



Ministério da Educação

Universidade Federal de Goiás

Faculdade de Farmácia

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Mestrado**



FRANCYELLI MARIANA DOS SANTOS MELLO

**Estudo da atividade citotóxica, antitumoral e determinação do perfil tóxico de
complexos de rutênio(II)/aminoácidos em células do tumor de Ehrlich *in vitro* e
*in vivo***

Goiânia

2014

FRANCYELLI MARIANA DOS SANTOS MELLO

**Estudo da atividade citotóxica, antitumoral e determinação do perfil
toxicológico de complexos de rutênio(II)/aminoácidos em células do tumor de
Ehrlich *in vitro* e *in vivo***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade
Federal de Goiás para defesa do
mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Elisângela de
Paula Silveira Lacerda

Goiânia

2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

M527e Mello, Francielli Mariana dos Santos.
Estudo da atividade citotóxica, antitumoral e determinação do perfil tóxico de complexos de rutênio(II)/aminoácidos em células do tumor de Ehrlich *in vitro* e *in vivo* [manuscrito] / Francielli Mariana dos Santos Mello. - 2014.
xv, 96 f. : figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisângela de Paula Silveira Lacerda;
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2014.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.
Anexos.
1. Câncer – Tratamento 2. Atividade antitumoral – Complexo de rutênio 3. Complexo de rutênio – Efeitos citotóxico 4. Genotoxicidade I. Título.

CDU: 616.24-006.6

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Farmácia

Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: FRANCYELLI MARIANA DOS SANTOS MELLO

Orientadora: Profa. Dra. ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA LACERDA

MEMBROS:

- 1. Profa. Dra. Alane Pereira Cortez**
- 2. Prof. Dr. Ricardo Neves Marreto**
- 3. Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda**

ou

- 4. Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis**
- 5. Dr. Hugo Delleon da Silva**

Goiânia, 13 de março de 2014.

Dedico a minha avó, pelo amor incondicional, dedicação e exemplo de pessoa e mulher guerreira. A minha mãe por toda dedicação, amor, apoio, confiança e pelo seu exemplo de luta e recomeço. A minha tia que sempre me apoiou e incentivou sem medir esforços, pelo carinho, amor e confiança. Ao meu pai pelo apoio, incentivo e amor. Ao meu irmão e primos queridos pela confiança e encorajamento. Ao meu amado noivo pelo amor, apoio, paciência e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, tenho que agradecer a Deus por toda graça, honra e oportunidades a mim concedidas.

À Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda por me aceitar como sua aluna no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética desde a graduação, por ter acreditado que era capaz de realizar este trabalho, por me conduzir na minha formação e crescimento acadêmico, por sua compreensão, amizade e lado humano, pelo exemplo de profissional, mulher, esposa e mãe.

Aos professores colaboradores que tornaram a realização deste trabalho possível, Prof. Dr. Alzir Batista Azevedo por fornecer os compostos para estudo, Prof. Dr. Vicente Raul Chavarria pela realização dos exames hematológicos e bioquímicos.

Ao Prof. Andris Figueiroa Bakuzis pela grande oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa em Hipertermia magnética para o tratamento do câncer em parceria com a Profa. Dra. Elisângela, pela confiança, pela contribuição na minha formação acadêmica, pelo seu exemplo de pesquisador.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Sônia, Hugo, Plínio, Aliny, Flávia, Wanessa, Wanderson, Lorena, Raquel, Kézia, Thallita e Rafael, aqueles que estão afastados ou concluíram suas pesquisas, Adriana, Alessandra, Carlos, Cesar, Paula e Simone.

Em especial a Wanessa minha amiga e colega de trabalho que estivemos juntas desde o começo desta trajetória e temos crescido e aprendido juntas, por sempre buscar os camundongos comigo, e me ajudar a carregar o saco de ração de 20 kg, ao Wanderson, meu amigo, que me ajudou em todas as etapas deste desafio, a Aliny que muito contribuiu para minha formação acadêmica, a Lorena, Flávia, Raquel e, agora, Sônia, minhas caroneiras oficiais.

Aos recentes colegas de trabalho em “Spartacus”, Andersão, Carrião, Gustavo, Milton, Nicholas, em especial ao Harley, pelas horas infinitas de trabalho que embora cansativas, sempre, foram agradáveis, aos colegas do Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese, em especial ao Jefferson e Carol.

À minha família pelo apoio, incentivo, amor, palavras de consolo e carinho nos momentos difíceis, por compreenderem minha ausência e por todo esforço para me manter na minha jornada.

Ao meu noivo que sempre compreendeu os finais de semana no laboratório, ou os finais de semana no computador ou os congressos em outra cidade, pelo seu amor, carinho, companheirismo e por acreditar no meu sonho, me incentivar e apoiar.

Aos meus amigos Ariane, Felipe, Josiane, Lorena, Márcio, Maryelle, Rodrigo e Wanessa Prado por caminharem comigo, alguns desde o ensino fundamental, outros desde o ensino médio e outros desde a graduação, por me proporcionarem momentos de alegria, descontração, culturais e momentos gastronômicos deliciosos, por me incentivar e não deixar-me desaminar, sempre me lembrando que Deus está no comando e que “no fim tudo dá certo, e se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim”.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, aos professores do Programa que me guiaram na busca do conhecimento, ampliando minha visão além da minha formação em Biologia, a Fernanda secretária da Pós, pela paciência e atenção, que sempre se mostrou prestativa e esclarecendo as dúvidas de imediato.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás.

Aos colegas funcionários do Instituto de Ciências Biológicas, Celso, Fernando, Gleizilene, Rafael, Samerson, Tizuco, Verônica, Zé Flávio, pela amizade e incentivo desde a graduação; a Vaneide e Selma por manterem nossa segurança no Instituto de Ciências Biológicas 1, simpatia e amizade e a Luciana por manter o laboratório e o Instituto de Ciências Biológicas 1 limpos e pela simpatia.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram na minha formação pessoal e acadêmica e ajudaram na realização desta pesquisa.

“...então você entenderá o que é temer o Senhor e achará o conhecimento de Deus. Pois o Senhor é quem dá sabedoria; de sua boca procedem o conhecimento e o discernimento. Ele reserva a sensatez para o justo; como um escudo protege quem anda com integridade, pois guarda a vereda do justo e protege o caminho de seus fiéis. Então você entenderá o que é justo, direito e certo e aprenderá os caminhos do bem. Pois a sabedoria entrará em seu coração, e o conhecimento será agradável à sua alma. O bom senso o guardará e o discernimento o protegerá.”

Provérbios 2: 5-11.

Resumo

Complexos de rutênio representam uma nova alternativa de quimioterápicos para o tratamento do câncer, com atividade em vários tipos de tumores, inclusive os resistentes a cisplatina, baixa toxicidade e seletividade para as células tumorais. Novos complexos de rutênio(II)/aminoácido (RuAA) foram testados contra células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE), um carcinoma de mama murino, *in vitro* e *in vivo*. A concentração que inibe 50% o crescimento celular (IC_{50}) foi determinada pelo teste de MTT para as células de TAE e L929, fibroblasto murino. Com base nos valores de IC_{50} foi determinado o potencial seletivo dos complexos de RuAA e selecionados dois complexos de RuAA, denominados RuMet e RuTrp, mais promissores e a DL_{50} (dose letal mediana) foi estimada *in vitro*. O perfil tóxico dos complexos RuMet e RuTrp foi determinado pela toxicidade oral aguda pelo método de classe, *screening* hipocrático e a determinação do potencial genotóxico foi avaliada pelo ensaio cometa. A eficácia antitumoral dos complexos RuMet e RuTrp foi estabelecida pelo percentual de inibição do crescimento tumoral e o aumento da sobrevida *in vivo* após 24 h de inoculação do TAE. Camundongos Swiss foram tratados nas doses de 2 e 6 mg/Kg/dia, via intraperitoneal por 7 dias. *Screening* hipocrático, avaliação da viabilidade das células do TAE após tratamento, avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos também foram realizados. Os complexos de RuAA foram citotóxicos para as células do TAE *in vitro* com valor de IC_{50} variando de 8,70 a 90,41 μ M. Os complexos de RuMet e RuTrp apresentaram potencial seletivo para as células do TAE. A estimativa *in vitro* de DL_{50} para os complexos RuMet e RuTrp foram superiores a 1000 mg/Kg, e *in vivo* estes complexos apresentaram baixa toxicidade e genotoxicidade. Os complexos RuMet e RuTrp apresentaram atividade antitumoral moderada a elevada em relação ao grupo veículo, com aumento do tempo médio de sobrevida (de 23,6 a 27,4 dias) e aumento percentual de sobrevida (de 31 a 52%). Os complexos RuMet e RuTrp aumentaram o percentual de células de TAE mortas por apoptose. Não foram observados sinais de toxicidade ou alteração no comportamento dos animais. Parâmetros hematológicos apresentaram alteração na contagem de plaquetas nas doses de 6 mg/Kg/dia dos complexos de RuMet e RuTrp. A dosagem de lactato desidrogenase apresentou alteração na avaliação bioquímica. Os complexos de RuMet e RuTrp são eficientes, seletivos e potentes para células do tumor ascítico de Ehrlich apresentando citotoxicidade *in vitro* e atividade antitumoral *in vivo*, com aumento do tempo de sobrevida, com baixa toxicidade e genotoxicidade.

Palavras-Chave: complexo de rutênio (II); tumor de Ehrlich; citotoxicidade; genotoxicidade; atividade antitumoral.

Abstract

Ruthenium complexes represent a new alternative anticancer chemotherapeutics, with activity against several types of cancer, including those resistant to cisplatin, low toxicity and selectivity for tumor cells. The new amino acids/ruthenium(II) complexes (RuAA) were tested against Ehrlich ascitic tumor (TAE) cells, murino mammary carcinoma, *in vitro* and *in vivo*. The concentration that inhibits 50% of cell viability (IC_{50}) was determined by MTT assay to TAE and L929 cells. Based on the values of IC_{50} value was determined selective potential of RuAA and selected two complexes most promising, estimated the LD_{50} (median lethal dose). The toxicological profile of RuMet and RuTrp was determined by acute oral toxicity following the class method, hippocratic screening, and determination of the genotoxic potential evaluated by the comet assay. The effectiveness of the antitumor potential of RuMet and RuTrp was established by the percentage of inhibition of tumor growth and increased survival *in vivo* after 24 hours of inoculation of TAE. Swiss mice were treated at doses of 2 and 6 mg/kg/day v.ip for 7 days. Hippocratic screening, assessment the viability of TAE cells after treatment, and hematological and biochemical parameters also were performed. Complexes RuAA are cytotoxic to TAE cells *in vitro* with IC_{50} value ranging from 8.70 to 90.41 μ M. RuMet and RuTrp complexes showed selective and potent for tumor cells. The estimated *in vitro* LD_{50} for RuMet and RuTrp were higher than 1000 mg/kg, and *in vivo* these complexes have low toxicity and genotoxicity. RuMet and RuTrp complexes showed moderate to high antitumor activity compared to the vehicle group, with increased median survival time (from 23.6 to 27.4 days) and percentage increase in survival (from 31 to 52%). RuMet and RuTrp increased the percentage of cells killed by apoptosis initial. There were no signs of toxicity or changes in the behavior of animals. Hematological parameters showed alterations in platelet count at doses of 6 mg/kg/day complexes of RuMet and RuTrp. The dosage of lactate dehydrogenase showed a change in the assessment of biochemical parameters. Complexes of RuMet and RuTrp are efficient, selective and potent for ascitic tumor cells presenting *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* antitumor activity, with increased survival time, with low toxicity and genotoxicity.

Keywords: complex of ruthenium (II); Ehrlich tumor; cytotoxicity; genotoxicity; antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Características das células cancerosas.....	24
Figura 2-	Principais complexos de platina utilizados na quimioterapia antitumoral.	31
Figura 3-	Estrutura química de complexos de rutênio(III) em fase clínica de estudo.	33
Figura 4-	Delineamento experimental para avaliação do potencial antitumoral de complexos de rutênio(II)/aminoácido em células do tumor ascítico de Ehrlich transplantadas em camundongos <i>Swiss</i> , machos, tratados por 7 dias consecutivos, via intraperitoneal.....	43
Figura 5-	Mensuração da circunferência abdominal de camundongos.....	45
Figura 6-	Gráfico representativo de densidade de tamanho (FSC) <i>versus</i> granulocidade (SSC) obtido após seleção da população de interesse por citometria de fluxo.	46
Figura 7-	Gráfico representativo bidimensional de densidade de FL1/Anexina V/FITC <i>versus</i> FL2/PI utilizado para quantificar o percentual de células viáveis, apoptóticas e necróticas.....	47
Figura 8-	Delineamento experimental para avaliar sobrevivência de camundongos <i>Swiss</i> tratados com os complexos de RuMet e RuTrp em diferentes doses (2 mg/Kg/dia e 6 mg/Kg/dia) via intraperitoneal, por 7 dias consecutivos.	49
Figura 9-	Aspecto dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos após diluição....	51
Figura 10-	Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácido na variação do peso corporal de camundongos <i>Swiss</i> fêmeas após tratamento v.o. pelo teste de toxicidade oral aguda.....	53
Figura 11-	Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácido na circunferência abdominal de camundongos <i>Swiss</i> machos, após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.....	56
Figura 12-	Comparação da atividade antitumoral dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos pela variação da circunferência abdominal e pela variação do peso corporal	58
Figura 13-	Efeitos dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos no tipo de morte das células do TAE retiradas da cavidade intraperitoneal de camundongos <i>Swiss</i> após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.....	60

Figura 14-	Efeitos dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos no perfil de viabilidade e morte das células do TAE retiradas da cavidade intraperitoneal de camundongos Swiss após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.....	61
Figura 15-	Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos na sobrevivência animal mostrado pela curva de Kaplan Meier.....	66
Figura 16-	Hipótese de captação dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos por células tumorais.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Complexos de rutênio(II)/aminoácidos.....	37
Tabela 2.	Grupos de tratamento para realização do ensaio cometa.....	42
Tabela 3-	Grupos de tratamento para avaliação antitumoral.....	44
Tabela 4-	Valores de IC ₅₀ de complexos de rutênio(II)/aminoácidos obtidos após 48 horas de exposição das células não tumoral (L929) e tumoral (células do TAE) em diferentes concentrações (0,2 a 200 µM) pelo teste de MTT.....	50
Tabela 5-	Estimativa da DL ₅₀ <i>in vivo</i> de complexos de rutênio(II)/aminoácidos a partir de valores de IC ₅₀ obtidos após 48 horas de exposição das células não tumoral (L929) pelo teste de MTT.....	51
Tabela 6-	Efeitos dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos após administração v.o. em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas seguindo o <i>Guideline</i> 423 da OECD.....	52
Tabela 7-	Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácido no índice do peso relativo dos órgãos de camundongos <i>Swiss</i> fêmeas após tratamento v.o. pelo teste de toxicidade oral aguda.....	53
Tabela 8-	Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácido no DNA das células do sangue periférico de camundongos <i>Swiss</i> machos e fêmeas após 24 e 48 horas de exposição v.ip. pelo teste Cometa.....	54
Tabela 9-	Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácido na inibição do crescimento tumoral, pela variação da circunferência abdominal, de células do TAE inoculadas em camundongos <i>Swiss</i> machos, após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.....	55
Tabela 10-	Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácido na inibição do crescimento tumoral, pela variação do peso corporal, de células do TAE inoculadas em camundongos <i>Swiss</i> machos, após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.....	57
Tabela 11-	Efeitos dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos na viabilidade das células do TAE retiradas da cavidade intraperitoneal de camundongos <i>Swiss</i> após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.....	59

Tabela 12-	Efeitos dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos no tipo de morte das células do TAE retiradas da cavidade intraperitoneal de camundongos <i>Swiss</i> após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.....	63
Tabela 13-	Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos nos parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swiss</i> após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.....	64
Tabela 14-	Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos nos parâmetros bioquímicos de camundongos <i>Swiss</i> após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.....	65
Tabela 15-	Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácido no índice do peso relativo dos órgãos de camundongos <i>Swiss</i> machos após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.....	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMP: Adenosina monofosfato
AMPK: Proteína quinase dependente de adenosina monofosfato
ALT: Alanina aminotransferase
ANOVA: Análise de variância
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC: *American Type Culture Collection*
ATP: Adenosina trifosfato
ASCT: Sistema transportador do tipo ASC
AST: Aspartato aminotransferase
A549: Linhagem celular de carcinoma de pulmão humano
A-20: Linhagem celular de linfoma murino
B16F10: Linhagem celular de melanoma metastático murino
CTRu(III): Complexo *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl
DHL: Lactato desidrogenase
DL₅₀: Dose letal mediana
DMEM: Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO: dimetil sulfóxico
DNA: ácido desoxirribonucleico
DU-145: Linhagem celular de câncer de próstata humano
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
FDA: *Food and Drugs Administration*
FITC: Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
FSC: Parâmetro de densidade de tamanho celular
GHS: *Globally Harmonized Classification System*
HeLa: Linhagem celular de carcinoma cervical humano
IARC: Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IC₅₀: concentração que inibe 50% o crescimento celular
ID: Índice de dano ao DNA
INCA: Instituto Nacional do Câncer
IS: Índice de seletividade

Jurkat: Linhagem celular de leucemia aguda humana
KP1019: Indazol *trans*-[tetraclorobis (1*H*-indazol)rutenato(III)]
K562: Linhagem celular de leucemia mielóide crônica humana
LAT: Transportador de aminoácidos neutros do tipo-L
LGMC: Laboratório de Genética Molecular e Citogenética
L929: Linhagem celular de fibroblasto de pulmão murino
MCF-7: Linhagem celular de câncer de mama humano
MCV: Volume corpuscular médio
MCH: Hemoglobina corpuscular média
MCHC: Concentração de hemoglobina corpuscular média
MDA-MB-231: Linhagem celular de carcinoma de mama humano
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade
MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium
mTOR: serina/treonina quinase alvo da rapamicina
MRC-5: Linhagem celular de fibroblasto de pulmão murino
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NAMI-A: imidazol [*trans*-RuCl₄(1*H*-imidazol)(DMSO)]
OECD: *Organization for Economic Cooperation and Development*
OMS: Organização Mundial da Saúde
PBMC: Células mononucleares do sangue periférico
PBS: Solução salina de tampão fostato
pH: Potencial hidrogênico
PI: Iodeto de propídeo
RAPTA-C: [Ru(η^6 -p-cymene)Cl₂PTA)] (PTA=1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane)
RuAla: Complexo de rutênio(II) coordenado com alanina
RuGly: Complexo de rutênio(II) coordenado com glicina
RuMet: Complexo de rutênio(II) coordenado com metionina
RPMI: Meio de cultura de tecido animal desidratado
RuSer: Complexo de rutênio(II) coordenado com serina
RuTrp: Complexo de rutênio(II) coordenado com triptofano
SSC: Parâmetro de granulidade celular
SDS: Dodecil sulfato de sódio

SK-BR-3: Linhagem celular adenocarcinoma de mama humano

S180: Modelo tumoral de sarcoma murino

TAE: Tumor ascítico de Ehrlich

TIGAR: gene regulador de glicólise e apoptose TP53-induzido

Tm5: Linhagem celular de melanoma murino

TMS: Tempo médio de sobrevida

TS/A: Linhagem celular de adenocarcinoma de mama metastático murino

TP53: gene supressor tumoral

UFG: Universidade Federal de Goiás

v.ip.: Via de administração intraperitoneal

v.iv.: Via de administração endovenosa

v.o.: Via de administração oral

Δ : Variação

Δ BW: Variação do peso corporal

Δ CA: Variação da circunferência abdominal

μ L: Microlitro

μ M: Micromolar

%ILS: Aumento percentual do tempo médio de sobrevida

Σ : Soma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Câncer	21
2.2 Carcinomatose peritoneal	27
2.3 Tumor de Ehrlich	29
2.4 Complexos metálicos no tratamento do câncer: platina e rutênio	30
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo geral	36
4.2 Objetivos específicos	36
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 Síntese dos complexos de rutênio(II)/aminoácido	37
5.2 Preparação dos complexos de rutênio(II)/aminoácido e cisplatina	37
5.3 Animais	37
5.4 Modelo tumoral murino	38
5.5 Experimentos <i>in vitro</i>	38
5.5.1 Linhagem celular e manutenção da cultura celular	38
5.5.2 Teste de viabilidade celular (Teste MTT)	39
5.5.3 Índice de seletividade	39

5.5.4 Estimativa de DL_{50}	40
5.6 Experimentos <i>in vivo</i>	40
5.6.1 Inoculação das células tumorais para realização dos experimentos..	40
5.6.2 Teste de Toxicidade Oral Aguda	40
5.6.3 Ensaio genotóxico: análise de danos à molécula de DNA	41
5.6.5 Avaliação antitumoral	43
5.6.5.1 Inibição do crescimento tumoral pela variação da circunferência abdominal	44
5.6.5.2 Inibição do crescimento tumoral pela variação do peso corporal ...	45
5.6.5.3 Análise da viabilidade, apoptose e necrose celular pela técnica de Anexina V/FITC e Iodeto de Propídio (PI) por Citometria de fluxo ..	46
5.6.5.4 Avaliações hematológicas e bioquímicas	47
5.6.6 <i>Screening</i> hipocrático do teste de DL_{50} e avaliação antitumoral	48
5.6.7 Avaliação da sobrevida	48
5.6.8 Análise estatística	49
6 RESULTADOS	50
6.1 Atividade citotóxica e índice de seletividade	50
6.2 Estimativa de DL_{50}	51
6.3 Teste de Toxicidade Oral Aguda	51
6.4 Ensaio genotóxico: análise de danos à molécula de DNA	54
6.5 Avaliação antitumoral e sobrevida após tratamento com complexos de rutênio(II)/aminoácido	55

6.5.1 Perfil de viabilidade e morte celular	58
6.5.2 Avaliação de toxicidade do tratamento antitumoral	61
6.5.2.1 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos	61
6.5.2.2 Avaliação macroscópica dos órgãos	65
6.5.3 Sobrevida	65
7 DISCUSSÃO	67
8 CONCLUSÃO	80
9 PERSPECTIVAS	81
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO	96

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de morte no mundo. O número total de casos está aumentando globalmente. O impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Foram registrados 14,1 milhões de novos casos de câncer e o número global de mortes, em 2012, atingiu a marca de 8,2 milhões. Estima-se que 19,3 milhões pessoas vão morrer em decorrência de câncer em 2025. O câncer de mama afeta principalmente as mulheres, respondendo por 23% de todos os casos de câncer em mulheres. É a principal causa de morte por câncer entre as mulheres, representando 14% das mortes (JEMAL et al., 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

O desenvolvimento de terapias para o tratamento de câncer nas últimas décadas tem-se centrado principalmente na quimioterapia combinada com outros tipos de tratamento: cirurgia, radioterapia e terapia alvo dirigida (CASTONGUAY et al., 2012).

A cisplatina é o agente quimioterápico mais utilizado na prática clínica para o tratamento do câncer. Apesar de sua importante atividade contra vários tumores humanos, complexos de platina não são suficientemente eficazes contra alguns dos mais frequentes tipos de câncer, tais como câncer de mama, cólon e ovário (BERGAMO & SAVA, 2011; HEINRICH et al., 2011; KARTALOU & ESSIGMANN, 2001; KELLAND, 2000; SIDDIK, 2003). Além disso, sua eficácia é limitada devido à sua toxicidade grave, apresentando efeitos colaterais indesejáveis e resistência ao tratamento com o fármaco (BOULIKAS & VOUGIOUKA, 2003; ALONSO, PEREZ, 2003; JAKUPEC et al., 2008; WONG & GIANDOMENICO, 1999). Alguns tumores apresentam uma resistência natural à cisplatina e outros desenvolvem resistência após o tratamento inicial (WONG & GIANDOMENICO, 1999). As limitações da cisplatina motivaram extensas investigações para o desenvolvimento de quimioterápicos antitumorais à base de metal com faixas mais amplas de atividade e toxicidade sistêmica menor.

Durante os últimos 30 anos, vários tipos de complexos de rutênio foram descritos apresentando atividade antineoplásica. Esses complexos pertencem à classe dos complexos metálicos mais promissores como agentes quimioterápicos antineoplásicos não contendo platina em sua estrutura, com diferentes mecanismos

de ação, atividade contra vários tipos de câncer, menor toxicidade e seletividade para células tumorais (BERGAMO & SAVA, 2011; BRABEC & NOVÁKOVÁ, 2006; HEINRICH et al., 2011; LIMA et al., 2010a; LIMA et al., 2010b; SILVEIRA-LACERDA et al., 2010a; SILVEIRA-LACERDA et al., 2010b; TIMERBAEV et al., 2006).

Vários estudos tem avançado e dois complexos de rutênio(III) já se encontram sob ensaios clínicos, KP1019 ou FFC14A apresentando atividade em tumores sólidos e NAMI-A em tumores metastáticos (BERGAMO et al., 2012; HARTINGER et al., 2006; RADEMAKER-LAKAHAI et al., 2004). Além disso, vários complexos de rutênio estão sob avaliação pré-clínica, com diferentes ligantes e estados de oxidação diferentes apresentando promissores resultados de atividade antitumoral contra vários modelos tumorais (CHATTERJEE et al., 2008; CHEN et al., 2003; LIMA et al., 2010a; MENEZES et al., 2007; SILVEIRA-LACERDA et al., 2010a; TOMAZ et al., 2012).

Diante do exposto, estudos pré-clínicos de atividade biológica, toxicidade e genotoxicidade de novos complexos de rutênio(II)/aminoácidos foram realizados, na busca de novos agentes quimioterápicos com melhor eficácia terapêutica, efeitos colaterais menores e mais seguros.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

O câncer é segunda doença responsável pelo maior número de mortes no mundo, atrás somente das doenças cardiovasculares. O relatório Globocan 2012 fornecido pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS) diz que o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Foram registrados 14,1 milhões de novos casos de câncer, o número global de mortes por câncer aumentou em 8% em relação aos 7,6 milhões da pesquisa Globocan 2008, representando 8,2 milhões em 2012 em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Os casos de câncer de mama foram os que mais cresceram, foram diagnosticados 1,7 milhão de casos de câncer de mama, 20% a mais do que em

2008, responsável por 522 mil mortes de mulheres no ano em 2012, alta de 14%. As projeções provem um aumento substancial no número de casos de câncer no mundo, podendo chegar a 19,3 milhões em 2025 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

De acordo com a Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil do Instituto Nacional do Câncer (INCA) são estimados 576 mil novos casos para 2014. Mundialmente, os tipos mais frequentes de câncer, relatados no Globocan 2012, são os de pulmão, mama e colorretal. Os mais letais são os de pulmão, fígado e estômago. Nacionalmente, os cânceres mais incidentes em 2014/2015 serão pele não melanoma (182 mil), próstata (69 mil), mama (57 mil), colorretal (33 mil), pulmão (27 mil) e estômago (20 mil) (INCA, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

As estimativas do INCA de 2014 para casos novos de câncer, exceto pele não melanoma, mostram que dos 394.450 mil novos casos, as mulheres serão mais acometidas por câncer (203.930 mil casos, 52%) e 190.520 mil homens terão câncer (48%). Entre os homens, o câncer de próstata será o responsável pelo maior número de casos novos (68.800 mil, 22,8%) e nas mulheres o câncer de mama terá o maior número de casos novos (57.120 mil, 20,8%) (INCA, 2014).

