



**Serviço Público Federal
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia - Mestrado
Área de Concentração – Biologia Celular e Molecular**

FLÁVIA DE CASTRO PEREIRA

**Avaliação do Potencial Citotóxico, Genotóxico e Antitumoral do
Ditionato de *cis*-Tetraamino(oxalato)rutênio(III) em Diferentes
Linhagens Celulares**

Goiânia

2010

FLÁVIA DE CASTRO PEREIRA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Biologia, Área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof. Dra. Elisangela de Paula Silveira Lacerda.

Goiânia

2010

**Avaliação da Atividade Citotóxica, Genotóxica e Anti-Tumoral do
Composto Ditionato de *cis*-Tetraamino(oxalato)rutênio(III) sobre
Diferentes Linhagens Celulares**

Flávia de Castro Pereira B.Sc¹ *

Prof^a. Dr.^a Elisângela de Paula Silveira Lacerda¹

¹ Laboratório de Genética Molecular e Citogenética. ICB I - sala 200. Campus II. Universidade Federal de Goiás.

* Correspondência: silveiralacerda@gmail.com

Elisângela de Paula Silveira Lacerda
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral

Janeiro/ 2010

**Programa de Pós-Graduação em Biologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: FLÁVIA DE CASTRO PEREIRA

Orientadora: Profa. Dra. ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA LACERDA

Membros:

1. Dra. ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA LACERDA

2. Dr. ALZIR AZEVEDO BATISTA

3. Dra. SIMONE MARIA TEIXEIRA DE SABÓIA-MORAIS

ou

4. Dr. CLÁUDIO CARLOS DA SILVA

5. Dra. LEE CHEN CHEN

Data: 22/01/2010

Dedicatória

Aos meus pais, Maria Francisca Pereira de Castro e Orlando de Castro Sobrinho, exemplo de coragem, vida e amor. Obrigada pelo incentivo, compreensão, amor, dedicação e orações em todos os momentos da minha vida. A vocês, o meu eterno amor.

Ao meu namorado Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova Costa, pelo amor, dedicação, carinho e compreensão, que sempre esteve presente em todos os momentos. Obrigada por nunca desistir de mim, e por todo apoio e amor nesses seis anos juntos.

Ao meu irmão Patrick Carlos de Castro, por sempre estar presente em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por mais esta etapa de aprendizagem em minha vida, mas, acima de tudo, o agradeço por sempre ter me colocado no caminho certo, por nunca me deixar enfraquecer em meio às adversidades.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial, à minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Elisângela de Paula Silveira Lacerda, pelo exemplo de pesquisadora a ser seguido, que me ensinou grandes lições sobre conduta profissional e pessoal e a quem dedico profunda admiração, respeito e carinho. Muito do que sou, devo a você. Obrigada por estar sempre presente e, o mais importante, obrigada por acreditar em mim.

Ao Prof. Dr. Luis Alfredo Pavanin e sua equipe do Laboratório de Química da Universidade da Federal de Uberlândia, pela síntese e fornecimento do composto de Rutênio, muito importante para a realização deste trabalho.

À Prof^ª. Dr^ª. Marize Campos Valadares Bozinis pela disponibilidade do Laboratório de Farmácia para leitura das amostras.

À equipe do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, em especial aos meus amigos César Augusto Sam Tiago Vilanova Costa, Aliny Pereira de Lima, Alessandra Braga de Santana, Manuela Rocha Rezende, Hugo Delleon da Silva e Lucas Gomes Carlos Pereira, obrigado pela confiança e auxílio durante o mestrado e acima de tudo, pela amizade.

A todos os estagiários do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética em especial à Franciely Mariana dos Santos Melo, Wanessa Carvalho, Mariana Pedrosa Batista, Darline Kist Engelmann e Osmar Nunes de Oliveira que me auxiliaram em partes da pesquisa.

À minha colega Polyana Lopes Benfica, pela leitura das amostras no citômetro de fluxo.

Aos funcionários da Universidade Federal de Goiás; pelo auxílio e compreensão no decorrer da pesquisa.

Ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, pela estrutura didática e técnica para a realização dos estudos e trabalhos do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq, pela bolsa de estudos.

À toda a minha família pelo incentivo.

*“Não importa o que você faça ou sonhe que possa fazer: comece logo. A audácia,
por si só, atrai criatividade, poder e magia”.*

“Goethe”

SUMÁRIO

Lista de Figuras da Introdução e da Revisão de Literatura.....	x
Lista de Figuras e Tabelas do Artigo 1.....	xi
Lista de Figuras do Artigo 2.....	xii
Lista de Figuras e Tabelas do Artigo 3.....	xii
Lista de Anexos.....	xiv
Siglas e Abreviaturas.....	xv
Resumo.....	xviii
Abstract.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. Câncer.....	23
1.2. Compostos de Rutênio no Tratamento do Câncer.....	25
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	30
2.1. Ciclo Celular.....	30
2.2. Apoptose.....	32
2.3. Quimioterapia antineoplásica	37
2.4. Compostos baseados em metal usados na terapia antitumoral	40
2.5 Complexos de Rutênio e seu Mecanismo de Ação.....	45
2.6. Cultura de Células	55
2.7. Citotoxicidade.....	57
3. JUSTIFICATIVA.....	60
4. OBJETIVOS.....	62
4.1. Objetivo Geral.....	62

4.2. Objetivos Específicos	62
5. METODOLOGIA.....	63
5.1. Síntese do Composto Ditionato de <i>cis</i> -Tetraamino(oxalato)rutênio(III)	63
5.2. Teste <i>Allium cepa</i>	64
5.3. Droga antitumoral controle.....	65
5.4. Preparação do composto de Rutênio para ensaios biológicos <i>in vitro</i>	65
5.5. Meio de cultura celular.....	66
5.6. Linhagens celulares tumorais e normais	66
5.7. Cultura de células tumorais.....	67
5.8. Avaliação do potencial citotóxico e antitumoral.....	67
5.9. Ensaio cometa.....	70
5.10. Citometria de fluxo: Avaliação das fases do ciclo celular e apoptose.....	72
5.11. Eletroforese em gel de agarose.....	73
5.12. Análise Estatística.....	74
6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	75
6.1. ARTIGO 1.....	77
6.2. ARTIGO 2.....	104
6.3. ARTIGO 3.....	129
7.0. CONCLUSÕES.....	158
8.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	155
9.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	162
10.0 ANEXOS.....	172

