 poços, na presença ou na ausência do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl em concentrações de 1 a 0,01mg.mL⁻¹ diluídas em BHI. Inicialmente e após 6 horas de incubação a 37°C sem agitação, a densidade óptica

foi monitorada em espectrofotômetro (Leitor de microplacas Camberra-Packard) utilizando-se o filtro de interferência de 600nm.

09- Estudo *In vitro* da Interação DNA- *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl

09.1- Extração de plasmídeo pUC18

Uma colônia de *E. coli* XL-1 blue contendo o plasmídeo pUC18 foi cultivada em 3mL de meio BHI contendo ampicilina à 100µg/ml *overnight*. Centrifugou-se 1,5mL a 2.500rpm/5min., descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspendidas em 200µL de meio e incubadas em gelo por 5 min. Em seguida foram adicionados 360µL de solução II (500µL NaOH 2M, 500uL SDS 10% e 4mL de H₂O) recém preparada e homogeneizado por inversão. Após a lise celular adicionou-se 300µL de solução III (3mL de acetato de Potássio 5 M, 1,15 mL de ácido acético e completar para 10 mL com água) e 2 µL de RNase (10mg/mL) e incubou-se por 10 min. Centrifugou-se por 10min a 10.000rpm à 4 °C, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo ao qual adicionou-se 750µL de isopropanol, o qual foi centrifugado a 10.000rpm/10min. O pellet foi ressuspendido em 200µL de PBS. Foram adicionados 110µL de acetato de amônio 7,5 M, agitado vigorosamente e centrifugado 10.000rpm/15min à temperatura ambiente. Ao sobrenadante foram acrescentados 750µL de etanol 100% gelado e incubado a -20°C *overnight*. Foi centrifugado a 12.000 rpm por 30min. a 4°C. Lavou-se com etanol 70% gelado e ressuspendido em 50µL de H₂O. O plasmídeo foi quantificado a 260 nm e visualizado por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio, visualizado em UV e o gel foi fotografado.

09.2- Interação Ru - DNA plasmideal

O composto de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl, o plasmídeo pUC18 (1μg: 2.686pb; 0,57pmol; 3.4.10¹⁶ moléculas, Sigma) e o ácido ascórbico (Sigma) foram dissolvidos em 10mM NaCl₄, pH 6,5.

Alíquotas de 16μg de plasmídeo pUC19 foram incubados com o complexo de rutênio a 37°C em 10mM NaClO₄, pH 6.5 em *r*₁ (razão molar de Ru para nucleotídeo) de 0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 e 1,00 na ausência ou presença de 1,8mM de ácido ascórbico. Volumes iguais de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% por 16 horas a 25V em tampão TAE (Tris 40mM-acetato, EDTA 2mM, pH 8,0), corado com brometo de etídio, visualizado em luz UV e fotografado, segundo Grguric-Sipka et al. (2003).

10- Procedimentos estatísticos

Para comparação entre os grupos tratados e controle, foi realizado Análise de Variância (ANAVA) e para análise entre duas razões foi usado o teste Binomial, programas SISVAR 4.6 e BioEstat 2.0, respectivamente. (p>0,05)

III - RESULTADOS

01- Determinação da DL₅₀ do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl

O valor da DL₅₀ do composto de rutênio em camundongos Swiss, após 48 horas da administração intraperitoneal do cloreto de *cis*-tetraaminodiclororutênio, é 99,76mg/kg do animal.

02- Atividade Antitumoral do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III) em Animais com S180

2.1. Análise Física

Para análise da atividade antitumoral da droga testada sobre o Sarcoma 180 *in vivo* (tabela 01), foram considerados parâmetros o volume tumoral no decorrer do experimento e a massa do tumor após o sacrifício dos animais. Os resultados de ambos os parâmetros demonstraram ser significantes em relação à redução do tumor quando comparados ao grupo controle positivo (S180).

A mudança (ganho ou perda) de peso dos animais está apresentada na tabela 01. Os valores indicam que houve ganho de peso corpóreo para todos os grupos, exceto o GC (animais receberam 10mg/kg de animal de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl, durante 5 dias após o inóculo das células S180). No grupo F (animais tratados nos dias 7, 11 e 15 com 30mg/kg de animal do composto de rutênio, após a inoculação das células S180), houve um pequeno acréscimo ao peso médio dos animais, porém, foi significativamente menor em relação aos controles GH e GI, negativo e positivo, respectivamente.

O acompanhamento da mortalidade dos animais dos grupos experimentais indicou a sobrevivência de todos os animais testes tratados com a concentração de 10mg/kg de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl, enquanto apenas 1 animal morreu no GG após 60 dias pós-implante tumoral. Para a dose de 30mg/kg do complexo de rutênio, houve

morte de um maior número de animais, demonstrando ser esta dose da droga a menos tolerante para os animais tratados, com e sem o sarcoma 180.

Tabela 01: Atividade Antitumoral do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl em Animais com S180

Grupos	Tratamento ^{a,b}	Volume Tumor (±DP, mm ³)	T/C (%)	Massa Tumor (±DP; g)	T/C (%)	Δ Peso (±DP; g)	N° de Animais Vivos	
							15°	60°
A	10 (5) ^c	_____	_____	_____	_____	+2,17±1,41	05	05
B	30 (5) ^c	_____	_____	_____	_____	+1,47±2,38	03	03
C	10 (5) ^d	255,97±99,41*	44	0,44±0,06*	27	-0,33±0,99*	05	05
D	30 (5) ^d	224,54±170,23*	38	0,25±0,16*	15	+1,18±1,28	03	02
E	30 (4, 8 e 12) ^d	303,66±50,95*	52	0,36±0,05*	22	+1,32±0,90	05	05
F	30 (7, 11 e 15) ^d	255,71±51,86*	44	0,29±0,02*	18	+0,64±0,40*	05	03
G	10 (4 a 8) ^d	310,65±70,50*	53	0,37±0,05*	22	+1,83±0,55	05	04
H	PBS s/ tumor ^c	_____	_____	_____	_____	+2,66±1,06	05	04
I	PBS c/ tumor ^d	586,37±130,27	100	1,65±0,82	100	+2,24±1,00	04	00

^a Doses de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (mg/kg) administrados nos animais nos dias ^b pré-estabelecidos, ^c animais normais e ^d animais inoculados com 1x10⁶ células S180 na virilha esquerda. Grupo de 5 animais. O acompanhamento da mortalidade dos animais foi realizado até o 15° e 60° dia pós-implante tumoral. As medidas foram obtidas dos animais dos grupos testes que sobreviveram até o 15° dia pós-implante tumoral. Δ: Variação. ±DP a partir da média dos valores do grupo teste. Análise estatística: Análise de Variância (ANAVA) *p<0,05 vs. controle positivo (Grupo I).

2.2.8 Testes Bioquímicos

Os resultados da dosagem de creatinina, bilirrubina e LDH estão apresentados na tabela 02. Os níveis plasmáticos de creatinina dos grupos E e F (animais que receberam 30mg/kg de animal i.p. à partir do 4º e 7º dia pós-implante tumoral, respectivamente) foram 0,98 e 0,70mg/dL, sendo maiores do que os controles GH (0,27mg/dL) e GI (0,13mg/dL). A média dos valores dos animais dos demais grupos não diferiu daqueles dos controles.

A função hepática foi avaliada pela dosagem de bilirrubina (direta, indireta e total) no plasma dos animais experimentais. Os animais normais que receberam apenas rutênio e PBS demonstraram valores semelhantes de bilirrubina indireta aos dos animais normais (PBS), enquanto os demais grupos mantiveram um padrão oposto. Em valores totais de bilirrubina, houve resposta estatística semelhante à indireta para todos os grupos, demonstrando alteração funcional hepática dos animais com tumor S180, com ou sem tratamento.

Os resultados médios da dosagem de LDH no plasma dos animais com e sem tumor, na presença ou não do composto de rutênio, exceto para o grupo F (tratamento dos animais foi iniciado no 7º dia pós-implante tumoral), foram elevados quando comparados ao controle negativo (GH).

Tabela 02: Análises bioquímicas do efeito do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl no plasma de camundongos com tumor sólido S180

Grupos	Tratamento ^{a,b}	CREATININA (±DP,mg/dL)	BILIRRUBINA ((±DP,mg/dL)			LDH (±DP,U/L)
			Direta	Indireta	Total	
A	10 (5) ^c	0,24±0,26	1,97±0,71	11,53±1,68*	13,50±1,66*	2166,79±144,33
B	30 (5) ^c	0,48±0,37	1,34±0,32	12,87±3,42*	14,22±3,63*	2085,22±160,01
C	10 (5) ^d	0,13±0,03	0,42±0,51	25,44±2,85	25,66±2,95	2115,07±228,73
D	30 (5) ^d	0,03±0,02	2,65±1,61	26,81±1,42	29,46±16,83	1538,24±867,23
E	30 (4, 8 e 12) ^d	0,70±0,13*	1,61±0,90	21,06±3,86	22,67±4,06	2044,84±43,81
F	30 (7, 11 e 15) ^d	0,98±0,31*	2,76±1,06	20,72±1,44	23,47±1,31	897,40±92,83*
G	10 (4 a 8) ^d	0,11±0,02	1,62±0,50	19,66±0,92	21,29±0,58	1907,06±121,19
H	PBS s/ tumor ^c	0,27±0,38	0,97±0,28	9,76±1,18*	10,93±1,01*	800,33±98,12*
I	PBS c/ tumor ^d	0,13±0,03	1,53±0,40	23,65±3,71	25,18±3,36	1791,34±235,59

^a Concentrações de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (mg/kg) administrados nos animais nos dias ^b pré-estabelecidos, ^c animais normais e ^d animais inoculados com 1x10⁶ células S180 na virilha esquerda. Grupo de 5 animais. As dosagens plasmáticas foram obtidas dos animais dos grupos testes que sobreviveram até o 15º dia pós-implante tumoral. Análise estatística: Análise de variância, ± DP a partir da média dos valores do grupo. *p<0,05 vs. controle positivo (Grupo I).

2.3. Avaliação Hematológica

Os valores médios da contagem de hemácea e hemoglobina representados na figura 01 (a e b) apresentam números semelhantes aos controles positivo (GI) e negativo (GH). Em relação à contagem de células brancas (fig. 01 c), os leucócitos, tanto para os animais normais que receberam apenas o complexo de rutênio quanto para os animais com S180 tratados com 30mg/kg da droga testada, exceto o GF, houve decréscimo significativo na quantidade de leucócitos do sangue total.