O câncer é uma das doenças mais comuns e graves, atualmente, considerado um problema de saúde pública (JEMAL et al., 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Entretanto o câncer não é uma doença recentemente descrita, os primeiros registros constam em manuscritos antigos. Desde 3000 a.C. casos de câncer são descritos no papiro de Edwin Smith do Egito Antigo, no qual descreve oito casos de tumores ou úlceras da mama tratados por cauterização, consta também a informação de que não existe um tratamento para a doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

A multiplicação, diferenciação e morte celular são processos essenciais para a sobrevivência de qualquer organismo. Esses processos são influenciados por diversos agentes internos e externos às células, contudo deve haver um equilíbrio integrado e complexo dos processos de crescimento e morte celular para manutenção da população celular dentro dos limites fisiológicos. Caso esse equilíbrio seja perturbado, alterações podem ocorrer neste mecanismo regulador dos processos de crescimento e morte celular resultando em crescimento e/ou

diferenciação anormal do tecido, tendo como consequência o desenvolvimento do câncer (ANCHURI et al., 2012; FOLKMAN & KALLURI, 2004; SCOOT, 2003).

O câncer afeta, aproximadamente, duzentos tipos de células, compreendendo um conjunto de doenças complexas, que em comum tem a instabilidade genética; células em crescimento contínuo, com propriedades de invasão e destruição do tecido adjacente, bem como, capacidade de produzir metástase (HANAHAHAN & WEINBERG, 2000; INCA, 2014; MESQUITA et al., 2009).

De acordo com o INCA (2014) as causas do câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, e ambas podem estar inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes do ambiente social e cultural. As causas internas estão relacionadas com genes mutados que interferem no controle do ciclo celular.

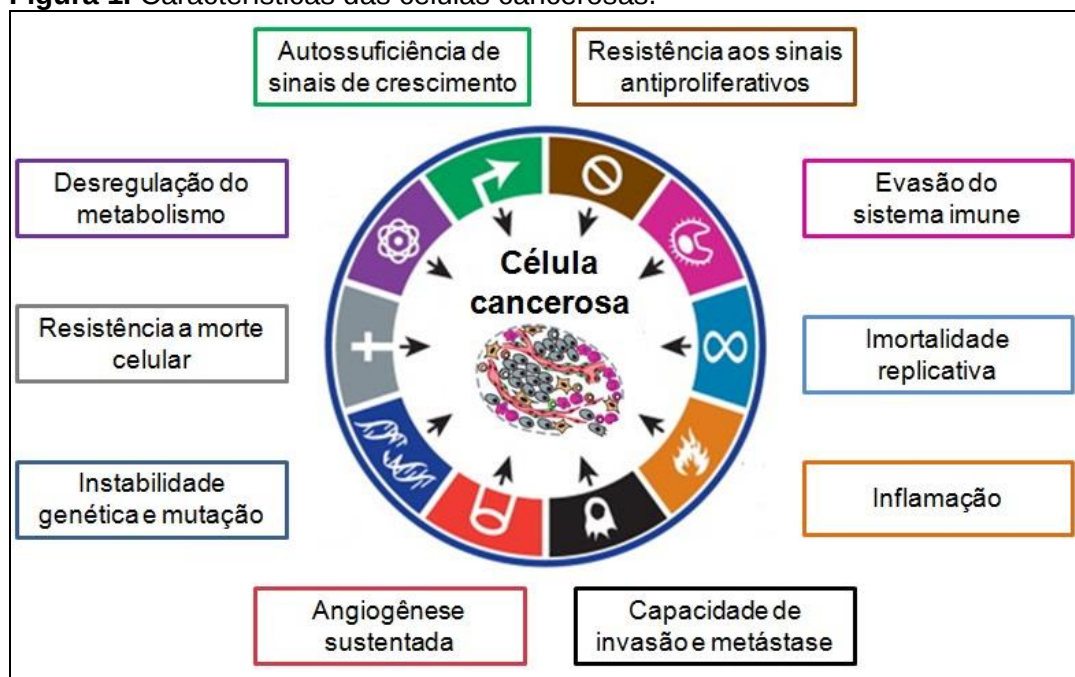
Sendo assim, vários fatores contribuem para o desenvolvimento de células cancerosas: ação de substâncias químicas presentes no meio ambiente ou na alimentação, alteração genômica por vírus ou mutações, influência de agentes físicos como a radiação ou herdada geneticamente. Estes fatores levam a um acúmulo de mutações no DNA em decorrência de alterações de sequência, perdas, ganhos e rearranjos cromossômicos (ALMEIDA et al., 2005) que interferem direta ou indiretamente nas funções dos proto-oncogenes, genes supressores e reparadores do DNA, levando à ativação dos proto-oncogenes, inativação destes genes supressores e reparadores (FOSTER, 2008, LUO, SOLMINI, ELLEDGE, 2009).

De modo geral, os proto-oncogenes são uma família de genes que codificam proteínas envolvidas no controle do ciclo celular a fim de promover a proliferação celular ordenada. Essas alterações no DNA adquiridas e/ou herdadas levam à transformação de proto-oncogenes em oncogenes, que quando presentes e/ou hiperativos podem predispor ao desenvolvimento de câncer, promovendo a proliferação celular excessiva. Os genes supressores mantêm a proliferação sob controle, restringindo o crescimento celular, uma vez mutados perdem sua função permitindo que as células com DNA alterado se multipliquem desordenadamente. Os genes reparadores de danos do DNA estão constantemente reparando as moléculas que sofreram mutação. As células mutadas estão em constante processo de divisão celular devido ao mal funcionamento dos mecanismos de regulação do ciclo celular,

com consequentemente acúmulo de mutações genômicas nas células cancerosas (COSTA-LOTUFO et al., 2010; VERMEULEN et al., 2003).

O conjunto dessas alterações funcionais e/ou estruturais conferem novas características fenotípicas às células cancerosas garantindo a malignidade tumoral, tais como: autossuficiência em sinais de crescimento (independem de fatores de crescimento), resistência aos sinais antiproliferativos (insensíveis aos inibidores de crescimento), evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado (imortalidade), angiogênese sustentada (crescimento sustentado em células do estroma para atrair novos vasos), invasão, metástase, e mais recentemente relatado, evasão do sistema imunológico, reprogramação do metabolismo energético (Figura 1) (BALDUCCI, 2007; HANAHAN & WEINBERG, 2011, LUO, SOLMINI, ELLEDGE, 2009).

Figura 1. Características das células cancerosas.



Fonte: Modificado de HANAHAN & WEINBERG, 2011.

A proliferação celular excessiva e descontrolada que representa a essência do câncer envolve não somente a perda do controle da proliferação celular, mas também correspondentes ajustes do metabolismo energético, a fim de impulsionar o crescimento e a divisão celular. A reprogramação do metabolismo energético ocorre em consequência da ativação de oncogenes e mutações em genes supressores de tumores, alterando a sinalização energética, estado nutricional e fatores de

crescimento, que resultam na absorção de nutrientes (HANAHAAN & WEINBERG, 2011; VANDER HEIDEN, CANTLEY, THOMPSON, 2009).

A absorção de glicose é relatada como a principal exigência bioenergética das células tumorais para manter o crescimento e proliferação celular. Nas células tumorais, diferentemente das células normais, a glicólise é favorecida em condições aeróbicas para atender a exigência energética. Embora a eficiência de geração de adenosina trifosfato (ATP) pela glicólise seja relativamente baixa, os produtos intermediários da glicólise são utilizados para várias vias biossintéticas, incluindo nucleotídeos, aminoácidos, macromoléculas e até mesmo organelas. Ademais, mais de 90% do piruvato produzido pela glicólise é convertida em lactato desidrogenase (DHL) e, esse, exportado para meio extracelular. Fato este que contribui para a degradação da matriz extracelular, facilitando a mobilidade das células e aumentando o potencial metastático das células tumorais (CASTRO et al., 2011; FUCHS & BODE; 2005; HANAHAAN & WEINBERG, 2011; JONES & THOMPSON, 2009).

As células tumorais exibem transporte de aminoácidos alterado e aumentado, muitas vezes associada com o Efeito Warburg ou glicólise aeróbica de tumores (BAGGETTO, 1992; BARKER & ELLORY, 1990; FUCHS & BODE; 2005; GEIER et al. 2013; HAASE et al. 2007). O Efeito Warburg ou glicólise aeróbica permite o rápido crescimento e duplicação dos componentes celulares na divisão e multiplicação celular, conferindo a essas células a capacidade de quebrar a glicose em taxas muito mais elevadas do que em tecidos normais, mesmo quando o oxigênio é abundante. Garantindo, assim, a proliferação celular descontrolada das células tumorais que requer não somente ATP, mas também nucleotídeos, aminoácidos, ácidos graxos e lipídeos (FUCHS & BODE; 2005; HANAHAAN & WEINBERG, 2011; HSU & SABATINI, 2008).

Os aminoácidos são a principal fonte de nitrogênio celular, utilizado para síntese de nucleotídeos, glutatona, amino açúcar e proteínas, sendo que alguns aminoácidos são importantes reguladores de via metabólicas necessárias para manutenção, crescimento, reprodução e imunidade do organismo (FUCHS & BODE; 2005; WU, 2009).

O metabolismo de aminoácidos aumentado nos tumores leva, entre outras coisas, a um balanço nitrogenado negativo no hospedeiro com câncer. Além disso,

os esqueletos de carbono dos ácidos aminados são utilizados como fonte de combustível para a geração de ATP, glicose e ácidos graxos, e pode também contribuir para a biossíntese de esteróis e lipídeos (BAGGETTO, 1992; FUCHS & BODE; 2005).

A função reguladora dos aminoácidos no crescimento tumoral envolve a sinalização direta e integrada do estado energético, nutricional e do fator de crescimento. Os aminoácidos essenciais são fornecidos para o interior celular através do transportador de aminoácidos neutros do tipo L (LAT) que, por sua vez, sinalizam para aumentar o crescimento e progressão do ciclo celular através da ativação da mTOR (serina/treonina quinase alvo da rapamicina), os níveis de aminoácidos necessários no interior celular são mantidos pelo sistema transportador do tipo ASC (ASCT), garantindo a inibição da apoptose e economia de energia pela entrega de glutamina (FUCHS & BODE; 2005). Nutrientes disponíveis, principalmente aminoácidos, são os principais ativadores de mTOR. Os aminoácidos podem influenciar diretamente a taxa de síntese de proteínas através da estimulação da mTOR (JONES & THOMPSON, 2009).

mTOR regula o processo de morte celular por autofagia, inibindo-a quando há disponibilidade de nutrientes, porém quando a proteína quinase dependente de adenosina monofosfato (AMPK) está ativa ou não há disponibilidade de aminoácidos a atividade da mTOR é inibida e a autofagia é estimulada. Os produtos da degradação derivados da autofagia são utilizados nos processos catabólicos (DANG, 2012; HSU & SABATINI, 2008; JONES & THOMPSON, 2009).

AMPK pode ser ativada por aumento na relação intracelular de adenosina monofosfato/adenosina trifosfato (AMP/ATP) ativando a glicólise. A AMPK induz *checkpoint* no ciclo celular na presença de TP53, restringindo a proliferação celular. TP53 é um fator de transcrição que em resposta a diversas injúrias celulares, incluindo danos ao DNA, hipóxia e estresse oxidativo, sendo ativada para promover a ativação de genes que induzem a parada do ciclo celular, senescência e morte celular por apoptose. Assim, a expressão de TP53 controla genes metabólicos e altera a utilização da glicose, ativando genes diretamente como o *TIGAR* (regulador de glicólise e apoptose TP53-induzido) que inibe a glicólise e redireciona a glicose para produção de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida), como uma resposta ao stress oxidativo, protegendo a célula contra um dano

intracelular mediado por espécies reativas de oxigênio. Na maioria das células tumorais, o gene *TP53* está mutado conferindo uma vantagem de crescimento para as células tumorais permitindo o acesso facilitado as vias energéticas e de biossíntese da glicólise aeróbica (DANG, 2012; JONES & THOMPSON, 2009).

2.2 Carcinomatose peritoneal

A cavidade peritoneal é uma cavidade virtual delimitada pelo peritônio, uma membrana serosa, lisa e delicada que reveste a parede e vísceras do abdômen e pélvis. Na cavidade peritoneal circula o líquido peritoneal, que em condições normais, contém aproximadamente 50 mL de fluido com aparência transparente, estéril e viscoso, produzido pelas células da membrana como um ultrafiltrado do plasma. O líquido peritoneal tem como principal função proteção da cavidade abdominal, garantindo lubrificação à região e, assim, evitando o atrito entre os órgãos e permitindo sua movimentação durante o processo da digestão (COMAR et al., 2011).

A presença de mais de 50 mL de líquido na cavidade peritoneal é uma condição patológica denominada ascite. O termo ascite tem origem na palavra grega “askos” que significa saco ou conteúdo de um saco. O líquido ascítico pode ser classificado, de acordo com sua composição, em exsudato ou transudato. O desenvolvimento das ascites tem como principais causas a cirrose (75%) e as neoplasias (10%). Os exsudatos são consequência de inflamações e neoplasias apresentando aumento de proteínas, DHL e leucócitos, pH baixo e glicose baixa. Já os transudatos apresentam conteúdo proveniente do extravasamento de líquido em consequência do aumento da pressão no sistema porta, como acontece na cirrose com baixos níveis de proteínas, DHL e leucócitos, pH elevado, nível normal de glicose (ANDRADE JÚNIOR et al., 2009; COMAR et al., 2011; MOORE & AITHAL, 2006).

Carcinomatose peritoneal é um câncer de ampla disseminação dentro da cavidade peritoneal, frequentemente associado ao acúmulo de líquido na cavidade, causando ascite neoplásica, considerado na clínica uma condição letal. Seu desenvolvimento na maioria dos casos causa dor abdominal, distensão abdominal, saciedade precoce, edema na perna, fadiga e náuseas. Com o acúmulo contínuo, a

ascite compromete a mobilidade e em casos mais extremos dificulta a atividade respiratória e obstrução do intestino. Apresenta uma crescente incidência com cerca de 46 mil novos casos por ano nos Estados Unidos da América e 17.700 mil no Brasil (BRANDÃO et al., 2013; HAMILTON et al., 2008; MACRÌ et al., 2010; ZALAVSKY et al., 2010). De acordo com Sugarbaker (2008) uma das principais causas de morte e sofrimento em pacientes com doenças neoplásicas é a progressão da doença na cavidade peritoneal.

Embora raro, pode ocorrer como resultado de uma doença primária do peritônio, como o mesotelioma ou, na forma mais frequente, resultado de carcinomatoses secundárias originárias de metástases de tumores primários de pulmão, estômago, ovário, intestino grosso, colón e reto (BARBOLINA et al., 2008; LOPES & CARNEIRO, 2011; SU, TSAI, PERNG, 2008; ZALAVSKY et al., 2010).

As opções de tratamento da carcinomatose peritoneal tem melhorado significativamente nos últimos anos. Habitualmente, os principais tipos de tratamentos para a doença são a quimioterapia via intravenosa (v.iv) e cirurgia citorrredutora. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos administrados por via sistêmica apresentam baixa concentração na cavidade peritoneal, sendo insuficiente para eliminar lesões residuais, motivo esse que levou a necessidade de estudos de administração intraperitoneal (v.ip) de quimioterápicos. Devido a alterações na via de administração dos quimioterápicos houve uma melhora na resposta terapêutica, sendo hoje bem difundido o tratamento pela v.ip ou por v.ip combinada com a v.iv e, ainda, a cirurgia citorrredutora associada à quimioterapia intraperitoneal hipertérmica (LOPES & CARNEIRO, 2011; MACRÌ et al., 2010; SUGARBAKER, 2008).

Segundo Sugarbaker (2008) a quimioterapia v.ip apresenta altas taxas de respostas terapêuticas na cavidade peritoneal com garantia de terapia de dose-intensiva devido à barreira peritoneal, sendo o peso molecular dos quimioterápicos um ponto relevante para ser considerado na quimioterapia v.ip, uma vez que, o peso molecular da substância farmacologicamente ativa pode estar relacionado com o tempo de exposição na região peritoneal. Assim, moléculas com peso molecular maiores podem ter seu tempo de exposição aumentado consideravelmente.

Dentre os agentes quimioterápicos em uso clínico para o tratamento de carcinomatose peritoneal tem-se a mitomicina C, doxorubicina, cisplatina e paclitaxel, gencitabina e 5-Fluorouracil (SUGARBAKER, 2008).

Em suma, a justificativa para o tratamento v.ip. da carcinomatose peritoneal é que o peritônio, pode receber alta concentração do quimioterápico, permitindo que o tumor fique mais tempo exposto à ação do quimioterápico, evitando a exposição sistêmica e, conseqüentemente, tecidos normais são relativamente poupados (MARONI et al., 2012). Contudo é importante relatar que a administração v.ip de agentes quimioterápicos não elimina seus efeitos colaterais e toxicidade. Sendo considerada como dose segura desses agentes quimioterápicos para tratamento de carcinomatose peritoneal, na maioria das vezes, a mesma dose considerada para administração v.iv (SANO, 2001; SUGARBAKER, 2008).

2.3 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich é um carcinoma mamário espontâneo de camundongo fêmea, indiferenciado, caracterizado como uma neoplasia transplantável. Realizado pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1896 e descrito em 1906 (SILVA, SANTOS, CASSALI, 2006). Apresenta um comportamento agressivo e tem sido transplantado com sucesso em quase todas as espécies de camundongos usados em pesquisa, fato associado, provavelmente, à perda da expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na membrana celular (BERGAMI-SANTOS, MARIANO, BARBUTO, 2004; BROMBERG et al., 2010). O desenvolvimento do tumor está associado a sua via de inoculação, podendo desenvolver na forma sólida quando inoculado no tecido subcutâneo ou muscular e na forma ascítica quando inoculado na cavidade peritoneal.

O tumor de Ehrlich tem sido utilizado como modelo experimental em diversos estudos que visam elucidar a ação de componentes físicos, químicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, cinética, imunologia, bioquímica e terapêutica dos tumores (BROMBERG et al., 2010; MADY, 2002; MOTA et al., 2012; PALERMO-NETO et al., 2003; SEGURA, BARBERO, MÁRQUEZ, 2000; SILVA, SANTOS, CASSALI, 2006; SUNIL et al., 2013).

O uso difundido e a vantagem da utilização de neoplasias transplantáveis estão associados com o conhecimento prévio da quantidade, das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e o desenvolvimento rápido da neoplasia. Fatores que estão relacionados diretamente com o número de células tumorais inoculadas que, por sua vez, também está relacionado com o tempo de sobrevivência dos animais, restringindo, assim, o tempo de estudo (BROMBERG et al., 2010; SILVA, SANTOS, CASSALI, 2006).

Experimentos realizados em camundongos *Swiss* demonstraram crescimento discreto do tumor de Ehrlich nos primeiros dias após a inoculação subcutânea com posterior crescimento acelerado (REIS et al., 2009), com pico de proliferação do tumor sólido ocorrendo a partir do sétimo dia após inoculação (SILVA, SANTOS, CASSALI, 2006).

Na forma ascítica, o volume do líquido ascítico e o número de células do tumor de Ehrlich aumentaram progressivamente em camundongos *Swiss* (MATSUZAKI et al., 2006), desencadeando discreta resposta inflamatória na cavidade peritoneal, praticamente sem infiltração de macrófagos e o influxo de células polimorfonucleares ocorre a partir do sexto dia após inoculação (FECCHIO et al., 1990), o pico de proliferação das células ocorre no sétimo dia após inoculação (SILVA, SANTOS, CASSALI, 2006).

O desenvolvimento do tumor Ehrlich na forma sólida e ascítica é marcado por esplenomegalia, hematopoese esplênica, neutrofilia, trombocitopenia e pela presença de grande quantidade de macrófagos supressores (SEGURA, BARBERO, MÁRQUEZ, 1997; SEGURA, BARBERO, MÁRQUEZ, 2000). O mecanismo que desencadeia essas alterações é desconhecido até o presente momento.

Não há evidências que o tumor de Ehrlich seja metastático para os órgãos torácicos e abdominais. Entretanto, há evidências de metástase nos linfonodos com presença de células neoplásicas organizadas em cordões ou em pequenos ninhos. Também, não há relatos que o desenvolvimento do tumor de Ehrlich, um carcinoma mamário, sofra influência dos hormônios sexuais envolvidos na patogênese do câncer de mama (SILVA et al., 2004).

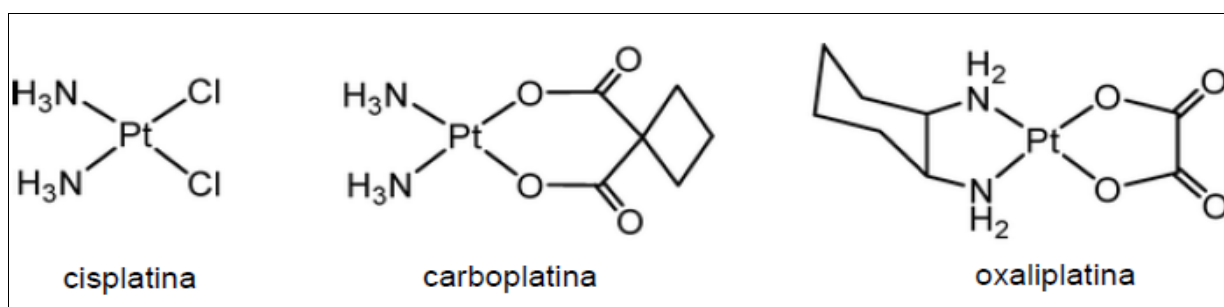
2.4 Complexos metálicos no tratamento do câncer: platina e rutênio

Embora, hoje, existam diversos tratamentos e medicamentos disponíveis para muitas doenças, a busca contínua na tentativa de encontrar fármacos mais eficazes, seguros e com menores efeitos colaterais tem aumentado. Isto é particularmente verdadeiro no enfrentamento ao câncer (KAMATCHI et al., 2013).

Os complexos metálicos ganharam espaço na pesquisa oncológica após descoberta de elevada atividade antitumoral do complexo de platina, a cisplatina, em 1969, sendo relatada remissão completa do tumor de sarcoma 180 (S180), implantado em camundongos, em 36 dias após tratamento com a cisplatina em dose única (ROSENBERG et al., 1969).

Os complexos de platina são os agentes quimioterápicos mais utilizados na prática clínica, sendo um dos principais pilares no tratamento do câncer. O complexo de platina mais utilizado na quimioterapia antitumoral é a cisplatina. (KELLAND, 2007). A partir do sucesso da cisplatina como antitumoral, complexos análogos à cisplatina foram sintetizados e avaliados com o propósito de ampliar sua utilização na quimioterapia antitumoral. Além da cisplatina, dois complexos de platina foram aprovados para utilização mundial, a carboplatina e oxaliplatina (Figura 2). Outros complexos de platina, como a nedaplatina, lobaplatina e heptaplatina; são aprovados para utilização no Japão, China e Coreia (HARTINGER et al., 2008).

Figura 2. Principais complexos de platina utilizados na quimioterapia antitumoral.



Fonte: SÜSS-FINK, 2010.

Na prática clínica, o uso de complexos de platina, sozinhos ou em associação, representa 40 a 80% dos tratamentos de pacientes com câncer. A cisplatina é utilizada para diversos tipos de tumores dentre eles tumor de ovário, testículo, bexiga, mama e, mais recentemente, no tratamento de carcinomatose peritoneal; a carboplatina é utilizada para tratamentos de câncer de ovário e por

último, a oxaliplatina, utilizada para tratar câncer colorretal (ARMSTRONG et al., 2006; HANIGAN & DEVARAJAN, 2003; KELLAND, 2007; MUGGIA & FOJO, 2004).

Entretanto, a cisplatina e seus análogos apresentam desvantagens aos pacientes, incluindo toxicidade sistêmica elevada, com sintomas gastrointestinais como, náuseas, vômitos, diarreia; nefro e neurotoxicidade, resistência intrínseca ou adquirida (JIRSOVA et al., 2006; KAMATCHI et al., 2013; KARTALOU & ESSIGMANN, 2001).

Diante de tais desvantagens dos complexos de platina, uma variedade de análogos de complexos metálicos foi sintetizada com intuito de não somente proporcionar melhores efeitos terapêuticos, mas também oferecer informações úteis no estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do tumor. Os complexos de rutênio representam uma nova alternativa de quimioterápicos antitumorais, com diferentes mecanismos de ação, atividade contra diversos tipos de câncer, menor toxicidade e seletividade para célula tumoral, podendo representar novos e eficazes agentes quimioterápicos para a prática clínica (HARTINGER et al., 2008; HEINRICH et al., 2011; KAMATCHI et al., 2013).

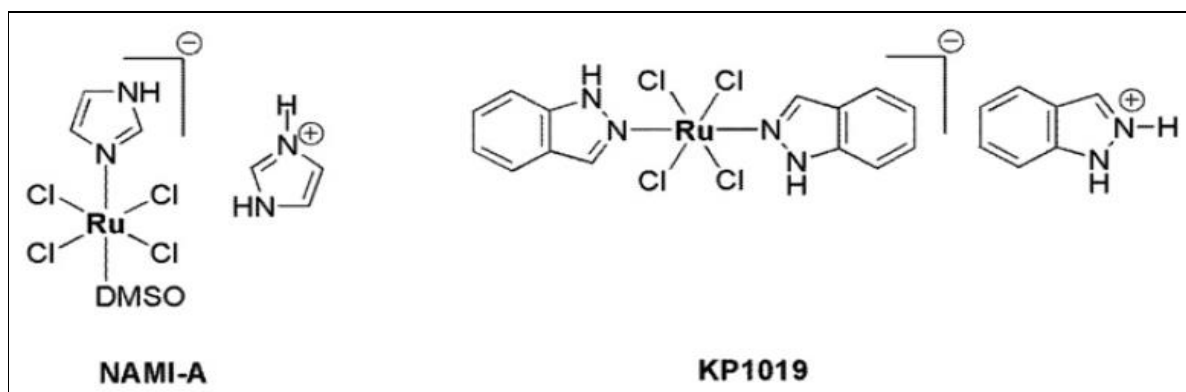
Nos últimos 30 anos, uma grande quantidade de complexos de rutênio tem sido sintetizados e testados para atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Devido às propriedades e características dos complexos de rutênio, esses são considerados bem adequados para aplicação médica: i) variedade de coordenação, ii) cinética de substituição similar ao da platina, com a possibilidade de substituição de moléculas doadoras de O- e N-, iii) diferentes estados de oxidação em condições fisiológicas (+2, +3 e +4), iv) toxicidade em geral menor quando comparada à cisplatina, v) possibilidade de obter pró-fármacos com o íon de rutênio no estado de oxidação +3 que pode ser reduzido à forma ativa de estado de oxidação +2, vi) transporte por biomoléculas, como a transferrina (ALLARDYCE, DYSON, 2001; BERGAMO et al., 2012; LEVINA et al., 2009). Além disso, a geometria octaédrica dos complexos de rutênio é atribuída uma das principais diferenças observadas no mecanismo de ação dos complexos de rutênio em relação à cisplatina, possibilitando ligação covalente, eletrostática e intercalação com os ácidos nucleicos (LEVINA et al., 2009; KAMATCHI et al., 2013).