LISTA DE FIGURAS E TABELAS DA INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Estimativas, para o ano 2008, do número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária.....	25
Figura 1 – Pontos de checagem do sistema de controle do ciclo celular.....	32
Figura 2 – Características de uma célula em necrose e apoptose.....	34
Figura 3 – Via intrínseca e extrínseca da apoptose.....	36
Figura 4 – Estrutura química da Cisplatina.....	41
Figura 5 – Estrutura química de antitumorais a base de platina.....	42
Figura 6 – Diferentes tipos de adutos DNA-cisplatina, para uma dada seqüência aleatória. O aduto intrafita 1,2-GG (superior esquerdo) é considerado uma lesão crítica.....	43
Figura 7 – Estrutura química do composto NAMI-A (<i>trans</i> imidazoldimetilsulfoxidotetraclororutênio).....	44
Figura 8 – Estrutura do composto de Rutênio KP1019 {Indazolium <i>trans</i> -[(tetracloreto)bis(1H-indazol)rutênio(III)]}.....	45
Figura 9 – Mecanismo de ação do rutênio no ambiente da célula tumoral.....	48
Figura 10 – Estrutura Química do Composto de rutênio Cloreto de <i>cis</i> -Tetraaminodiclororutênio (III).....	54
Figura 11 – Complexo de Ditionato <i>cis</i> -Tetraamino(oxalato)rutênio(III).....	54
Figura 12 – Classificação de leitura para o Ensaio Cometa.....	71

LISTA DE FIGURAS E TABELAS DO ARTIGO 1

Figure 1 – Mitotic index of <i>A. cepa</i> root tips exposed to <i>cis</i> - [Ru(C ₂ O ₄)(NH ₃) ₄] ₂ (S ₂ O ₆) and Pb (NO ₃) ₂	86
Figure 2 – Chromosomal aberrations in root tip cells of <i>A. cepa</i> L. exposed to Ruthenium complex (a, b, d, and e) and lead nitrate (c, f, g, and h)...	89
Table 1 – Cytogenetic Analysis of <i>A. cepa</i> Root Cells Exposed to Different Concentrations of <i>cis</i> -Tetraammine(oxalato)Ruthenium(III) Dithionate and Lead Nitrate for Different Periods.....	91

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 2

Figure 1 – Chemical structure of <i>cis</i> -Tetraammine(oxalato)Ruthenium(III) Dithionate.....	124
Figure 2 – Anti-proliferative activity of <i>cis</i> -Tetraammine(oxalato)Ruthenium (III) Dithionate compound towards A-549 and MRC-5 cell lines.....	125
Figure 3 – Cytotoxic activity of <i>cis</i> -Tetraammine(oxalato)Ruthenium(III) Dithionate compound towards A-549 and MCR-5 cell lines	126
Figure 4 – Proliferation of A-549 tumor cells cultured in the presence of different concentrations of <i>cis</i> -[RuCl ₂ (NH ₃) ₄]Cl compound.....	127
Figure 5 – DNA agarose gel electrophoresis profile of A-549 cells cultured in the presence of <i>cis</i> -[Ru(C ₂ O ₂)(NH ₃) ₄] ₂ (S ₂ O ₆) compound.....	128

LISTA DE FIGURAS E TABELAS DO ARTIGO 3

Figure 1 – Chemical structure of <i>cis</i> -Tetraammine(oxalato)Ruthenium(III) Dithionate.....	152
Figure 2 – Anti-proliferative activity of <i>cis</i> -Tetraammine(oxalato)Ruthenium(III) Dithionate compound towards K562 cell line.....	153
Figure 3 – Cytotoxic activity of <i>cis</i> -Tetraammine(oxalato)Ruthenium(III) Dithionate compound towards K562 cell line (a and b).....	154
Figure 4 – Induction of DNA strand breaks of A-549 cells cultured in the presence of <i>cis</i> -[Ru(C ₂ O ₄)(NH ₃) ₄] ₂ (S ₂ O ₆) compound.....	155
Figure 5 – Cell cycle profile histogram of K562 cells treated with <i>cis</i> -Tetraammine(oxalato)Ruthenium(III) Dithionate.....	156
Table 1 – Cell cycle analysis of K562 tumor cell lines after treatment with <i>cis</i> -Tetraammine(oxalato)Ruthenium(III) Dithionate.....	157

ANEXOS

Anexo 1 – Artigo 1 “Cytotoxic and genotoxic effects of *cis*-Tetraammine(oxalato)Ruthenium(III) Dithionate on the root meristem cells of *Allium cepa* “, publicado no periódico Biological Trace Element Research, Springer, (2009) 128, 258-268;

SIGLAS E ABREVIATURAS

AIF – Fator indutor de apoptose, do inglês *Apoptosis-Inducing Factor*;

Bad – Agonista de morte celular associado a BCL2, do inglês BCL2-associated agonist of cell death

Bak – Proteína destruidora de Antagonistas de BCL2, do inglês BCL2-antagonist/killer 1;

Bax – Proteína X associada à BCL2, do inglês BCL2-associated X protein;

Bcl2 – Proteína reguladora anti-apoptótica, do inglês B-cell CLL/lymphoma 2.