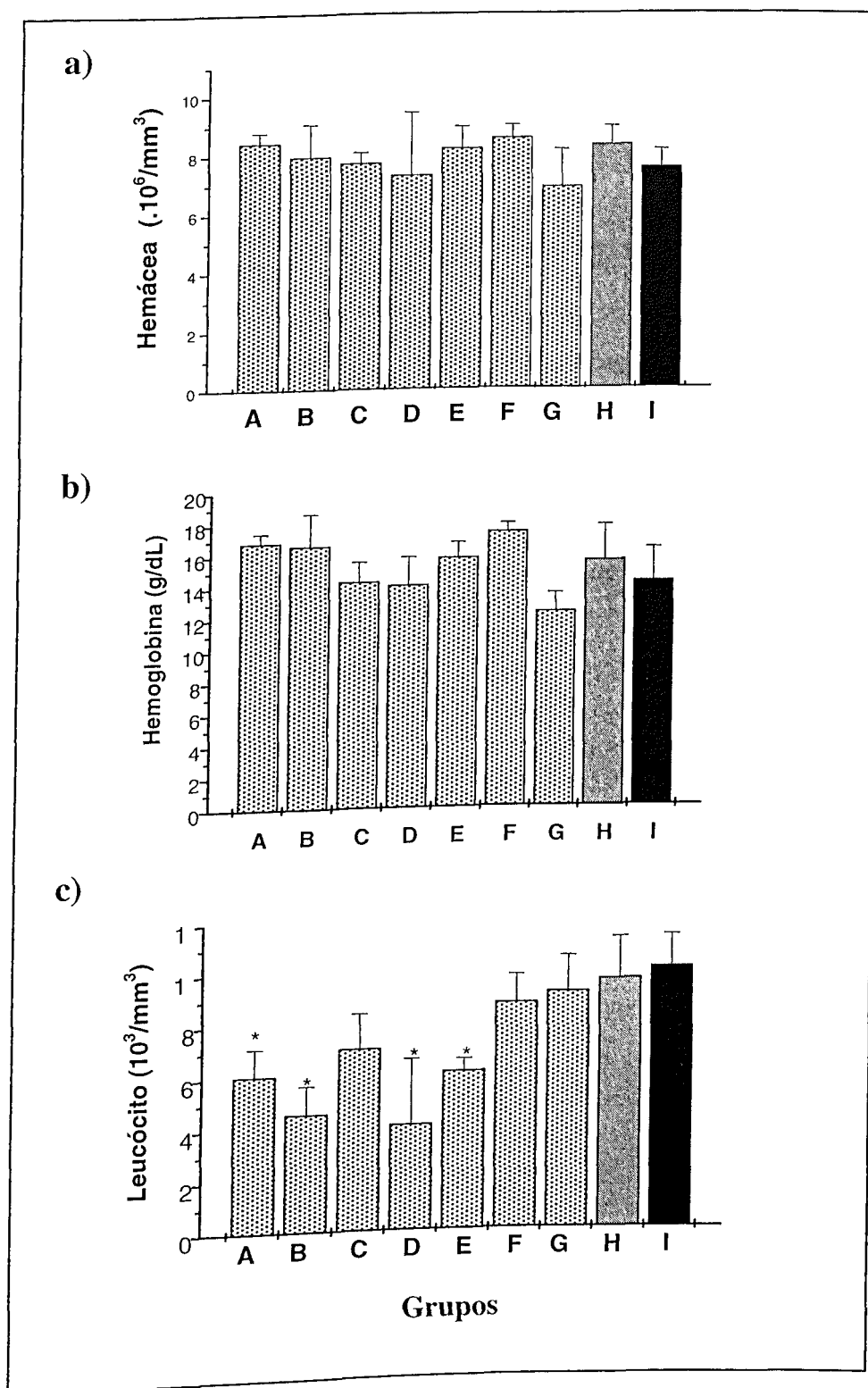


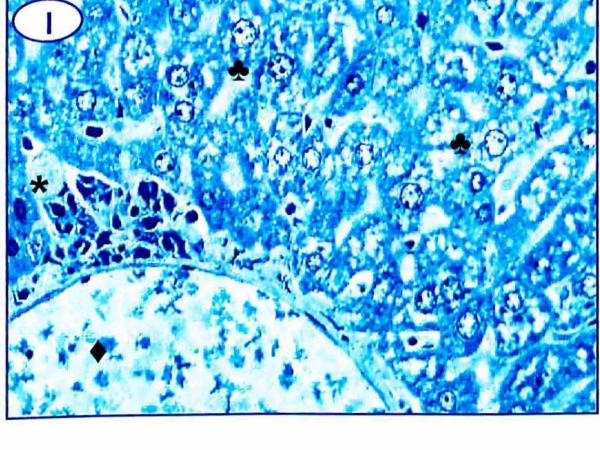
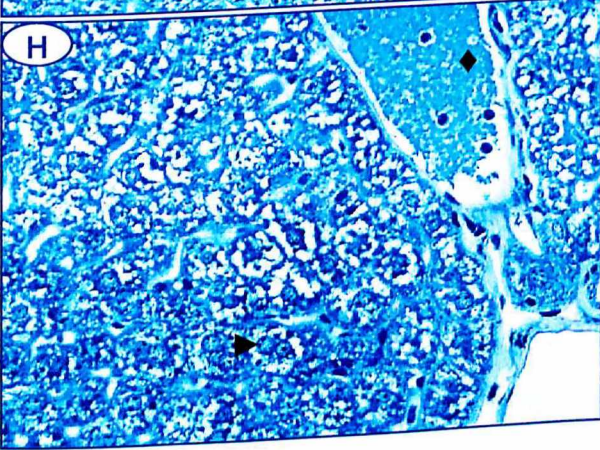
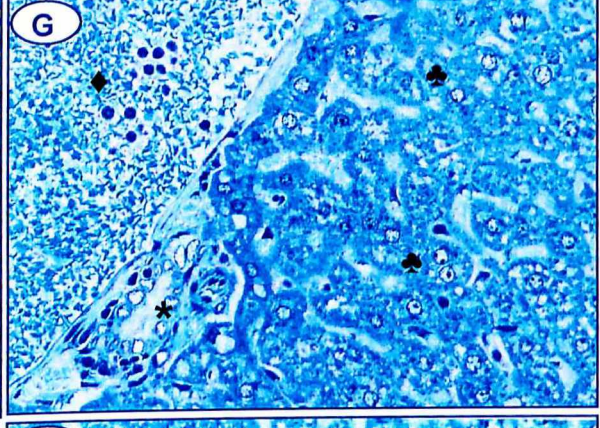
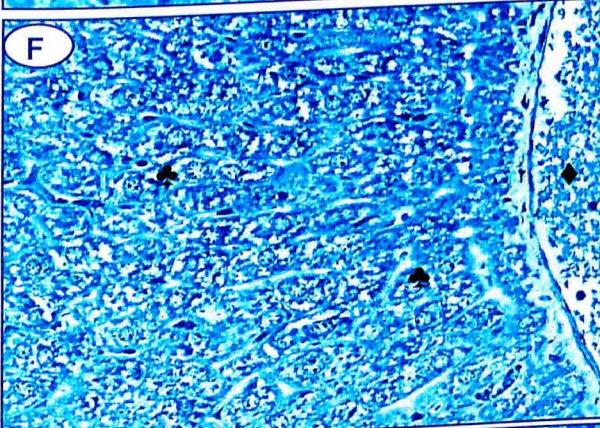
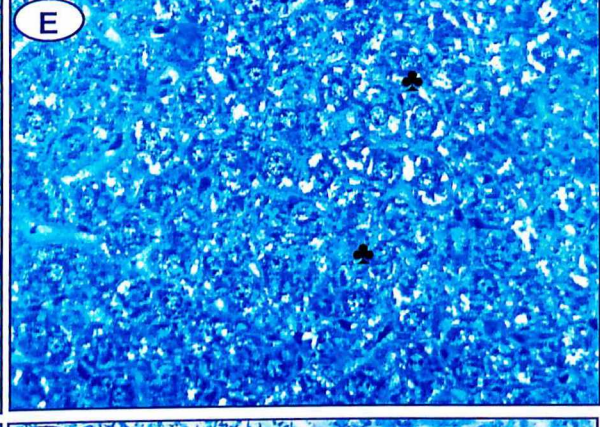
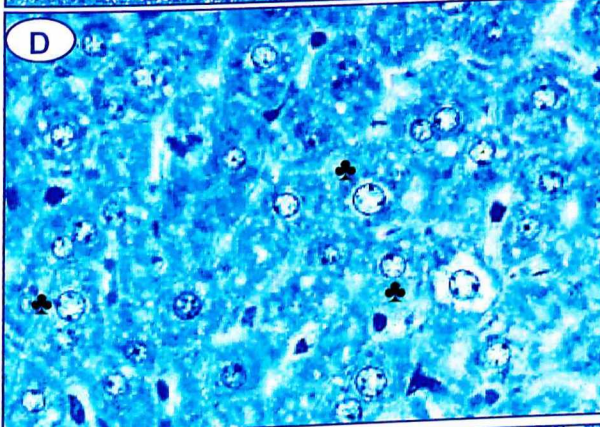
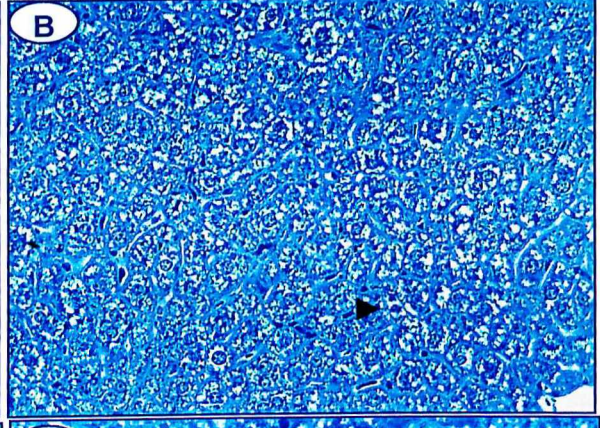
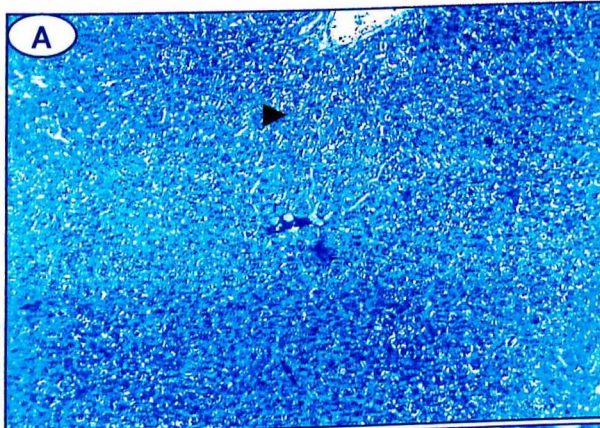
Figura 01: Análise hematológica do soro dos animais experimentais. Barras representam contagem de hemáceas (**fig.01 a**), hemoglobina (**fig.01 b**) e leucócitos (**fig. 01 c**) do sangue total dos animais experimentais. Os grupos A e B (animais normais receberam $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$); C a G (animais com S180 receberam $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$); GH: controle negativo e GI: controle positivo. Análise estatística: Análise de Variância (ANAVA), * $p < 0,05$ vs. controle positivo.

2.4. Avaliação Histológica

2.4.1 – Efeito do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III) sobre a morfologia hepática de camundongos normais e com o tumor sólido S180

A análise histopatológica do fígado foi realizada para todos os animais experimentais, ilustrado na figura 02. Para os animais normais que receberam apenas PBS estéril i.p. (fig.02H) e o complexo de rutênio (figs.02 A e B), não foi observado nenhum tipo de alteração morfológica. No entanto, para os grupos com implante tumoral, independente do tratamento, notou-se tumefação dos hepatócitos, caracterizando um quadro de intensa degeneração hidrópica. Neste caso, as células são aparentemente mais salientes na superfície do corte e o citoplasma adquire aspecto menos basófilo (grupos I, D, E, F e G).

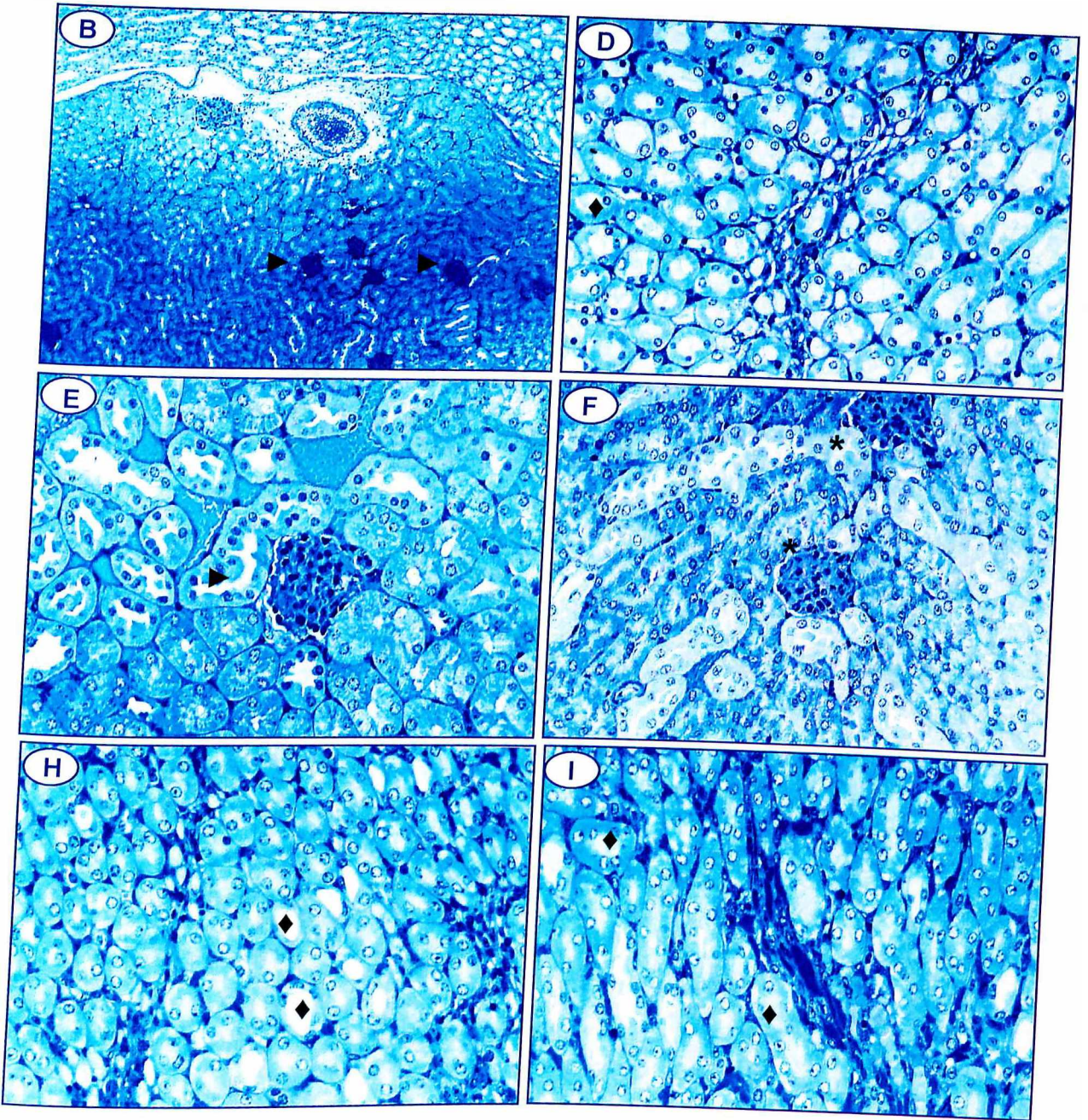
Figura 02: Fotomicrografia do fígado de Balb/c normais e com miosarcoma 180 tratados com *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III). Cortes histológicos de 2,5µm de espessura do fígado de, **A** e **B**: animais normais tratados com 10 e 30mg/kg por 5 dias i.p. de *cis*-rutênio, 120x e 260x, respectivamente. Animais com S180 tratados com 30mg/kg de i.p. de *cis*-rutênio do 1º ao 5º dia (**D**), nos dias 4, 6 e 8 (**E**), no 7, 11 e 15 (**F**) dia pós-implante tumoral. **G**: animais com S180 tratados com 10mg/kg de i.p. de *cis*-rutênio do 4º ao 8º dia pós-implante tumoral, 260x, **H**: animal normal do controle negativo; 260x, **I**: animais com S180, controle positivo, 260x. Observar: (►) Hepatócitos poliédricos normais, (♦) Vasos sanguíneos com muitos eritrócitos e alguns neutrófilos, (*) Sinusóides hepáticos característicos, (♣) Hepatócitos intumescidos. Nota-se o intumescimento dos hepatócitos, característico de degeneração hidrópica intensa do fígado. **Coloração:** azul de toluidina.



2.4.2. Efeito do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III) sobre a morfologia renal de Balb/c normal e com o miosarcoma 180

Nenhuma alteração histopatológica grave foi observada para os rins dos animais experimentais. Para os animais normais, com S180 com ou sem tratamento com *cis*-rutênio (fig.03 H, I, D, E e F, respectivamente), o lúmen dos túbulos proximais estavam com aspecto normal, a luz do túbulo arredondada e superfície apical celular precisa. Na fig. 03B, é possível observar corpúsculos renais íntegros bem distribuídos na região cortical. Apenas para os animais com S180 tratados com 30mg/kg de i.p. de *cis*-rutênio no 7, 11 e 15 dia pós-implante tumoral (fig.03F), notou-se uma leve injúria renal, observando corpúsculos renais levemente reduzidos.

Figura 03: Fotomicrografia do rim de Balb/c normais e com miosarcoma 180 tratados com *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III). Cortes histológicos de 5,0µm de espessura do rim de: **B:** animais normais tratados com 30mg/kg por 5dias i.p. de *cis*-rutênio, 120x. Animais com S180 tratados com 30mg/kg de i.p. de *cis*-rutênio do 1° ao 5° dia (**D**), nos dias 4, 6 e 8 (**E**) e no 7, 11 e 15 (**F**) dia pós-implante tumoral, 260x, **H:** animal normal do controle negativo; 260x, **I:** animais com S180, controle positivo, 260x. Observar: (▶) corpúsculo renal íntegro na região cortical, (◆) tubos coletores na medula renal, com aspecto normal, com luz do túbulo mais arredondada e superfície apical celular mais precisa, (*) corpúsculo renal levemente reduzido. **Coloração:** azul de toluidina.



2.4.3. Efeito do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III) sobre a morfologia do pulmão de Balb/c normal e com o miosarcoma 180

Levando em consideração que várias drogas podem alcançar o tecido pulmonar e lesá-lo, a análise histopatológica do pulmão foi realizada para todos os animais experimentais. Nenhuma alteração morfológica ou injúria de qualquer espécie foram observadas, tanto para os animais controles quanto para os animais que receberam *cis*-rutênio i.p., com ou sem tumor sólido S180 (figura 04).

Adicionalmente, sabendo que o pulmão é o tecido pioneiro de tumores secundários em camundongos e, embora o Sarcoma 180, geralmente, não leve ao quadro de metástase, também não foi observada a presença de células tumoral S180.