Os primeiros complexos de rutênio e suas propriedades antitumorais foram estudados na década de 80 com os complexos *fac*-[RuCl₃(NH₃)₃] e *cis*-

$[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ (BRATSOS et al., 2007; CLARKE, 1980). Posteriormente, novos complexos de rutênio foram desenvolvidos, como o imidazol $[\text{trans-RuCl}_4(1H\text{-imidazol})(\text{DMSO})]$ (NAMI-A), e o complexo indazol $[\text{trans-RuCl}_4(1H\text{-indazol})_2]$ (KP1019, recentemente nomeado FFC14A), os quais estão em triagem clínica fase II (BERGAMO et al., 2012; LENTZ et al., 2009; SAVA et al., 1999).

Apesar da estrutura e similaridade química (Figura 3), NAMI-A e KP1019, apresentam distinta atividade antitumoral. Na fase pré-clínica, NAMI-A mostrou-se eficaz contra metástase, prevenindo a formação de metástase e inibindo seu crescimento, enquanto KP1019 apresentou atividade contra tumores colorretais e tumores humanos primários resistentes à cisplatina (BERGAMO et al., 2012; GIANFERRARA, BRATSOS, ALESSIO, 2009; HARTINGER et al., 2006; LEVINA et al., 2009; SAVA et al., 1999).

Figura 3. Estrutura química de complexos de rutênio(III) em fase clínica de estudo.



Fonte: KAMATCHI et al., 2013.

Complexos de rutênio (III) vêm sendo estudados pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa Dra Elisângela de Paula Silveira Lacerda (UFG, Goiás, Brasil) em parceria com Universidade Federal de Uberlândia. Esses complexos de rutênio têm resultados promissores na fase pré-clínica.

Estudos realizados *in vitro* com o complexo de rutênio(III) $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ (CTRu(III)) verificou que esse complexo possui atividade citotóxica em diferentes linhagens celulares tumorais, humanas e murinas, a citar: A549 (carcinoma de pulmão), K562 (leucemia mielóide crônica humano), SK-BR-3 (adenocarcinoma de mama humano), A-20 (linfoma murino) e S180 (sarcoma 180 murino) (LIMA et al., 2010a; LIMA et al., 2010b; LIMA et al., 2012; SILVEIRA-LACERDA et al., 2010b).

Além de apresentar atividade *in vitro*, o complexo CTRu(III) apresentou atividade antitumoral *in vivo* satisfatória, com redução do volume do tumor de S180 e aumento do tempo de vida dos animais tratados com CTRu(III) (MENEZES et al., 2007).

O mesmo complexo, CTRu(III), foi testado em linhagens celulares não tumorais, MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) e células mononucleares do sangue periférico (PBMC), os resultados obtidos mostraram que o complexo CTRu(III) não apresenta citotoxicidade para estas células (LIMA et al., 2010b ; SILVEIRA-LACERDA et al., 2010a).

Atualmente, complexos de rutênio (II) com diferentes ligantes são os mais estudados para atividade antitumoral (ANCHURI et al., 2012; DAVID et al., 2012; EGBEWANDE et al., 2014; HEINRICH et al., 2011; KAMATCHI et al., 2013; OSTI et al., 2012). A mudança de ligantes tem sido relatada como um fator essencial para a relação estrutura/função dos complexos de rutênio (II) (HEINRICH et al., 2011; CHELOPO et al., 2013).

Complexos de rutênio(II)/nitrosil apresentaram atividade antitumoral *in vitro* contra células HeLa (carcinoma cervical humano) e atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* contra Tm5 (melanoma murino) (HEINRICH et al., 2011). Novos complexos de rutênio(II)/nitrosil também apresentaram atividade citotóxica contra células de melanoma (B16F10, melanoma metastático murino) (OSTI et al., 2012). Complexos de rutênio(II)/areno/PTA (RAPTA) e análogos demonstraram atividade antitumoral *in vitro* em modelo de adenocarcinoma de mama metastático murino (TS/A) (SCOLARO et al., 2005). Complexos de rutênio(II)/pirazol apresentaram atividade contra células MCF-7 (câncer de mama humano) (DAVID et al., 2012). Complexos de rutênio(II)/tiosemicarbazona revelaram atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* contra células do tumor ascítico de Ehrlich (ANCHURI et al., 2012).

O mecanismo de ação antitumoral dos complexos de rutênio tem sido investigado, porém vários fatores tem sido identificados como responsáveis por sua atividade farmacológica tais como, ativação por redução, hidrólise de grupos de saída, transporte por biomoléculas, ligação ao DNA (TAN et al., 2008). Sabe-se que complexos de rutênio (II) e (III) podem se ligar ao DNA assim como complexos de platina, contudo estudos têm demonstrado mecanismos de ação independentes do DNA, como inibição de metaloproteases e interferência com processos de adesão

celular e metabolismo do óxido nítrico, interação com proteínas e produção de espécies reativas de oxigênio são responsáveis pelos efeitos antitumorais de alguns complexos de rutênio (HEFFETER et al., 2008; LIU et al., 2005; MARTÍNEZ et al., 2010; MORENO et al., 2011; MORBIDELLI et al., 2003; PACCOR et al., 2004; SAVA et al., 2004).

3 JUSTIFICATIVA

A quimioterapia antitumoral é uma terapia bem estabelecida para o tratamento de vários tipos tumorais, contudo os medicamentos atualmente disponíveis não são específicos para as células tumorais causando danos severos em tecidos normais que, proliferam rapidamente como a medula óssea, os folículos pilosos e no epitélio gastrointestinal. Isto resulta em uma desvantagem importante deste tratamento devido aos numerosos efeitos secundários indesejáveis: dor nos ossos e nas costas, formação de coágulos sanguíneos, fraqueza, fadiga, acidente vascular cerebral hemorrágico, perda de cabelo, dentre outros.

Diante de tal cenário é necessário o desenvolvimento de novos protótipos antitumorais para superar as limitações de eficácia e segurança dos medicamentos em uso clínico, garantindo melhor qualidade de vida aos pacientes em tratamento antineoplásico.

Dada à taxa acelerada de crescimento celular e desregulação metabólica das células tumorais e partindo-se dos conhecimentos prévios que complexos de rutênio apresentam propriedades antitumorais favoráveis com menor toxicidade, novos complexos de rutênio (II) coordenados a aminoácidos foram sintetizados.

Contudo, estudos para investigação do potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo* são importantes para comprovação de sua eficácia, além disso, estudos de toxicidade oral aguda e genotoxicidade também são necessários para verificar sua segurança e efeitos colaterais.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Determinar a atividade citotóxica e seletiva *in vitro*, e a toxicidade oral aguda, atividade antitumoral, média de sobrevida, potencial genotóxico de complexos de rutênio(II)/aminoácidos *in vivo* em modelo experimental de tumor de Ehrlich (carcinoma de mama murino).

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a atividade citotóxica dos complexos de rutênio(II)/aminoácido em células do tumor de Ehrlich e em fibroblastos humanos (L929) *in vitro*, estimando a concentração que inibe 50% o crescimento celular (IC_{50});
- Determinar a seletividade dos complexos de rutênio(II)/aminoácido *in vitro*;
- Comparar a potência dos complexos de rutênio(II)/aminoácido em relação a cisplatina, *in vitro*;
- Estimar a dose letal mediana a partir de dados de IC_{50} obtidos *in vitro*;
- Determinar a toxicidade oral aguda dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos em camundongos Swiss livres de tumor;
- Verificar efeito genotóxico dos complexos de rutênio(II)/aminoácido induzido em células do sangue periférico de camundongos Swiss, machos e fêmeas, por 24 e 48 horas;
- Determinar o potencial de inibição do crescimento tumoral dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos em camundongos Swiss portadores de tumor ascítico de Ehrlich pela variação da circunferência abdominal e pela variação do peso corporal;
- Determinar o tempo médio de sobrevida dos camundongos Swiss portadores de tumor ascítico de Ehrlich após tratamento com os complexos de rutênio(II)/aminoácidos;
- Analisar o perfil de viabilidade das células do tumor ascítico de Ehrlich retiradas da cavidade abdominal dos camundongos Swiss tratados com os complexos de rutênio(II)/aminoácido;
- Avaliar os efeitos tóxicos em camundongos Swiss portadores de tumor ascítico de Ehrlich tratados com os complexos de rutênio(II)/aminoácido;

5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1 Síntese dos complexos de rutênio(II)/aminoácido

Os complexos de rutênio(II)/aminoácido denominados RuAla, RuGly, RuMet, RuSer e RuTrp (Tabela 1) foram sintetizados e caracterizados no Laboratório de Química Supramolecular, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos (ALMEIDA, 2009) e encaminhados ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética (LGM/C), Instituto do Ciências Biológicas I, Universidade Federal de Goiás (UFG) para a realização deste trabalho. Esses complexos de rutênio apresentam depósito de patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) referente à sua composição farmacêutica e uso (nº de depósito no INPI: BR10201303360).

Tabela 1. Complexos de rutênio(II)/aminoácidos.

Fórmula geral dos compostos	Sigla	Aminoácido	Massa molecular (g mol⁻¹)
[Ru(L-Ala)(bipy)(dppb)]PF ₆	RuAla	Alanina	916,8
[Ru(Gly)(bipy)(dppb)]PF ₆	RuGly	Glicina	902,7
[Ru(L-Met)(bipy)(dppb)]PF ₆	RuMet	Metionina	976,8
[Ru(L-Ser)(bipy)(dppb)]PF ₆	RuSer	Serina	946,8
[Ru(L-Trp)(bipy)(dppb)]PF ₆	RuTrp	Triptofano	1030,9

5.2 Preparação dos complexos de rutênio(II)/aminoácido e cisplatina

Os complexos de rutênio(II)/aminoácido e cisplatina (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, utilizados para os testes *in vitro*, foram dissolvidos em dimetil sulfoxido (DMSO), o qual apresenta concentração final de uso de 0,1% (p/v). Os complexos de rutênio(II)/aminoácido e cisplatina, utilizados para os testes *in vivo*, foram dissolvidos em DMSO, o qual apresenta concentração final de uso 10% (p/v).

5.3 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* com idade de 6 a 8 semanas e peso

corporal entre 30 a 40 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da UFG. Os animais foram mantidos no Laboratório de Oncologia Experimental no Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas I, UFG, em estante ventilada modelo EB275C, com 3 a 5 animais por mini isolador, sala climatizada sob condições controladas de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}$) e ciclo claro-escuro de 12h. Os animais foram mantidos em regime alimentar com ração comercial padrão e água *ad libitum*. Os animais foram aclimatizados por 5 dias antes de iniciar os protocolos experimentais. Todos os procedimentos experimentais descritos neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG, sob número de protocolo 039/12 (Anexo A).

5.4 Modelo tumoral murino

As células do tumor de Ehrlich utilizadas para indução em modelo animal foram obtidas do Laboratório de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Pernambuco. As células foram mantidas em camundongos *Swiss* por meio de passagens sucessivas intraperitoneais na quantidade de 2×10^6 células ajustada para um volume final de 0,2 mL. Após 7 dias de inoculação tumoral, o líquido da cavidade peritoneal foi aspirado, as células foram lavadas em solução salina de tampão fosfato (PBS) e uma alíquota da suspensão celular foi adicionada ao corante Azul de Tripiano 1% (m/v) (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO) e quantificado em Câmara de Neubauer. A viabilidade das células utilizadas para os estudos *in vitro* e *in vivo* foram $\geq 90\%$ (MENEZES et al., 2007).

5.5 Experimentos *in vitro*

5.5.1 Linhagem celular e manutenção da cultura celular

As células do tumor de Ehrlich foram mantidas em cultura após obtenção e quantificação das células presentes no líquido da cavidade peritoneal de camundongos *Swiss* portadores de tumor ascítico de Ehrlich (TAE) previamente descrito no item 5.4, por 24 horas antes de iniciar os testes *in vitro*. As células L929 (fibroblasto murino, ATCC número CCL-1™) foram obtidas do Banco de Célula do Rio de Janeiro. As células do TAE e L929 foram mantidas em meio RPMI 1640 e

DMEM (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO), respectivamente, suplementados com 10% de soro fetal bovino, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de penicilina e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina, incubadas em estufa (Thermo Scientific) a 37°C , 5% de CO_2 segundo protocolo estabelecido pela *American Type Culture Collection* com modificações (ATCC, Rockville, MD, EUA).

5.5.2 Teste de viabilidade celular (Teste MTT)

Para avaliar os efeitos citotóxicos dos complexos de rutênio(II)/aminoácido foi utilizado o teste MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium). O princípio deste método descrito por Mosman (1983) consiste em medir a viabilidade celular pela atividade enzimática de oxirredutases das células vivas. Para o teste, 1×10^5 células do TAE e 2×10^4 células L929 foram semeadas em microplacas de 96 poços na ausência ou presença dos complexos de rutênio(II)/aminoácido (0,2 a $200 \mu\text{M}$) ou cisplatina (0,2 a $200 \mu\text{M}$) e incubadas em estufa a 37°C , 5% de CO_2 por 48 horas. Ao final do período de incubação, foi adicionado aos poços de cultivo celular $10 \mu\text{L}$ de MTT (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO) na concentração de 5 mg mL^{-1} , e após 3 horas de incubação com o MTT, foram acrescentados $50 \mu\text{L}$ SDS a 10% diluído em HCl/0,01N para dissolver os cristais de azul de formazana. A absorbância foi determinada em 545 nm usando espectrofotômetro de microplaca Stat Fax 2100 (Awareness Technology, Palm City, FL, USA). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da seguinte fórmula: Viabilidade celular (%) = (Absorbância do tratamento)/(Absorbância do controle negativo) $\times 100$. O valor de IC_{50} (concentração (μM) que inibe 50% o crescimento celular) foi determinada por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5.5.3 Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) é determinado pela relação dos valores obtidos de IC_{50} para as linhagens celulares não tumoral e tumoral, indicando a seletividade dos complexos estudados e o seu potencial uso para os testes pré-clínicos *in vivo* e clínicos.

O IS foi determinado para todos os complexos de rutênio(II)/aminoácidos testados e para a cisplatina a partir da seguinte fórmula: $IS = IC_{50}$ da célula não tumoral (L929)/ IC_{50} da célula tumoral (TAE) (OSTI et al., 2012). Considerou-se valor de $IS \geq 2,0$ significativo.

5.5.4 Estimativa de DL_{50}

A partir dos valores obtidos de IC_{50} é possível estimar a dose letal mediana (DL_{50}). A estimativa de DL_{50} *in vitro* é parâmetro relevante de seleção dos complexos em estudo para posteriores testes *in vivo*.

Os complexos de rutênio que apresentaram IS significativo ($\geq 2,0$) tiveram calculada a estimativa de DL_{50} para a linhagem celular não tumoral, de acordo com a seguinte fórmula: $\log(DL_{50}) = 0,506 \times \log(IC_{50}) + 0,475$ (CUNHA et al., 2013).

5.6 Experimentos *in vivo*

5.6.1 Inoculação das células tumorais

Após obtenção e quantificação das células presentes no líquido da cavidade peritoneal de camundongos *Swiss* portadores de TAE, previamente descrito no item 5.4, o mesmo foi inoculado em camundongos *Swiss* dos grupos experimentais para determinar a atividade antitumoral e sobrevida dos animais após administração dos complexos de rutênio(II)/aminoácido, RuMet e RuTrp, selecionados para os testes *in vivo*. Uma injeção v.ip. de 6×10^6 células/animal num volume igual a 0,2 mL de células do TAE foi inoculada nos animais. Todos os animais receberam células TAE no tempo 0 do estudo.

5.6.2 Teste de Toxicidade Oral Aguda

A toxicidade aguda foi estimada de acordo com as normas preconizadas pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD). Seguindo o guia *Acute Toxic Class Method - Guideline 423* da OECD de 2001, para determinar a menor faixa de DL_{50} que causa letalidade foram utilizados grupos de três fêmeas e uma dose padrão dentre as quatro recomendadas (5, 50, 300 e 2000mg/Kg).

Os testes de toxicidade oral aguda pelo método de classes foram iniciados com a dose de 300 mg/Kg. Segundo o protocolo, após 24 horas de observação, se ocorresse a morte de 0-1 animal a mesma dose seria repetida em 3 animais nas mesmas condições que anteriormente. Se ocorresse a morte de 2-3 animais doses sequenciais menores seriam administradas até possibilitar estimativa de uma faixa de DL₅₀.

O *Guideline 423* estima a faixa de DL₅₀ de acordo com o preconizado pela Globally Harmonized Classification System (GHS): classe 1 (0 mg/Kg < DL₅₀ < 5 mg/Kg), classe 2 (5 mg/Kg < DL₅₀ < 50 mg/Kg), classe 3 (50 mg/Kg < DL₅₀ < 300 mg/Kg), classe 4 (300 mg/Kg < DL₅₀ < 2000 mg/Kg), classe 5 (2000 mg/Kg < DL₅₀ < 5000 mg/Kg) e não classificado (DL₅₀ > 5000 mg/Kg). Sendo classificado entre composto muito tóxico (classe 1) e atóxico (classe 5).

Os animais foram observados, de acordo com critérios estabelecidos e descritos, a seguir, no item 5.6.6; nas primeiras 4 horas e diariamente, até o 14º dia de experimento, quando estes foram eutanasiados com solução de 0,2 mL/100g de quetamina (100 mg mL⁻¹) (Dopalen, Vetbrands Brasil LTDA) e xilazina (100 mg mL⁻¹) (Dorcipec, Vallée S/A).

O fígado, baço, rins, pulmões e coração, foram excisados e avaliados, macroscopicamente, quanto à coloração, tamanho e presença de focos hemorrágicos. Posteriormente, os órgãos foram pesados em balança eletrônica de precisão para determinar o peso relativo dos órgãos de acordo com a seguinte fórmula: índice relativo do órgão (mg/g) = peso do órgão (mg) / peso do respectivo animal (g) (ZHENG et al., 2011).

5.6.3 Ensaio genotóxico: análise de danos à molécula de DNA

Para detecção de danos na fita simples e/ou dupla do DNA de células do sangue periférico de camundongos *Swiss*, foi utilizada a versão alcalina do ensaio cometa segundo Singh (1988). Camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, livres de tumor foram tratados por 24 e 48 horas na ausência ou presença dos complexos de RuMet e RuTrp, conforme esquema de tratamento mostrado na Tabela 2. Após tratamento, uma amostra de 10 a 15 µL de sangue periférico foi coletada na veia caudal lateral dos camundongos. Posteriormente, a suspensão de células do sangue periférico foi homogeneizada com 100 µL de agarose de baixo ponto de

fusão (0,5%), e então colocadas em lâminas pré-cobertas com agarose padrão (1,5%). Em seguida, as lâminas foram refrigeradas a 4 °C por 10 min e, posteriormente, imersas em solução de lise (2,4M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris, 10% DMSO e 1% Triton-X, pH 10) por 24 horas. Após etapa de lise, as lâminas foram transferidas para cuba de eletroforese contendo tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH ~13), em corrente de 25V, 300mA. Na etapa seguinte, as lâminas foram retiradas da cuba de eletroforese e submetidas a uma solução de neutralização (0,4M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 min, após a secagem, elas foram então fixadas em etanol 100% por 3 min. A coloração das lâminas foi realizada com brometo de etídio (20 µg mL⁻¹) e analisadas imediatamente após coloração. As lâminas foram preparadas em duplicata e 100 nucleóides foram analisados (50 nucleóides de cada lâmina) utilizando microscópio de fluorescência (Leica, Wetzlar, Alemanha) com interface a um computador. As imagens obtidas foram analisadas em sistema de análise de imagem do *software* CometScore 15 de acordo com a migração dos fragmentos, os seguintes parâmetros foram considerados: comprimento do cometa, diâmetro da cabeça e comprimento da cauda.

Tabela 2. Grupos de tratamento para realização do ensaio cometa.

Grupos (n=3)		Tratamentos
Machos	Fêmeas	
Controle	Controle	Solução Salina
RuMet 2 mg/Kg	RuMet 2 mg/Kg	RuMet 2 mg/Kg
RuMet 6 mg/Kg	RuMet 6 mg/Kg	RuMet 6 mg/Kg
RuTrp 2 mg/Kg	RuTrp 2 mg/Kg	RuTrp 2 mg/Kg
RuTrp 6 mg/Kg	RuTrp 6 mg/Kg	RuTrp 6 mg/Kg
Cisplatina 2 mg/Kg	Cisplatina 2 mg/Kg	Cisplatina 2 mg/Kg

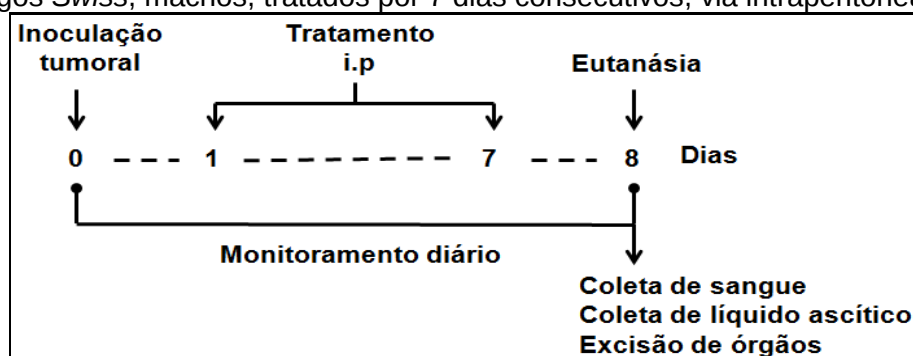
A partir destes parâmetros foi determinada a classe de dano ao DNA como proposto por Kobayashi et al. (1995): classe 0 (nenhum dano), classe 1 (dano pequeno, comprimento da cauda menor do que o diâmetro da cabeça), classe 2 (dano médio, comprimento da cauda uma ou duas vezes o diâmetro da cabeça), classe 3 (dano significativo, comprimento da cauda maior que duas ou três vezes o diâmetro da cabeça), classe 4 (dano significativo, comprimento da cauda maior que três vezes o diâmetro da cabeça). Um valor de índice de dano (ID) foi atribuído a

cada um dos nucleóides de acordo com a sua classe, a partir da seguinte fórmula: $ID = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$, onde n = número de nucleóides de cada classe analisada. Desta forma, o índice de dano para 100 nucleóides variou de 0 (completamente sem danos: 100×0) a 400 (totalmente danificadas: 100×4) (TICE et al., 2000).

5.6.5 Avaliação antitumoral

Para determinação do potencial antitumoral dos complexos de RuMet e RuTrp utilizando-se duas doses (2 e 6 mg/Kg/dia). A figura 4 mostra o delineamento experimental.

Figura 4. Delineamento experimental para avaliação do potencial antitumoral de complexos de rutênio(II)/aminoácido em células do tumor ascítico de Ehrlich transplantadas em camundongos Swiss, machos, tratados por 7 dias consecutivos, via intraperitoneal.



Os animais foram divididos em grupos ($n=8$) (Tabela 3) e tratados por 7 dias consecutivos (1 vez ao dia) v.ip. Todos os grupos experimentais tiveram inoculado o TAE (Tabela 3). O dia da inoculação do TAE foi considerado dia zero, sendo o tratamento iniciado após 24 horas de inoculação das células tumorais.

Os animais foram monitorados nas primeiras 4 horas e diariamente verificando a presença ou não de alterações respiratórias, digestivas e neurológicas como descrito, a seguir, no item 5.6.6.

A atividade antitumoral foi determinada com base no percentual de inibição do crescimento tumoral. Dois métodos distintos de avaliação foram utilizados para obtenção dos valores percentuais de inibição do crescimento tumoral: 1) percentual de inibição do crescimento tumoral pela variação da circunferência abdominal

(GUPTA et al., 2000) e 2) percentual da inibição do crescimento tumoral pela variação do peso corporal (SUNIL et al., 2013).

Tabela 3. Grupos de tratamento para avaliação antitumoral.

Grupos (n=8)	Tratamentos
Tumor	TAE + Solução Salina
Veículo	TAE + DMSO 10%
RuMet 2 mg/Kg	TAE + RuMet 2 mg/Kg/dia
RuMet 6 mg/Kg	TAE + RuMet 6 mg/Kg/dia
RuTrp 2 mg/Kg	TAE + RuTrp 2 mg/Kg/dia
RuTrp 6 mg/Kg	TAE + RuTrp 6 mg/Kg/dia
Cisplatina 2 mg/Kg	TAE + Cisplatina 2 mg/Kg/dia

A atividade antitumoral foi classificada de acordo com percentual de inibição do crescimento tumoral em: ausente (quando o percentual de inibição tumoral for igual a 0), discreta (quando o percentual de inibição tumoral for $\leq 25\%$), moderada (quando o percentual de inibição tumoral for $\geq 26 - 50\%$) e elevada (quando o percentual de inibição tumoral for $\geq 51\%$).

No 8º dia, os animais foram eutanasiados com solução de 0,2 mL/100g de quetamina (100 mg mL⁻¹) (Dopalen, Vetbrands Brasil LTDA) e xilazina (100 mg mL⁻¹) (Dorcipec, Vallée S/A). O sangue foi coletado por punção cardíaca para análise de hemograma e bioquímica. O líquido da cavidade peritoneal foi coletado após lavagem da cavidade abdominal com solução de PBS 1x (LGC, LabTrade, Brasil) para posterior análise de viabilidade celular por Citometria de fluxo. O fígado, baço, rins, pulmões e coração, foram excisados e avaliados, macroscopicamente, quanto à coloração, tamanho e presença de focos hemorrágicos. Posteriormente, os órgãos foram pesados em balança eletrônica de precisão para determinar o peso relativo dos órgãos de acordo com a seguinte fórmula: índice relativo do órgão (mg/g)= peso do órgão (mg) / peso do respectivo animal (g) (ZHENG et al., 2011).

5.6.5.1 Inibição do crescimento tumoral pela variação da circunferência abdominal

Para determinar o percentual de inibição tumoral foram realizadas mensurações diárias da circunferência abdominal com o uso de fita métrica (Figura 5). A variação da medida da circunferência abdominal foi calculada pela diferença entre a medida final (após o oitavo dias de tratamento) e a medida inicial (medida do dia zero). Os resultados foram expressos em centímetros.

Figura 5. Mensuração da circunferência abdominal de camundongos.