Bcl-w – Proteína reguladora anti-apoptótica, agonista de Bcl2;

Bcl-Xs – Proteína reguladora pró-apoptótica antagonista de Bcl2;

Bid – Proteína reguladora pró-apoptótica antagonista de Bcl2, do inglês BH3 interacting domain death agonist;

Bik – Proteína reguladora pró-apoptótica antagonista de Bcl2, do inglês BCL2-interacting killer

cis-Pt (II) – Cisplatina II;

DD – Domínio de morte celular, do inglês *Death Domain*;

DIABLO – Proteínas ligantes de IAP com baixo ponto isoelétrico, do inglês *direct IAP binding protein with low PI*;

DL₅₀ – Dose Letal 50%;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

DNA – Ácido Desoxirribonucléico;

Et al. – e outros, do latim *et alii*;

Fas – receptor de superfície envolvido na ativação da apoptose (pertence a família TNF);

Fase M – fase de mitose do ciclo celular;

Fase S – fase de síntese do ciclo celular;

FDA (E.U.A.) – Food and Drug Administration, agência regulatória de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos da América;

FLIPs – Proteína inibitória homóloga a FLICE, do inglês *FLICE-like inhibitory protein*;

G₀ – Do inglês Gap, intervalo. Fase Gap0 do ciclo celular;

G₁ – Do inglês Gap, intervalo. Fase Gap1 do ciclo celular;

G₂ – Do inglês Gap, intervalo. Fase Gap2 do ciclo celular;

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana;

IAPs – Proteínas inibidoras de apoptose, do inglês *Inhibitors of Apoptosis Proteins*;

IC₅₀ – Inibição de Concentração 50%;

INCA – Instituto Nacional de Câncer;

Kbp – quilopares de bases;

KP1019 – Composto Indazolium *trans*-[(tetracloreto)bis(1H- indazol)rutênio(III)];

Mcl-1 – Leucemia mielóide - sequência 1, do inglês *Myeloid Cell Leukemia Sequence 1*;

mg.kg⁻¹ – Miligrama por quilograma;

mg.mL⁻¹ – Miligrama por mililitro;

MS – Ministério da Saúde.

NAMI A – Composto *trans*-imidazoldimetilsulfoxidotetraclororutênio;

NCI – Instituto Nacional do Cancer dos Estados Unidos da América, do inglês *National Cancer Institute*;

NO – Óxido Nitrico;

NGFr – Fator de crescimento de nervos, dos inglês *Nerve Growth Factor*;

Omi/HtrA2 - proteína A requerida em altas temperaturas;

pH – potencial hidrogeniônico

RM175 – Composto de Rutênio $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_5)\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$;

RNA – Ácido Ribonucléico;

Ru (II) – Rutênio em estado de oxidação II;

Ru (III) – Rutênio em estado de oxidação III;

Ru (IV) – Rutênio em estado de oxidação IV

SMAC – Segundo ativador de caspase derivado da mitocôndria, do inglês *Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases*;

Tf – Proteína transferrina;

TNF – Fator de necrose tumoral, do inglês *Tumor Necrosis Factor*;

TRAIL-R1 – Superfamília do Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral, do inglês *Tumor necrosis factor receptor 1*;

RESUMO

Apesar do sucesso da cisplatina e dos medicamentos à base de platina, o mercado de fármacos ainda é acessível para novas drogas à base de metal que oferecem uma melhor viabilidade, tais como a administração oral, o que pode ajudar a diminuir os efeitos colaterais graves e custos clínicos. Além disso, novos estudos concentram-se na investigação de novas drogas com maior eficácia, ou seja, drogas que interajam de forma diferente com o DNA, o que pode levar à superação da resistência inata ou adquirida de certos tipos de tumores. Dentre os vários complexos à base de metais desenvolvidos, os complexos de rutênio (III) representam uma nova família de promissores agentes anticâncer. No presente estudo foi investigado *in vitro* o efeito do composto Ditionato de *cis*-Tetraamino(oxalato)rutênio(III) sobre a viabilidade celular, distribuição das fases do ciclo celular, mecanismos de indução de apoptose e danos à molécula de DNA. Os resultados provenientes da análise do teste *Allium cepa* mostraram um efeito tempo dose-dependente. A avaliação mostrou que a concentração de rutênio teve um impacto maior do que o tempo de exposição. O efeito também se mostrou cumulativo, com uma quase completa inibição da mitose em uma concentração de rutênio de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ou superior por períodos superiores a 24 h. Por outro lado, os resultados não revelaram efeitos clastogênicos significativos nas células meristemáticas expostas ao complexo de rutênio (III). A comparação entre os valores dos Índice Mitótico de células meristemáticas de cebolas tratadas com o complexo de rutênio em relação às células tratadas com nitrato de chumbo também mostrou que o complexo de rutênio induziu uma inibição mitótica média oito vezes maior do que o chumbo. Notadamente, as frequências de anomalias e aberrações celulares mitóticas foram quase quatro vezes e três vezes menores, respectivamente. Os resultados mostram que o composto estudado causa

significativa redução da proliferação das células A549 com viabilidades entre 55,5% para 24,6% quando tratados com 40 μM por 24 e 48h; e 32% para 18,2% quando tratados com 150 μM por 24 e 48h. O composto de rutênio(III) induz moderada (31,9% e 39,6% para concentrações 10 e 40 μM , respectivamente) para alta degradação (74% para a concentração 150 μM) para avaliação da atividade citotóxica das células A549 (IC_{50} = 33,72 μM). Quanto à linhagem de fibroblasto de pulmão humano normal MRC-5, não mostrou redução significativa na proliferação celular na presença do composto. Quando tratadas com altas concentrações do Ditionato *cis*-Tetraamino(oxalato)rutênio(III) por 48 horas, células MRC-5 mostraram viabilidades altas de 85% e 78,4% para 40 μM e 150 μM , respectivamente. A atividade citotóxica e antiproliferativa revelou que a cultura de células K562 nas concentrações de 40 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do composto de Rutênio(III) mostrou redução significativa na proliferação 72h de exposição, com viabilidades de 88,2% para 55,6% quando tratadas com 40 μM por 24 e 72h; e 76,2% para 26,7% quando tratadas com 150 μM por 24 e 72h. O composto de Rutênio(III) induziu baixa [22,4% (24h) para 28,2% (48h) e 29,8% (24h) para 35,7% (48h) para concentrações de 10 e 40 μM , respectivamente] para moderada [44% (24h) e 53% (48h) para concentrações de 150 μM] atividade citotóxica em células K562. Após a incubação de 48 h, o valor da IC_{50} foi de 18,28 μM . Quando comparado o ciclo celular de células não tratadas, a análise indica que as células foram arrastadas para sub-G1 apresentando um aumento de 1,7 para 2,2 e 2,4% no número de células em sub-G1 por 24, 48 e 72 h, respectivamente, quando comparado com o grupo controle. O composto também causou um significativo aumento em danos celulares nas concentrações testadas quando comparado com o controle negativo, o que pode estar associado com efeitos citotóxicos diretamente no DNA celular.