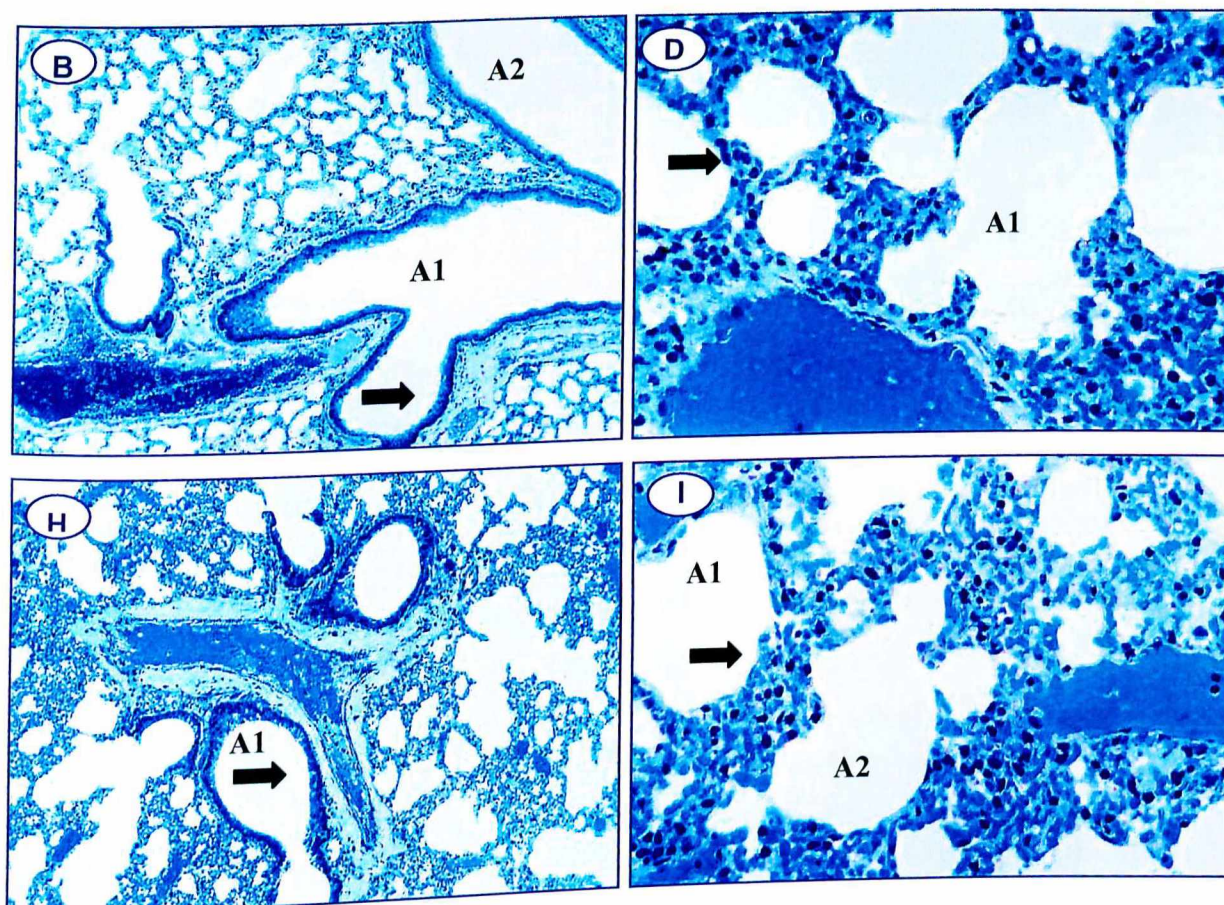


Figura 04: Fotomicrografia do pulmão de Balb/c normais e com miosarcoma 180 tratados com *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III). Cortes com miosarcoma 180 tratados com *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III). Cortes histológicos de 5,0µm de espessura de pulmão de: **B:** animais normais tratados com 30mg/kg/5dias i.p. de *cis*-rutênio, 120x, **D:** animais com S180 tratados com 30mg/kg/5dias i.p. de *cis*-rutênio, 120x, **H:** animal normal do controle negativo; 120x, **I:** animais com S180, controle positivo, 260x. Observar: **A1** e **A2** são espaços alveolares íntegros, cercados por parede interalveolar (seta) contendo capilares que apresentam eritrócitos. **Coloração:** azul de toluidina.

2.4.4. Efeito do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl sobre a morfologia do miosarcoma 180 de Balb/c comparados ao músculo normal de Balb/c

Para analisar o efeito do *cis*-rutênio no tumor sólido S180 de músculo estriado esquelético de Balb/c, realizou-se cortes histológicos de todos os tumores sólidos retirados após o óbito dos animais experimentais. A visão panorâmica destes tecidos está ilustrada na figura 05.

O músculo normal de Balb/c está representado na figura 05 H 1 e 2, com fibras musculares preservadas e organizadas. Nos tumores dos animais do controle positivo S180, fig.05 I, nota-se intenso infiltrado inflamatório, vasos sangüíneos, ilhotas de células viáveis polimórficas circundadas por grandes áreas de necrose isquêmica, sem qualquer resquício de fibra muscular íntegra.

Para os grupos que receberam tratamento com *cis*-rutênio há presença de fibras musculares organizadas e desagregadas, porém íntegras. Embora haja menor infiltrado inflamatório, as áreas tumorais necróticas estão bem acentuadas. Nas fig.05 C e D, grupos de animais que receberam *cis*-Ru logo após o inóculo das células S180, nenhuma área com células S180 viáveis foi encontrada, e algumas áreas de tecido de granulação, com formação de tecido fibroso foram encontradas. Ainda na fig.05D4, observa-se dois mastócitos, característicos de tecidos de granulação.

Nos demais grupos, animais que receberam *cis*-Ru em dias alternados e/ou após a pega tumoral, foram encontradas poucas células S180 viáveis. O padrão de células necróticas foi mantido e áreas de tecido de granulação também foram encontradas em todos os cortes histológicos (fig.05 E, F e G).

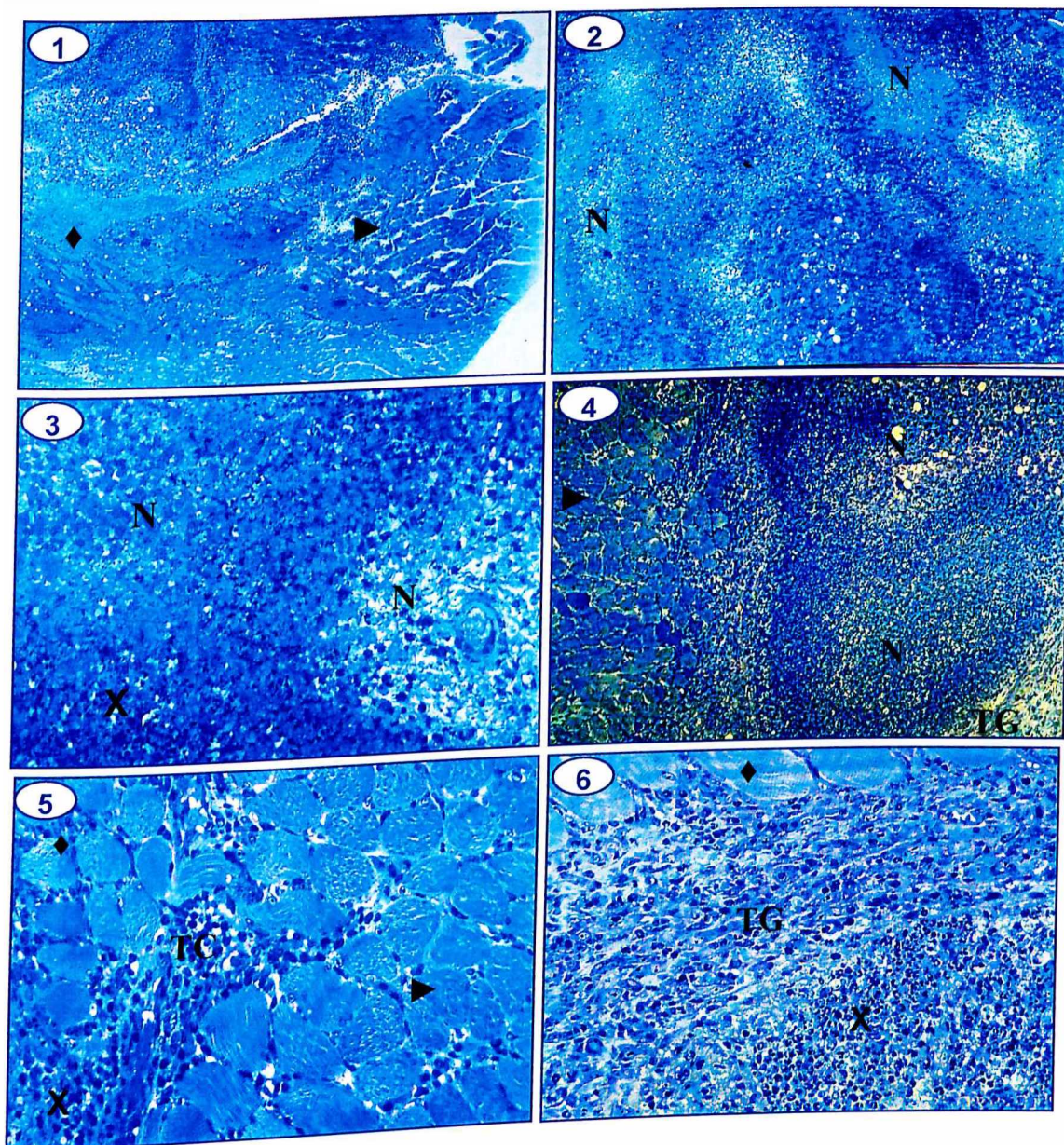


Figura 05.1: Fotomicrografia de músculo normal e do miosarcoma 180 de Balb/c com e sem tratamento de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III). Cortes histológicos de 2,5µm de espessura do tumor sólido S180 dos animais 10mg/kg de i.p. de *cis*-rutênio do 1º ao 5º dia pós-implante tumoral (GC). (Aumento de 1: 40x, 2-4: 120x, 5-6: 260x). Observar: (▶) Fibras musculares preservadas, (◆) Fibras musculares desagregadas, (X) Infiltrado inflamatório, (N) Área tumoral necrótica e (TG) Tecido de Granulação, com formação de tecido fibroso. Coloração: Azul de Toluidina.

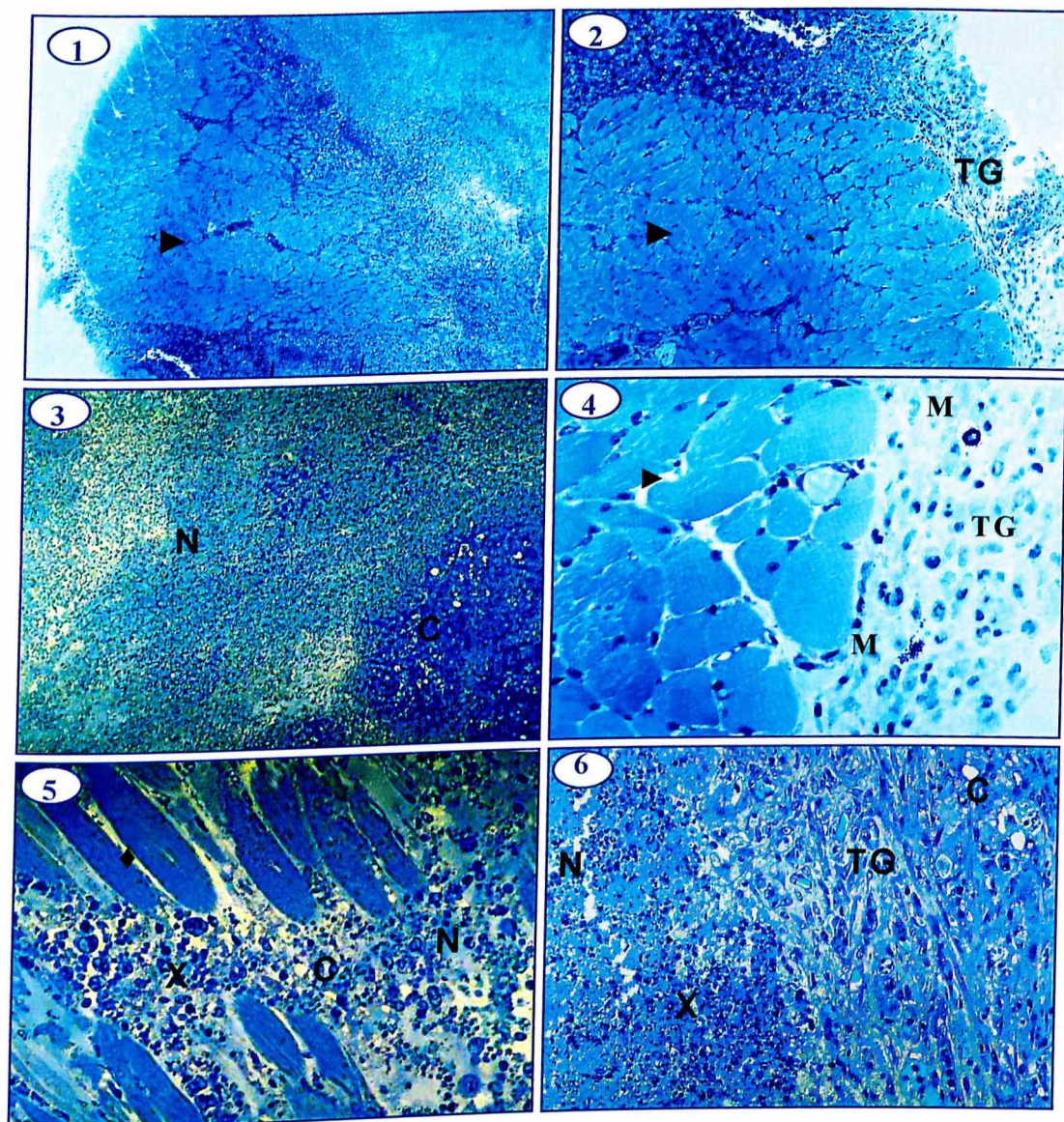


Figura 05.2: Fotomicrografia de músculo normal e do miosarcoma 180 de Balb/c com e sem tratamento de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III). Cortes histológicos de 2,5µm de espessura do tumor sólido S180 dos animais 30mg/kg de i.p. de *cis*-rutênio do 1º ao 5º dia pós-implante tumoral (GD). (Aumento de 1: 40x, 2-3: 120x, 4-6: 260x). Observar: (▶) Fibras musculares preservadas, (◆) Fibras musculares desagregadas, (X) Infiltrado inflamatório, (N) Área tumoral necrótica, (M) Mastócito, (C) Célula S180 viável e (TG) Tecido de Granulação, com formação de tecido fibroso. **Coloração:** Azul de Toluidina