A partir dos dados obtidos pela variação da medida da circunferência abdominal foi determinado o percentual de inibição do crescimento tumoral, conforme fórmula abaixo (GUPTA et al., 2000): % Inibição do Crescimento Tumoral = $(\Delta CA_{\text{grupo tumor}} - \Delta CA_{\text{grupo tratado}}) / \Delta CA_{\text{grupo tumor}} \times 100$, onde ΔCA = variação da circunferência abdominal.

5.6.5.2 Inibição do crescimento tumoral pela variação do peso corporal

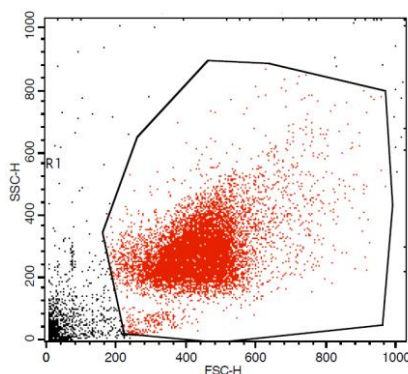
A evolução do peso corporal foi registrada diariamente pesando os camundongos em balança eletrônica de precisão. A variação do peso corporal foi obtida pela diferença entre a medida final (após o oitavo dia de tratamento) e a medida inicial (medida do dia zero). Os resultados foram expressos em gramas.

A partir destes dados determinou-se o percentual de inibição do crescimento tumoral como proposto por Eckhardt et al., 1982 *apud* Sunil et al., 2013, de acordo com a expressão descrita: % Inibição do Crescimento Tumoral = $(\Delta BW_{\text{grupo tumor}} - \Delta BW_{\text{grupo tratado}}) / \Delta BW_{\text{grupo tumor}} \times 100$, onde ΔBW = variação do peso corporal.

5.6.5.3 Análise da viabilidade, apoptose e necrose celular pela técnica de Anexina V/FITC e Iodeto de Propídeo (PI) por Citometria de fluxo

Para determinar o perfil de distribuição das células do TAE foi necessário primeiramente realizar a seleção da população de interesse contida no líquido ascítico. Após coleta do líquido ascítico de camundongos transplantados com TAE as células foram lavadas com PBS 1x e quantificadas. 5×10^5 células foram ressuspensas em 500 μ L de PBS 1x para seleção da população celular de interesse por meio de análises de gráficos de densidade de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) em citômetro de fluxo (FACSCalibur™, BD Biosciences) (Figura 6).

Figura 6. Gráfico representativo de densidade de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) obtido após seleção da população de interesse por citometria de fluxo.



Após a seleção da população de TAE, da cavidade intraperitoneal, a frequência das subpopulações celulares foi obtida em gráficos bidimensionais de densidade de fluorescência de FL1/Anexina V-FITC versus FL2/PI.

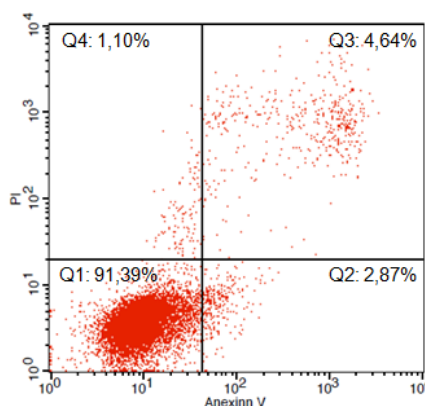
A detecção de células do TAE viáveis e mortas por apoptose ou necrose foi realizada utilizando o Kit de detecção de apoptose Anexina V-FITC/Iodeto de Propídeo (PI) (BD Bioscience) de acordo com as instruções do próprio fabricante. O procedimento de marcação por Anexina V-FITC/Iodeto de Propídeo consiste na ligação da anexina V-FITC à fosfatidilserina, na membrana das células que estão iniciando o processo apoptótico, e na ligação do iodeto de propídeo ao DNA das células no processo final da apoptose (HENRY et al., 2013).

Após quantificação, 5×10^5 células de TAE foram ressuspensas em 500 μ L de tampão de ligação. Em seguida, 2,5 μ L de anexina V-FITC e 3 μ L de PI foram

adicionados. A análise pela citometria de fluxo foi realizada após 15 minutos de coloração. A aquisição de dados e análise foram feitas no citômetro de fluxo (FACSCalibur™, BD Biosciences) adquirindo 10.000 eventos/amostra, utilizando o *software* CellQuest.

Os critérios de classificação das células em: viáveis, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose; consistem na positividade dos corantes anexina V/FITC e PI: células viáveis não apresentam marcação (An-)/(PI-), células em apoptose inicial apresentam marcação positiva somente para Anexina-V (An+)/(PI-), células em apoptose tardia apresentam dupla marcação de Anexina V e PI (An+)/(PI+) e células em necrose apresentam marcação positiva somente para PI (An-)/(PI+) (Figura 7).

Figura 7. Gráfico representativo bidimensional de densidade de FL1/Anexina V/FITC *versus* FL2/PI utilizado para quantificar o percentual de células viáveis, apoptóticas e necróticas.



Os quatro quadrantes representam o perfil de distribuição das células de acordo com a positividade dos corantes: Q1 representa células viáveis, Q2 representa células em apoptose inicial, Q3 representa células em apoptose tardia e Q4 representa células em necrose.

5.6.5.4 Avaliações hematológicas e bioquímicas

Análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Araújo Jorge em Goiânia/Goiás sob a supervisão do Dr. Vicente Raul Chavarria Irusta. Estas análises possibilitam avaliar possíveis mudanças hematológicas, principalmente nas concentrações de leucócitos, plaquetas e hemácias, assim como, função renal e hepática que podem estar relacionadas aos possíveis efeitos tóxicos do tratamento com complexos de RuMet e RuTrp.

Para obtenção dos resultados hematológicos, o sangue periférico foi coletado com seringa sem anticoagulante por punção cardíaca, e armazenado em tubos contendo solução de EDTA 10%. As amostras foram armazenadas e transportadas sob refrigeração até o momento de sua análise. Os valores para leucócitos, hemácias, hemoglobinas, hematócrito, plaquetas, linfócitos, volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH) e concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) foram determinados após a coleta, no intervalo máximo de 3 horas, através do analisador automático Beckman Coulter T-890.

Para a análise bioquímica, amostras de sangue periférico foram armazenadas em tubos sem adição de anticoagulante. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos para obtenção do soro. O soro foi congelado a -20 °C por 24 horas e, em seguida, determinados ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST/TGO), alanina aminotransferase (ALT/TGP) e DHL em aparelho automático VitalabFlexor XL (Vital Scientific).

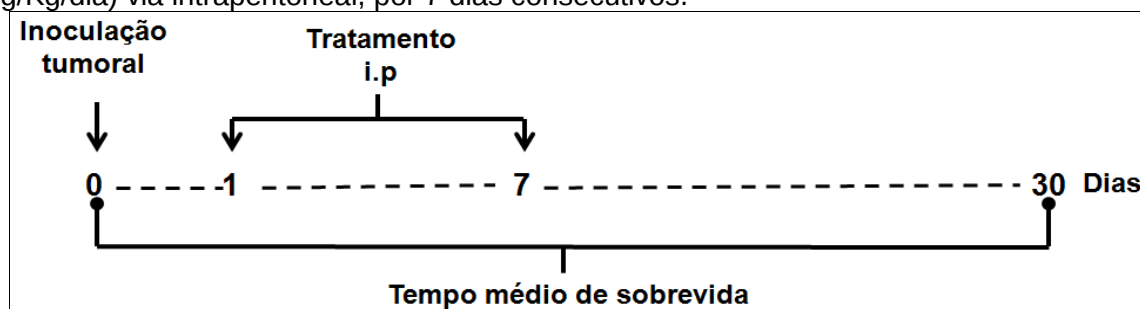
5.6.6 Screening hipocrático

Procedeu-se a observação dos animais experimentais após tratamento nos tempos de 30 minutos, 1h, 2h, 4h e diariamente até o final do experimento, com o objetivo de identificar possíveis alterações dos parâmetros descritos: estado de consciência e disposição (aparência geral, frênilo vocal, irritabilidade); coordenação motora (atividade geral, resposta ao toque, resposta ao pinçamento da cauda, contorção abdominal, marcha, reflexo de endireitamento); tônus muscular (tônus das patas, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia); reflexos (auricular e corneal); atividade do sistema nervoso central (tremores, convulsões, estimulações, fenômeno de “Straub”, sedação); atividade do sistema nervoso autônomo (lacrimação, ptoses, piloereção, hipotermia, respiração) (MALONE & ROBICHAUD, 1962). Sendo as alterações descritas como normal, ausente, discretamente alterado, moderadamente alterado e acentuadamente alterado.

5.6.7 Avaliação da sobrevida

Os dados de sobrevida permitem, juntamente com a avaliação antitumoral, determinar a eficácia terapêutica dos complexos de RuMet e RuTrp. A sobrevida foi determinada seguindo o mesmo procedimento experimental de tratamento descrito na Tabela 3 do item 5.6.5. Os grupos de animais (n=8) foram mantidos por até 30 dias (Figura 8), a contar do dia de inoculação tumoral, sobre observação diária para registro de morte. A partir do registro de morte foi calculado o tempo médio de sobrevida (TMS) e o aumento percentual do tempo médio de sobrevida (%ILS), de acordo com as fórmulas descritas: $\%ILS = ((TMS \text{ do grupo tratado} - TMS \text{ do grupo controle}) / TMS \text{ do grupo controle}) \times 100$, onde $TMS = \sum \text{tempo de sobrevida (dias) de cada animal no grupo} / \text{número total de animais}$ (SATHISHA, REVANKAR, PAI, 2008; SUNIL et al., 2013). Aumento no %ILS $\geq 25\%$ sobre o grupo tumor foi considerado como resposta antitumoral eficaz. O peso corporal dos animais foi monitorado 3 vezes por semana durante o procedimento experimental.

Figura 8. Delineamento experimental para avaliar sobrevida de camundongos *Swiss* tratados com os complexos de RuMet e RuTrp em diferentes doses (2 mg/Kg/dia e 6 mg/Kg/dia) via intraperitoneal, por 7 dias consecutivos.



5.6.8 Análise estatística

Para as amostras não paramétricas foi empregado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de comparação múltipla de Dunns. Os resultados das amostras não paramétricas foram expressos em mediana. As amostras paramétricas foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey ou Bonferroni. Os resultados das amostras paramétricas foram expressos através de média. Para a avaliação de sobrevida foi utilizado o teste de Kaplan-Meier. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software *GraphPad Prism*® versão 5.0 para *Windows*. Considerando-se um nível de significância de 5%.

6. RESULTADOS

6.1 Atividade citotóxica e índice de seletividade

A avaliação da atividade citotóxica dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos foi determinada através dos valores de IC_{50} obtidos pelo método do MTT após 48 horas de exposição.

Os valores de IC_{50} (Tabela 4) dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos obtidos para a célula de L929 variaram de 21,18 a 97,75 μM e para as células do TAE variam de 8,70 a 90,41 μM . Os resultados mostram que os complexos RuGly, RuMet e RuTrp são mais citotóxicos para as células do TAE com valores de $IC_{50} \leq 50 \mu M$.

Tabela 4. Valores de IC_{50} de complexos de rutênio(II)/aminoácidos obtidos após 48 horas de exposição das células não tumoral (L929) e tumoral (células do TAE) em diferentes concentrações (0,2 a 200 μM) pelo teste de MTT.

Composto	IC_{50} (μM)		IS ^[3]
	L929 ^[1]	TAE ^[2]	
RuAla	97,75 $\pm$ 8,99	64,40 $\pm$ 2,51	1,52
RuGly	51,93 $\pm$ 1,10	31,20 $\pm$ 3,21	1,66
RuMet	27,53 $\pm$ 0,83	10,06 $\pm$ 2,27	2,74
RuSer	88,03 $\pm$ 6,65	90,41 $\pm$ 3,68	0,97
RuTrp	21,28 $\pm$ 3,05	8,70 $\pm$ 3,09	2,45
Cisplatina	29,05 $\pm$ 1,88	60,13 $\pm$ 6,94	0,48

Os dados mostram a média $\pm$ desvio padrão da média de três experimentos independentes.

^[1]fibroblasto murino; ^[2]tumor ascítico de Ehrlich; ^[3]índice de seletividade.

Todos os complexos de rutênio(II)/aminoácidos, com exceção do complexo RuSer, apresentaram valores de IC_{50} para as células do TAE inferiores aos valores obtidos para a célula de L929, evidenciando seu potencial seletivo. Contudo, somente os complexos de RuMet e RuTrp apresentaram significativo IS: 2,74 e 2,45, respectivamente (Tabela 4). Com base nestes resultados *in vitro* os complexos de RuMet e RuTrp demonstraram maior potencial antitumoral.

A cisplatina apresentou IC_{50} para a célula L929 de 29,05 $\pm$ 1,88 μM e para as células do TAE de 60,13 $\pm$ 6,94 μM e um IS inferior a 1 (Tabela 4).

6.2 Estimativa de DL₅₀

Com base nos resultados de IC₅₀ para a célula de L929 a estimativa de DL₅₀ dos complexos de RuMet e RuTrp foi calculada (Tabela 5). Estimou-se que *in vivo* os complexos RuMet e RuTrp têm DL₅₀ em doses superiores a 1000 mg/Kg de peso corporal do animal.

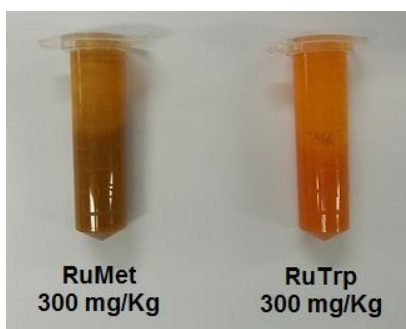
Tabela 5. Estimativa da DL₅₀ *in vivo* de complexos de rutênio(II)/aminoácidos a partir de valores de IC₅₀ obtidos após 48 horas de exposição das células não tumoral (L929) pelo teste de MTT.

Composto	IC ₅₀ (μ M)	Estimativa de DL ₅₀ (mg/Kg)
RuMet	27,53 $\pm$ 0,83	1175,62
RuTrp	21,28 $\pm$ 3,05	1182,39

6.3 Teste de Toxicidade Oral Aguda

Os complexos de RuMet e RuTrp foram testados seguindo as recomendações do *Guideline* 423. A primeira dose administrada v.o. nos camundongos fêmeas (n=3, para cada complexo) foi de 300 mg/Kg dos complexos de RuMet e RuTrp. A suspensão obtida dos complexos de RuMet e RuTrp apresentavam aspecto homogêneo e cremoso (Figura 9).

Figura 9. Aspecto visual da suspensão obtida dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos.



Após a administração dos complexos de RuMet e RuTrp os camundongos foram observados para identificar possíveis alterações comportamentais, sinais indicativos de toxicidade e mortalidade.

Os animais tratados com o complexo de RuMet (300 mg/Kg) não apresentaram alteração comportamental, sinal de toxicidade ou morte durante os 14 dias de observação (Tabela 6).

Tabela 6. Efeitos dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos após administração v.o. em camundongos *Swiss* fêmeas seguindo o *Guideline* 423 da OECD.

Grupo n=3	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Δ peso (g)	Morte
Controle	27,4 ± 1,6	31,1 ± 1,6	3,6	0
RuMet 300 mg/Kg	23,4 ± 0,4	24,6 ± 0,6	1,2	0
RuMet 600 mg/Kg	28,1 ± 0,3	31,3 ± 1,1	3,3	0
RuTrp 300 mg/Kg	24,2 ± 0,6	25,9 ± 0,8	1,7	1
RuTrp 600 mg/Kg	30,3 ± 0,5	32,8 ± 0,7	2,8	0

O experimento foi realizado em duplicata. Os dados mostram a média ± desvio padrão, $p > 0,05$.

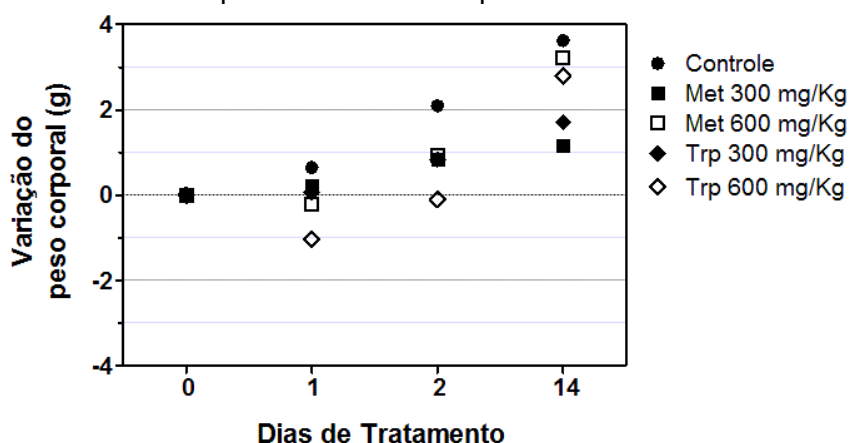
Um animal (n=1) tratado com o complexo de RuTrp (300 mg/Kg) apresentou sinais acentuadamente alterados de comportamento e toxicidade após 24 horas de tratamento. A eutanásia deste animal foi realizada evidenciando erro no procedimento experimental, o qual ocasionou perfuração do esôfago. Assim, as observações de toxicidade não estavam relacionadas ao tratamento com o complexo de RuTrp na dose de 300 mg/Kg. Os demais animais tratados com esse complexo não revelaram sinais de toxicidade e morte durante os 14 dias experimentais.

A partir dos dados obtidos após 24 horas de administração dos complexos de RuMet e RuTrp o *Guideline* 423 preconiza repetição da mesma dose em mais 3 animais. Novamente, não foi observada nenhuma alteração comportamental, sinais de toxicidade ou morte. Assim, uma dose superior dos complexos de RuMet e RuTrp foi administrada seguindo os mesmos procedimentos experimentais. O *Guideline* 423 preconiza testar a dose de 2000 mg/Kg, porém devido a dificuldade de obtenção da suspensão dos complexos de RuMet e RuTrp, uma dose 2 vezes maior que a anterior foi testada (600 mg/Kg). As suspensões obtidas dos complexos de RuMet e RuTrp apresentavam aspecto homogêneo e cremoso, semelhante ao observado na suspensão de 300 mg/Kg.

Os animais tratados com complexo de RuMet e RuTrp na dose de 600 mg/Kg não apresentaram sinais de toxicidade ou morte durante 14 dias de

observação (Tabela 6). Nas primeiras 24 horas ambos os tratamentos provocaram perda de peso, representando um valor de variação relativa do peso corporal dos animais baixo, com recuperação após 48 horas de administração dos complexos de RuMet e RuTrp, contudo estes valores não apresentaram diferença estatística com o grupo controle ($p>0,05$) (Figura 10, Tabela 6).

Figura 10. Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácido na variação do peso corporal de camundongos *Swiss* fêmeas após tratamento v.o. pelo teste de toxicidade oral aguda.



Os dados mostram à média, $p>0,05$.

Os órgãos dos animais tratados com os complexos de RuMet e RuTrp nas doses de 300 e 600 mg/Kg v.o. não apresentaram sinais de alterações macroscópicas quanto ao tamanho, volume e coloração, bem como não apresentaram pontos hemorrágicos. Os órgãos não apresentaram diferença estatística quanto ao índice do peso relativo dos órgãos em relação ao grupo controle (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácido no índice do peso relativo dos órgãos de camundongos *Swiss* fêmeas após tratamento v.o. pelo teste de toxicidade oral aguda.

Grupo n=3	Fígado (mg/g)	Rins (mg/g)	Baço (mg/g)	Coração (mg/g)	Pulmão (mg/g)
Controle	5,5 ± 0,1	1,5 ± 0,6	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,4	0,6 ± 0,3
RuMet 300 mg/Kg	5,1 ± 0,1	1,3 ± 0,7	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,4	0,5 ± 0,1
RuMet 600 mg/Kg	5,3 ± 0,4	1,4 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,1
RuTrp 300 mg/Kg	4,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,3
RuTrp 600 mg/Kg	5,8 ± 0,3	1,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2

O experimento foi realizado em duplicata. Os dados mostram a média ± desvio padrão, $p>0,05$.

6.4 Ensaio genotóxico: análise de danos à molécula de DNA

A Tabela 8 mostra o potencial genotóxico dos complexos de rutênio(II)/aminoácido em células do sangue periférico de camundongos *Swiss* machos e fêmeas submetidos à administração v.ip. após 24 e 48 horas de exposição.

Tabela 8. Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácido no DNA das células do sangue periférico de camundongos *Swiss* machos e fêmeas após 24 e 48 horas de exposição v.ip. pelo teste Cometa.

Grupo n=3	Índice de dano ao DNA			
	24 horas		48 horas	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
<i>Controle</i>	59 ± 3	62 ± 5	67 ± 8	72 ± 4
<i>RuMet 2 mg/Kg</i>	74 ± 4 ^{a*} ^{b***}	74 ± 8 ^{a**} ^{b***}	82 ± 6 ^{b***}	78 ± 3 ^{b***}
<i>RuMet 6 mg/Kg</i>	67 ± 3 ^{b***}	77 ± 5 ^{b***}	77 ± 8 ^{b***}	72 ± 3 ^{b***}
<i>RuTrp 2 mg/Kg</i>	70 ± 5 ^{b***}	69 ± 7 ^{b***}	83 ± 4 ^{b***}	81 ± 5 ^{b***}
<i>RuTrp 6 mg/Kg</i>	83 ± 7 ^{a***} ^{b***}	86 ± 8 ^{b***}	93 ± 3 ^{a**} ^{b***}	80 ± 4 ^{b***}
<i>Cisplatina 2 mg/Kg</i>	186 ± 7 ^{a***}	195 ± 6 ^{a***}	178 ± 6 ^{a***}	170 ± 20 ^{a***}

Os dados mostram média ± desvio padrão, *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001, sendo “a” em relação ao grupo controle e “b” em relação ao grupo cisplatina.

O tratamento com a cisplatina induziu dano significativo ao DNA das células de camundongos *Swiss* machos e fêmeas nos tempos testados (Figura 11).

O índice de dano ao DNA induzido pelos complexos de RuMet e RuTrp nas doses de 2 e 6 mg/Kg foram menores aos observados com o tratamento com a cisplatina apresentando diferença estatística significativa em relação ao grupo cisplatina (Tabela 8).

Os tratamentos com os complexos RuMet e RuTrp apresentaram valores de índice de dano ao DNA semelhantes aos valores de índice de dano ao DNA obtidos para o grupo controle (Tabela 8). O complexo de RuMet na dose de 2 mg/Kg apresentou índice de dano significativo ao DNA das células do sangue periférico de camundongos *Swiss* machos e fêmeas após 24 horas de exposição em relação ao grupo controle (Tabela 8).

O complexo de RuTrp na dose de 6 mg/Kg induziu dano ao DNA das células do sangue periférico nos camundongos machos após 24 e 48 horas de exposição

(ID= 83 ± 7 , $p < 0,001$ e ID= 93 ± 3 , $p < 0,01$, respectivamente) em relação ao grupo controle de 24 e 48 horas (ID = 59 ± 3 e ID= 67 ± 8 , respectivamente) (Tabela 8).

6.5 Avaliação antitumoral e sobrevida após tratamento com complexos de rutênio(II)/aminoácido

Camundongos *Swiss* machos portadores do TAE foram tratados por 7 dias consecutivos (1 vez ao dia) v.ip., com complexos de RuMet e RuTrp nas doses de 2 e 6 mg/Kg/dia para determinar o potencial antitumoral.

A análise de inibição do crescimento tumoral pela variação da circunferência abdominal após administração dos complexos de RuMet e RuTrp nas doses testadas revelou atividade antitumoral elevada destes complexos contra o TAE (Tabela 9).

Tabela 9. Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácido na inibição do crescimento das células do TAE inoculadas em camundongos *Swiss* machos pela variação da circunferência, após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.

Grupo n=8	Δ Circunferência abdominal (cm)	Inibição tumoral (%)
Tumor	$2,1 \pm 0,2$	--
Veículo	$2,0 \pm 0,2$	--
RuMet 2 mg/Kg	$0,5 \pm 0,3$ ^{a** b**}	$68,6 \pm 15,0$ ^{b***}
RuMet 6 mg/Kg	$0,7 \pm 0,3$ ^{a** b**}	$68,0 \pm 15,0$ ^{b***}
RuTrp 2 mg/Kg	$0,9 \pm 0,2$ ^{a* b*}	$65,4 \pm 10,0$ ^{b**}
RuTrp 6 mg/Kg	$0,3 \pm 0,1$ ^{a*** b***}	$84,4 \pm 7,7$ ^{b***}
Cisplatina 2 mg/Kg	$0,2 \pm 0,1$ ^{a*** b***}	$87,7 \pm 5,2$ ^{b***}

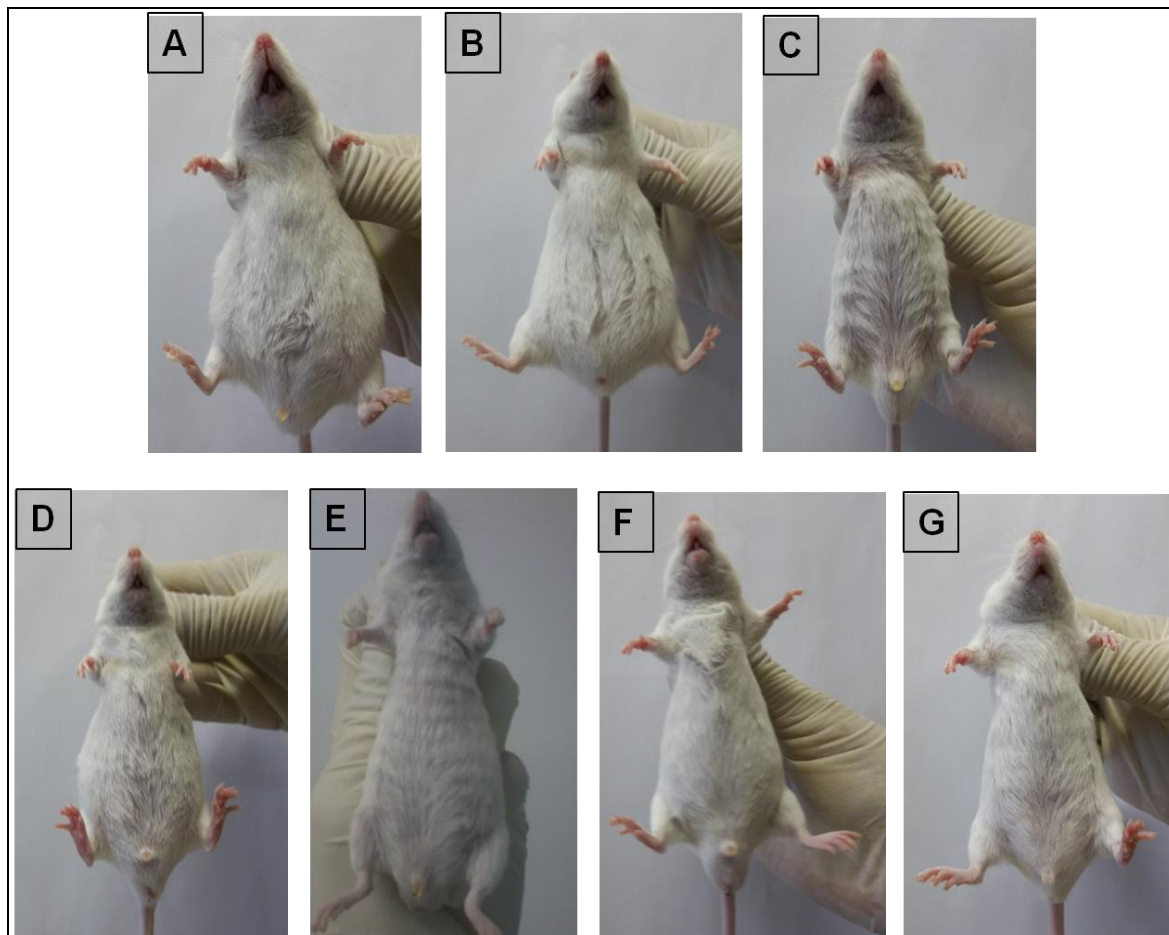
Os dados mostram média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, sendo “a” em relação ao grupo tumor e “b” em relação ao grupo veículo.