Palavras-chave: Apoptose, atividade antitumoral, A549, citotoxicidade, Ditionato de *cis*-Tetraamino(oxalato)rutênio(III), genotoxicidade, K562.

ABSTRACT

Despite the resounding success of cisplatin and closely related platinum antitumor agents, the movement of other transition-metal antitumor agents toward the clinic has been exceptionally slow. Non-Platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals hold much promise for the future, and needs to be actively explored in a large variety of tumor types in combination therapies. The preparations of metallocomplexes with potential antitumor activity has been one of the main targets of transition metal chemistry since Rosenberg's discovery of cisplatin {*cis*-diamminedichloridoplatinum(II), *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂]} cytotoxic activity in the 1960s. In 1978, cisplatin was approved as the first platinumbased drug for the oncology treatment, although several negative side-effects (nephrotoxicity, neurotoxicity, nausea, etc.) had been induced on treated patients. Nevertheless, cisplatin was followed by carboplatin {*cis*-diammine-1,1'-cyclobutanedicarboxylateplatinum(II), [Pt(NH₃)₂(cbdc)]}, approved in 1985} and oxaliplatin {1*R*,2*R*-diamminocyclohexaneoxalatoplatinum(II), [Pt(dach)(ox)]}, approved in 1996}, which met requirements of improving antitumor activity and reducing disadvantages of cisplatin, carboplatin and oxaliplatin represent the second, and third platinum-based drug generations, respectively. Nowadays, not only platinum-bearing complexes are extensively studied with the aim to broaden a spectrum of transition metal-based complexes which could be used in the treatment of cancer. Ruthenium complexes have shown potential utility in chemotherapy and photodynamic therapy. Ruthenium complexes generally have lower toxicities compared to cisplatin attributed to their specific accumulation in cancer tissues. In vitro and in vivo studies show high anticancer activity of Ruthenium complexes and some of them are currently undergoing clinical trials. In the present work we studied the antitumor activity of the

Ruthenium(III) compound *cis*-Tetraammine(oxalato)Ruthenium(III) Dithionate {*cis*-[Ru(C₂O₄)(NH₃)₄]₂(S₂O₆)} against different tumor and normal cells lineages, analysing cell viabilities, cell cycle distribution, apoptosis induction mechanisms and genome DNA damage. Correlation tests were performed to determine the effects of the time of exposure and concentration of Ruthenium complex on mitotic index (MI) and mitotic aberration index on *Allium cepa* root cells. A comparison of MI results of *cis*-[Ru(C₂O₄)(NH₃)₄]₂(S₂O₆) to those of lead nitrate reveals that the Ruthenium complex demonstrates an average mitotic inhibition eightfold higher than lead, with the frequency of cellular abnormalities almost fourfold lower and mitotic aberration threefold lower. *A. cepa* root cells exposed to a range of Ruthenium complex concentrations did not display significant clastogenic effects. The *cis*-Tetraammine(oxalato)Ruthenium(III) Dithionate therefore exhibits a remarkable capacity to inhibit mitosis, perhaps by inhibiting DNA synthesis or blocking the cell cycle in the G2 phase. Results showed that Ruthenium(III) causes a significant reduction of proliferation of A549 cells with viabilities ranging from 55.5% to 24.6% when treated with 40 µM for 24 and 48h; and 32% to 18.2% when treated with 150 µM for 24 and 48h. The Ruthenium(III) compound induced a moderate (31.9% and 39.6% for concentrations 10 and 40 µM, respectively) to high degree (74% for concentration 32 µM) of cytotoxic activity against A549 cells (IC₅₀= 33.72 µM). On the other hand, the normal lung fibroblast MRC-5 did not show significant reduction proliferation in the presence of Ruthenium(III) compound. Even when treated with higher concentrations of *cis*-Tetraammine(oxalato)Ruthenium(III) Dithionate for 48 hours, MRC-5 cells showed viabilities ranging from 85% to 78.4% for 40 µM and 150 µM, respectively. The antiproliferative and cytotoxic activity revealed that K562 cells cultured with concentrations 40 and 150 µg mL⁻¹ of Ruthenium(III) compound showed

significant reduction of proliferation after 72h of exposition, with viabilities ranging from 88.2% to 55.6% when treated with 40 μ M for 24 and 72h; and 76.2% to 26.7% when treated with 150 μ M for 24 and 72h. The Ruthenium(III) compound induced low [22.4% (24h) to 28.2% (48h) and 29.8% (24h) to 35.7% (48h) for concentrations 10 and 40 μ M, respectively] to moderate [44% (24h) and 53% (48h) for concentration 150 μ M] of cytotoxic activity against K562. After incubation for 48 h, the IC₅₀ value was 18.28 μ M. Compared to the cell cycle profiles of untreated cells, flow cytometric analysis indicated a sub-G1 arresting effect of Ruthenium compound on K562 cells, inducing a 1.7-fold, 2.2-fold and 2.4-fold increase in the number of sub-G1 cells for 24, 48 and 72 h, respectively, when compared to control. The compound also caused a significant increase in tailed cells in any of the concentrations tested compared with negative control that can be associated cytotoxicity with direct effect on K562 cells DNA.

Keywords: *cis*-Tetraammine(oxalato)Ruthenium(III) Dithionate; Cytotoxicity; Antitumor activity; A549; K562, Ruthenium(III) compounds; immunomodulatory activity, Apoptosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer é o resultado de um acúmulo de alterações genéticas, e epigenéticas, que comprometem o controle do crescimento celular normal e a diferenciação terminal, em que o acúmulo de mutações no DNA é a causa subsequente ao desenvolvimento neoplásico e, conseqüentemente, ao surgimento da doença (Hollstein et al., 1999; Lodish et al., 2000; Griffith et al., 2001; Alberts et al., 2004).