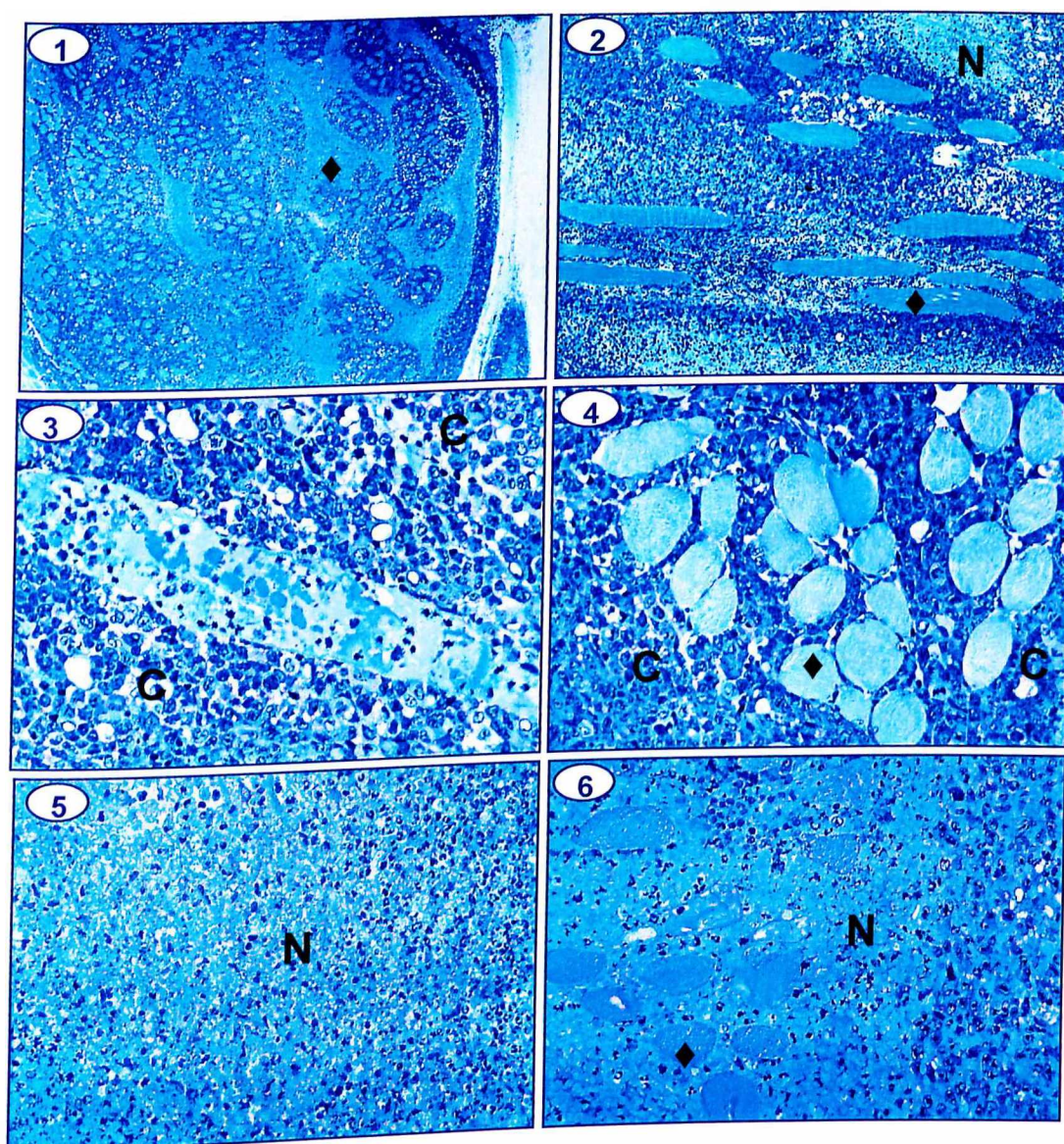


Figura 05.3: Fotomicrografia de músculo normal e do miosarcoma 180 de Balb/c com e sem tratamento de *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}(\text{III})$. Cortes histológicos de $2,5\mu\text{m}$ de espessura do tumor sólido S180 dos animais 10mg/kg de i.p. de *cis*-rutênio no 4º, 8º e 12º dia pós-implante tumoral (GE). (Aumento de 1: 40x, 2: 120x, 3-6: 260x). Observar: (◆) Fibras musculares desagregadas, (X) fibra muscular com Infiltrado inflamatório e debris celulares, (N) Área muscular com Infiltrado inflamatório e debris celulares, (N) Área tumoral necrótica, (C) Célula S180 viável. **Coloração:** Azul de Toluidina

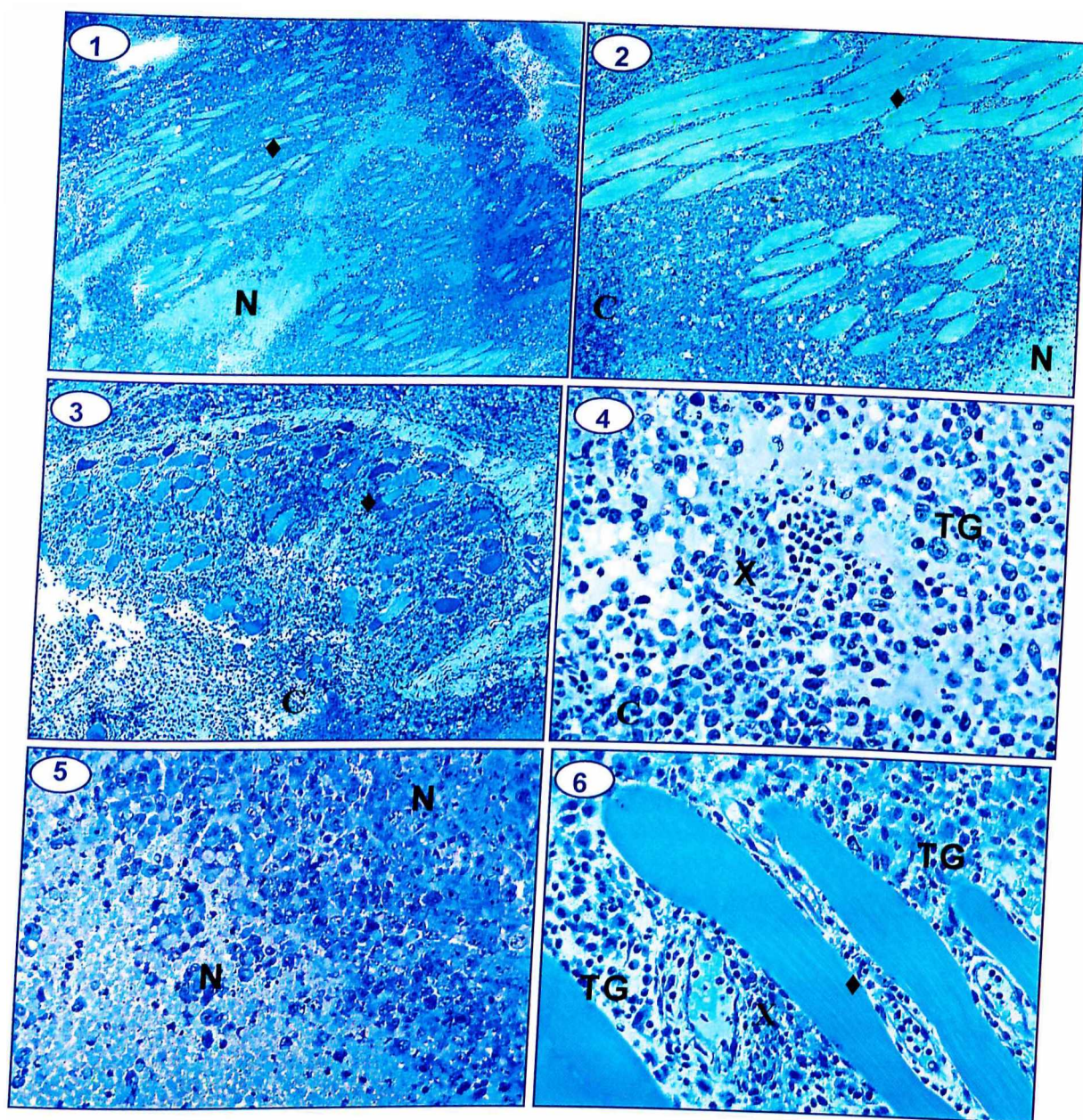


Figura 05.4: Fotomicrografia de músculo normal e do miosarcoma 180 de Balb/c com e sem tratamento de *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}(\text{III})$. Cortes histológicos de $2,5\mu\text{m}$ de espessura do tumor sólido S180 dos animais 30mg/kg de i.p. de *cis*-rutênio no 7º, 11º e 15º dia pós-implante tumoral (GF). (Aumento de 1: 40x, 2-4: 120x, 5-6: 260x). Observar: (♦) Fibras musculares desagregadas, (X) Infiltrado inflamatório, (N) Área tumoral necrótica e (TG) Tecido de Granulação, com formação de tecido fibroso e (C) Células S180 viáveis. Coloração: Azul de Toluidina

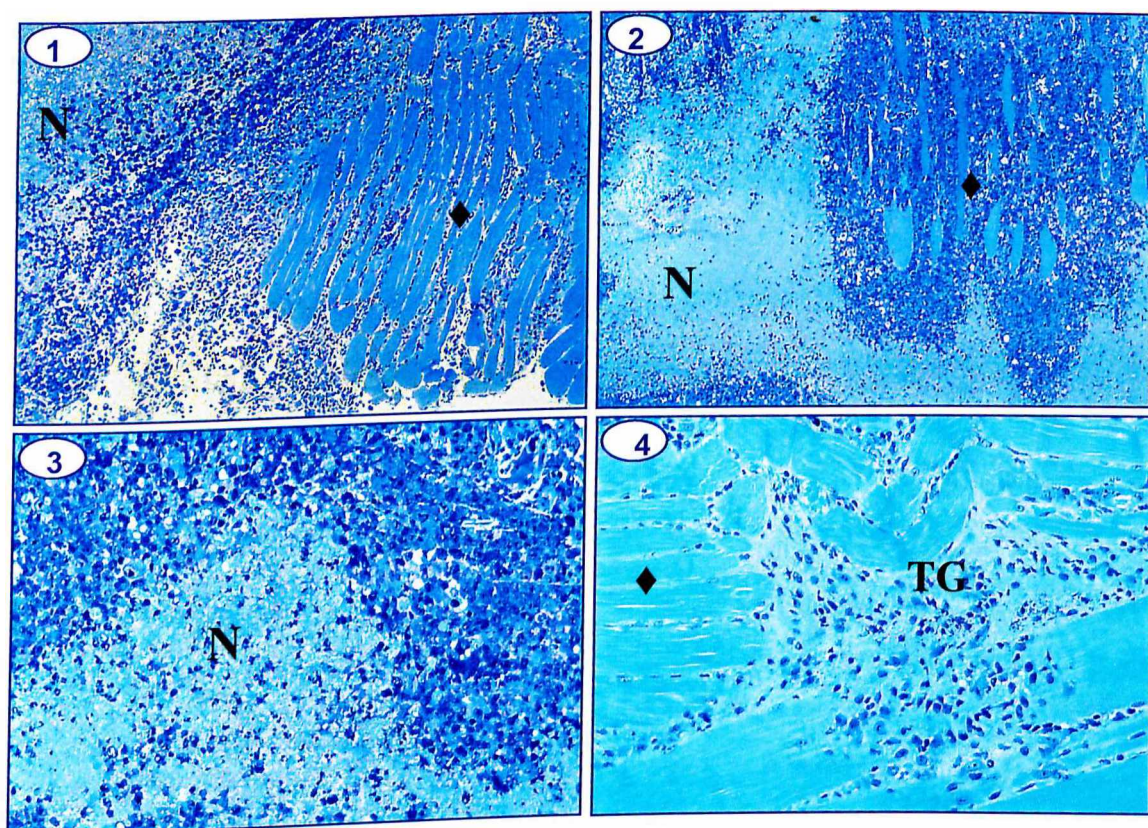
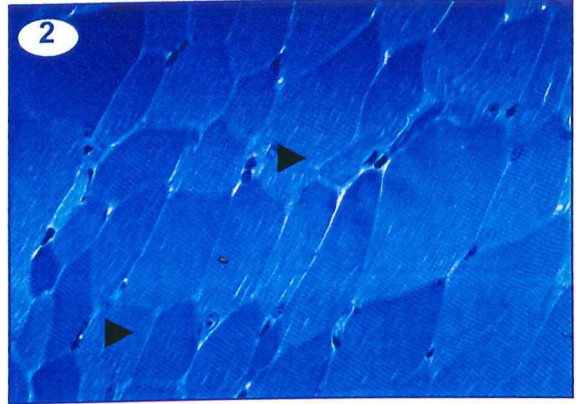
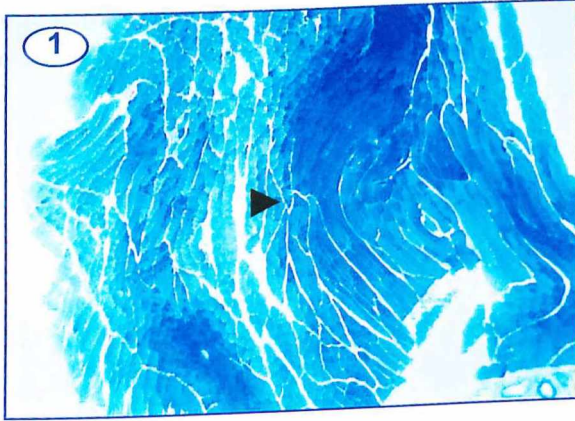