Os dados de variação da circunferência abdominal em relação ao dia 0 e dia 8 do período de tratamento mostram que os valores de circunferência abdominal dos grupos tumor ($2,1 \pm 0,2$ cm, n=8) e veículo ($2,0 \pm 0,2$ cm, n=8) não apresentaram diferença estatística entre si (Tabela 9).

A administração dos complexos de RuMet e RuTrp nas duas doses de tratamento (2 e 6 mg/Kg/dia) resultou em variação da circunferência abdominal inferior a 1 cm, enquanto os grupos controle tumor e veículo tiveram uma variação

da circunferência abdominal superior a 2 cm (Tabela 9, Figura 11).

Figura 11. Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácido na circunferência abdominal de camundongos *Swiss* machos, após sete dias de tratamento consecutivo v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.



(A) grupo tumor, (B) grupo veículo, (C) grupo cisplatina 2 mg/Kg/dia, (D) RuMet 2 mg/Kg/dia, (E) RuMet 6 mg/Kg/dia, (F) RuTrp 2 mg/Kg/dia e (G) RuTrp 6 mg/Kg/dia.

O complexo de RuMet na dose de 2 e 6 mg/Kg/dia demonstrou ter atividade antitumoral elevada, inibindo o crescimento tumoral em $68,6 \pm 15\%$ ($n=8$, $p<0,001$) e $68,07 \pm 15,0\%$ ($n=8$, $p<0,001$), respectivamente (Tabela 9). O complexo de RuTrp também apresentou atividade antitumoral elevada, inibindo o crescimento das células do TAE de maneira dose-dependente. Na dose de 2 mg/Kg/dia, a inibição do crescimento tumoral foi de $65,4 \pm 10\%$ ($n=8$, $p<0,01$), enquanto na dose de 6 mg/Kg/dia a inibição observada foi de $84,4 \pm 7,7\%$ ($n=8$, $p<0,001$).

O tratamento com a cisplatina na dose de 2 mg/Kg/dia inibiu o crescimento das células do TAE em $87,7 \pm 5,2\%$ ($n=8$, $p<0,001$) (Tabela 9).

A partir dos dados obtidos diariamente de peso corporal obteve-se a

variação do peso corporal. A análise de inibição do crescimento tumoral pela variação do peso corporal revelou atividade antitumoral moderada à elevada contra o TAE após administração dos complexos de RuMet e RuTrp.

Os animais do grupo tumor tiveram variação do peso corporal de $10,6 \pm 1,0$ g (n=8) e os animais do grupo veículo apresentaram variação do peso corporal de $8,3 \pm 0,9$ g (n=8), não representando diferença estatística entre si ($p > 0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10. Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácido na inibição do crescimento das células do TAE inoculadas em camundongos Swiss machos pela variação do peso corporal, após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.

Grupo n=8	Δ Peso corporal (g)	Inibição tumoral (%)
Tumor	$10,6 \pm 1,0$	--
Veículo	$8,3 \pm 0,9$	$9,1 \pm 3,4$
RuMet 2 mg/Kg	$5,0 \pm 0,8$ ^{a**}	$52,4 \pm 7,9$ ^{b**}
RuMet 6 mg/Kg	$5,0 \pm 0,9$ ^{a***}	$50,5 \pm 9,0$ ^{b*}
RuTrp 2 mg/Kg	$6,1 \pm 0,6$ ^{a*}	$47,7 \pm 4,7$ ^{b*}
RuTrp 6 mg/Kg	$3,7 \pm 0,9$ ^{a***}	$74,6 \pm 6,4$ ^{b***}
Cisplatina 2 mg/Kg	$3,9 \pm 0,4$ ^{a***}	$62,8 \pm 4,1$ ^{b*}

Os dados mostram média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, sendo “a” em relação ao grupo tumor e “b” em relação ao grupo veículo.

Os tratamentos com o complexo de RuMet nas doses de 2 e 6 mg/Kg/dia resultaram em variação do peso corporal de $5,0 \pm 0,8$ g (n=8, $p < 0,01$) e $5,00 \pm 0,92$ g (n=8, $p < 0,001$), respectivamente, com diferença estatística em relação ao grupo tumor (Tabela 10).

O tratamento com o complexo de RuTrp 2 mg/Kg/dia causou nos animais variação do peso corporal dos animais de $6,1 \pm 0,6$ g (n=8, $p < 0,05$) com diferença estatística em relação ao grupo tumor e o complexo de RuTrp na dose de 6 mg/Kg/dia causou variação do peso corporal de $3,7 \pm 0,9$ g (n=8) com diferença estatística em relação ao grupo tumor (Tabela 10).

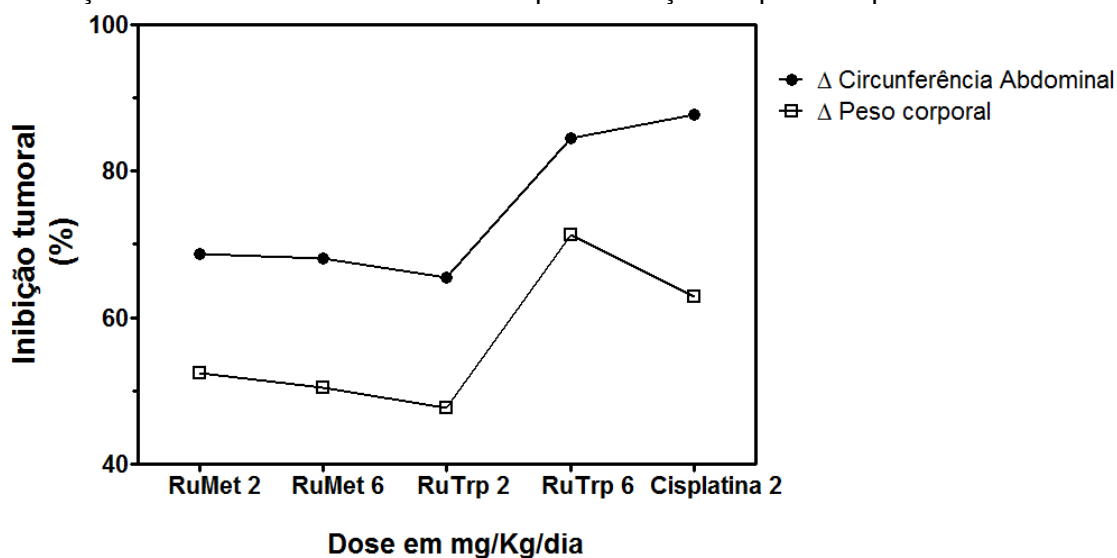
O grupo veículo demonstra discreta atividade antitumoral ($9,1 \pm 3,4$ %, n=8). Contudo os tratamentos com os complexos de RuMet e RuTrp nas diferentes doses apresentam atividade antitumoral moderada à elevada. Na dose de 2 mg/Kg/dia o RuMet inibiu o crescimento tumoral em $52,4 \pm 7,9$ % (n=8, $p < 0,01$) e o RuMet na

dose de 6 mg/Kg/dia teve inibição tumoral de $50,5 \pm 9,0\%$ ($n=8$, $p<0,05$). O complexo de RuTrp teve inibição tumoral moderada, na dose de 2 mg/Kg/dia o percentual de inibição foi de $47,7 \pm 4,7\%$ ($n=8$, $p<0,05$) e na dose de 6 mg/Kg/dia a inibição do crescimento das células do TAE foi elevada ($74,6 \pm 6,4\%$, $n=8$, $p<0,001$) (Tabela 10).

A cisplatina 2 mg/Kg/dia apresenta atividade antitumoral elevada com inibição do crescimento das células do TAE em $62,8 \pm 4,1\%$ ($n=8$, $p<0,01$) (Tabela 10).

Os dados de inibição tumoral obtidos pela variação da circunferência abdominal e pela variação do peso corporal demonstram atividade antitumoral moderada à elevada dos complexos de RuMet e RuTrp nas diferentes doses (2 e 6 mg/Kg/dia). Os dois métodos empregados para determinar o percentual de inibição tumoral não apresentaram diferença estatística para nenhum dos resultados obtido ($p>0,05$) (Figura 12).

Figura 12. Comparação da atividade antitumoral dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos pela variação da circunferência abdominal e pela variação do peso corporal.



Os dados mostram à média ($p>0,05$).

6.5.1 Perfil de viabilidade e morte celular

O perfil de viabilidade e morte das células do TAE após tratamento com os complexos de RuMet e RuTrp (2 e 6 mg/Kg/dia) foi determinado pela técnica de Anexina V/FITC e PI por Citometria de fluxo.

Os animais tratados com os complexos de RuMet e RuTrp nas doses de 2 e 6 mg/Kg/dia tiveram o percentual de células viáveis diminuído em relação aos animais do grupo tumor e veículo (Tabela 11).

Tabela 11. Efeitos dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos na viabilidade das células do TAE retiradas da cavidade intraperitoneal de camundongos Swiss após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.

Grupo n=8	% de células do TAE	
	Viáveis	Mortas
Tumor	91,2 ± 0,6	8,7 ± 0,6
Veículo	91,2 ± 0,8	8,8 ± 0,8
RuMet 2 mg/Kg	75,6 ± 6,0 ^{a*** b***}	24,4 ± 6,0 ^{a*** b***}
RuMet 6 mg/Kg	83,9 ± 3,4 ^{a** b**}	16,1 ± 3,4 ^{a** b**}
RuTrp 2 mg/Kg	84,4 ± 1,7 ^{a* b*}	15,5 ± 1,7 ^{a* b*}
RuTrp 6 mg/Kg	84,8 ± 1,2	13,8 ± 1,2
Cisplatina 2 mg/Kg	78,0 ± 2,5 ^{a*** b***}	21,9 ± 2,5 ^{a*** b***}

Os dados mostram média ± erro padrão da média, *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001, sendo “a” em relação ao grupo tumor e “b” em relação ao grupo veículo.

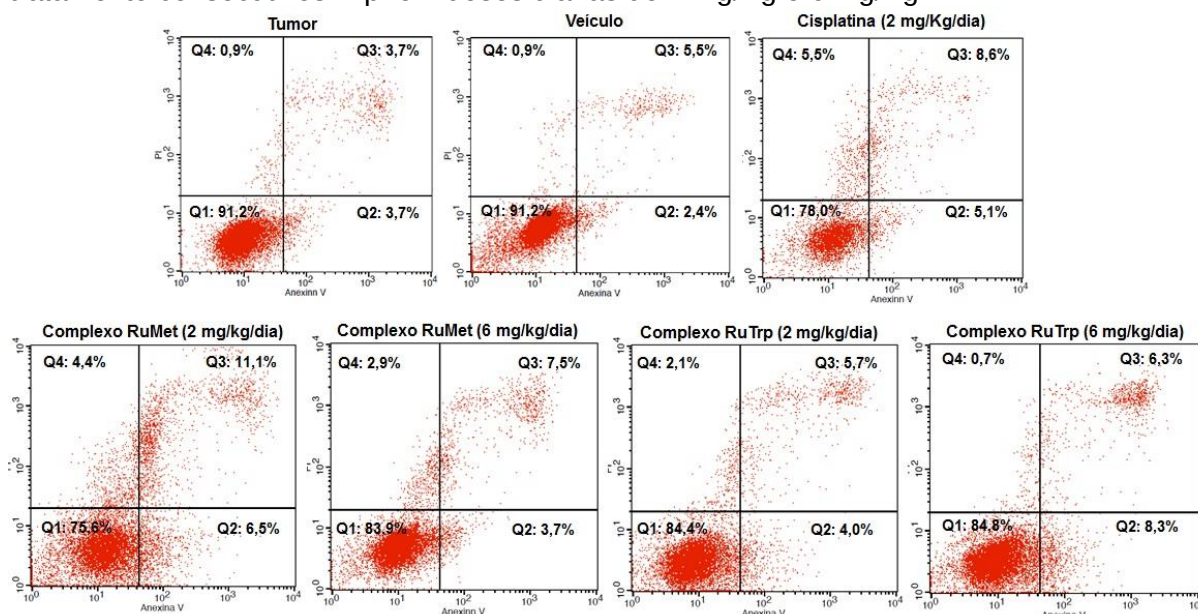
Os animais do grupo tumor e veículo apresentam um percentual de células viáveis de aproximadamente 91%, os grupos que receberam complexos de RuMet e RuTrp (2 e 6 mg/Kg/dia) apresentaram percentual de células viáveis variando entre 75,6 a 84,8%, confirmando seu efeito citotóxico nas células do TAE. Os animais tratados com a cisplatina 2 mg/Kg/dia, também, tiveram o percentual de células do TAE reduzido (78%).

Com a redução do percentual de células viáveis após tratamento com os complexos de RuMet e RuTrp (2 e 6 mg/Kg/dia), observou-se, consequentemente, aumento percentual de células mortas (Tabela 11). Com isso, foi investigado pela técnica de Anexina V/FITC e PI o tipo de morte celular induzida pelos complexos de RuMet e RuTrp.

Embora os valores percentuais de morte celular por apoptose inicial, apoptose tardia e necrose apresentem-se superiores aos valores percentuais dos grupos tumor e veículo (Figura 13), somente o tratamento com o complexo de RuMet 2 mg/Kg/dia induziu morte celular significativa por apoptose tardia (11,1 ± 3,1, p<0,01)

em relação ao grupo tumor. Os demais tratamentos com os complexos de RuMet e RuTrp não apresentaram aumento significativo de morte celular induzida por apoptose (inicial e/ou tardia) ou necrose. O tratamento com cisplatina 2 mg/Kg/dia induziu morte celular por apoptose tardia e necrose ($8,6 \pm 1,6\%$ e $5,5 \pm 2,2\%$, respectivamente).

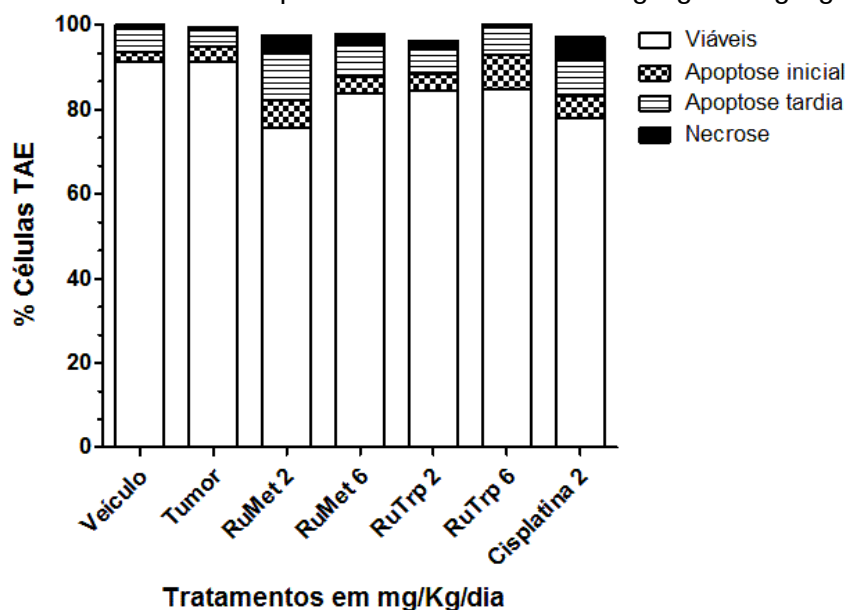
Figura 13. Efeitos dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos no tipo de morte das células do TAE retiradas da cavidade intraperitoneal de camundongos Swiss após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.



Os dados mostram média. Q1 representa células viáveis (Anexina V- e PI-), Q2 representa células em apoptose inicial (Anexina V+ e PI-), Q3 representa células em apoptose tardia (Anexina V+ e PI+) e Q4 representa células necróticas (Anexina V- e PI+).

A Figura 14 mostra o perfil de viabilidade e morte das células do TAE para cada grupo experimental. O perfil celular determinado para os grupos tumor e veículo são semelhantes, com valores percentuais de viabilidade e morte celular próximos (Tabela 11, Figura 13). O perfil celular do grupo de animais tratados com o complexo de RuMet 2 mg/Kg/dia evidencia o percentual de viabilidade celular reduzido e o aumento no percentual de apoptose tardia. Os tratamentos com os complexos de RuMet 6 mg/Kg/dia e RuTrp 2 mg/Kg/dia mostram o aumento percentual das células em apoptose tardia. Enquanto o tratamento com o complexo de RuTrp 6 mg/Kg/dia tem um aumento percentual de células em apoptose inicial. O grupo tratado com cisplatina 2 mg/Kg/dia apresentou aumento percentual de células em apoptose e necrose.

Figura 14. Efeitos dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos no perfil de viabilidade e morte das células do TAE retiradas da cavidade intraperitoneal de camundongos *Swiss* após sete dias de tratamento consecutivos v.i.p. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.



6.5.2 Avaliação de toxicidade do tratamento antitumoral

Durante todo o período experimental foram realizadas observações após os tratamentos nos camundongos com a finalidade de detectar possíveis alterações comportamentais, neurológicas, respiratória e/ou digestivas.

Os animais tratados com complexos de RuMet e RuTrp (2 e 6 mg/Kg/dia) não apresentaram sinais de toxicidade ou alteração comportamental, uma vez que não foi observado irritabilidade, permanência dos animais recolhidos no canto da gaiola, ausência de força de agarrar, fenômeno de *Straub*, ptose palpebral, piloereção, alopecia. Não houve registro de morte durante o tratamento.

Foi constatado que no primeiro dia de tratamento, nos primeiros 30 minutos iniciais, dois animais do grupo RuMet 2 mg/Kg/dia apresentaram discreta contorção abdominal. Nos dias subsequentes tal sinal não foi observado.

Os animais tratados com a cisplatina 2 mg/Kg/dia apresentaram alopecia, diarreia e tônus muscular alterados discretamente e ataxia moderada ao longo dos 7 dias de tratamento.

6.5.2.1 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Alterações hematológicas e bioquímicas podem detectar possíveis sinais de toxicidade dos tratamentos com os complexos de RuMet e RuTrp. Os dados obtidos para os parâmetros hematológicos constam na Tabela 12 e os valores dos parâmetros bioquímicos estão demonstrados na Tabela 13.

Nenhum dos tratamentos com os complexos de RuMet e RuTrp (2 e 6 mg/Kg/dia) alteraram significativamente os valores de eritrócitos, leucócitos e linfócitos em relação aos grupos tumor e veículo.

Porém, os tratamentos com os complexos de RuMet e RuTrp na dose de 6 mg/Kg/dia alteraram estatisticamente a contagem de plaquetas (Tabela 12). O tratamento com o complexo de RuMet 6 mg/Kg/dia provocou a diminuição do número de plaquetas, enquanto o complexo de RuTrp 6 mg/Kg/dia provocou o aumento do número de plaquetas. A cisplatina 2 mg/Kg/dia diminuiu consideravelmente a contagem de plaquetas dos animais tratados (Tabela 12).

Os tratamentos com doses de 2 mg/Kg/dia dos complexos de RuMet e RuTrp, cisplatina e o complexo de RuMet 6 mg/Kg/dia aumentaram significativamente os níveis de DHL em relação a grupo tumor. Nenhum outro parâmetro bioquímico avaliado apresentou alteração estatística (Tabela 13).

Tabela 12. Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos nos parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss* após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.

Parâmetros	Grupos experimentais (mg/Kg/dia)						Cisplatina 2
	Tumor	Veículo	RuMet 2	RuMet 6	RuTrp 2	RuTrp 6	
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	5,0 ± 0,9	4,6 ± 0,4	6,7 ± 1,3	5,8 ± 0,7	8,1 ± 0,4	5,5 ± 0,8	2,1 ± 0,4
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	5,7 ± 0,5	5,2 ± 0,6	5,6 ± 0,9	4,8 ± 0,3	6,1 ± 0,6	7,5 ± 0,4	3,4 ± 0,9
Hemoglobinas (g/dL)	9,4 ± 1,0	9,4 ± 1,0	10,5 ± 1,4	8,8 ± 0,6	10,9 ± 1,0	12,5 ± 0,8	6,4 ± 1,2
Hematócrito (%)	30,2 ± 2,8	27,9 ± 3,4	30,1 ± 5,1	25,6 ± 1,8	33,0 ± 3,5	39,3 ± 2,3	17,6 ± 4,7
MVC (fL)	53,3 ± 0,2	46,7 ± 6,8	52,7 ± 0,6	53,4 ± 0,6	54,0 ± 0,5	52,4 ± 0,3	51,4 ± 0,4
MCH (pg)	17,1 ± 1,6	18,3 ± 0,2	16,2 ± 1,7	18,4 ± 0,7	18,1 ± 0,4	37,2 ± 20,7	35,0 ± 17,0
MCHC (g/dL)	32,0 ± 3,0	34,0 ± 0,6	37,2 ± 3,3	34,5 ± 1,4	33,7 ± 0,7	32,0 ± 1,3	68,7 ± 33,9
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	716,7 ± 92,4	564,8 ± 190,1	583,1 ± 73,4	334,8 ± 93,2 ^{a***}	837,6 ± 187,6	1218,7 ± 130,1 ^{a***}	279,6 ± 75,7 ^{a***}
Linfócitos (%)	65,40 ± 4,61	58,42 ± 10,72	41,13 ± 8,18	58,05 ± 5,84	51,07 ± 6,24	70,10 ± 2,86	80,65 ± 1,33

Os dados mostram média ± erro padrão da média, *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001, sendo “a” em relação ao grupo tumor.

Tabela 13. Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos nos parâmetros bioquímicos de camundongos *Swiss* após sete dias de tratamento consecutivos v.i.p. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.

Parâmetros	Grupos experimentais (mg/Kg/dia)						
	Tumor	Veículo	RuMet 2	RuMet 6	RuTrp 2	RuTrp 6	Cisplatina 2
Ureia (mg/dL)	52,5 ± 3,4	59,1 ± 5,4	51,3 ± 1,1	60,2 ± 2,7	59,0 ± 3,6	58,1 ± 4,5	56,0 ± 2,8
Creatinina (mg/dL)	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1
AST/TGO (U/L)	933,7 ± 140,7	812,3 ± 181,3	1150 ± 232	1291 ± 195	1964 ± 251	1374 ± 236	1577 ± 344
ALT/TGP (U/L)	739,2 ± 104,2	763,7 ± 73,8	139,6 ± 16,9	132,5 ± 14,4	177,0 ± 26,0	128,6 ± 22,6	181,5 ± 25,3
Proteínas (g/dL)	5,5 ± 0,3	6,4 ± 0,4	5,1 ± 0,1	5,3 ± 0,1	5,6 ± 0,4	6,3 ± 0,3	6,3 ± 0,4
Albumina (g/dL)	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,2	2,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,1
DHL (g/dL)	13000 ± 634	14702 ± 1264	16491 ± 2153 ^{a***}	15726 ± 1642 ^{a**}	21164 ± 1655 ^{a***}	13218 ± 1849	22582 ± 1912 ^{a***}

Os dados mostram média ± erro padrão da média, *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001, sendo “a” em relação ao grupo tumor.

6.5.2.2 Avaliação macroscópica dos órgãos

Após o período de tratamento, os órgãos dos animais foram excisados para avaliações macroscópicas. Nos grupos tumor e veículo não foram observados sinais de alterações macroscópicas. Os órgãos dos animais que receberam complexos de RuMet e RuTrp (2 e 6 mg/Kg/dia) não apresentaram sinais de alterações macroscópicas quanto ao tamanho, volume e coloração, bem como não apresentaram pontos hemorrágicos.

A tabela 14 mostra o índice do peso relativo dos órgãos. Não foi observada alteração no índice do peso relativo dos órgãos dos animais tratados com os complexos de RuMet e RuTrp (2 e 6 mg/Kg/dia).

Tabela 14. Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácido no índice do peso relativo dos órgãos de camundongos Swiss machos após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.

Grupo n=8	Fígado (mg/g)	Rins (mg/g)	Baço (mg/g)	Coração (mg/g)	Pulmão (mg/g)
Tumor	6,7 ± 0,2	1,5 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Veículo	6,4 ± 0,2	1,4 ± 0,5	0,8 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1
RuMet 2 mg/Kg	6,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1
RuMet 6 mg/Kg	6,7 ± 0,2	1,5 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1
RuTrp 2 mg/Kg	6,7 ± 0,2	1,6 ± 0,3	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1
RuTrp 6 mg/Kg	6,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Cisplatina 2 mg/Kg	5,8 ± 0,2^{a***}	1,4 ± 0,1	0,5 ± 0,4	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1

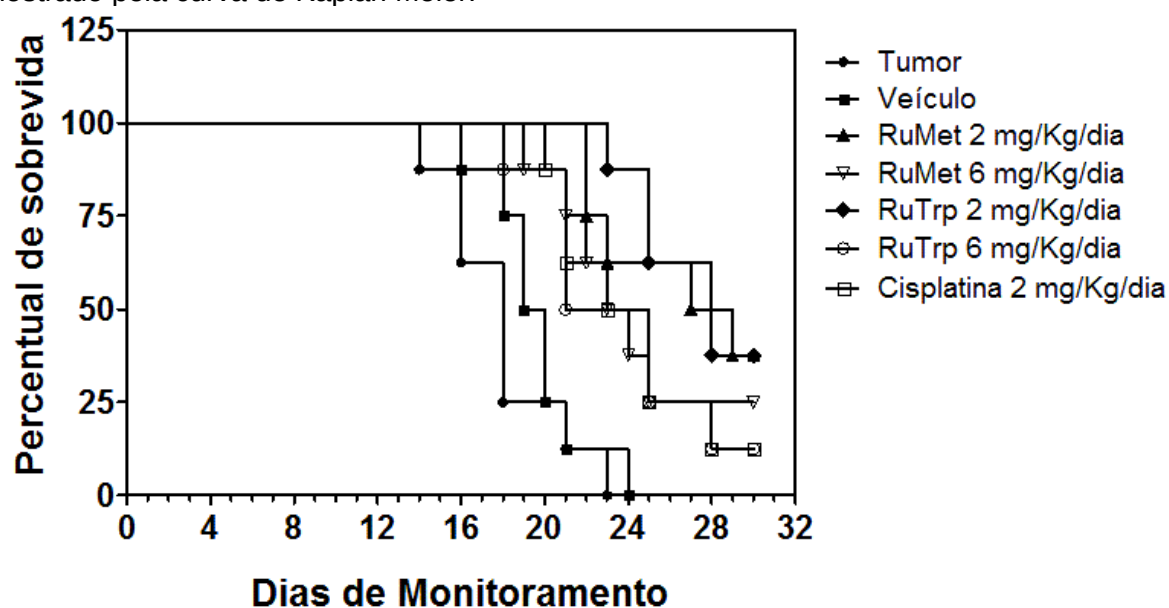
Os dados mostram média ± erro padrão da média, *p<0,05, **p<0,01 e p<0,001, sendo “a” em relação ao grupo tumor.