A carcinogênese pode ser compreendida como um processo complexo no qual se encontram envolvidos muitos genes, particularmente os que regulam a estabilidade e o reparo do DNA, o crescimento celular, a imunidade e a quimiorresistência às drogas. Um grupo de genes envolvidos nesse processo é denominado genes supressores tumorais, os quais parecem agir normalmente, como reguladores da proliferação celular (Anderson et al., 1994; Nagai, 1999; Sigal & Rotter, 2000; Cavalcante JR et al., 2002; Gleich & Salamone, 2002).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando inter-relacionadas. As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Há diferentes tipos de câncer com distintas causas moleculares. As alterações oncogênicas podem ser divididas em dois grandes grupos: por aquisição (introduzidos por infecção viral) e desenvolvimento (mutações em protooncogenes) de oncogenes; ou por alterações genéticas que contribuem para o desenvolvimento do câncer devido à perda da funcionalidade dos genes supressores de tumor, que protegem as células

contra a divisão celular descontrolada (Diffley & Evan, 1999; INCA, 2010).

O câncer é uma das doenças mais comuns e graves vistas na medicina clínica (Jemal et al., 2004). Dados epidemiológicos demonstram que o câncer, de alguma forma, ataca mais que um terço da população mundial, sendo responsável por mais de 20% de todas as mortes, e, em países desenvolvidos, chega a ser responsável por mais de 10% do custo total em cuidados médicos (IARC, 1990; Cairns, 1995; Barreto et al., 1998; Thompson et al., 2008).

No Brasil, estimativas para o ano de 2009 apontam que ocorreriam 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes seriam os de próstata e pulmão para o sexo masculino e mama e colo útero para o sexo feminino (Tabela 01). Em Goiás, acredita-se que neste mesmo ano, a incidência para novos casos seria de 16.130 para cada 100.000 habitantes (INCA/MS, 2010). Tornando-se o terceiro grupo de causas de mortalidade, superado apenas por doenças cardiovasculares e por morte accidental - incluindo acidentes de trânsito quanto violência urbana - e consolidando-se como um problema de saúde pública (INCA 2010).

Os termos “câncer”, “neoplasia maligna” e “tumor maligno” são sinônimos e distinguem-se dos tumores benignos pelas suas propriedades de desdiferenciação, poder de invasão e capacidade de metastizar-se, isto é, disseminar-se para outras partes do corpo (Lodish et al., 2000).

Existem três abordagens principais para o tratamento do câncer: excisão cirúrgica, irradiação e quimioterapia dependendo do tipo de tumor e do seu estágio de desenvolvimento. A quimioterapia constitui o método mais utilizado para muitos tipos de tumores e é subclassificada como curativa (controle completo do tumor), adjuvante (esterilizar células residuais locais ou circulantes, diminuindo incidências

de metástases à distância), neoadjuvante (redução parcial do tumor) e paliativa (qualidade de sobrevivência) (Laurence et al., 1997; INCA/MS 2009).

Tabela 1: Estimativas, para o ano 2008, do número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de casos novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	52.350	-	52.350
Mama Feminina	-	49.240	49.240
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.800	9.830	27.630
Cólon e Reto	13.310	14.800	28.110
Estômago	13.820	7.680	21.500
Colo do Útero	-	18.430	18.430
Cavidade Oral	10.330	3.790	14.120
Esôfago	7.890	2.740	10.630
Leucemias	5.240	4.340	9.580
Pele/Melanoma	2.960	2.970	5.930
Outras Localizações	59.130	78.770	137.900
Subtotal	182.830	192.590	375.420
Pele/não-Melanoma	53.410	60.440	113.850
Todas as Neoplasias	236.240	253.030	489.270

Fonte: MS/Instituto Nacional de Câncer – INCA

Atualmente, têm sido pesquisadas novas abordagens para o tratamento do câncer, incluindo a imunoterapia, o uso de inibidores da angiogênese, a terapia com genes, as modificações da resposta biológica (por exemplo: interferons, fatores de crescimento hematopoiético, entre outros) e a terapia fotodinâmica (Goodman & Guzman, 2002).

1.2. Os compostos de Rutênio(III) no tratamento do câncer

Ultimamente, têm-se alcançado grandes avanços no desenvolvimento, seleção e aplicação de agentes quimioterapêuticos, muitas vezes com sucessos

clínicos notáveis, como no caso de tratamento para os linfomas ou de agentes baseados em platina para o tratamento de câncer testicular. A quimioterapia antineoplásica tem como objetivo o tratamento de diversos tumores malignos, tornando-se uma das mais importantes e promissoras maneiras de combater o câncer. Essa forma de tratamento pode ser empregada de forma curativa ou paliativa, dependendo do tipo e extensão do tumor, além da condição física do paciente. A associação da quimioterapia a outras formas de tratamento é bastante comum (Mealey et al., 1994). Seu emprego antes da cirurgia e/ou radioterapia na tentativa de promover a erradicação de micrometástases constitui a quimioterapia neo-adjuvante. Porém, o uso depois da cirurgia e/ou radioterapia constitui a quimioterapia adjuvante (Sonis, 1998).

No entanto, uma grande parte de pacientes com câncer, principalmente os em estágios avançados, apresentam uma sobrevida bastante pequena. O ataque indiscriminado promovido pelas drogas antineoplásicas às células de rápida proliferação, cancerosas ou normais, produz os indesejáveis efeitos colaterais ou tóxicos conhecidos e extremamente temidos pelos indivíduos que necessitam submeter-se ao tratamento (Mealey et al., 1994). Uma parcela dos óbitos desses pacientes acontece, principalmente, devido à administração de uma quimioterapia ineficaz, especialmente quando se emprega agentes citotóxicos, o que leva a um aumento da probabilidade de efeitos colaterais e a consequente diminuição da qualidade de vida do paciente (Egger et al., 2005).