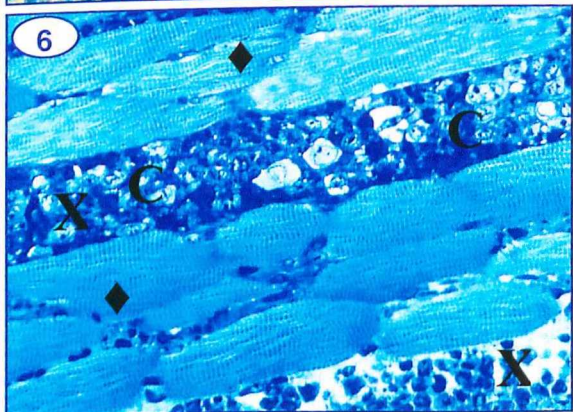
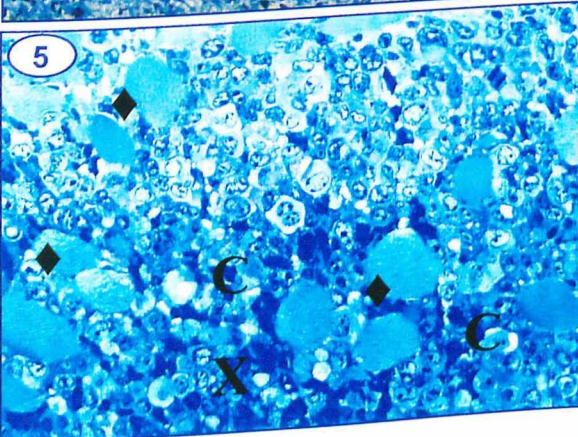
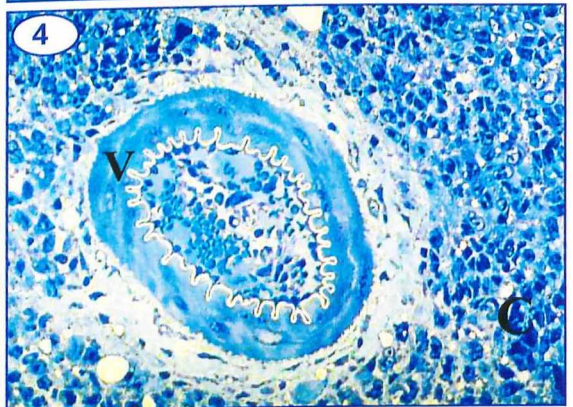
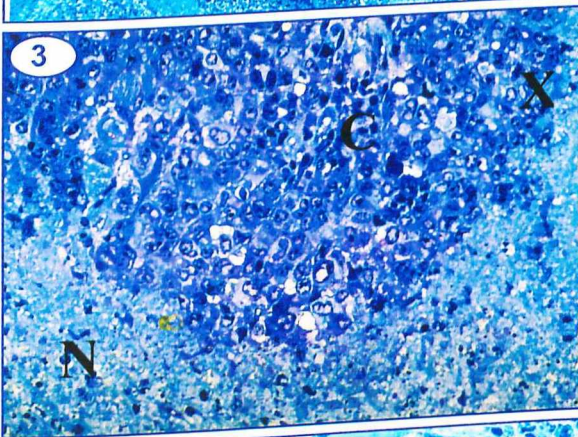
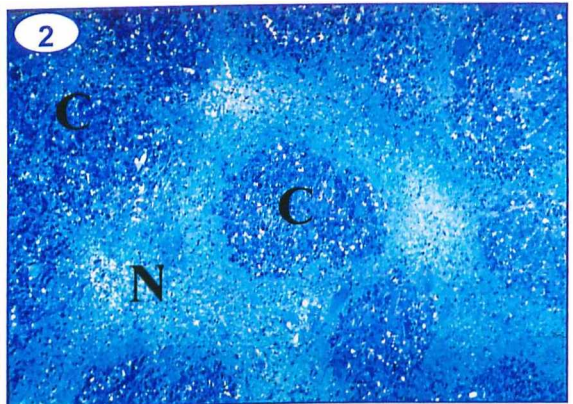
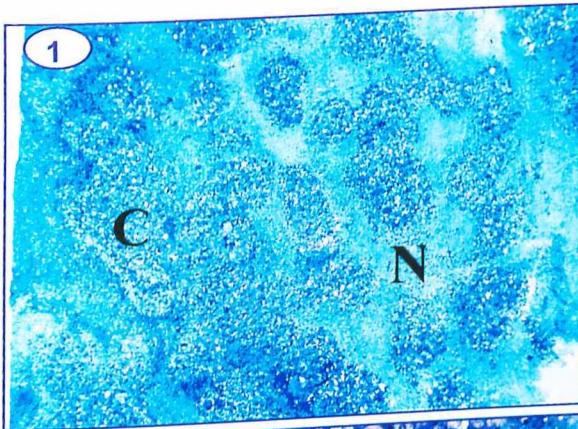
Figura 05.5: Fotomicrografia de músculo normal e do miosarcoma 180 de Balb/c com e sem tratamento de *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}(\text{III})$. Cortes histológicos de $2,5\mu\text{m}$ de espessura do tumor sólido S180 dos animais 10mg/kg de i.p. de *cis*-rutênio do 4º ao 8º dia pós-implante tumoral (GG). (Aumento de 1: 40x, 2: 120x, 3-4: 260x). Observar: (◆) Fibras musculares desagregadas, (N) Área tumoral necrótica e (TG) Tecido de Granulação, com formação de tecido fibroso. **Coloração:** Azul de Toluidina

Figura 05.6: Fotomicrografia de músculo normal e do miosarcoma 180 de Balb/c com e sem tratamento de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III). Cortes histológicos de 2,5µm de espessura do **GH:** músculo estriado esquelético do animal normal do controle negativo (aumento de **1:** 40x e **2:** 260x), **GI:** do tumor sólido S180 dos animais do controle positivo (aumento de **1:** 40x, **2-3:** 120x, **4-6:**260x). Observar: (►) Fibras musculares preservadas, (♦) Fibras musculares desagregadas, (X) Infiltrado inflamatório, (N) Área tumoral necrótica, (C) Células S180 viáveis mostrando acentuado polimorfismo: núcleos múltiplos e hipercromáticos e (V) Vaso sangüíneo. **Coloração:** azul de toluidina.

GH:



GI:



03- Efeito Genotóxico do Cloreto de *cis*-tetraminodiclororutênio(III)

O Teste do Micronúcleo (MN), ilustrado na figura06, foi realizado com concentrações de 10 e 30mg/kg de animal de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III), as quais induziram 0,7% e 4,6% a formação de MN em relação ao número de eritrócito policromático total em células da medula óssea de camundongos Swiss. Os controles positivo e negativo induziram 57% e 1,8% de PCEMN, respectivamente, como apresentados na tabela03.

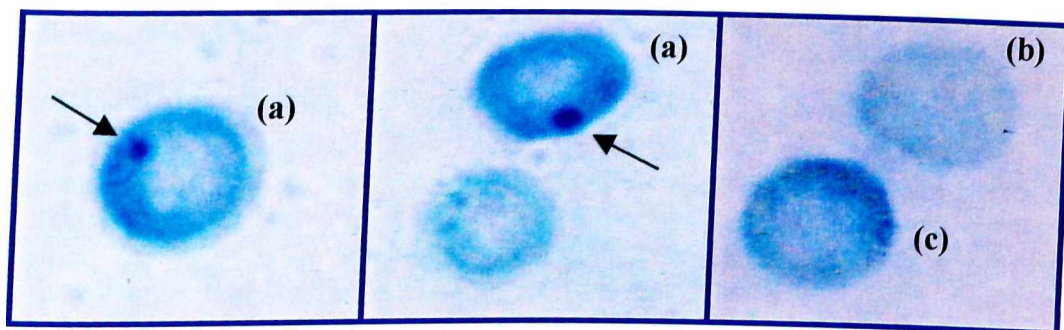


Figura 06: Efeito Genotóxico do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III) sobre células de medula óssea de Swiss. Microfotografias (100x) mostrando eritrócito policromático (a) com micronúcleo (seta) de medula óssea de Balb/c induzido por Ciclofosfamida® (controle positivo-G1). Eritrócito normocromático (b) e (c) policromático sem micronúcleo de animais do controle negativo (G2).

Tabela 03: Frequência de eritrócitos normocromáticos (NCE) e policromático (PCE) com e sem micronúcleo (MN) de células da medula óssea de Balb/c tratados com *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III)

TRATAMENTO	N ^o de NCE		N ^o de PCE		%PCEMN/PCE/GRUPO
	s/MN	c/MN	s/MN	c/MN	
G1- controle +	935	65	428	572	57,20
G2- controle -	996	4	982	18	1,80*
G3- 10mg/kg ^a	981	19	954	46	4,6*
G4- 30mg/kg ^a	998	2	993	7	0,7*

^a Doses de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III) utilizadas no tratamento dos animais, + animais tratados i.p. com Ciclofosfamida® e - animais normais. Dados percentuais por total de PCE por grupo (10³ células). Análise estatística: Teste de Hipótese para diferença entre duas proporções. *p<0,001 vs.% controle positivo.

04- Citotoxicidade do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III) sobre linhagem Tumoral S180

O composto *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III) apresentou crescente atividade citostática sobre células do sarcoma 180 nas concentrações de 0,01 a 5,0 mg.mL⁻¹ (figura07), sendo significativamente superior nas concentrações de 1,0 e 5,0 mg.mL⁻¹ (colunas hachuradas), em relação ao controle paclitaxel® (coluna preta). A IC₅₀ está entre 0,1 e 1 mg.mL⁻¹.

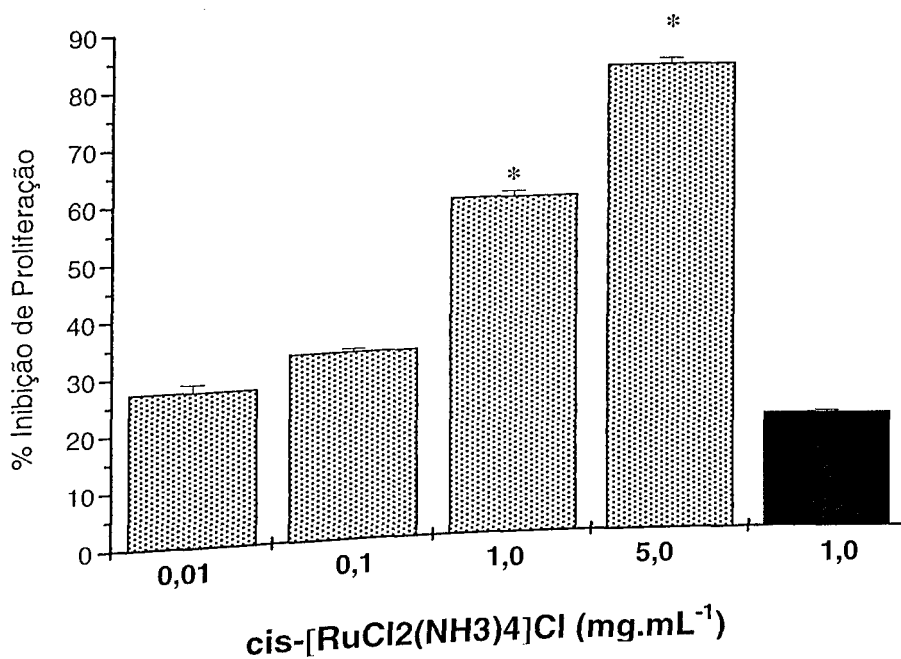
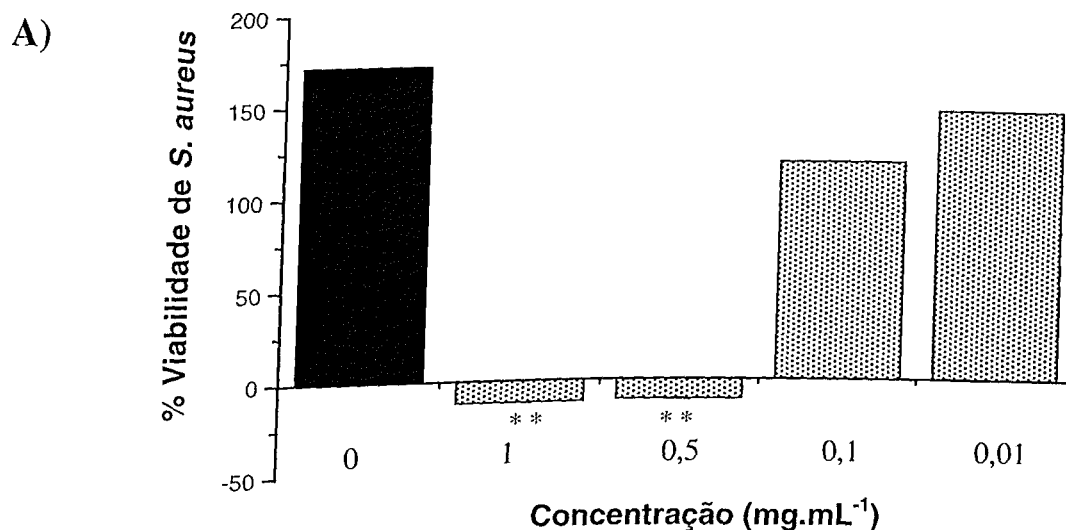


Figura 07: Efeito antitumoral do composto *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III) *in vitro* sobre célula tumoral S180 de camundongo. As células tumorais foram incubadas na presença do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (5,0 a 0,01mg.mL⁻¹) e do Paclitaxel® (1,0mg.mL⁻¹) e, após 24h à 37°C, a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT. Os dados mostram a média ± DP de três experimentos independentes. Análise de Variância (ANAVA), *(p<0,05).

05- Atividade Bactericida do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III) sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

A avaliação do efeito do composto de rutênio sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (fig. 08 A e B, respectivamente) indica que concentrações igual ou superior a 0,01mg.mL⁻¹ do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl apresentam atividade bactericida, sendo que 1 e 0,5mg.mL⁻¹ inibiram significativamente a proliferação destas células. Adicionalmente, para a bactéria *E.coli*, os dados percentuais demonstram para todas as concentrações do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl, inclusive 0,1 e 0,01mg.mL⁻¹, atividade citostática significante.