Os animais tratados com a cisplatina 2 mg/Kg/dia apresentaram fígado e rins esbranquiçados. O índice do peso relativo do fígado apresentou-se reduzido em relação ao grupo tumor (Tabela 4). Os demais órgãos tinham aspecto sem sinais de alterações macroscópicas.

6.5.3 Sobrevida

Camundongos *Swiss* machos portadores do TAE foram tratados por 7 dias consecutivos (1 vez ao dia) v.i.p., com complexos de RuMet e RuTrp nas doses de 2 e 6 mg/Kg/dia e monitorados por um período de 30 dias para determinar a eficácia do tratamento por meio da obtenção do tempo médio de sobrevida destes animais tratados. O tempo médio de sobrevida foi representado através da curva de Kaplan Meier (Figura 15).

Figura 15. Efeito dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos na sobrevivência animal mostrado pela curva de Kaplan Meier.



Os grupos tumor e veículo apresentaram TMS de 18 e 19,6 dias, respectivamente (Tabela 15). Os complexos RuMet e RuTrp (2 e 6 mg/Kg/dia) apresentaram TMS entre 23,6 e 27,4 dias, com diferença estatística relevante em relação aos grupos tumor e veículo (Tabela 15). Os animais tratados com a cisplatina na dose de 2 mg/Kg/dia tiveram TMS de 21 dias.

Os animais tratados com complexo de RuMet e RuTrp nas doses de 2 e 6 mg/Kg/dia apresentaram %ILS significativo ($\%ILS \geq 25\%$) (Tabela 15). Os tratamentos nas doses de 2 mg/Kg/dia dos complexos de RuMet e RuTrp tiveram %ILS dos animais tratados mais significativamente, 48 e 52%, respectivamente. O tratamento com a cisplatina 2 mg/Kg/dia não demonstrou %ILS significativo (17%) (Tabela 15).

Tabela 15. Efeitos dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos no tempo médio de sobrevida e aumento percentual do tempo médio de sobrevida de camundongos *Swiss* (machos, n=8), após sete dias de tratamento consecutivos v.ip. em doses diárias de 2 mg/Kg e 6 mg/Kg.

Grupo n=8	TMS^[1] (dias)	ILS^[2] (%)	Mortes
Tumor	18	--	8/8
Veículo	19,6	9	8/8
RuMet 2 mg/Kg	26,6 ^{a*** b***}	48 ^{b***}	5/8
RuMet 6 mg/Kg	24,3 ^{a*** b***}	35 ^{b***}	6/8
RuTrp 2 mg/Kg	27,4 ^{a*** b***}	52 ^{b***}	5/8
RuTrp 6 mg/Kg	23,6 ^{a*** b***}	31 ^{b***}	7/8
Cisplatina 2 mg/Kg	21	17 ^{b***}	7/8

*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001, sendo “a” em relação ao grupo tumor e “b” em relação ao grupo veículo. ^[1]tempo médio de sobrevida; ^[2]aumento no tempo de sobrevida.

7 DISCUSSÃO

O tratamento do câncer tem como objetivo principal a cura da doença, mas caso esse objetivo não seja possível, busca-se o tratamento paliativo com o intuito de melhorar o bem estar do paciente, com melhora dos sintomas, preservação da qualidade de vida e aumento da sobrevida. Para garantia desses objetivos estão disponíveis várias modalidades de tratamento: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia alvo dirigida, transplante de medula óssea; que de maneira isolada ou combinada, aumentam a chance de cura ou controle da doença. Contudo, o tratamento do câncer tem-se centrado principalmente na quimioterapia (CASTONGUAY et al., 2012; INCA, 2014; SAUSVILLE & LONGO, 2004).

Nos últimos anos a pesquisa de novos agentes quimioterápicos tem crescido significativamente. Sendo importante ressaltar que na avaliação do potencial terapêutico de novos compostos, pode-se considerar tão importante ou mais a comprovação de sua segurança do que de sua eficácia, uma vez que novas estratégias terapêuticas devem fornecer uma redução nos efeitos tóxicos ou colaterais em comparação com os medicamentos disponíveis para uso na prática clínica (MORAES et al., 2003).

No Brasil, para que um medicamento possa ser utilizado, faz-se necessário à concessão do registro de medicamentos novos sintéticos ou semissintéticos pela

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) após análise dos estudos de farmacotécnica, segurança e eficácia do fármaco candidato em estudos pré-clínicos e clínicos. Todavia, para que um novo composto terapêutico seja aceito e escolhido para os estudos clínicos, é necessária a realização de estudos pré-clínicos numerosos (ANVISA, 2014).

Os estudos pré-clínicos devem checar os parâmetros de segurança e eficácia, através da avaliação da toxicidade e da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, fornecendo informações sobre a farmacodinâmica, farmacocinética e a toxicologia de protótipos em desenvolvimento. Informações de segurança e eficácia obtidas nessa fase são fundamentais para estimar uma dose inicial a ser administrada em seres humanos e identificar parâmetros a serem monitorados para detectar possíveis efeitos adversos. Portanto, vale ressaltar que um grande número de protótipos não chega aos estudos clínicos, devido a riscos inaceitáveis detectados nos estudos pré-clínicos (ANVISA, 2014).

Nesse estudo, foram investigados pontos importantes e relevantes para uma futura validação de um novo agente terapêutico: avaliação da atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, potencial citotóxico seletivo para a atividade biológica *in vitro*, eficácia do tratamento, determinação de parâmetros de segurança *in vivo* (teste de toxicidade oral aguda, genotoxicidade, avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos) seguindo normativas da ANVISA.

Os complexos de rutênio(II)/aminoácidos foram sintetizados e testados, primeiramente, em células MDA-MB-231 (câncer de mama humano), onde os resultados obtidos por Almeida (2009) demonstraram promissores em relação à atividade citotóxica *in vitro* para os nove compostos testados com valores de IC₅₀ de 5 a 28,5 µM. Os resultados obtidos, neste trabalho, *in vitro* com os complexos de rutênio(II)/aminoácidos (RuAla, RuGly, RuMet, RuSer e RuTrp) demonstraram o potencial citotóxico para as células do TAE com valores de IC₅₀ de 8,70 a 90,41 µM (Tabela 4). Esses novos complexos de rutênio(II)/aminoácidos podem ser considerados protótipos promissores com potencial antitumoral *in vitro* com valores de IC₅₀ menores ou semelhantes ao relatados na literatura para os modelos tumorais de câncer de mama.

Complexos de rutênio(II) vem sendo desenvolvidos e testados contra várias linhagens tumorais *in vitro*. Scolaro e colaboradores (2005) desenvolveram nove

complexos de rutênio(II)/areno/PTA (RAPTA) e análogos e testaram em modelo de adenocarcinoma murino (TS/A). Dos nove compostos testados apenas dois compostos apresentaram potencial citotóxico relevante com valores de IC_{50} para a célula TS/A de 66 e 74 μM . Os demais compostos apresentaram valores de IC_{50} superiores a 103 μM .

Mais recentemente, complexos de rutênio(II)/pirazol foram sintetizados, e dois desses compostos apresentaram atividade contra células MCF-7 (câncer de mama humano) (IC_{50} de 32,2 e 71 μM) e outros dois não mostraram atividade citotóxica efetiva ($IC_{50} > 100 \mu M$) (DAVID et al., 2012). Outros dois complexos de rutênio(II)/tiosemicarbazona revelaram atividade contra células do TAE (IC_{50} de 19,95 e 78,8 $\mu g mL^{-1}$) (ANCHURI et al., 2012).

Com base nos valores de IC_{50} , a atividade citotóxica dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos testados em relação a cisplatina é demonstrada pela sequência a seguir conforme maior potencial citotóxico RuTrp>RuMet>RuGly>Cisplatina>RuAla>RuSer. Os complexos RuMet e RuTrp se destacaram entre os compostos testados neste trabalho, por apresentarem alto potencial citotóxico para as células do TAE com valores de IC_{50} entre 8,7 e 10,0 μM e; também, potencial seletivo para as células do TAE ($IS \geq 2,0$) (Tabela 4). Sendo que a concentração necessária para inibir o crescimento de 50% das células do TAE não foi capaz de inibir o crescimento das células não tumorais, pois foi necessária uma concentração quase 3 vezes superior para que o mesmo acontecesse nas células de L929.

Complexos de rutênio são particularmente promissores, por apresentarem menor citotoxicidade em células não tumorais quando comparados com a cisplatina (LIMA et al., 2012; OSTI et al., 2012). Neste estudo, a cisplatina foi mais citotóxica para as células de L929 ($IC_{50} = 29,05 \mu M$) do que para as células do TAE ($IC_{50} = 60,13 \mu M$), não demonstrando potencial seletivo para células tumorais (Tabela 4). Os complexos RuMet e RuTrp revelaram serem os mais promissores dentre os complexos testados *in vitro*, com elevado potencial citotóxico para as células do TAE e potencial seletivo ($IS \geq 2,0$) para as células do TAE *versus* L929.

Além dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos serem seletivos, eles demonstraram ser mais potentes que a cisplatina para as células tumorais. Nos estudos iniciais de triagem em células MDA-MB-231, câncer de mama humano, os

complexos de rutênio(II)/aminoácidos revelaram-se mais citotóxicos em comparação com a cisplatina, com valores de IC_{50} inferiores (IC_{50} de 5 a $28,5\mu M$) ao determinado para a cisplatina ($IC_{50} = 87,5\mu M$) (ALMEIDA, 2009). Os complexos de rutênio(II)/aminoácidos testados para a células de TAE, também, demonstraram ser mais potentes em relação a cisplatina ($IC_{50} = 60,1 \pm 6,9\mu M$), com exceção dos complexos de RuAla, que revelou potência semelhante ($IC_{50} = 64,4 \pm 2,5\mu M$), e RuSer que demonstrou potência inferior ($IC_{50} = 90,4 \pm 3,6\mu M$).

Diante desses resultados, os complexos de RuMet e RuTrp se apresentaram como os mais promissores e foram selecionados para a realização de triagem pré-clínica *in vivo*.

A experimentação animal tem grande importância nas pesquisas científicas, contribuindo para o desenvolvimento da ciência e tecnologia (CHORILLI, MICHELIN, SALGADO; 2007). Animais de laboratório representam um sistema experimental para a compreensão e elucidação da patogênese, imunologia, bioquímica e terapêutica dos tumores, uma vez que modelos experimentais como os camundongos são modelos acessíveis e possuem sistemas, órgãos e genes semelhantes aos humanos (KAMB, 2005).

A avaliação da toxicidade deve ser realizada com o propósito de determinar o potencial de novas substâncias e produtos de causar danos à saúde. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e rotular as substâncias de acordo como seu potencial de letalidade ou toxicidade. Contudo, além da letalidade, outros parâmetros devem ser investigados em estudos de toxicidade aguda, como sinais de toxicidade e potencial tóxico em órgãos específicos (OECD, 2000; VALADARES, 2006).

A estimativa de DL_{50} *in vitro* a partir dos dados de IC_{50} determinou que os complexos RuMet e RuTrp apresentaram valores de DL_{50} superiores a 1100 mg/Kg de peso corporal (Tabela 5). O teste de toxicidade oral aguda pelo método de classe da OECD de 2001 foi realizado, primeiramente, na dose de 300 mg/Kg. Houve morte de um animal devido a um erro experimental e não em consequência do tratamento com o complexo de RuTrp. Posteriormente, a dose de 600 mg/Kg foi testada para os complexos de RuMet e RuTrp não sendo observada mortalidade de nenhum animal (Tabela 6). Nenhuma alteração comportamental ou sinal de toxicidade foram observados em decorrência dos tratamentos nas doses testadas.

Embora, não tenha sido possível testar a dose recomendada de 2000 mg/Kg, o *Guideline* 423 não estima um valor exato de DL_{50} , mas possibilita identificar a menor dose que causa letalidade através da estimativa de uma faixa de DL_{50} e sinais de toxicidade aguda. Assim, os complexos de RuMet e RuTrp diante dos dados encontrados podem ser considerados como compostos de baixa toxicidade, provavelmente pertencendo a classe 4 da GHS com $300 \text{ mg/Kg} < DL_{50} < 2000 \text{ mg/Kg}$.

Além dos complexos de RuMet e RuTrp não causar letalidade e sinais de toxicidade, estes complexos induzem poucas lesões no DNA das células do sangue periférico de camundongos Swiss machos e fêmeas quando testados pelo ensaio cometa. O ensaio cometa, também conhecido como eletroforese de células únicas em gel, é amplamente empregado para avaliar dano ao DNA em células eucarióticas. É considerado um teste sensível e de custo relativamente baixo, capaz de realizar uma avaliação de genotoxicidade que detecta danos primários ao DNA induzidos por uma série de agentes químicos, como agentes intercalantes, alquilantes e oxidantes (COLLINS, 2004).

Estudo do potencial clastogênico e genotóxico em linfócitos do sangue periférico humano *in vitro* induzidos pelos complexos de rutênio (III) *cis*- $[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ e CTRu(III) revelaram que os compostos não possuem atividade clastogênica, sendo as alterações cromossômicas encontradas definidas como espontâneas. O complexo de rutênio(III) *cis*- $[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ em baixas concentrações não induziu dano genotóxico detectado pelo teste cometa e o complexo CTRu(III) não apresentou efeito genotóxico nas concentrações testadas (REZENDE, 2010; RIBEIRO et al., 2009).

Os danos no DNA das células do sangue periférico induzidos pelos complexos RuMet (2 mg/Kg, machos em 24 h) e RuTrp (6 mg/Kg, machos em 24 e 48 h) diante do índice de dano induzido pela cisplatina (2 mg/Kg, machos e fêmeas em 24 e 48 h) não são significativos. O índice de dano encontrado para a cisplatina em valores próximos a 200 e os índices de danos determinados para os complexos de RuMet e RuTrp inferiores a 100, com valores próximos ao do grupo controle, podendo, portanto, serem definidos como lesões genômicas espontâneas.

Todos os tratamentos com os complexos de RuMet e RuTrp (2 e 6 mg/Kg, machos e fêmeas em 24 e 48 h) são estatisticamente significativo em relação ao

tratamento com cisplatina ($p < 0,001$) (Tabela 8). A cisplatina administrada v.ip. é rapidamente absorvida pelos capilares e transferida para a corrente sanguínea (ARAÚJO et al., 2011) causando genotoxicidade nas células do sangue periférico dos camundongos pela ausência do potencial seletivo para células tumorais.

A administração v.ip. de agentes quimioterápicos para o tratamento de carcinomatose peritoneal vem sendo justificada por garantir uma elevada concentração e tempo prolongado de exposição do fármaco ao tumor. A v.ip. é considerada a via mais rápida e direta, uma vez que garante uma completa biodisponibilidade, em comparação com a v.o. A biodisponibilidade oral de fármacos está sujeita a barreiras de absorção e aos efeitos de primeira passagem. Como resultado, agentes orais apresentam variações farmacocinéticas maiores que aqueles administrados no peritônio (UNDEVIA, GOMES-ABUIN, RATAIN, 2005).

A cisplatina é um dos mais ativos agentes citotóxicos usados no tratamento da carcinomatose peritoneal, porém devido ao seu baixo peso molecular (300 g mol^{-1}) é rapidamente absorvida pelos capilares e transferida para a corrente sanguínea, aumentando o risco de toxicidade sistêmica (ARAÚJO et al., 2011; MARONI et al., 2012).

Os resultados obtidos para a avaliação antitumoral com a cisplatina 2 mg/Kg/dia evidenciaram seu potencial terapêutico. Entretanto, o tratamento com a cisplatina causou diversos efeitos colaterais, como fraqueza, diarreia, alopecia; indícios de toxicidade sistêmica, uma vez que a avaliação macroscópica do fígado e rins detectou alteração na coloração desses órgãos. Embora, o tratamento com a cisplatina 2 mg/Kg/dia apresente potencial antitumoral elevado, o tempo média de sobrevida dos animais não apresentou diferença estatística em relação aos grupos tumor e veículo (Tabela 15).

Outros tratamentos realizados com cisplatina em células do TAE implantadas na cavidade peritoneal de camundongos *Swiss* também apontaram sinais clínicos de toxicidade e tempo relativamente curto de sobrevida. Araújo e colaboradores (2011) trataram com cisplatina em dose única de 10 mg/Kg e relataram que os animais apresentaram fraqueza, ataxia, diarreia, piloereção e sobrevida de 15 dias. Animais tratados com 12 mg/Kg de cisplatina em dose única também apresenta sinais de fraqueza, ataxia e diarreia, com tempo de sobrevida de 16 dias (MARONI et al., 2012). Anchuri e colaboradores (2012) trataram por nove dias camundongos *Swiss*

transplantados com células do TAE com cisplatina na dose de 2 mg/Kg, mas não incluíram em seus estudos a observação de alteração comportamental ou sinais de toxicidade, contudo determinaram o TMS de 29 dias.

Os complexos RuMet e RuTrp nas doses testadas (2 e 6 mg/Kg/dia) revelaram atividade antitumoral de moderada à elevada, pelos dois métodos avaliados: $\Delta C.A$ e $\Delta B.W$ (Tabela 9 e 10).

Os resultados obtidos de $\Delta C.A$ e $\Delta B.W$ mostraram que não há diferença estatística entre os grupos tumor e veículo (Tabela 9e 10), com isso, percebe-se que o veículo de diluição utilizado (DMSO 10%) parece não influenciar na atividade antitumoral dos compostos em estudos.

O tratamento na menor dose de RuMet (2 mg/Kg/dia) se mostra mais satisfatório, em relação ao tratamento de 6 mg/Kg/dia, devido a menor $\Delta C.A$ e $\Delta B.W$ observados e, conseqüentemente, ao discreto aumento observado nos percentuais de inibição tumoral.

O complexo de RuTrp (2 e 6 mg/Kg/dia) inibiu o crescimento das células do TAE de maneira dose-dependente. Embora, os dois tratamentos com RuTrp não sejam diferentes estatisticamente, os dados sugerem que o complexo de RuTrp 6 mg/Kg/dia tem potencial antitumoral mais elevado, com valores de $\Delta C.A$ e $\Delta B.W$ mais baixos, que a dose de 2 mg/Kg/dia.

Comparando os grupos tratados, RuMet *versus* RuTrp, os percentuais de inibição tumoral pela $\Delta C.A$ e $\Delta B.W$ nas doses testadas (2 e 6 mg/Kg/dia) não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre si.

Os tratamentos com os complexos RuMet e RuTrp nas doses de 2 e 6 mg/Kg/dia não apresentaram diferença estatística com o grupo cisplatina 2 mg/Kg/dia e evidenciando que os complexos RuMet e RuTrp representam uma alternativa promissora como novos agentes quimioterápicos, com elevada atividade antitumoral *in vivo*.

Os complexos de RuMet e RuTrp nas doses testadas apresentaram melhor resposta antitumoral que dois novos complexos de rutênio(II)/tiosemicarbazona testados em células do TAE implantadas na cavidade peritoneal de camundongos Swiss nas doses de 2 e 4 mg/Kg administrados v.ip por nove dias. Os autores relataram que complexos de rutênio (II) apresentam $\Delta B.W$ entre 4,2 e 9,6 g

(ANCHURI et al., 2012), enquanto que os complexos de rutênio(II)/aminoácidos apresentaram valores inferiores de $\Delta B.W$ entre 3,76 e 6,10 g, o que reflete diretamente na inibição do crescimento tumoral.

As células do TAE ao final do período de tratamento com os complexos RuMet e RuTrp foram analisadas e o perfil de viabilidade e morte celular foram determinados. Os dados mostraram que os complexos RuMet e RuTrp foram capazes de aumentar o percentual de células mortas por apoptose (Tabela 11 e Figura 13). Chatterjee e colaboradores (2008) também avaliaram por citometria de fluxo a viabilidade de células do TAE tratadas com o complexo de rutênio(II)/areno/PTA denominado RAPTA-C por Anexina V/FITC e PI. Os autores mostram que o tratamento *in vivo* com o RAPTA-C induz apoptose nas células do TAE.

Os complexos de rutênio(II)/aminoácido, RuMet e RuTrp, além de apresentarem elevada atividade antitumoral, aumentaram os percentuais de morte celular por apoptose, e também, foram capazes de aumentar a sobrevivência dos animais portadores do TAE com, consequente, aumento no %ILS (Tabela 15). O prolongamento do tempo de vida dos animais tem sido considerado como um critério confiável para a representação de eficácia de novos protótipos antitumorais (ANCHURI et al., 2012; DOLAI et al., 2012).

Anchuri e colaboradores (2012) também avaliaram o tempo médio de sobrevivência dos animais com células do TAE tratados com os complexos de rutênio(II)/tiosemicarbazona e encontraram TMS de 15 a 26 dias. Novamente, os complexos de RuMet e RuTrp nas doses testadas apresentaram melhor resposta antitumoral que dois novos complexos de rutênio(II)/tiosemicarbazona já descritos na literatura.

O tumor de Ehrlich induzido na cavidade peritoneal induz, localmente, aumento da permeabilidade vascular com progressão do líquido ascítico, fator essencial para o crescimento tumoral, uma vez que constitui uma fonte nutricional direta para as células tumorais (HALDAR et al., 2010; DOLAI et al., 2012).

O potencial antitumoral dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos deve estar relacionado com as mudanças fundamentais nas vias do metabolismo energético e absorção de nutrientes das células tumorais, como resultado de várias mutações no

metabolismo energético das células tumorais, dando vantagem de crescimento seletivo e resistência à morte. Sendo necessário, para a sua sobrevivência e crescimento, não só a glicose, mas também outras biomoléculas, como aminoácidos (DANG, 2012; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Vários estudos envolvendo mutações nos genes que regulam o metabolismo (CAIRNS et al., 2011; DANG, 2010; DANG, 2012; GAO et al., 2009; HU & SABATINI, 2008; KING et al., 2006; KOPPENOL, BOUNDS, DANG, 2011; LIU et al., 2011; NICKLIN et al., 2009; SEMENZA, 2010; YAN et al., 2009) e de transporte de aminoácidos nas células tumorais foram relatados (GEIER et al., 2013; HAASE et al., 2007; KAIRA et al., 2008; KOBAYASHI, ISHII, TAKAYAMA, 2005; SAKATA et al., 2009; UMEKI et al., 2002; WANG, TIFFEN, BAILEY, 2013).

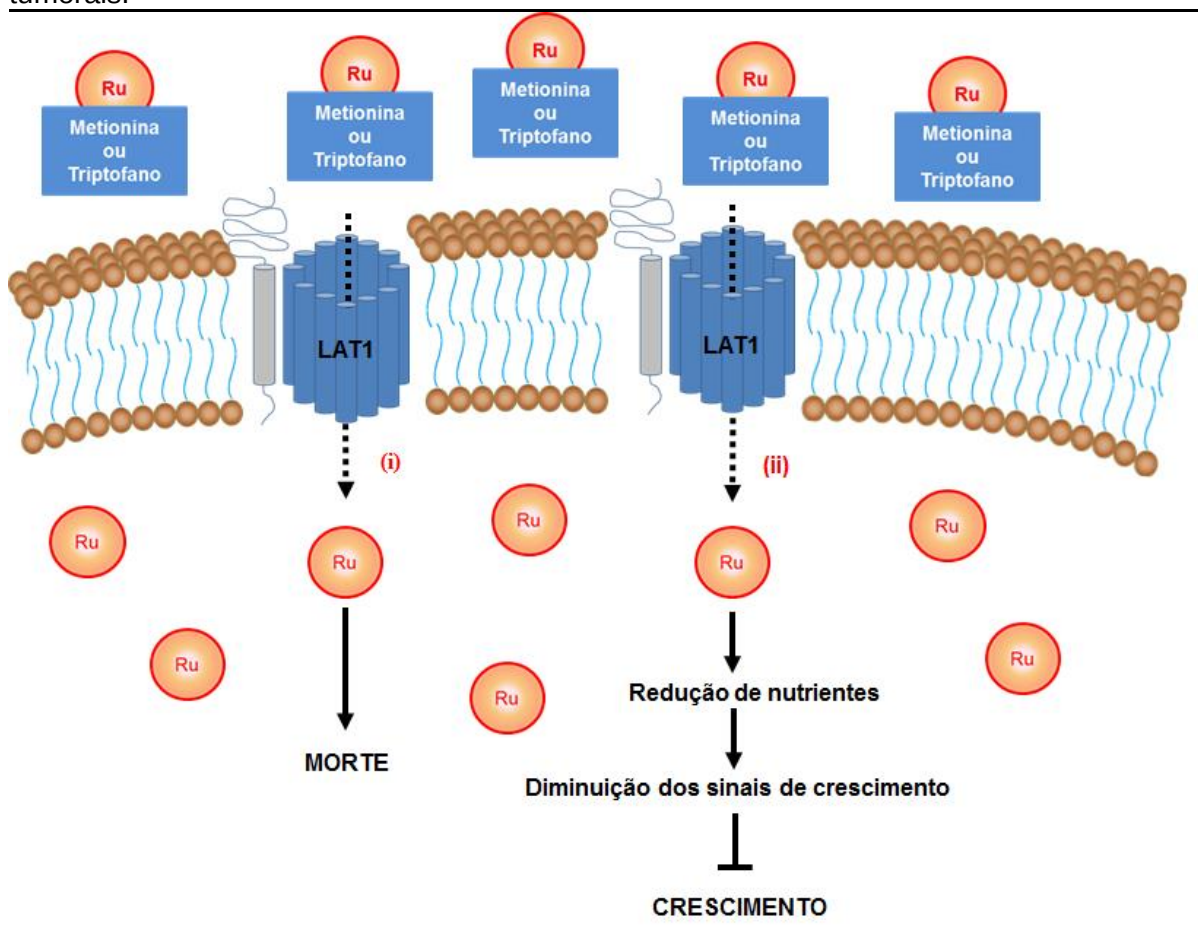
O LAT é um membro do sistema de transporte de amino ácido L sódio-independente primeiramente descrito nas células do TAE (BARKER & ELLORY, 1990). Os aminoácidos metionina e triptofano coordenados na estrutura dos complexos de rutênio investigados neste estudo são aminoácidos transportados, preferencialmente, pelo subtipo 1 do LAT (LAT1) (FUCHS & BODE, 2005; JONES & THOMPSON, 2009). O LAT1 é regulado positivamente em câncer primário humano e linhagens celulares tumorais, sendo detectado o aumento da sua expressão em câncer de pulmão, câncer de cólon, câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço, câncer genital e sarcomas de tecidos moles (JONES & THOMPSON, 2009; WANG et al., 2011). Além disso, o LAT1 tem uma seletividade ampla de substratos, permitindo o transporte de compostos relacionados com aminoácidos, incluindo melfalano ou L-fenil alanina de mostarda, um agente quimioterápico (LIN et al., 2004; GEIER et al., 2013).