Os agentes alquilantes, de forma geral, têm como alvo a molécula de DNA da célula tumoral, apresentando geralmente boa eficácia e produzindo aumentos significativos na expectativa de vida de pacientes com câncer, especialmente quando associados aos antineoplásicos de diferentes mecanismos de ação (Kelland,

200). Porém, por sua relativa inespecificidade, tornam-se tóxicos também para os tecidos saudáveis, principalmente os de maior grau de proliferação. Conseqüentemente, os esforços agora estão direcionados no sentido de se produzir agentes mais seletivos. Se isso for possível, poderíamos dispor de drogas mais eficazes, pois agiriam especificamente nos mecanismos moleculares da neoplasia, com um grau bem menor de toxicidade (Jung, 2007; Oliveira & Alves, 2002).

Neste contexto, os compostos de rutênio têm sido objetos de grande atenção por terem propriedades antimetastática e de baixa toxicidade. Os componentes do rutênio parecem penetrar na célula tumoral e ligar efetivamente ao seu DNA, realizando ligação cruzada com as duas fitas, sendo então chamados de “cross-linkers” (Kostova, 2006).

Existem três propriedades principais do rutênio que fazem com que seus derivados sejam bem apropriados para aplicações biológicas; mudança de ligante – os complexos de Rutêni (II) e (III) apresentam cinética de mudança de ligante similar aos complexos de platina (II), sendo importante para as drogas atingirem o alvo biológico sem serem modificadas; estados de oxidação – o rutênio é o único entre o grupo de metais em que os estados de oxidação são acessíveis em condições fisiológicas, permitindo a administração de complexos de Ru (III) que poderão ser ativados por redução formando complexo de Ru (II) nos tecidos alvos. No sistema biológico, a redução de Ru (IV) e Ru (III) é favorecida pela glutatona, ascorbato e proteínas transportadoras de um único elétron, enquanto que o oxigênio e citocromo oxidase promovem a oxidação do Ru (II); mimetizando o ferro – a baixa toxicidade das drogas de rutênio é explicada pela habilidade que este elemento tem de imitar o ferro na ligação a várias biomoléculas, incluindo a transferrina e a albumina. Em mamíferos, estas duas proteínas são responsáveis pela solubilização e transporte de

ferro, reduzindo a toxicidade deste metal (Alama et al., 2009; Pereira et al., 2009; Kostova, 2006; Silveira-Lacerda et al, 2009b; Allardyce & Dyson, 2001).

A redução do Ru (III) para Ru (II) pode ser um mecanismo fundamental da ativação celular por compostos de rutênio (Depenbrock et al., 1997). Os compostos de Ru (III) podem ser reduzidos em áreas tumorais com hipóxia, a qual é capaz de ligar-se rapidamente e causar dano ao DNA (Grguric-Sipka et al., 2003).

Em trabalhos anteriores, foi descrito que os composto Cloreto de *cis*-Tetraaminodiclororutênio(III) (*cis*-[RuCl₂(NH₃)₄]Cl) apresenta atividade citotóxica sobre linhagem tumoral humanas Jurkat e HeLa, com IC₅₀ de 190 e 3,5μM, respectivamente (Frasca et al., 2001). Este composto apresentou atividade citotóxica sobre as linhagens tumorais humanas Jurkat e HeLa, com IC₅₀ de 190 e 3,5μM, respectivamente (Frasca et al., 2000). Silveira-Lacerda et al., (2009b), trabalhando com o mesmo composto, verificaram que o mesmo apresentava atividade citostática significativa, em estudos realizados com células tumorais humanas e de camundongos. Os resultados indicaram que este composto apresentava atividade citotóxica e genotóxica sobre células tumorais A-20, SK-Br-3, e S-180, onde DNA de células tumorais tratadas apresentavam fragmentação do material genético.

Esse complexo de rutênio atua como droga citostática ao impedir a progressão do ciclo celular da linhagem tumoral A-20 e induzir a apoptose. Observou-se também que a atividade citostática exercida pelo composto de rutênio sobre células mononucleares do sangue periférico humano foi menor quando comparadas à atividade citostática deste composto em outras linhagens tumorais que foram testadas (Silveira-Lacerda, 2009b). Verificou-se ainda que a toxicidade do composto foi seletiva às células cancerígenas e com potencial efeito

imunoestimulante sobre células mononucleares do sangue periférico humano (Silveira-Lacerda, 2009a).

O Ditionato de *cis*-Tetraamino(oxalato)rutênio(III), assim como o Cloreto de *cis*-Tetraamindiclororutênio(III), mostrou ação contra o tumor ascítico Sarcoma 180 *in vivo*, estatisticamente significativa e dose-dependente, e se mostrou mais efetivo contra os tumores ascíticos em relação aos tumores sólidos (Barbosa, 2007). Com este composto, também se tem observado baixa toxicidade frente às células humanas normais e grande capacidade de bloqueio do ciclo celular de células de linhagem tumoral.

Estudos indicam que comparados com outras drogas de coordenação, os compostos baseados em complexos de rutênio estão entre os mais promissores (Allardyce & Dyson, 2001). Desta forma, o complexos Ditionato de *cis*-Tetraammino(oxalato)rutênio(III), assim como o Cloreto de *cis*-Tetraamindiclororutênio (III), apresentam grande potencial para o uso clínico por possuir baixa toxicidade, segundo dados preliminares provenientes de estudos realizados no laboratório de Genética Molecular e Citogenética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

O modo de ação dos compostos baseados em rutênio pode ser mais amplo e complexo do que o esperado. É possível que estes compostos possuam a habilidade de modular o consumo e a liberação de sinalizadores intercelulares, além de importantes moléculas intracelulares (Clarke, 2003).