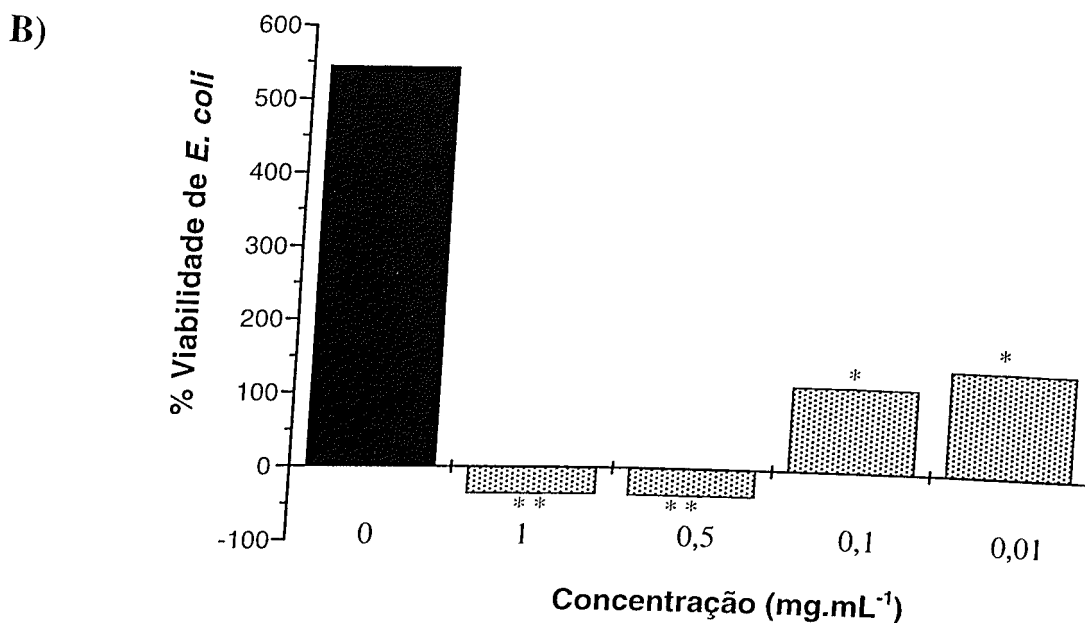
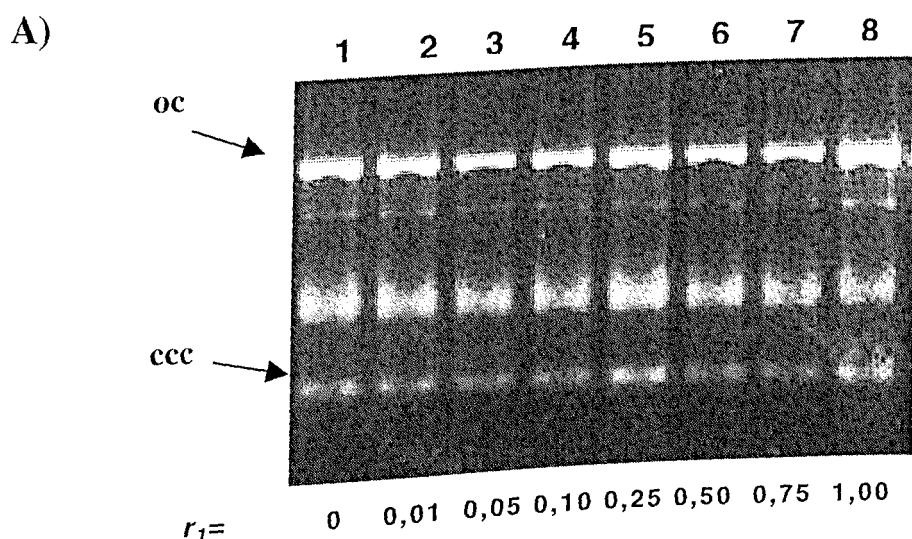


Figura 08: Atividade bactericida do composto de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl(III) sobre *S. aureus* (A) e *E. coli* (B). Após o plaqueamento, as bactérias individuais foram incubadas por 2 h na presença de várias concentrações de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (barra hachurada) ou na ausência da droga teste (barra preta). A atividade do complexo de rutênio sobre as bactérias foi representada pela redução da densidade óptica a 600nm, com 0, 2 e 4 h a 37°C. Os dados percentuais são relativos à diferença entre 0 e 4 h, e a média ± DP representativa de amostras em triplicata. Análise de Variância (ANOVA, * p<0,05, ** p<0,001).

06- Interação Ru-DNA plasmideal

O perfil do DNA plasmideal pUC18 nativo (linha1) e incubado com concentrações crescentes de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (linhas 2-8), está representado na figura 09 A. Pode ser observado que a mobilidade da forma oc (DNA circular aberto) aumentou de $r_1 = 0,01$ para 1,00; ocorrendo o mesmo em relação à mobilidade eletroforética da forma ccc (DNA circular covalentemente fechado), ou seja, houve um aumento gradual da mobilidade do DNA de $r_1 = 0,01$ para 1,00 (figura09 A).

Na figura09 B está ilustrado a mobilidade eletroforética do DNA plasmideal pUC18 nativo (linha1) incubado com ácido ascórbico o mesmo sistema na presença de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (linhas 2-5). Nota-se que nos valores de $r_1 = 0,01$ a 0,05 de Ru (III), houve degradação do DNA plasmideal em ambas as formas: oc e ccc. No $r_1 = 0,1$ e 0,25 não foi detectado nenhum fragmento de DNA, assim como nos valores de $r_1 = 0,50$, 0,75 e 1,0 (dados não apresentados).



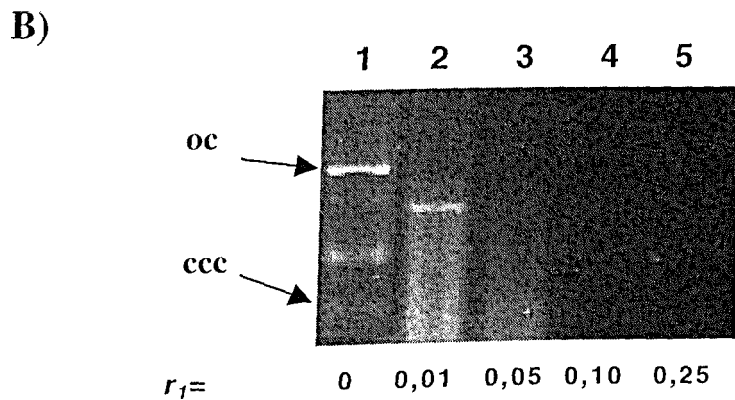


Figura 09: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando as mudanças na mobilidade eletroforética (A) e da clivagem das formas oc e ccc do DNA do pUC18 (B), após 24 h à 37°C incubado com várias concentrações do complexo de rutênio, na ausência e na presença de ácido ascórbico, respectivamente. A) Linha 1 sem *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl e linha 2 a 8: pUC18 incubado em concentrações crescentes de r_1 (razão molar de Ru por nucleotídeo) de 0,01 a 1. B) Linha 1 é controle de pUC18 com ácido ascórbico sem *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl e linha 2 a 5: pUC18 incubado em concentrações crescentes de r_1 de 0,01 a 0,25 na presença de 1.8mM de ascorbato. As formas oc e ccc são; DNA circular aberto (open circular DNA) e DNA circular covalentemente fechado (covalently closed circular DNA), respectivamente.

IV - DISCUSSÃO

A partir da década de 70, o câncer passou a representar a segunda causa de morte em todo o mundo. Desde então, a dificuldade é encontrar um fármaco que aja especificamente nas células cancerígenas, sem interferir com outras reações bioquímicas vitais.

Os medicamentos conhecidos atualmente são relativamente inespecíficos, agindo indistintamente no tumor e nos tecidos normais de proliferação mais rápida, como o sistema hematopoiético, o que obriga à interrupção periódica do tratamento para recuperação do paciente.

Outros tipos de terapêuticas, como a radioterapia, a cirurgia e o homotransplante da medula têm permitido notáveis resultados. Porém, os progressos na quimioterapia antineoplásica ainda são lentos (Calamai et al., 1998).

Diante dos resultados apresentados com o cloreto de *cis*-tetraaminodiclororutênio (III) por Silveira-Lacerda (2003), o intuito deste estudo foi pesquisar de forma mais ampla os efeitos deste composto, especialmente em modelo tumoral *in vivo*, já que os resultados obtidos outrora tornaram esta droga promissora na terapêutica do câncer.

Em trabalhos anteriores, foi descrito que o composto de *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ apresenta atividade citotóxica sobre linhagem tumoral humanas Jurkat e HeLa, com IC_{50} de 190 e $3,5\mu\text{M}$,

respectivamente (Frasca et al., 2001). Em célula tumoral A-20 de camundongo, a atividade citostática foi observada em concentrações \geq a $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ de *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ (Silveira-Lacerda, 2003). A citotoxicidade destes complexos de rutênio parece estar correlacionada com sua ligação com o DNA, no entanto, o mecanismo de ação destas drogas permanece ainda desconhecido.

Neste estudo, sobre a linhagem tumoral S180, a IC_{50} encontrada para o complexo de rutênio foi menor que 1mg.mL^{-1} (figura 07) confirmando a atividade antitumoral do mesmo.

Com os resultados prévios obtidos sobre a célula cancerígena S180, o *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ foi utilizado no tratamento de camundongos com miosarcoma 180.

Primeiramente foi investigada a toxicidade aguda do complexo de *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ pela determinação da DL_{50} da droga testada via i.p. em camundongos normais. O resultado indica que a dose da droga que provocou a mortalidade de 50% dos animais foi de $99,76\text{mg/kg}$.

Em comparação aos quimioterápicos em uso ou em triagem clínica, a cisplatina e o NAMI e o seu análogo NAMI-A, respectivamente, esse valor é relativamente alto. Para a cisplatina, largamente utilizada no tratamento de vários cânceres, a dose terapêutica está entre $8\text{-}10\text{mg/kg}$, enquanto a DL_{50} é $11,5\text{mg/kg}$ de animal (Khyriam e Prasad, 2003). Nota-se uma relação estreita entre a dose terapêutica e a DL_{50} da cisplatina. É sabido que doses abaixo da terapêutica não possuem atividade terapêutica e ainda causam nefrotoxicidade. Neste contexto, o composto de rutênio é promissor porque possui uma DL_{50} maior do que a cisplatina, possibilitando doses distantes e, por isso, menos tóxica que a DL_{50} .

Os compostos derivados de rutênio que estão em fase de triagem clínica, o NAMI e NAMI-A, só atingem sua atividade antimetastática em doses \geq a 35mg/kg de animal (Casarsa et al., 2004). Assim, o *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ demonstrou ser uma droga

menos tóxica do que os compostos NAMI e NAMI-A para tratamentos *in vivo*.

No teste de toxicidade DL_{50} foi utilizado concentrações de 25 e 50mg/kg/animal do composto de rutênio. Visto que não houve morte no grupo de animais que receberam 25mg/kg de peso do animal de *cis*-rutênio, padronizou-se uma concentração entre 25 e 50mg/kg, ou seja, 30mg/kg para a realização dos tratamentos dos animais com miosarcoma.

No ensaio *in vivo*, houve efeito antitumoral para as duas concentrações de *cis*- $[RuCl_2(NH_3)_4]Cl$ utilizadas no tratamento dos animais (10 e 30mg/kg). Observou-se redução do volume e peso do tumor e aumento da sobrevivência dos animais tratados comparados ao controle positivo (tabela 01). Em relação ao efeito tóxico, não foi observado nenhuma variação brusca no peso dos animais, com ou sem tumor, que receberam o *cis*- $[RuCl_2(NH_3)_4]Cl$ i.p. (tab.01). No entanto, durante a observação da mortalidade, dois animais normais que receberam tratamento de 30mg/kg durante 5 dias consecutivos morreram, implicando num provável efeito cumulativo do rutênio no organismo do animal.

Após o sacrifício dos animais no dia pré-estabelecido, testes bioquímicos, hematológicos e análises histopatológicas do pulmão, fígado, rins e do tumor sólido foram realizados a fim de avaliar os efeitos da droga no animal.

A função renal foi avaliada pela dosagem de creatinina no soro dos animais experimentais. Dois grupos de animais tratados com *cis*-rutênio apresentaram níveis séricos elevados de creatinina (tabela 02): E e F (animais que receberam 30mg/kg/animal i.p. à partir do 4º e 7º dia pós-implante tumoral, respectivamente, 0,70 e 0,98mg/dL).

A concentração de creatinina no plasma aumenta quando ocorre a redução da velocidade da filtração glomerular, implicando na deterioração da função renal, com lesões nos glomérulos, túbulos, vaso sanguíneo ou tecido intersticial renal (Motta, 1989).

No entanto, por meio da análise histopatológica nenhuma alteração relevante foi observada (fig. 03). Apenas para os animais do grupo F foi observada uma leve injúria renal, com corpúsculos renais levemente reduzidos. Isto explica o alto valor de creatinina no plasma dos animais, devido à insuficiência glomerular, que reduziu a filtração do plasma.

Lesões renais caracterizadas por atrofia são decorrentes de agentes tóxicos, porém, uma vez retirado o agente causador da degeneração o órgão volta ao seu estado normal (Pereira, 2003).

Estado de injúria renal foi observado tanto para a cisplatina quanto para o complexo de rutênio NAMI-A. A cisplatina é conhecida por causar grave nefrotoxicidade no segmento S3 do túbulo proximal na medula renal até áreas de necrose. Isso por que as células do epitélio tubular retêm e acumula a platina, inativando enzimas que contém grupo tiol (Marzano et al., 2004). Injúria renal causada pelo NAMI-A foi observada nas concentrações de 200mg/kg, diluído em água. Quando se adicionou 5% de DMSO, houve significativa redução da lesão tecidual. A hipótese é que a redução do Ru (III) para Ru (II) pela adição de DMSO diminuiu a toxicidade do complexo (Sava et al., 2002).

Neste contexto, é importante ressaltar que para o *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ apenas dois grupos experimentais demonstraram valores de creatinina plasmática elevados e associados à análise histopatológica, visto que não houve lesão tecidual grave, as demais concentrações e formas de tratamento tornam-se importante para tratamentos a longo prazo como no câncer secundário.

Em ambos os grupos anteriormente mencionados (E e F), o tratamento utilizado foi com a maior dose de *cis*-rutênio (30mg/kg de animal) e iniciou-se após a pega tumoral com aplicações em intervalos de 4 dias. Duas observações podem ser feitas: os tratamentos iniciados logo após a inoculação das células S180 demonstraram resultados melhores na redução do volume e peso tumoral e, semelhantemente aos resultados obtidos por Pacor et al.

(1992) com derivados de rutênio, baixas doses de compostos de Ru aplicados diariamente podem ser mais efetivos do que grandes doses administradas como tratamentos simples ou repetitivos em intervalos de 4 dias.

Para analisar o efeito hepatotóxico do composto de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl, a dosagem plasmática de bilirrubina (direta, indireta e total) e cortes histológicos do fígado dos animais experimentais (tabela 02 e figura 02, respectivamente) foram realizados.

Os valores médios de bilirrubina dos animais normais tratados com *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl não demonstraram diferenças em relação ao controle PBS, confirmando o aspecto normal observado nas fotomicrografias do fígado dos mesmos.

Para os grupos de animais com tumor sólido de S180, todos os valores encontrados para de bilirrubina indireta e total foram elevados e em correlação com a tumefação dos hepatócitos observada na análise histopatológica do tecido, onde notou-se uma intensa degeneração hidrópica do fígado, sugerindo prejuízo na glucuronização da bilirrubina indireta que ocorre neste tecido. A bilirrubina pode apresentar níveis séricos elevados na presença de obstrução das vias biliares, doenças hemolíticas, geralmente em neonatais, e na insuficiência hepática.

Nesse caso, houve lesão tecidual do fígado, aparentemente, caracterizando um quadro de insuficiência dos hepatócitos em transformar bilirrubina indireta em direta para ser excretada pelas vias biliares até o intestino.

Sabendo que a degeneração hidrópica é uma lesão reversível caracterizada pelo acúmulo de água e hidrólitos no interior das células e que alguns dos fatores responsáveis por esta lesão não-letal é a hipóxia - comum em tumores agressivos como o S180 - e também por agentes tóxicos que lesam a membrana plasmática - como metais pesados (Pereira, 2003), é difícil determinar ao certo se há um ou mais fatores agredindo o tecido hepático dos animais experimentais. Vale ressaltar que a degeneração hidrópica é um

processo reversível e, suprimida a causa, as células voltam a exercer suas funções vitais normais e ainda; a insuficiência hepática por lesão exclusivamente do tipo degenerativa é muito rara.

Relatos sobre a hepatotoxicidade dos complexos de rutênio na terapia do câncer, embora escassos, indicam que este metal é menos tóxico em relação à cisplatina. O NAMI-A, em doses de 35mg/kg de animal causou moderado dano da arquitetura lobular, inchaço dos sinusóides hepáticos e turvação focal do epitélio, enquanto que para a cisplatina, com apenas 2mg/kg houve dano lobular generalizado e início de necrose dos hepatócitos (Bergamo et al., 1999).