Fuchs e Bode (2005) desenvolveram a hipótese que o LAT1 fornece os aminoácidos essenciais às células tumorais, que sinalizam para aumentar o crescimento de células tumorais e inibir a apoptose. Estudos e revisões posteriores vêm corroborando com essa hipótese (DANG, 2012; CANTOR & SABATINI, 2012; FU et al., 2010; GEIER et al., 2013; HAASE et al., 2007; MACCHIARULO et al., 2009; WANG, TIFFEN, BAILEY, 2013).

A hipótese para o potencial citotóxico e antitumoral dos complexos RuMet e RuTrp nas células tumorais consiste no fato de que esses complexos de rutênio(II)/aminoácidos podem ser captados pelos LAT1 para o interior celular,

causando a morte das células de TAE (Tabela 4, 9, 10 e 11). A figura 16 ilustra como os complexos RuMet e RuTrp poderiam estar agindo nas células tumorais, como (i) substratos citotóxicos que seriam fornecidos para dentro da célula através de LAT1 para atuar sobre um alvo intracelular e promover a morte das células do TAE ou (ii) inibidores que bloqueiam seletivamente o transporte por LAT1, privando as células tumorais de nutrientes necessários para o crescimento e proliferação.

Figura 16. Hipótese de captação dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos por células tumorais.



Em (i) sugerindo que LAT1 pode ser alvo de entrega dos complexos de rutênio(II)/aminoácidos para as células tumorais e causar a morte das células e em (ii) os complexos de rutênio(II)/aminoácidos podem ser inibidores que bloqueiam seletivamente o transporte por LAT1, privando a célula tumoral de nutrientes necessários para a proliferação.

Outras hipóteses de mecanismo de ação dos complexos de rutênio foram descritas. O mecanismo de ação do NAMI-A está, principalmente, relacionado com sua interação com o microambiente tumoral, interferindo no metabolismo de ROS (espécie reativa de oxigênio) (SAVA et al., 2004; HEFFETER et al., 2008). Acredita-

se que a captação dos complexos de rutênio (III) ocorra por receptores de transferrina devido sua capacidade de mimetizar o íon ferro. Os receptores de transferrina nas células tumorais apresentam alta regulação gênica, fator considerado importante para a seletividade dos complexos de rutênio (III) (ALLARDYCE & DYSON, 2001).

Avaliação toxicológica realizada durante o período experimental não revelou pelo *screening* hipocrático nenhum sinal de alteração comportamental ou sinais de toxicidade, bem como não foi observado alteração no peso relativo dos órgãos dos animais tratados com os complexos de RuMet e RuTrp (2 e 6 mg/Kg/dia) (Tabela 13). É importante avaliar estes parâmetros, pois a toxicidade sistêmica de determinado composto pode se manifestar, também, por meio de alteração comportamental, apatia, má condição de pelagem e alteração do peso relativo dos órgãos (PIRES JÚNIOR et al., 2012).

Alterações nos parâmetros de hemograma e bioquímica em modelos experimentais podem estar relacionadas aos efeitos terapêuticos e/ou toxicológicos, sendo que os resultados obtidos devem ser comparáveis aos de grupo controle ou aos valores de referência da literatura (PETTERINO, ARGETINO-STORINO, 2006).

A progressão do tumor de Ehrlich é acompanhada de alterações dos parâmetros hematológicos, com redução da contagem de eritrócitos e hemoglobina (ANCHURI et al., 2012; DOLAI et al., 2012; SUNIL et al., 2013). Os valores de eritrócitos, hemoglobinas e hematócitos obtidos para os grupos tumor e veículo (Tabela 11) estão abaixo dos valores de referência de camundongos Swiss machos, livres de tumor, estudados por Castello Branco et al., (2011) de $9,4 \times 10^6/\text{mm}^3$ para eritrócitos, $13,6 \text{ g dL}^{-1}$ para hemoglobina e 41,2% para hematócrito. Os tratamentos com os complexos RuMet (2 mg/Kg/dia) e RuTrp (2 e 6 mg/Kg/dia) apresentaram valores discretamente aumentados para os parâmetros citados anteriormente, enquanto que o tratamento com a cisplatina diminuiu a contagem desses parâmetros em relação ao grupo tumor e veículo.

Os valores reduzidos dos eritrócitos, hemoglobina e hematócrito sugerem quadro anêmico destes animais, além disso, eritrócitos reduzidos indicam que está ocorrendo alteração no transporte de oxigênio, podendo comprometer a ventilação pulmonar. Nos tratamentos com número de eritrócitos próximos aos valores de referência o peso relativo dos pulmões está discretamente aumentado em relação

ao grupo tumor, enquanto que no tratamento com a cisplatina está semelhante ao grupo tumor (Tabela 13).

A anemia exibida em camundongos portadores do tumor de Ehrlich é relatada, principalmente, pela redução dos eritrócitos ou hemoglobina, devido a deficiência de ferro ou condições hemolíticas/mielopática (HALDAR et al., 2010).

O valor de referência para leucócitos é de $6,9 \times 10^3/\text{mm}^3$ (CASTELLO BRANCO et al., 2011), sendo obtido para os grupos tumor e veículo valores de leucócitos próximos de $5,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ (Tabela 11). A contagem de leucócitos dos tratamentos com complexos de RuMet e RuTrp apresentaram-se aumentadas em relação ao grupo tumor e veículo, com valores de leucócitos mais próximos ao valor de referência.

Os dados sugerem que os complexos de RuMet e RuTrp podem reverter as alteração induzida pelo tumor de Ehrlich. Complexos rutênio(II)/tiosemicarbazona também foram capazes de reverter a queda no número de eritrócitos, hemoglobina e leucócitos induzidas pelo tumor de Ehrlich (ANCHURI et al., 2012).

Distúrbios na produção de células de medula óssea foram relatados para metalofármacos, os quais a cisplatina e carboplatina provocam mielotoxicidade (LOKICH & ANDERSON, 1998; MARONI et al., 2012), enquanto que para complexos de rutênio são relatados toxicidade hematológica por eritropenia e leucopenia (KEPPLER, BERGER, HEIM, 1990; MENEZES et al., 2007).

O tratamento com a cisplatina diminuiu os valores de leucócitos e plaquetas em relação ao grupo tumor (Tabela 11), comprovando mielotoxicidade como relatado na literatura (MARONI et al., 2012). A contagem de plaquetas está diminuída no tratamento RuMet 6 mg/Kg/dia ($p < 0,001$) e aumentada no tratamento com RuTrp 6 mg/Kg/dia ($p < 0,001$) em relação ao grupo tumor. De acordo com Castello Branco et al. (2011) a contagem de plaquetas obtida em seu estudo foi alta ($810 \times 10^3/\text{mm}^3$) em relação a outros estudos citados por ele que identificaram valores em torno $450 \times 10^3/\text{mm}^3$. Apesar disso, os valores alterados na contagem de plaquetas sugerem que o tumor de Ehrlich está comprometendo a função do baço e da medula óssea. Contudo, a produção de plaquetas foi alterada, podendo causar alteração na coagulação sanguínea.

Danos ao fígado e rins frequentemente resultam na elevação dos níveis enzimáticos de AST/TGO, ALT/TGP, ureia e creatinina. Durante o dano tecidual, algumas dessas enzimas caem no soro sanguíneo devido a alterações na permeabilidade das membranas celulares. A mensuração dessas enzimas é uma valiosa ferramenta no diagnóstico clínico, fornecendo informações sobre o efeito patológico do composto sobre alguns tecidos (AKDOGAN et al., 2003; SHAHJAHAN et al., 2004).

Creatinina e ureia são os principais produtos catabólicos do metabolismo dos músculos e proteínas, respectivamente, sendo que a creatinina é considerada um parâmetro mais específico de toxicidade renal (AFOLAYAN, YAKUBUN, 2009). Considerando o valor de referência de 47 mg/dL para ureia (CASTELLO BRANCO et al., 2011), todos os tratamentos apresentaram valores de ureia aumentados (Tabela 12), sugerindo que o tumor de Ehrlich é capaz de induzir toxicidade renal e os complexos de RuMet e RuTrp não foram capazes de reverter esse efeito. Maroni et al. (2012) também relatam toxicidade renal induzida pelo tumor de Ehrlich. Entretanto, os valores de creatinina para todos os tratamentos estão próximos aos valores de referência de 0,4 mg/dL (CASTELLO BRANCO et al., 2011).

Os níveis de AST/TGO e ALT/TGP estão alterados, sendo o nível de AST/TGO aumentado em relação ao valor de referência 277 U/L (CASTELLO BRANCO et al., 2012) e ALT/TGP, também, aumentado em comparação com o valor de referência 62 U/L (CASTELLO BRANCO et al., 2012), entretanto os tratamentos com os complexos RuMet e RuTrp reduziram o nível de ALT/TGP em relação ao grupo tumor, sugerindo que a hepatotoxicidade é consequência da indução do tumor de Ehrlich e não de hepatite medicamentosa induzida pelos complexos de rutênio(II)/aminoácido.

A enzima DHL é distribuída por todo o organismo sendo liberada na corrente sanguínea após lesão ou destruição celular, fato que pode justificar o aumento observado dos níveis de DHL para todos os grupos tratados. Tanto os complexos RuMet e RuTrp (2 e 6 mg/Kg/dia), como a cisplatina 2 mg/Kg/dia aumentaram o percentual de células do TAE mortas (Tabela 11). Outros trabalhos relacionam os níveis aumentados de DHL com redução da viabilidade das células tumorais. Huang e colaboradores (2011) mediram os níveis de DHL em células de A549 após tratamento com ácido ursólico e encontram que nas concentrações que

apresentavam menores percentuais de viabilidade celular apresentam, inversamente, maiores valores de DHL. No trabalho de Porto et al. (2010), células de B16F10 tiveram os níveis de DHL dosados após tratamentos com alguns complexos de rutênio(II)/aminoácidos e, também, mostrou a relação inversa de diminuição da viabilidade celular e aumento de DHL (dados não publicados).

Em suma, os complexos RuMet e RuTrp na dose mais baixa testada (2 mg/Kg/dia) demonstraram, diante de análise geral dos resultados obtidos, potencial terapêutico antitumoral mais eficaz e com perfil de toxicidade inferior, haja vista que tem atividade antitumoral elevada, aumentaram o TMS, o %ILS e o percentual de células mortas mais expressivamente, sem causar genotoxicidade nas células do sangue periférico ou alteração nos parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Os complexos RuMet e RuTrp revelaram-se candidatos promissores a novos protótipos antitumorais, fazendo-se necessário prosseguir com os testes de avaliação pré-clínica *in vivo* para obtenção de dados farmacológicos importantes tais como, farmacocinética e farmacodinâmica e elucidação de seu mecanismo de ação.

8 CONCLUSÃO

Complexos de rutênio(II)/aminoácidos apresentaram atividade citotóxica *in vitro* contra células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e células de fibroblasto murino, L929, sendo possível estimar a concentração que inibe 50% da viabilidade celular (IC_{50}) e avaliar o potencial seletivo dos complexos de rutênio.

Os complexos de RuMet e RuTrp demonstraram potencial seletivo significativo para células de TAE e, revelaram serem mais potentes que a cisplatina para as células do TAE.

A estimativa *in vitro* da dose letal mediana (DL_{50}) corroborou com os dados *in vivo* de toxicidade oral aguda que estimou pelo método de classe da OECD, DL_{50} dos complexos de RuMet e RuTrp maior que 600 mg/Kg, podendo ser classificados como compostos de baixa toxicidade, sem indução de alteração comportamental, sinais de toxicidade ou alteração no órgãos dos animais tratados.

O complexo de RuMet 2 mg/Kg induziu dano ao DNA das células do sangue periférico de animais machos após 24 horas de exposição. O complexo de RuTrp 6

mg/Kg induziu dano ao DNA dos camundongos machos tratados em 24 e 48 horas. Os outros tratamentos com os complexos de RuMet e RuTrp não apresentaram efeitos genotóxicos.

Os complexos de RuMet e RuTrp nas doses de 2 e 6 mg/Kg/dia inibiram o crescimento das células do TAE implantados em camundongos *Swiss* tratados por sete dias consecutivos após 24 horas de implantação tumoral. Após 30 dias de observação diária, os complexos de RuMet e RuTrp nas doses de 2 e 6 mg/Kg/dia aumentaram a média de sobrevivência de camundongos *Swiss* tratados por sete dias consecutivos após 24 horas de implantação tumoral.

Os resultados de inibição do crescimento tumoral obtidos pela variação da circunferência abdominal e variação do peso corporal não apresentaram diferença estatística, portanto os dois métodos utilizados são confiáveis e reprodutíveis.

Os complexos de RuMet e RuTrp (2 e 6 mg/Kg/dia) induzem morte celular com aumento dos valores percentuais de morte celular por apoptose.

Os tratamentos com os complexos de RuMet e RuTrp *in vivo* não comprometeram a estrutura do fígado, baço, rins, pulmão e coração, macroscopicamente, sugerindo que os complexos de rutênio(II)/aminoácidos não causam toxicidade sistêmica. Além disso, os tratamentos com RuMet e RuTrp (2 e 6 mg/Kg/dia) não causaram efeitos adversos.

Os complexos RuMet (2 mg/Kg/dia) e RuTrp (2 mg/Kg/dia) mostram-se mais eficazes, devido ao perfil tóxico praticamente ausente e potencial antitumoral elevado.

Por fim, os resultados dos testes pré-clínicos dos complexos RuMet e RuTrp mostraram que são protótipos promissores para o tratamento do câncer.

9 PERSPECTIVAS

Diante dos dados obtidos, estudo adicionais de toxicidade subcrônica e crônica são relevantes para verificar os efeitos dos complexos de RuMet e RuTrp a longo prazo, bem como teste de mutagenicidade são necessários para verificar se as lesões observadas no DNA das células do sangue periférico de camundongos

Swiss tratados com o complexo de RuMet e RuTrp foram permanentes. A análise anatomopatológica do baço, fígado e rins devem ser realizadas para verificar e comprovar se as alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos são consequência da indução tumoral.

O estudo do mecanismo de ação dos protótipos de complexos de rutênio(II)/aminoácidos, também, é necessário para elucidação da via de sinalização envolvida na atividade antitumoral desses novos e promissores protótipos antitumorais como complementação e continuação dos estudos já realizados de atividade biológica antitumoral *in vitro* e *in vivo*, potencial citotóxico seletivo para a atividade biológica *in vitro*, eficácia do tratamento determinada por inibição do crescimento tumoral e tempo de sobrevida, determinação de parâmetros de segurança *in vivo* (teste de toxicidade oral aguda, genotoxicidade, avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos).

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFOLAYAN, A.J.; YAKUBUN, M.T. Effect of Bulbine natalensis barker stem extract on the functional indices and histology of the liver and kidney of male Wistar rats. **J Med Food**. v. 12, n. 4, p. 814-820, 2009.

AKDOGAN, M.; KILINÇ, I.; ONCU, M.; KARAOZ, E.; DELIBAS, N.; Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* L. and *Mentha spicata* L. on kidney tissue in rats. **Hum Exp Toxicol**. v. 22, n. 4, p. 213-219, 2003.

ALLARDYCE, C.S.; DYSON, P.J. Ruthenium in Medicine: current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Rev**. v. 45, p. 62-69. 2001.

ALMEIDA, M.A.P. Complexos de rutênio contendo aminoácidos com propriedades citotóxicas. 151 f. Dissertação de Mestrado - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2009.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. del C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular não Específicos que Interagem com o DNA: Uma Introdução. **Quim. Nova**. v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. The History of Cancer. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/the-history-of-cancer-what-is-cancer>. Acesso em: 27 de fevereiro de 2014.

ANCHURI, S.S.; THOTA, S.; YERRA, R.; DEVARAKONDA, K.P.; DHULIPALA, S. Novel Mononuclear Ruthenium(II) Compounds in Cancer Therapy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 13, p. 3293-3298, 2012.

ANDRADE JÚNIOR, D.R.; GALVÃO, F.H.F.; SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R. Ascite - Estado da Arte Baseado em Evidências. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 55, p. 489-496, 2009.

ANVISA. Registro de Produtos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/registro/index.htm>. Acesso em: 26/01/2014.

ARMSTRONG, D.K.; BUNDY, B.; WENZEL, L.; HUANG, H.Q.; BAERGEN, R.; LELE, S.; COPELAND, L.J.; WALKER, J.L.; BURGER, R.A. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. **N Engl J Med**. v. 354, n. 1, p. 34-43. 2006.

ARAÚJO, J.G.C.; MOTA, L.G.; LEITE, E.A.; SAVASSI-ROCHA, L.R.; PEREIRA, M.T.; CARVALHO, A.T.; MARONI, V.C.; WAINSTEIN, A.J.A.; COELHO, L.G.V.; CARDOSO, P.N.; OLIVEIRA, M.C. Biodistribution and antitumoral effect of long-circulating and pH-sensitive liposomal cisplatin administered in Ehrlich tumor-bearing mice. **Experimental Biology and Medicine**. v. 236, p. 808-815, 2011.

BAGGETTO, L.G. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. **Biochimie**. v. 74, p. 959-74. 1992.

BALDUCCI, L. Molecular insight in cancer treatment and prevention. **Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 39, p. 1329-1336, 2007.

BARBOLINA, M.V.; ADLEY, B.P.; KELLY, D.L.; FOUGHT, A.J.; SCHOLTENS, D.M.; SHEA, L.D.; STACK, M.S. Motility-related actinin alpha-4 is associated with advanced and metastatic ovarian carcinoma. **Lab Invest**. v. 88, p. 602-614. 2008.

BARKER, G.A.; ELLORY, J.C. The identification of neutral amino acid transport systems. **Exp Physiol**. v. 75, p. 4-26. 1990.

BERGAMI-SANTOS, P.C.; MARIANO, M.; BARBUTO, J.A.M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Science**. v. 75, p. 245-255. 2004.

BERGAMO, A.; ZORZET, S.; GAVA, B.; SORC, A.; ALESSIO, E.; IENGO, E.; SAVA, G. Effects of NAMI-A and Some Related Ruthenium Complexes on Cell Viability after Short Exposure of Tumor Cells. **Anti-Cancer Drug**. v. 11, p. 665-672. 2000.

BERGAMO, A.; SAVA, G. Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs. **Dalton Trans**. v. 40, p. 7817-7823, 2011.

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

BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. **Oncol Rep.** v.10, p.1663–1682, 2003.

BRABEC, V.; NOVÁKOVÁ, O. DNA Binding Mode of Ruthenium Complexes and Relationship to Tumor Cell Toxicity. **Drug Resist.** v. 9, p.111–122. 2006.

BRANDÃO, E.M.; BRANDÃO, P.H.D.M.; SOUZA, I.A.; PAIVA, G.S.; CARVALHO, M.C.; LACERDA, C. Antineoplastic Effect of Aqueous Extract of *Plectranthus Amboinicus* in Ehrlich Ascites Carcinoma. **Journal of Cancer.** v. 4, p. 573-576. 2013.

BRATSOS, I.; JADNER, S.; GIANFERRARA, T.; ALESSIO, E. Ruthenium anticancer compounds: challenges and expectations. **Chimia.** v. 61, p. 692-697, 2007.

BROMBERG, N.; DREYFUSS, J.L.; REGATIERI, C.V.; PALLADINO, M.V.; DURÁN, N.; NADER, H.B.; HAUN, M.; JUSTO, G.Z. Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. **Chemico-Biological Interactions.** v. 186, p. 43-52, 2010.

CAIRNS, R.A.; HARRIS, I.S.; MAK, T.W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nat Rev Cancer.** v. 11, p. 85–95. 2011.

CANTOR, J.R.; SABATINI, D.M. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. **Cancer Discov.** v. 10, p. 881-898. 2012.

CASTELLO BRANCO, A.C.S.; DINIZ, M.F.F.; ALMEIDA, R.N.; SANTOS, H.B.; OLIVEIRA, K.M.; RAMALHO, J.A.; DANTAS, J.G. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde.** v. 15, p. 209-214. 2011.

CASTONGUAY, A.; DOUCET, C.; JUHAS, M.; MAYSINGER, D. New Ruthenium(II)-Letrozole Complexes as Anticancer Therapeutics. **J. Med. Chem.** v.55, p.8799-8806. 2012.

CASTRO, A.S.; OLIVEIRA, R.S.; RODRIGUES, E.S.; RIBAS, J.L. Ação do complexo enzimático da piruvato desidrogenase em células neoplásicas sob efeito do ácido Dicloroacético: uma revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas.** v.10, p.170-178. 2011.

CHATTERJEE, S.; KUNDU, S.; BHATTACHARYYA, A.; HARTINGER, C.G.; DYSON, P.J. The ruthenium(II)-arene compound RAPTA-C induces apoptosis in EAC cells through mitochondrial and p53-JNK pathways. **J. Biol. Inorg. Chem.** v. 7, p. 1149-1155. 2008.

CHEN, H.; PARKINSON, J.A.; MORRIS, R.E.; SADLER, P.J. Highly selective binding of organometallic ruthenium ethylenediamine complexes to nucleic acids: novel recognition mechanisms. **J Am Chem Soc.** v.125, p.173-186, 2003.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.11-23, 2007.

CLARKE, M. J.; BITLER, S.; RENNERT, D.; BUCHBINDER, M.; KELMAN, A. D. Reduction and subsequent binding of ruthenium ions catalyzed by subcellular components. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 12, p. 79-209, 1980.

COLLINS, A.; DUSINSKÁ, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKÁ, M.; PETROVSKÁ, H.; DUTHIE, S.; FILLION, L.; PANAYIOTIDIS, M.; RASLOVÁ, K.; VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environ Mol Mutagen**. v. 30, n. 2, p. 139-146. 1997.

COLLINS, A.R. Comet Assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p. 249-61, 2004.

COMAR, S.R.; SCHULZ, T.; MACHADO, N.A.; FRANÇA, F.S.; HAAS, P. Análise citológica do líquido peritoneal. **Estud Biol**. v. 32/33, p. 73-79. 2011.

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A.P.N.N., MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim**. V. 2, p. 47-58.2010.

CUNHA, C.R.M.; MEDANHA-NETO, S.A.; SILVA, C.C.; CORTEZ, A.P.; GOMES, M.N.G.; MARTINS, F.I.; ALONSO, A.; REZENDE, K.R.; MENEGATTI, R.; MAGALHÃES, M.T.Q.; VALADARES, M.C. 4-Nerolidylcatechol and its synthetic analogues: Antioxidant activity and toxicity evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 62, p. 371-378, 2013.

DAVID, S.; PERKINS, R.S.; FRONCZEK, F.R.; KASIRI, S.; MANDAL, S.S.; SRIVASTAVA, R.S. Synthesis, characterization, and anticancer activity of ruthenium-pyrazole complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 111, p. 33–39, 2012.

DANG, C.V. Glutaminolysis: Supplying carbon or nitrogen or both for cancer cells?. **Cell Cycle**. v. 19, p. 3884-3886. 2010.

DANG, C.V. Links between metabolism and cancer. **Genes Dev**. v. 26, p. 877–890. 2012.

DOLAI, N.; KARMAKAR, I.; SURESH KUMAR, R.B.; KAR, B.; BALA, A.; HALDAR, P.K. Evaluation of antitumor activity and in vivo antioxidant status of Anthocephalus cadamba on Ehrlich ascites carcinoma treated mice. **J Ethnopharmacol**. v. 142, p. 865-70. 2012.

EGBEWANDE, F.A.; PAUL, L.E.H.; THERRIEN, B.; FURRER, J. Synthesis, Characterization and Cytotoxicity of (η^6 -p-cymene)ruthenium(II) Complexes of α -Amino Acids. **Eur. J. Inorg. Chem**. 2014.

FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**. v. 14, n. 1, p. 125–132, 1990.

FOLKMAN, J.; KALLURI, R. Cancer without disease. **Nature**, v. 427, p. 787. 2004.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**. v. **14**, p. **144–149**, 2008.

FU, Y.M.; LIN, H.; LIU, X.; FANG, W.; MEADOWS, G.G. Cell death of prostate cancer cells by specific amino acid restriction depends on alterations of glucose metabolism. **J Cell Physiol**. v. **224**, p. 491-500. 2010.

FUCHS, B.C.; BODE, B.P. Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? **Semin Cancer Biol**. v. **15**, p. 254-66. 2005.

FUERTES, M.A., ALONSO, C., PÉREZ, J.M. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. **Chem Rev**. v.103, p.645-62. 2003.

GAO, P.; TCHERNYSHYOV, I.; CHANG, T.C.; LEE, Y.S.; KITA, K.; OCHI, T.; ZELLER, K.I.; DE MARZO, A.M.; VAN EYK, J.E.; MENDELL, J.T.; DANG, C.V. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. **Nature**. v. **458**, p. 762-765. 2009.

GEIER, E.G.; SCHLESSINGER, A.; FAN, H.; GABLE, J.E.; IRWIN, J.J.; SALI, A.; GIACOMINI, K.M. Structure-based ligand discovery for the Large-neutral Amino Acid Transporter 1, LAT-1. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. **110**, p. 5480-5485. 2013.

GIANFERRARA, T.; BRATSOS, I.; ALESSIO, E. A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action. **Dalton Trans.**, v. **37**, p. 588-598, 2009.
GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; RATH, N.; MUKHOPADHYAY, D.K. Antitumor activity of methanolic extract of *Cassia fistula* L. seed against Ehrlich Ascites Carcinoma. **Journal of Ethnopharmacology**. v. **72**, p. 151 – 156, 2000.

HAASE, C.; BERGMANN, R.; FUECHTNER, F.; HOEPPING, A.; PIETZSCH, J. L-type amino acid transporters LAT1 and LAT4 in cancer: uptake of 3-O-methyl-6-18F-fluoro-L-dopa in human adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. **J Nucl Med**. v. **48**, p. 2063-2071. 2007.