O aprofundamento do conhecimento acerca dos mecanismos pelos quais os complexos organometálicos desempenham suas atividades no ambiente celular é de suma importância para o sucesso clínico de drogas antitumorais baseadas em metais, assim como auxiliará imensamente no desenvolvimento de novos compostos

com elevado potencial clínico e no bem-estar humano (Pereira et al., 2009; Silveira-Lacerda et al., 2009b).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ciclo celular

Nos últimos anos, a noção de proliferação celular evoluiu muito, proporcionando maior conhecimento da biologia da célula. Por sua vez, esse avanço está começando a originar novas abordagens para o desenvolvimento de agentes antineoplásicos. Para se compreender como atuam os grandes antineoplásicos atuais e como irão atuar os novos medicamentos, é importante se considerar as características especiais da célula cancerosa (Laurence et al., 1997).

Diversos estudos demonstram que mutações em células somáticas e a progressão do ciclo celular envolvem a expressão de uma série de genes, dentre eles muitos oncogenes (Hollstein et al., 1991; Thompson et al., 1993; Alberts et al., 2004). Os mecanismos de ativação desses genes, que participam na oncogênese, incluem translocações cromossômicas, mutações de ponto, deleções, inversões e amplificações do DNA (Merritt et al., 1990; Anderson et al., 1992; Alberts et al., 2004).

Os cânceres geralmente parecem desenvolver-se por um processo no qual uma população inicial de células levemente anormais, descendentes de uma célula ancestral com uma única mutação, evolui em ciclos sucessivos de mutação e de seleção natural. Em cada estágio, uma célula adquire mais uma mutação que lhe confere uma vantagem seletiva em relação às células vizinhas, tornando-a mais apta a prosperar naquele ambiente (Alberts et al., 2004). A evolução do tumor necessita de uma grande dose de chance e normalmente leva muitos anos. Para esta evolução, as células cancerosas adquirem propriedades especiais, que incluem alterações nas vias de sinalização celular que levam as células tumorais a ignorar os sinais do ambiente que normalmente mantém a proliferação celular sob controle

rígido, as células cancerosas também adquirem uma aversão anormal ao suicídio (apoptose), de modo que evitam ou rompem as limitações normalmente programadas para a proliferação; são geralmente instáveis; escapam do tecido original e sobrevivem, proliferando em novos ambientes (Alberts et al., 2004).

A descoberta de drogas anticancerígenas pode ser resultado de testes empíricos ou da síntese dirigida de substâncias. Os testes empíricos consistem na seleção aleatória dos compostos que são testados em animais experimentais com tumores. A síntese dirigida de substâncias químicas e de produtos biológicos contra as células tumorais constitui um dos métodos empregados na atualidade, para triagem de diversas drogas sintetizadas por grandes universidades e laboratórios. As descobertas podem ser também, resultado de observações feitas ao acaso, geralmente de substâncias sintetizadas para outras finalidades (Mather, 1998; Freshney, 2000).

O ciclo celular é composto de duas fases funcionais e duas preparatórias. As fases funcionais são a fase S, com síntese do DNA, e a fase M, ou mitose, com segregação dos cromossomos duplicados. As fases preparatórias são a G_1 (*gap 1*) que prepara a célula bioquimicamente para as fases S e G_2 (*gap 2*), que preparam a célula para a mitose. As células que não se dividem ativamente podem ser permanentemente removidas do ciclo por diferenciação ou ficar temporariamente presas em um estado inerte, chamado de fase G_0 . (Alberts et al., 2004)

Pontos de checagem do ciclo celular podem interromper o ciclo se determinados eventos não se completarem. A entrada na mitose é impedida, por exemplo, quando a replicação do DNA não está completa; a separação dos cromossomos na mitose é atrasada se alguns dos cromossomos não estiverem adequadamente fixados no fuso mitótico. O avanço através de G_1 e G_2 é atrasado

pelos mecanismos de freagem se o DNA no cromossomo estiver danificado por radiação ou por processos químicos. O atraso nestes pontos de checagem de dano no DNA fornece tempo para o DNA danificado ser reparado; então a freagem do mecanismo é liberada e o ciclo celular é retomado (Figura 1) (Alberts et al., 2004).



Figura 1 – Pontos de checagem do sistema de controle do ciclo celular (Alberts et al., 2004).

2.2. Apoptose

É essencial a compreensão da cinética do ciclo celular para o uso apropriado da atual geração de drogas antineoplásicas. Muitos dos mais potentes agentes citotóxicos atuam em fases específicas do ciclo celular e, portanto, têm atividade apenas em células que estão em processo de divisão. Nos estudos *in vitro* da ação citotóxica das drogas antineoplásicas, verifica-se que há distúrbios do ciclo celular e, posteriormente, morte celular, embora cada droga possa apresentar mecanismos de ação específicos. Isto sugere que vários estímulos citotóxicos iniciam os eventos que conduzem à morte celular (Freshsney, 2000).

A morte celular pode ocorrer de duas formas: por necrose ou por apoptose (Moraes et al., 2007). A necrose é a morte celular causada por trauma e, portanto,

há uma resposta inflamatória. As características das células em necrose são o intumescimento celular e da mitocôndria, o aumento da permeabilidade da membrana plasmática e ruptura da mesma e a desintegração das organelas e dos componentes nucleares. A necrose é associada a danos graves como a hipóxia aguda e a deficiência abrupta de nutrientes (Grivicich et al., 2007).

A apoptose, ou morte celular programada, foi primeiramente descrita em 1972 por Kerr, Wyllie e Currie para designar uma forma de morte celular que se distinguia da morte por necrose, pois não se observavam danos à membrana plasmática e nem resposta inflamatória. A apoptose pode ser ativada por diversos estímulos tais como agentes fisiológicos na embriogênese e no sistema imune. Em condições fisiológicas, a apoptose é um processo controlado, estando envolvida na homeostase do tecido, representando um mecanismo de destruição seletiva das células danificadas, cuja sobrevivência poderia prejudicar o organismo como um todo. A célula, ao sofrer apoptose, apresenta alterações morfológicas e bioquímicas distintas daquela em necrose. A célula apoptótica é caracterizada pelo encolhimento celular, condensação e fragmentação da cromatina, que produz fragmentos de 50 a 300 kpb (Wyllie et al., 1980; Ramenghi et al., 2000; Maurillo et al., 2000; Grivicich et al., 2007; Moraes et al., 2007).