Finalmente, no caso do composto de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl, com base nos dados obtidos dos animais normais que receberam apenas o tratamento, as análises realizadas indicam que a droga não apresenta efeito hepatotóxico nas doses utilizadas (10 e 30mg/kg).

Algumas drogas, inclusive a cisplatina e alguns complexos de rutênio com ligantes doadores de NO, podem alcançar o tecido pulmonar e lesá-lo. A análise histopatológica do pulmão não demonstrou nenhuma alteração morfológica ou injúria de qualquer espécie, por exemplo, inflamação ou necrose dos bronquíolos pulmonares, tanto para os animais controles quanto para os animais que receberam *cis*-rutênio i.p., com ou sem tumor sólido S180 (figura 04). Adicionalmente, sabendo que o pulmão é o tecido pioneiro de tumores secundários em camundongos e, embora o Sarcoma 180, geralmente, não acarrete quadro de metástase, também não foi observada a presença de células tumorais S180 neste tecido.

Estes dados nos permitem sugerir a utilização do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl para tratamentos de cânceres secundários do pulmão. Porém, estudos com células tumorais que promovem metástase pulmonar (não realizados neste trabalho) devem ser feitos para um maior esclarecimento.

Devido à larga distribuição da lactato desidrogenase no organismo, encontrando-se em altas concentrações no fígado, músculos esquelético e cardíaco, rins, hemácias e outros tecidos, os

níveis séricos de LDH também foram determinados e utilizados como parâmetro na atividade antitumoral do composto de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl *in vivo*.

Para os animais normais que receberam o composto de rutênio, níveis elevados de LDH em relação ao controle negativo (GH) foram obtidos independentemente da dose, assim como para os animais com S180; exceto para o GF e GD (animais com S180 que receberam injeções i.p. de 30mg/kg/animal do composto de rutênio do 1° ao 5°, e no 7°, 11° e 15° dias após a inoculação das células tumorais, respectivamente), em relação aos controles.

Muitos compostos de rutênio têm apresentado redução dos níveis séricos da LDH no tratamento de tumores sólidos em camundongo, porém, a liberação citoplasmática desta enzima na presença apenas dos complexos de rutênio permanece desconhecida.

Em geral, os metais são tóxicos e interferem em inúmeros processos metabólicos essenciais para o organismo. Eles podem intervir com a transcrição dos genes, expressão e ativação de numerosas proteínas que participam das vias de transdução incluindo receptores de fatores de crescimento, como a proteína-G, as tirosinas quinases, as proteínas MAPK, bomba de Na⁺/K, variações eletroquímicas na membrana plasmática, precipitação de proteínas, etc. Os efeitos são variados, podendo ser diretos ou indiretos ou envolver vias de ativação ou inativação (Leonard et al., 2004).

Em relação ao complexo de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl, as alterações metabólicas que este complexo pode causar ao animal normal ainda não foram esclarecidas.

A diminuição da LDH em animais tratados com o *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl indica que houve uma inibição da lesão muscular causada pela alta proliferação do sarcoma 180 neste tecido. E, embora ainda obscura a causa de altos níveis de LDH em animais normais, isto não impossibilita a utilização deste composto na quimioterapia do câncer, já que há o conhecimento do seqüestro do

Ru (III) para áreas de hipóxia tumoral (Barca et al., 1999) e o favorecimento da redução do Ru (III) para Ru (II) apenas nas células neoplásicas (Claire e Dyson, 2001).

A análise hematológica por meio da contagem de hemácea e hemoglobina (fig. 01) demonstraram números semelhantes aos controles com e sem tumor. Em relação à contagem de leucócitos, o decréscimo na quantidade destas células no sangue total dos animais normais indica que o complexo de rutênio pode estar causando a supressão destas células. Porém, em cultura de células mononucleares do sangue periférico humano, Silveira-Lacerda (2003) observou que em baixas concentrações do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl houve proliferação destas células e mesmo em concentrações relativamente altas, foi observado apenas a inibição da capacidade proliferativa, mas não quebra na molécula do DNA.

Sabe-se que os metais pesados podem causar imunomodulação dose-dependente devido a distúrbios no mecanismo de regulação da defesa celular. Dependendo do metal, da concentração, da viabilidade biológica e de outros fatores, a modulação pode ser por imunossupressão ou imunointensificação (Burns et al., 1995).

Distúrbios da produção de células da medula óssea já foram descritos para alguns agentes antineoplásicos derivados de metal pesado. A cisplatina apresenta mielotoxicidade moderada permitindo sua utilização com outros agentes quimioterápicos. Já a carboplatina, pela sua severa mielotoxicidade, é restrita no uso com outros agentes, mas é eficazmente aplicada no tratamento de pacientes com tumores malignos resistentes à cisplatina (Waud, 1995).

O ZD0473, um novo agente baseado em platina na fase II da triagem clínica, não causa nefro, neuro ou ototoxicidade como a cisplatina, porém seu uso é limitado por causar mielosupressão, particularmente, neutropenia (Douillard e Schiller, 2002).

O efeito mielosupressor para os antineoplásicos derivados da platina é bem conhecido, mas poucas informações são disponíveis para complexos de rutênio.

Segundo Depenbrock et al. (1997), o *trans*-indazolium [(tetraclorobisindazolrutenato (III))], tende a ser hematotóxico em concentrações $\geq 10\mu\text{g/mL}$ *in vitro*.

Em contraste, o NAMI-A, quando administrado subcutaneamente ou intraperitonealmente (35mg/kg), reduziu o volume tumoral do carcinoma mamário MCa, diminui a metástase pulmonar e promoveu um aumento de infiltrado leucocitário no tecido tumoral (Magnarin et al., 2000; Casarsa et al., 2004).

No caso do *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$, outros estudos devem ser realizados para um maior esclarecimento dos efeitos deste composto sobre as células brancas do sangue, por exemplo, o diferencial leucocitário dos animais experimentais.

Na análise histopatológica realizada no miosarcoma 180, notou-se a presença de infiltrado inflamatório nos tecidos tumorais dos animais tratados e controles (fig.05.6). Geralmente, a maioria dos tumores humanos possui infiltrado linfocitário quando estudados histologicamente, sendo composto principalmente por linfócitos T e macrófagos (Brocker et al., 1988).

Em todos os tumores dos camundongos tratados com *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ i.p. depois da inoculação das células S180, uma faixa de tecido de granulação era visualizada na periferia do tumor. O tecido de granulação foi originalmente descrito na reparação de ferimentos da pele, e se caracteriza pela proliferação de vasos que se dirigem à área lesada acompanhados de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e fibroblastos. À medida que os fagócitos lisam o tecido, os vasos vão se proliferando em direção a lesão, acompanhados pelos fibroblastos, que sintetizam as fibras de colágeno. Progressivamente a área lesada vai sendo substituída por uma cicatriz fibrosa, que pode cobrir toda a área lesada, ou forma uma cápsula tentando isolar o agente agressor do organismo (Brocker et al., 1988).

O tecido de granulação observado em torno do tumor pode, portanto, ser resultado da agressão às células tumorais

desencadeada pela redução do *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (III) para (II), já que foi observado apenas nos tumores dos animais que receberam tratamento com o composto de rutênio.

Para os grupos que receberam tratamento com *cis*-rutênio observou-se a presença de fibras musculares organizadas e desagregadas, porém íntegras, estruturas totalmente ausentes no controle sem tratamento. Embora houvesse menor infiltrado inflamatório, as áreas tumorais necróticas estavam bem acentuadas, com pouca ou nenhuma área de célula S180 viável ou em proliferação. Provavelmente, este efeito citotóxico foi causado pelo *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl (III), pois estes aspectos morfológicos foram observados exclusivamente nos animais tratados com *cis*-Ru.

Os dados bioquímicos e hematológicos correlacionados às análises histopatológicas, suportam a idéia que a melhor dose utilizada neste estudo para o tratamento do câncer é a de 10mg/kg de animal de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl em dias consecutivos, desde que não houve óbito neste grupo de animais, nem lesão tecidual normal e com redução significativa do volume tumoral, tornando esta droga promissora na terapêutica do câncer.

Uma consequência do tratamento antineoplásico, exemplificado pela cisplatina, é a alteração na estabilidade genômica (mutações gênicas) dos pacientes tratados. Vários outros metais podem produzir erros no sistema de informação gênica, como alterações na estrutura e no número dos cromossomos.

No presente trabalho, o teste de micronúcleo (MN) para o *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl, não demonstrou efeito genotóxico deste composto comparado à Ciclofosfamida® na mesma concentração (tabela 03).

Estudos demonstram que a cisplatina e a carboplatina são potentes indutores de MN, a partir de concentrações relativamente baixas (10 e 0,5µM, respectivamente). Este potencial genotóxico pode ser devido à redução química e/ou por razões estereoquímicas, ou seja, pela estrutura quadrado planar dos compostos de platina. Vale ressaltar que existem evidências que os compostos de Pt (IV)

são menos genotóxicos que as espécies de Pt (II) (Gebel et al., 1997).

A habilidade da cisplatina em promover mutagênese ao induzir dano do material gênico, parece envolver a formação de cross-links e subsequente processamento da dupla fita do DNA para fita simples, burlando o mecanismo de reparo, e formando inúmeros MN nos sistemas experimentais. No entanto, outros compostos de platina, como o [Pt (ESDT0(Py)Cl)] formam cross-links com a fita dupla de DNA semelhante a cisplatina, mas não formam cross-links com proteínas e o DNA, provavelmente, induzindo menos dano ao DNA (Marzano et al., 2004).

Os composto de rutênio usualmente são hexa-coordenados com geometria octaédrica, o oposto da estrutura quadrado planar da cisplatina e carboplatina. Em adição, os dois sítios de coordenação a mais do rutênio propicia a ligação de diferentes alvos intracelulares, além de interagir diferentemente em nível molecular com as estruturas alvos. Porém, devido à falta de estudos de mutagenicidade para compostos derivados de rutênio, este tipo de atividade ainda não é claro.

A produção de muitos metalofarmacêuticos de Ru (III) e Ru (II) envolve a capacidade dos mesmos em se ligar ao DNA e, conseqüentemente, aumentar o efeito antitumoral da droga.

O composto de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl ligou-se ao DNA e aumentou a mobilidade eletroforética das formas ccc (DNA circular covalentemente fechado) e oc (DNA circular aberto) do plasmídeo pUC18 (figura 09A).

Provavelmente, a interação *cis*-Ru-DNA resultou no encurtamento do comprimento de ambas as formas do pUC18 (oc e ccc) induzido pelo centro de Ru (III), justificando o aumento da mobilidade eletroforética de ambos.

Também foi observada a clivagem do DNA plasmideal, quando se incubou o *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl na presença de ácido ascórbico (figura 09B). Estes resultados sugerem que as formas oc e ccc do

DNA foram clivadas como consequência da interação de espécies reativas de Ru (II), formadas a partir da redução de Ru (III) pelo ascorbato, com o DNA. Ainda, o fato de nenhum fragmento de DNA ser detectado em r_1 (razão molar de Ru por nucleotídeo) acima de 0,50 (dados não apresentados), sugere que o composto de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl apresenta um alto potencial de reatividade com o DNA.

O mecanismo de clivagem do DNA induzido pelo *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl pode ser explicado pela clivagem hidrolítica das ligações fosfodiéster, por meio de um mecanismo oxidativo local, com formação de radicais livres que vão promover um ataque nos anéis das bases nitrogenadas como também a clivagem das ligações N-glicosídicas (Grguric-Sipka et al., 2003).

A clivagem randômica do DNA plasmideal suporta a idéia que o complexo *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl pode atuar como pró-droga que será transformada *in vivo* em espécies reativas de Ru (II).

Parece que o mecanismo da teoria de “ativação por redução” pode ser aplicado neste caso: os complexos de Ru (III) podem ser considerados como pró-drogas que seriam ativadas por redução gerando espécies reativas de Ru (II). Em tumores sólidos com hipóxia, a reoxidação do rutênio +2 para +3 seria improvável. Este fato poderia induzir um acúmulo de espécies reativas de Ru (II) dentro dos tecidos tumorais, promovendo a citotoxicidade destas moléculas seletivamente contra tumores e não para tecidos normais.

Segundo Clarke (2003), existem evidências que o NAMI seja ativado por redução, além de uma série de outros compostos antineoplásicos derivados de rutênio.

Os complexos de platina (II) também são conhecidos por alterar a mobilidade eletroforética das formas oc e ccc de DNA plasmideal, formando espécies multiméricas, indicando que estas mudanças ocorrem diretamente da interação de metal-DNA permitindo o bloqueio da divisão celular (Gallori et al., 2000).

Baseado nos dados experimentais obtidos, sugere-se que o DNA seja um possível alvo para a atividade antitumoral do complexo *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl e que, similarmente a cisplatina, a ação citotóxica pode ser consequência direta da ligação e dano ao DNA.

O mecanismo da teoria de “ativação por redução” também pode ser sugerido para explicar a atividade bacteriolítica do composto de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (fig. 08 A e B, respectivamente).

Dados da literatura de compostos de rutênio com atividade bacteriolítica citam a teoria de quelação de Tweedy, onde a quelação poderia facilitar a habilidade do complexo de rutênio atravessar a membrana celular bacteriana. A quelação reduz consideravelmente a polaridade do íon metálico central, dividindo a carga positiva com o grupo doador e, possivelmente, deslocando os elétrons π , situados sobre o quelato. Possivelmente, o caráter lipofílico do quelato favoreceria a permeabilidade destes complexos de rutênio através da camada lipídica das bactérias (Venkatachalam e Ramesh, 2004).

Mecanismos de ação similares são esperados para o *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl, no entanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados para o melhor entendimento da sua atividade bactericida.

Neste trabalho, o conjunto de resultados abre perspectivas para novas investigações sobre o complexo de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl como uma droga promissora para o tratamento do câncer e para outras moléstias. Porém, outros experimentos, [tais como: a farmacodinâmica em animais, por ex.; testar a especificidade da droga em diferentes tumores (benignos e malignos), utilizar mais de uma espécie animal, a farmacocinética em animais (analisar a melhor via de administração da droga e o veículo mais adequado, estudar mais amplamente o mecanismo de ação da droga), a toxicidade (subaguda e crônica) e a teratogênese e embriotoxicidade, seguindo as normas previstas] devem ser realizados para uma perfeita avaliação da droga candidata antes de iniciar a sua triagem clínica.