HALDAR, P.K.; KAR, B.; BALA, A.; BHATTACHARYA, S.; MAZUMDER, U.K. Antitumor activity of *Sansevieria roxburghiana* rhizome against Ehrlich ascites carcinoma in mice. **Pharm Biol**. v. **48**, p 1337-1343. 2010.

HAMILTON, C.A.; MAXWELL, G.L.; CHERNOFSKY, M.R.; BERNSTEIN, S.A.; FARLEY, J.H.; ROSE, G.S. Intraperitoneal bevacizumab for the palliation of malignant ascites in refractory ovarian cancer. **Gynecol Oncol**. v. **111**, p. 530–532. 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**. v. **100**, p.57-70. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v. **144**, p. 646 – 674, 2011.

HANIGAN, M.H.; DEVARAJAN, P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. **Cancer Ther.** v. 1, p. 47–61. 2003.

HARTINGER, C.G.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; JAKUPEC, B. K., ZORBAS, H.; KEPPLER, B. K. From bench to bedside- preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans- [tetrachlorobis (1 H-indazole)ruthenate (III)] KP1019 or FFC14A). **Journal of Inorganic Biochemistry.** v.100. p. 891-904. 2006.

HARTINGER, C.G.; NAZAROV, A. A.; ASHRAF, S.M.; DYSON, P.J.; KEPPLER, B.K. Carbohydrate-Metal Complexes and their Potential as Anticancer Agents. **Curr. Med. Chem.** v. 15, p. 2574–2591. 2008.

HEFFETER, P.; JUNGWIRTH, U.; JAKUPEC, M.; HARTINGER, C.; GALANSKI, M.; ELBLING, L.; MICKSCHE, M.; KEPPLER, B.; BERGER, W. Resistance against novel anticancer metal compounds: differences and similarities. **Drug Resist Updat.** v. 11, p. 1-16. 2008.

HEINRICH, T.A.; POELHSITS, G.V.; REIS, R.I.; CASTELLANO, E.E.; NEVES, A.; LANZMASTER, M.; MACHADO, S.P.; BATISTA, A.A.; COSTA-NETO, C.M. A new nitrosyl ruthenium complex: Synthesis, chemical characterization, in vitro and in vivo antitumor activities and probable mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 46, p. 3616-3622. 2011.

HENRY, C.M.; HOLLVILLE, E.; MARTINS, S.J. Measuring Apoptosis by Microscopy and Flow cytometry. **Methods.** V. 61, n. 2, p. 90-97, 2013.

HSU, P.P.; SABATINI, D.M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. **Cell.** v. 134, p. 703–707. 2008.

HUANG, C.Y.; LIN, C.Y.; TSAI, C.W.; YIN, M.C. Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by ursolic acid in human lung cancer cell lines. **Toxicology in Vitro.** v. 25, n. 7, p. 1274–1280. 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 17/01/2014.

JAKUPEC, M.A.; GALANSKI, M.; ARION, V.B.; HARTINGER, C.G.; KEPPLER, B.K. Antitumor metal compounds: more than theme and variations. **Dalton Trans.** p. 183-194. 2008.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T.; THUN, M. J. Cancer Statistics. **Cancer Journal Clinical.** v.58, p.71–96, 2008.

JIRSOVA, K.; MANDYS, V.; GISPEN, W.H.; BAR, P.R. Cisplatin-Induced Apoptosis in Cultures of Human Schwann Cell. **Neuroscience Letters.** v 392. p. 2-26. 2006.

JONES, R.G.; THOMPSON, C.B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. **Genes Dev.** v. 23, p. 537-548. 2009.

KAIRA, K.; ORIUCHI, N.; IMAI, H.; SHIMIZU, K.; YANAGITANI, N.; SUNAGA, N.; HISADA, T.; TANAKA, S.; ISHIZUKA, T.; KANAI, Y.; ENDOU, H.; NAKAJIMA, T.; MORI, M. I-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms. **Cancer Sci.** v. 99, p. 2380–2386. 2008.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? **Nature Review Drug Discovery.** v. 4, p. 161-165, 2005.

KARTALOU, M.; ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of Resistance to Cisplatin. **Mutation Research.** v. 478. p. 23-43. 2001.

KAMATCHI, T.S.; NATARAJ CHITRAPRIYA, N.; KIM, S.K.; FRONCZEK, F.R.; NATARAJAN, K. Influence of carboxylic acid functionalities in ruthenium (II) polypyridyl complexes on DNA binding, cytotoxicity and antioxidant activity: Synthesis, structure and in vitro anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry.** v. 59, p. 253-264, 2013.

KELLAND, L.R. Preclinical perspectives on platinum resistance. **Drugs.** v.4, p.1-8. 2000.

KELLAND, L.R The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. **Nature.** v. 7, p. 573-584, 2007.

KEPPLER, B.K.; BERGER, M.R.; HEIM, M.E. New tumor-inhibiting metal complexes. **Cancer Treatment Rev.** v. 17, p. 261-277. 1990.

KING A, SELAK MA, GOTTLIEB E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: Linking mitochondrial dysfunction and cancer. **Oncogene.** v. 25, p. 4675–4682. 2006.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel eletrophoresis assay. **MMS Commum.** v. 3, p. 103-115. 1995.

KOBAYASHI, H.; ISHII, Y.; TAKAYAMA, T. Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in esophageal carcinoma. **J Surg Oncol.** v. 90, p. 233–238. 2005.

KOPPENOL, W.H.; BOUNDS, P.L.; DANG, C.V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. **Nat Rev Cancer.** v. 11, p. 325–337. 2011.

LEVINA, A. MITRA, A.; LAY P.A. Recents developments in ruthenium anticâncer drugs. **Metallomics.** v.1, p.458-470, 2009.

LIMA, A. P. de; PEREIRA, F. de C.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; RIBEIRO, A. de S. B. B.; SILVA, C. C. da; PAVANIN, L. A.; SANTOS, W. B. dos; SILVEIRA-LACERDA, E. de P.; The ruthenium complex *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride induces apoptosis and damages DNA in murine sarcoma 180 cells. **J. Biosci,** v. 35, p. 371-378, 2010a.

LIMA, A. P. de; PEREIRA, F. de C.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; MELLO, F. M. dos S.; RIBEIRO, A. de S. B. B.; BENFICA, P. L.; VALADARES, M. C.; PAVANIN, L. A.; SANTOS, W. B. dos; SILVEIRA-LACERDA, E. de P. The compound cis-(dichloro)tetramineruthenium(III) chloride induces caspase-mediated apoptosis in K562 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 1562-1568, 2010b.

LIMA, A. P. de; PEREIRA, F. de C.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; SOARES, J. R.; PEREIRA, L. C. G.; PORTO, H. K. P.; PAVANIN, L. A.; SANTOS, W. B. dos; SILVEIRA-LACERDA, E. de P. **Induction of cell Cycle Arrest and Apoptosis by Ruthenium Complex cis-(Dichloro)tetramineruthenium(III) Chloride in Human Lung Carcinoma Cells A549**. Biol Trace Elem Res, 2012.

LIN, J.; RAOOF, D.A.; THOMAS, D.G.; GREENSON, J.K.; GIORDANO, T.J.; ROBINSON, G.S.; BOURNER, M.J.; BAUER, C.T.; ORRINGER, M.B.; BEER, D.G. L-type amino acid transporter-1 overexpression and melphalan sensitivity in Barrett's adenocarcinoma. **Neoplasia**. v. 6, p. 74-84. 2004.

LIU, Y.J.; CHAO, H.; TAN, L.F.; YUAN, Y.X.; WEI, W.; JI, L.N. Interaction of polypyridyl ruthenium (II) complex containing assymmetric ligand with DNA. **J Inorg Biochem**. v.99, p.530-537, 2005.

LIU, P.; CHENG, H.; SANTIAGO, S.; RAEDER, M.; ZHANG, F.; ISABELLA, A.; YANG, J.; SEMAAN, D.J.; CHEN, C.; FOX, E.A.; GRAY, N.S.; MONAHAN, J.; SCHLEGEL, R.; BEROUKHIM, R.; MILLS, G.B.; ZHAO, J.J. Oncogenic PIK3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms. **Nat Med**. v. 17, p. 1116–1120. 2010.

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

LOPES, A.; CARNEIRO, A. Cirurgia citorrredutora associada a quimioterapia intraperitoneal hipertérmica (QtlPH) no tratamento da carcinomatose peritoneal. **Revista Onco&**. v. 1, p. 26-34. 2011.

LUO, J.; SOLIMINI, N.L.; ELLEDGE, S.J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell**. v. 136, p.823-837, 2009.

MACCHIARULO, A.; CAMAIONI, E.; NUTI, R.; PELLICCIARI, R. Highlights at the gate of tryptophan catabolism: a review on the mechanisms of activation and regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), a novel target in cancer disease. **Amino Acids**. v. 37, p. 2192-29. 2009.

MACRÌ, A.; SALADINO, E.; ADAMO, V.; ALTAVILLA, G.; CONDEMI, G.; MONDELLO, E.; SINARDI, A.; IRATO, S.; FAMULARI, C. The treatment of peritoneal carcinomatosis in elderly patients. **BMC Geriatrics**. v. 10 (Suppl 1), p. 1-2. 2010.

MADY, E.A. Antitumor and biochemical effects of *Echis coloratus* Crude venom on Ehrlich Ascite Carcinoma cells *in vivo*. **J Venon Anim Toxins**. v. 8, p. 283-296. 2002.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**. v. 25: p. 320-332, 1962.

MATSUZAKI, P.; HARAGUCHI, M.; AKISUE, G.; OLORIS, S.C.S.; NAGAMINE, M.K.; SILVA, T.C.; SAKAI, M.; FONSECA, E.S.M.; PALERMO-NETO, J.; GÓRNIK, S.L.; DAGLI, M.L.Z. Antineoplastic effects of butanolic residue of *Pfaffia paniculata*. **Cancer letters**, v. 238, p. 85- 89, 2006.

MARONI, L.C.; SILVEIRA, A.C.O.; LEITE, E.A.; MELO, M.M.; RIBEIRO, A.F.C.; CASSALI, G.D.; SOUZA, C.M.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; CALDAS, I.R.; ARAÚJO, M.S.S.; OLINDO ASSIS MARTINS-FILHO, O.A.; OLIVEIRA, M.C; TEIXEIRA-CARVALHO, A.. Antitumor effectiveness and toxicity of cisplatin-loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes against Ehrlich ascitic tumor. **Experimental Biology and Medicine**. v. 237, p. 973-984, 2012.

MARTÍNEZ, A.; RAJAPAKSE, C.S.; SÁNCHEZ-DELGADO, R.A.; VARELA-RAMIREZ, A.; LEMA, C.; AGUILERA, R.J. Arene-Ru(II)-chloroquine complexes interact with DNA, induce apoptosis on human lymphoid cell lines and display low toxicity to normal mammalian cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v.104,p. 967-977, 2010.

MENEZES, C.S.R.; COSTA, L.C.G.P.; ÁVILA, V.M.R.; FERREIRA, M.J.; VIEIRA, C. U.; PAVANIN, L.A., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., HAMAGUCHI, A.; Silveira-Lacerda, E.P. Analysis *in vivo* of antitumor activity, Cytotoxicity and Interaction between plasmid DNA and the *cis*-dichlorotetraammineruthenium (III) chloride. **Chemico-Biological Interactions**. v.167. p.116-124. 2007.

MESQUITA, M.L.; de PAULA, J.E.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L.S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **J. Ethnopharmacol**. v. 123, p.:439-45. 2009.

MOORE, K.P.; AITHAL, G.P. Guidelines on the management of ascites in cirrhosis. **Gut**. Suppl 6:v. I, p. 1-12. 2006.

MORAES, M.O.; BEZERRA, F.A.F.; COSTA-LOTUFO, L.; MORAES, M.E.A. Avaliação Clínica da Eficácia e Segurança de Fitoterápicos no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**. v. 1, p. 30-38, 2003.

MORBIDELLI, L.; DONNINI, S.; FILIPPI, S.; MESSORI, L.; PICCIOLI, F.; ORIOLI, P.; SAVA, G.; ZICHE, M.; Antiangiogenic properties of selected ruthenium(III) complexes that are nitric oxide scavengers. **British Journal of Cancer**. v. 88. p. 1484-1491. 2003.

MORENO, V, FONT-BARDIA M, CALVET T, LORENZO J, AVILÉS FX, GARCIA MH, MORAIS TS, VALENTE A, ROBALO MP.. DNA interaction and cytotoxicity studies of new ruthenium (II) cyclopentadienyl derivate complexes containing heteroaromatic ligands. **J Inorg Biochem**. v.105, p.241-249, 2011.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth an survival: application to

proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**. v. 16, p. 55-63, 1983.

MOTA, M.F.; BENFICA, P.L.; BATISTA, A.C.; MARTINS, F.S.; PAULA, J.R.; VALADARES, M.C. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 139, p. 319–329. 2012.

MUGGIA, F.; FOJO, T. Platinums: extending their therapeutic spectrum. **J Chem**. v. 16, p. 77–82. 2004.

NICKLIN, P.; BERGMAN, P.; ZHANG, B.; TRIANTAFELLOW, E.; WANG, H.; NYFELER, B.; YANG, H.; HILD, M.; KUNG, C.; WILSON, C.; MYER, V.E.; MACKEIGAN, J.P.; PORTER, J.A.; WANG, Y.K.; CANTLEY, L.C.; FINAN, P.M.; MURPHY, L.O. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. **Cell**. v. 136, p. 521-34. 2009.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2000. Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animal used in safety evaluation. Disponível em: <http://www.oecd.org/ehs/>.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2001. Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Guideline: 423. Disponível em: <http://www.oecd.org/ehs/>.

OSTI, R.Z.; SERRANO, F.A.; PASCHOALIN, T.; MASSAOKA, M.H.S.; TRAVASSOS, L.R.; DANIELA R. TRUZZI, D.R.; RODRIGUES, E.G.; FRANCO, D.W. The In Vitro and In Vivo Antitumour Activities of Nitrosyl Ruthenium Amine Complexes. **Aust. J. Chem**. v. 65, p. 1333–1341, 2012.

PACOR, S.; ZORZET, S.; COCCHIETTO, M.; BACAC, M.; VADORI, M.; TURRIN, C.; GAVA, B.; CASTELLARIN, A.; SAVA, G.; Intratumoral NAMI-A Treatment Triggers Metastasis Reduction, Which Correlates to CD44 Regulation and Tumor Infiltrating Lymphocyte Recruitment. **J of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.310, n.2, p.737-744, 2004.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C.O.; SOUZA, W.R. Effects of physical and psychological stressors on behaviour, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain Behavior and Immunity**. v. 17, p. 43-54. 2003.

PETTERINO, C.; ARGENTINO-STORINO, A. Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 57, p. 213-219. 2006.

PIRES-JÚNIOR, H.B.; BORGES, L.M.F.; SOUSA, L.A.D.; CUNHA, L.C.; LINO-JÚNIOR, R.S.L.; MELO, D.F.A.; PEREIRA, M.E. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (MELLIACEAE) em camundongos. **Ci. Anim. Bras**. v. 13, n. 4, p. 512-519, 2012.

RADEMAKER-LAKAHAI, J.M.; BONGARD, D.V.D.; PLUIM, D.; BEIJNEN, J.H.;

SCHELLENS, J.H.M. A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent. **Clinical Cancer Research**. v.10, p.3717-3727, 2004.

REIS, O.T.G.; RAINI, J.C.; CORADI, S.T.; CONSTANTINO, D.H.J. Effect of L-arginine and L-NAME treatments on polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells influx during tumor growth. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.24, n.2, p.107-111, 2009.

REZENDE, M.R.M. Avaliação da atividade citotóxica, clastogênica e genotóxica do composto ditionato de cis-tetraamino(oxalato)rutênio(III) em linfócitos do sangue periférico humano. 76 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2010.

RIBEIRO, A. de S. B. B.; SILVA, C. C. da; PEREIRA, F. de C.; LIMA, A. P. de; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; AGUIAR, S. S.; PAVANIN, L. A.; CRUZ, A. D. da; SILVEIRA-LACERDA, E. de P. Mutagenic and Genotoxic Effects of *cis*-(Dichloro)tetraammineruthenium(III) Chloride on Human Peripheral Blood Lymphocytes. **Biol Trace Elem Res**, v. 130, p. 249-261, 2009.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; TROSKO, J.; MANSOUR, V. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, n. 5191, p. 385-386, 1969.

SAKATA, T.; FERDOUS, G.; TSURUTA, T.; SATOH, T.; BABA, S.; MUTO, T.; UENO, A.; KANAI, Y.; ENDOU, H.; OKAYASU, I. L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer. **Pathol Int**. v. 59, p. 7–18. 2009.

SANO, T. Is peritoneal carcinomatosis an incurable disease or controllable locoregional condition? – Challenge of surgeons with intraperitoneal hyperthermic chemotherapy. **Jpn J Clin Oncol**. v. 31, p. 1571-1572, 2001.

SATHISHA, M.P.; REVANKAR, V.K.; PAI, K.S.R. Synthesis, structure, electrochemistry and spectral characterization of bis-isatin thiocarbohydrazone metal complexes and their antitumor activity against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Metal based Drugs**, p. 1-11. 2008.

SAVA, G.; CLERICI, K.; CAPOZZI, I.; COCCHIETTO, M.; GAGLIARDI, R.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; PERBELLINI, A. Reduction of lung metastasis by ImH[*trans*-RuCl₄(DMSO)Im]: mechanism of the selective action investigated on mouse tumors. **Anticancer Drugs**. v. 10, p. 129-138, 1999.

SAVA, G.; FRAUSIN, F.; COCCHIETTO, M.; VITA, F.; PODDA, E.; SPESSOTTO, P.; FURLANI, A.; SCARCIA, V.; ZABUCCHI, G. Actin-dependent tumor cell adhesion after short exposure to the antimetastatic ruthenium complex NAMI-A. **Eur J Cancer**. v. 40, p. 1383–1396. 2004.

SCOLARO, C.; BERGAMO, A.; BRESCACIN, L.; DELFINO, R.; COCCHIETTO, M.; LAURENCZY, G.; GELDBACH, T.J.; SAVA, G.; DYSON, P.J. In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes. **J Med Chem.** v. 16, p. 4161-4171. 2005.

SCOTT, M.P. Cancer: A twist in the Hedgehog's tale. **Nature**, v. 425, p. 780-782. 2003.

SEMENZA, G.L. HIF-1: Upstream and downstream of cancer metabolism. **Curr Opin Genet Dev.** v. 20, p. 51-56. 2010.

SIDDIK, Z.H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene.** v.22, p.7265-7279. 2003.

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R; FERREIRA, E.; MORAES, J.R.C; OCARINO, N.M.; CASSALI, G.D. Efeito do hipotireoidismo no tumor de ehrlich sólido em camundongos fêmeas castradas e não castradas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*v.48, n. 6, p.867-874, 2004.

SILVA, A.E.; SANTOS, F.G.A.; CASSALI, G.D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 58, n. 4, p. 658-661, 2006.

SILVEIRA-LACERDA, E. de P.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; PEREIRA, F. de C.; HAMAGUCHI, A.; PAVANIN, L. A.; GOULART, L. R.; HOMSI -BRANDENBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; SANTOS, W. B. dos; NOMIZO, A. The Ruthenium Complex *cis*-(Dichloro)tetraammineruthenium(III) Chloride Presents Immune Stimulatory Activity on Human Piripheral Blood Mononuclear Cells. **Biol Trace Elem Res**, v. 133, p. 270-283, 2010a.

SILVEIRA-LACERDA, E. de P.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; HAMAGUCHI, A.; PAVANIN, L. A.; GOULART, L. R.; HOMSI -BRANDENBURGO, M. I.; SANTOS, W. B. dos; SOARES, A. M.; NOMIZO, A. The Ruthenium Complex *cis*-(Dichloro)tetraammineruthenium(III) Chloride Presents Selective Cytotoxicity Against Murine B Cell Lymphoma (A-20), Murine Ascitic Sarcoma 180 (S-180), Human Breast Adenocarcinoma (SK-BR-3), and Human T Cell Leukemia (Jurkat) Tumor Cell Lines. **Biol Trace Elem Res.**, v. 135, p. 98-111, 2010b.

SINGH, N.P.; MC COY, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low DNA levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** v. 175. p. 184-191, 1988.

SHANHJAHAN, M.; SABITHA, K.E.; MALLIKA, J.; SHYAMALA-DEVIS, C.S. Effect of *Solanum triobatum* against carbon tetrachloride induced hepatic damage in albino rats. **Indian J Med Res.** v. 120, p. 194-198, 2004.

SEGURA, J. A.; BARBERO, L.G.; MÁRQUEZ, J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. **FEBS Lett.** v. 414, p. 1-6, 1997.

SEGURA, J. A.; BARBERO, L.G.; MÁRQUEZ, J. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. **Immunol. Lett.**, v.74, p.111-115, 2000.

SU, H.; TSAI, C.; PERNG, R. Peritoneal carcinomatosis in lung câncer. **Respirology**. v. 13, p. 465-467, 2008.

SUGARBAKER, P.H. Overview of peritoneal carcinomatoses. **Cancerologia**. v. 3, p. 119-124. 2008.

SUNIL, D.; ISLOOR, A.M.; SHETTY, P.; NAYAK, P.G.; PAI, K.S.R. *In vivo* anticancer and histopathology studies of Schiff bases on Ehrlich ascitic carcinoma cells. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 6, p. 25–33, 2013.

SÜSS-FINK, G. Arene ruthenium complexes as anticancer agents. **Dalton Trans**, v. 39, p.1673-1688, 2010.

TAN, C.; LIU, J.; LI, H.; ZHENG, W.; SHI, S.; CHEN, L.; JI, L. Differences in structure, physiological stability, electrochemistry, cytotoxicity, DNA and protein binding properties between two Ru(III) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 347-358, 2008.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen.** v. 35, n. 3, p. 206-221. 2000.

TIMERBAEV, A.R.; HARTINGER, C.G.; ALEKSENKO, S.S.; KEPPLER, B.K. Interactions of Antitumor Metallodrugs with Serum Proteins: Advances in Characterization Using Modern Analytical Methodology. **Chem. Rev.** v. 106, p. 2224-2248. 2006.

TOMAZ, I.A.; JAKUSCH, T.; MORAIS, T.S.; MEQUES, F.; ALMEIDA, R.F.M.; MENDES, F.; ENYED, E.A.; SANTOS, I.; PESSOA, J.C.; KISS, T.; GARCIA, M.H. [RuII(η^5 -C₅H₅)(bipy)(PPh₃)⁺, a promising large spectrum antitumor agent: Cytotoxic activity and interaction with human serum albumin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.117, p. 261-269, 2012.

UMEKI, N.; FUKASAWA, Y.; OHTSUKI, S.; HORI, S.; WATANABE, Y.; KOHNO, Y.; TERASAKI, T. mRNA expression and amino acid transport characteristics of cultured human brain microvascular endothelial cells (hBME). **Drug Metab Pharmacokinet**. v. 17, p. 367–373. 2002.

UNDEVIA, S.D.; GOMES-ABUIN, G.; RATAIN, M.J. Pharmacokinetic variability of Anticancer Agents. **Nat. Rev. Cancer**. v. 5, p. 447-458, 2005.

VANDER HEIDEN, M.G.; CANTLEY, L.C.; THOMPSON, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**. v. 22, p. 1029-1033. 2009.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VERMEULEN K, BERNEMAN ZN, VAN BOCKSTAELE DR. Cell cycle and apoptosis. **Cell Proliferation**. v. 36, p. 165-175, 2003.

ZASLAVSKY, A.; CHEN, C.; GRILLO, J.; BAEK, K.; HOLMGREN, L.; YOON, S.S.; JUDAH FOLKMAN, J.; RYEOM, S. Regional Control of Tumor Growth. **Mol Cancer Res**. v. 8, p. 1198–1206. 2010.

ZHENG, M.; HAN, B.; YANG, Y.; LIU, W. Synthesis, characterization and biological safety of O-carboxymethyl chitosan used to treat Sarcoma 180 tumor. **Carbohydrate Polymers** . v. 86, p. 231– 238, 2011.

WANG, Q.; BAILEY, C.G.; Ng, C.; TIFFEN, J.; THOENG, A.; MINHAS, V.; LEHMAN, M.L.; HENDY, S.C.; BUCHANAN, G.; NELSON, C.C.; RASKO, J.E.; HOLST, J. Androgen receptor and nutrient signaling pathways coordinate the demand for increased amino acid transport during prostate cancer progression. **Cancer Res**. v. 71, p. 7525-7536. 2011.

WANG, Q.; TIFFEN, J.; BAILEY, G.C. Targeting Amino Acid Transport in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Effects on Cell Cycle, Cell Growth, and Tumor Development. **J Natl Cancer Inst**. v. 105, p. 1463-1473. 2013.

WONG, E., GIANDOMENICO, C.M. Current status of platinum-based antitumor drugs. **Chem. Rev**. v. 99, p.2451–2466. 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health Statistics and Informatics Department. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em: 17 de janeiro de 2014.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**. v. 37, p. 1–17, 2009.

YAN, H; PARSONS, D.W.; JIN, G.; MCLENDON, R.; RASHEED, B.A.; YUAN, W.; KOS, I.; BATINIC-HABERLE, I.; JONES, S.; RIGGINS, G.J.; FRIEDMAN, H.; FRIEDMAN, A.; REARDON, D.; HERNDON, J.; KINZLER, K.W.; VELCULESCU, V.E.; VOGELSTEIN, B.; BIGNER, D.D. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **N Engl J Med**. 360:765–773. 2009.

ANEXO A - Protocolo 039/12 aprovado pela CEUA/PRPPG/UFG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 14 de janeiro 2013.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA PROTOCOLADO NA CEUA SOB O Nº. 039/2012

I. IDENTIFICAÇÃO:

1. **Título do projeto:** Estudo do perfil toxicológico, atividade antitumoral, mutagenicidade, genotoxicidade e mecanismo de indução de morte celular de diferentes complexos de rutênio em camundongos
2. **Pesquisador Responsável:** Elisângela de Paula Silveira Lacerda
3. **Pesquisadores colaboradores**
Andris Figueiroa Bakuzis
Aliny Pereira Lima
Cesar Augusto Sam-Tiago Vila Nova
Flávia de Castro Pereira
Francielli Mariana dos Santos Mello
Wanessa Carvalho Pires
Wanderson Lucas da Costa
4. **Unidade/Órgão:** ICB – UFG
5. **Unidade onde será realizado:** ICB
6. **Data de apresentação do protocolo na CEUA:** 04/04/2012
7. **Data do relato:** 14/05/2012
8. **Data de Atendimento das Pendências:** 11/01/2013

II - Parecer da CEUA:

Após reunião com a coordenadora do projeto foi apresentada uma carta com o atendimento das pendências quanto à analgesia dos animais.

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08.

III - Data da reunião: 14/01/13

Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera

Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFG

Profª. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação / UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP: 74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.

Email: ceua.ufg@gmail.com