V - CONCLUSÕES

1. O complexo de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl possui atividade antitumoral sobre a linhagem tumoral Sarcoma 180 de camundongos *in vivo* e *in vitro*;
2. O valor encontrado da DL₅₀, de 99,76mg/kg de animal, é relativamente alta comparada às DL₅₀ observadas para outros quimioterápicos derivados de metal.
3. De acordo com as análises bioquímica e hematológica do sangue dos animais correlacionadas a histopatologia dos órgãos, o complexo de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl não provocou efeito toxicológico grave.
4. O composto *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl não foi genotóxico para células da medula óssea de camundongos;
5. O complexo de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl apresentou atividade bactericida sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
6. O complexo de *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl demonstrou interagir com o DNA plasmideal pUC18.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKHTIAR, R. e OCHIAI, E.-I. Pharmacological applications of inorganic complexes. **General Pharmacology**, v.32, p.525-540, 1999.
- BARCA, A.; PANI, B.; TAMARO, M. e RUSSO, E. Molecular interactions of ruthenium complexes in isolated mammalian nuclei and cytotoxicity on V79 cells in culture. **Mutations Research**, v.423, p.171-181. 1999.
- BERG, T.; VANDERSTEEN, A.M. e JANDA, K.D. High-throughout synthesis and direct screening for the discovery of novel hydrolytic metal complexes. **Biorg. Med. Chem. Lett**, v.8, p.1221-1224, 1998.
- BERGAMO, A.; GAGLIARDI, R.S.; CARCIA, V.; FURLANI, A.; ALESSIO, E; MESTRONI, G. e SAVA, G. In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors, and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.289, n.1, p.559-564, 1999.
- BOGGS, S.E.; CLARKE, R.E e FORD, P.C. Synthesis of cis- and trans-tetraamminedichlororuthenium (III) chloride. **Inorganica Chimica Acta**, v.247, p.129-130, 1996.
- BROCKER, E. B.; ZWADLO,G.; HOLZMANN, B.; MACHER, E. e SORG,C.: Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression. **International Journal of Cancer**, v. 41, p. 562-567, 1988.
- BUCHI, D.F. **Efeitos do medicamento homeopático método Canova em camundongos normais e portadores de tumor Sarcoma** 180. Curitiba, 51p., 2002.

<http://www.canovadobrasil.com.br/areamedica/.vportuguesdorly-sarcoma>. Acessado em dezembro de 2004.

BURNS, L.A.; MEADE, B.J. e MUNSON, A.E. Toxic responses of the immune system. In: Klaassen, C.D. (Ed.), Cassaret and Doull's, **Toxicology: The Basic Science of Poisons**. McGraw-Hill, New York, pp. 355-402, 1995.

CABRERA, E.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; GAMBINO, D.; NOBLIA, P.; OTERO, L.; PARAJÓN-COSTA, B.; ANZELLOTTI, A., SÁNCHEZ-DELGADO, R.; AZQUETA, A., CERÁTIN, A.L. e MONGE, A. Ruthenium(II) nitrofurylsemicarbazone complexes: new DNA binding agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.39, p.377-382, 2004.

CALAMAI, P.; CAROTTI, S.; GUERRI, A.; MAZZEI, T.; MESSORI, L.; MININ, E.; ORIOLI, P. e SPERONI, G.-P. Cytotoxic effects of gold (III) complexes on establish human tumor cell lines sensitive and resistant to cisplatin. **Anti-Cancer Drug Des**, v.13, p.67-80, 1998.

CASARSA, C.; MISCHIS, M.T. and SAVA, G. TGF β ₁ regulation and collagen- release-independent connective tissue re-modelling by the ruthenium complex NAMI-A in solid tumours. **Journal of Inorganic Biochemistry**, in press, 2004.

CAUCI, S.; ALESSIO, E., MESTRONI, G. e QUADRIFOGLIO, F. Reaction of *cis*-Ru^{II}(DMSO)₄Cl₂ with DNA and with some of its bases in aqueous solution. **Inorganica Chimica Acta**, v.137, p.19, 1987.

CLAIRE, S. e DYSON, P.J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Rev.**, v.45, n.2, p. 62-69, 2001.

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

DEPENBROCK, H.; SCHMELCHER, S.; PETER, R.; KEPPLER, B.K.; WEIRICH, G.; BLOCK, T.; RASTETTER, J. e HANAUSKE, A.R. Preclinical Activity of *Trans*-indazolium [Tetrachlorobisindazoliruthenate(III)] (NSC 666158; IndCR; KP1019) against tumour colony-forming units and haematopoietic progenitor cells. **European Journal of Cancer**, v.33, n.14, p.2404-2410, 1997.

DIFFLEY, J.F.X. and EVAN, G. Oncogenes and cell proliferation. Cell cycle, genome integrity and cancer- a millennial view. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.10, p.13-16, 1999.

DOUILLARD, J-Y. e SCHILLER, J. ZD0473 combined with other chemotherapeutic agents for the treatment of solid malignancies. **European Journal of Cancer**, v.38, p.26-31, 2002.

EL-DEIRY, W.S. Role of oncogenes in resistance and killing by cancer therapeutic agents. **Currents Operational Oncology**; Philadelphia, v.9, p.59-62, 1997.

FARELL, N. **Transition metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1ed, 194p., 1989.

FERGUSON, L.R. e PEARSON, A.E. The clinical use of mutagenic anticancer drugs. **Mutation Research**, v. 355, p. 1-12, 1996.

FRASCA, R.D.; GEHRIG, L.E. e CLARKE, M.J. Cellular effects of transferrin coordinated to $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ and *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{C}$. **J. Inorg. Biochemistry**, v.83, p.139-149, 2001.

GAFFEY, M.J.; FRIERSON, H.F.; MILLS, S.E.; BOYD, J.C.; ZARBO, R.J.; SIMPSON, J.F. e WEISS, L.M. Medullary carcinoma of the breast: Identification of lymphocyte population and their significance. **Model Pathology**, v.6, p.721-728, 1993.

GALLORI, E.; VETTORI, C.; ALESSIO, E.; VILCHEZ, F.G.; VILAPLANA, R.; ORIOLI, P.; CASINI, A. e MESSORI, L. DNA as a possible target for antitumor ruthenium (III) complexes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.1, n.376(1), p.156-162, 2000.

GEBEL, T.; HEIKO, L.; PLEBBOW, K. e DUNKELBERG, H. Genotoxicity of platinum and palladium compounds in human and bacterial cells. **Mutation Research**, v.389, p.183-190, 1997.

GIRI, A.; KHYNRIAM, D. e PRASAD, S.B. Vitamin C mediated protection on cisplatin induced mutagenecity in mice. **Mutation Research**, v.42, p.139-148, 1998.

GLEU, K. & BREUEL, W. Z. **Anorg. Allgem. Chem.**, v.235, p.201, 1938.

GOODMAN, A. e GILMAN, A. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, Joel G. Hardman, Lee E. Limbird (Editor), Alfred Goodman Gilman (editor), 10ed., 2148p., 2002.

GRGURIC-SIPKA, S.R.; VILAPLANA, R.A.; PÉREZ, J.M.; FUERTES, M.A.; ALONSO, C.; ALVAREZ, Y.; SABO, T.J. e GONZÁLEZ-VÍLCHEZ, F. Synthesis, characterization, interaction with DNA and cytotoxicity of the new potential antitumor drug *cis*-K[Ru(eddp)Cl₂]. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.97, p.215-220, 2003.

- HARDMAN, J.G. e LIMBIRD, L.E. (Eds). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 9ed., 1436p., McGraw-Hill, New York. 1996.
- HUXHAM, L.A.; CHEU, E.L.S.; PATRICK, B.O. e JAMES, B.R. The synthese, structural characterization, and in vitro anti-cancer activity of chloro(p-cymene) complexes of ruthenium(II) containing a disulfoxide ligand. **Inorganica Chimica Acta**, v.352, p.238-246, 2003.
- INCA, 2002.<http://www.inca.gov.br/cancer/epidemiologia/estimativa> 2002. Acessado em novembro de 2004.
- JEMAL, A.; TIWARI, R.C. e MURRAY, T. Cancers Statistics. **CA Cancer J.Clin**, v.54, p.8-29. 2004.
- KARVEMBU, R. e NATARAJAN, K. Synthetic catalytic and biological studies of new binuclear ruthenium(II) complexes containing thiobis (β -diketones) and triphenylphosphine. **Polyhedron**, v.21, p.1721-1727, 2002.
- KATSAROS, N. e ANAGNOSTOPOULOU, A. Rhodium and its compouns as potential agents in cancer treatment. **Oncology Hematology**, v.42, p.297-308, 2002.
- KHYNRIAM, D. e PRASAD, S.B. Cisplatin-induced genotoxic effects and endogenous glutathione levels in mice bearing ascites Dalton's lymphoma. **Mutation Research**, v.526, p.9-18, 2003.
- KUMAR, K.N. e RAMESH, R. Synthesis, characterization, redox property and biological activity of Ru(II) carbonyl complexes containing O, N-donor ligands and heterocyclic bases. **Spectrochimica Acta Part**, v.60, p.2913-2918, 2004.

KÜNG, A.; PIEPER, T. e KEPPLER, B.K. Investigations into the interaction between tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and nucleotides by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v.759, p.81-89, 2001.

LEMES, G.D.F. Utilização de complexos de rutênio (II/III) como bactericidas. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal Uberlândia/MG, Instituto de Química, 53p., 2004.

LIPPARD, S.J. e PIL, P. **Encyclopedia of cancer, cis-platina and related drugs**. San Diego, California: Academic Press, 1ed., 392p., 1997.

LEONARD, S.S.; HARRIS, K. e SHI, X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. **Free Radical Biology & Medicine**, v.37, n.12, p.1921-1942, 2004.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D. e DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**, New York, W.H. Freeman and company, 4ed., 1084p., 2000.

LOKICH, J. and ANDERSON, N. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. **Ann Oncol**, v.9, p.13-21, 1998.

MAGNARIN, M.; BERGAMO, A.; CAROTENUTO, M.E.; ZORZET, S. e SAVA, G. Increase of tumour infiltrating lymphocytes in mice treated with antimetastatic doses of NAMI-A. **Anticancer Res.**, v.20, p.2939-2944, 2000.

MARZANO, C.; BETTIO, F.; BACCICHETTI, F.; TREVISAN, A.; GIOVAGNINI, L. e FREGONA, D. Antitumor activity of new platinum(II) complex with low nephrotoxicity and genotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v.148, p.37-48, 2004.

- MELÉNDEZ, E. Titanium complexes in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v.42, p.309-315, 2002.
- MESTRONI, G.; ALESSIO, E. e CALLIGARIS, M. Rhodium (III) analogues of antitumour-active ruthenium (III) compounds: the crystal structure of [ImH] [*trans*- RhCl₄ (Im)₂](Im = imidazole). **Inorganica Chimica Acta**, v.273, p.62-71, 1989.
- MORINAGA, Y.; SUGA, Y.; EHARA, S.; HARADA, K., NIHEI, Y. e SUZUKI, M. Combination effect of AG-7700, a novel combretastatin A-4 derivative, and cisplatin against murine and human tumors *in vivo*. **Cancer Science**, v.94, n.2, p.200-204, 2002.
- MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica: técnica laboratorial**. Porto Alegre, ed.Médica Missau, 2.ed., 356p., 1989.
- NOVÁKOVÁ, O.; KASPARKOVA, J.; VRANA, O. et al. Correlation between cytotoxicity and DNA-binding of polypyridyl ruthenium complexes. **Biochemistry**, v.34, n.38, p.12369-78, 1995.
- PACOR, S.; SAVA, G.; MESTRONI, G. e ALESSIO, E. Tumor inhibition and effects on host survival time by ruthenium(III) and rhodium(III) complexes with dimethylsulphoxide ligands. **Pharmacological Research**, v.25, p.73-74, 1992.
- PATRA, M.; BHOWMIK, N.; BANDOPADHYAY, B. e SHARMA, A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v.52. p.199-223, 2004.
- PAVANIN, L.A. Estudo das cis-Tetraaminas de rutênio (III) com ligantes heterocíclicos nitrogenados aromáticos. **Tese de Doutorado**, USP-RP, Faculdade de Farmácia, São Paulo, 1989.

PEREIRA, F.E.L. Degenerações. Morte celular. Alterações do Interstício. In: **Patologia Geral** (Filho, G.B., org.), Belo Horizonte: Ed.Guanabara Koogan, 3ed., p.44-82, 2003.

RUDIN, C.M. e THOMPSON, C.B. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. **Annu. Rev. Med.**, v.48, p.81-267, 1997.

SAVA, G.; BERGAMO, A.; ZORZET, S.; GAVA, B.; CASARSA, C.; COCCHIETTO, M.; FURLANI, A.; SCARCIA, V.; SERLI, B.; IENGO, E.; ALESSIO, E. e MESTRONI, G. Influence of chemical stability on the activity of the antimetastasis ruthenium compound NAMI-A. **European Journal of Cancer**, v.38, p.427-435, 2002.

SAVA, G.; ZORZET, S.; GIRALDI, T. et al. Antineoplastic activity and toxicity of an organometallic complex of ruthenium (II) in comparison with *cis*-PDD in mice bearing solid malignant neoplasms. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, v.20, n.6, p.841-847, 1984.

SCHMID, W. The micronucleous test. **Mutation Research**, v.41, p.293-299, 1975.

SHARMA, A. e TALUKDER, G. Effects of metals on chromosome of higher organisms. **Environ. Mutagen.** v.9, p.191-226, 1987.

SILVEIRA-LACERDA, E.P. Atividade Citotóxica do Composto de Rutênio *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl em células neoplásicas. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Uberlândia/MG, Instituto de Genética e Bioquímica, 72p., 2003.

SMCTA, 2004. <http://www.smcta.org.br>. Acessado em junho de 2004.

SRIVASTAVA, S.C.; RICHARDS, P.; MEINKEN, S.M.; LARSON, Z. e GRUNBAUM, R.P. Spencer (Ed.), **Radiopharmaceuticals**, Grune & Stratton, Inc, New York, 207p., 1981.

VAN VLIET, P.M.; SARINTEN, M.S.; TOEKIMIN, S.M.S. et al. mer-[Ru(terpy)Cl₃](terpy = 2,2': 6', 2' - terpyridine) shows biological activity, forms interstrand cross-links in DNA and binds two guanine derivates in a trans configuration. **Inorganica Chimica Acta**, v.231, n.7, p.311-318, 1995.

VENKATACHALAM, G. e RAMESH, R. Catalytic and biological activities of Ru(III) mixed ligands complexes containing N, O donor of 2-hydroxy-a-naphthylideneimines. **Spectrochimica Acta Part**, in press, 2004.

WAUD, W.R. Platinum Complexes. In: **Cancer Chemotherapeutic Agents** (Foye, W. O., ed.), Massachusetts College of Pharmacy and Allied Health Sciences, Ed, ACS Professional Reference Book, 1ed., p.121-133, 1995.

WU, A.; KENNEDY, D.C.; PATRICK, B.O. e JAMES, B.R. Ruthenium(II)acetylacetonato-sulfoxide complexes. **Inorganic Chemistry Communications**, v.6, p.996-1000, 2003.

ZHANG, C.X. e LIPPARD, S.J. New metal complexes as potential therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.7, p.481-489, 2003.