A célula apoptótica se fragmenta formando os corpos apoptóticos. O vazamento do citocromo c da mitocôndria para o citosol é uma das primeiras características bioquímicas que precede as alterações no núcleo da célula em apoptose (Figura 2). Estas propriedades diferem significativamente das características de necrose ou morte celular acidental (Moraes et al., 2007).

A desregulação da apoptose pode interromper o delicado balanço entre proliferação celular e morte celular e contribuir para o aparecimento de neoplasias e doenças auto-imunes (Tompson et al., 1993; Danial & Korsmeyer, 2004).

Quando o processo de apoptose é iniciado, ele promove a ativação de eventos moleculares, que culminam na ativação de proteases, denominadas caspases, as quais são responsáveis pela iniciação e execução da morte celular. A regulação deste processo é realizada por fatores inibidores e ativadores da cascata apoptótica, entre os quais podemos destacar os receptores de morte, pertencentes à família do receptor TNF (Suda et al., 1993; Reiter et al., 2002), proteínas pertencentes às famílias Bcl-2, IAPs, FLIPs (Timerbaev et al., 2006; Perianayagam et al., 2006).

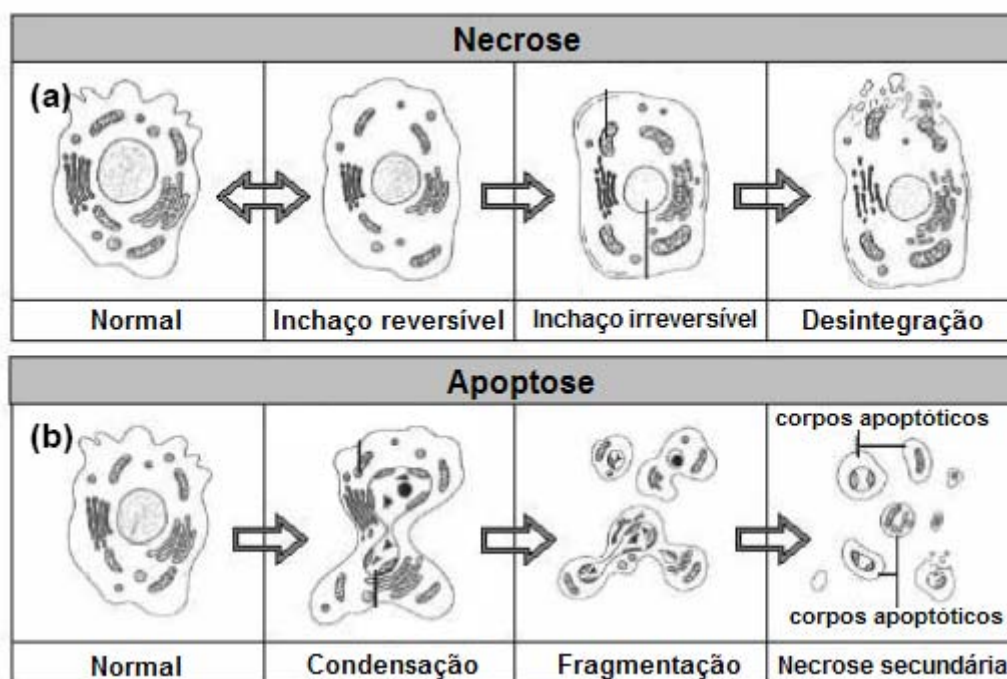


Figura 2 – Características de uma célula em necrose (a) e apoptose(b) (Modificado de Anazetti, 2007).

A apoptose pode ser desencadeada por duas vias principais, a intrínseca e a extrínseca. A chamada via extrínseca é iniciada pela ligação dos receptores de morte que são membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) e do

fator de crescimento neuronal (NGF). Entre os receptores de morte, estão TNF-R1, Fas (Apo-1/CD95), TRAIL-R1, TRAIL-R2 e NGF-R. Esses receptores são proteínas transmembranares contendo uma porção externa, à qual o ligante se associa, e uma porção citoplasmática, que contem o domínio de morte DD (*Death Domain*), eles podem ativar diretamente a via efetora de caspases, moléculas com atividade proteolítica e que são diretamente responsáveis pelo colapso celular característico do processo apoptótico (Sharma et al., 2000; Moraes et al., 2007).

Por outro lado, a via intrínseca começa pela ação de diferentes sinais de estresse intracelular, tais como irradiação, agentes quimioterápicos, vírus, bactérias e ausência de fatores de crescimento celular, os quais convergem para a mitocôndria. Esta organela contém, no seu espaço intermembranar, fatores apoptogênicos, como citocromo c, AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*), pró-caspases 2, 3 e 9, SMAC/DIABLO (*Second Mitochondria-DerivedA activator of Caspases/direct IAP binding protein with low pI*), Omi/HtrA2 (*High temperature requirement protein-2*) e endonuclease G⁵³. Na presença de sinais apoptóticos, esses fatores são liberados no citoplasma e alguns deles participam da ativação das caspases. Essa via apoptótica, centrada na mitocôndria, é conhecida como via intrínseca mitocondrial ou via de ativação das caspases dependente da mitocôndria (Sharma et al., 2000; Moraes et al., 2007).

A manutenção desses fatores na mitocôndria ou sua liberação no citoplasma é determinada por proteínas da família denominada Bcl-2. Por tal motivo, essa família e a família das caspases são consideradas os principais reguladores do processo de apoptose (Figura 3).

Existem pelo menos 20 membros da família Bcl-2 identificados até o momento, os quais podem ser divididos em dois grupos principais, dependendo de

sua função. O grupo pró-apoptótico (Bax, Bcl-Xs, Bak, Bad, Bid, Bik, entre outros) reúne os membros que induzem a liberação dos fatores apoptogênicos da mitocôndria no citoplasma, resultando em apoptose. Já o grupo antiapoptótico (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-w e Boo, entre outros) reúne os que são responsáveis pela manutenção desses fatores na mitocôndria, inibindo o processo de apoptose (Moraes et al., 2007).

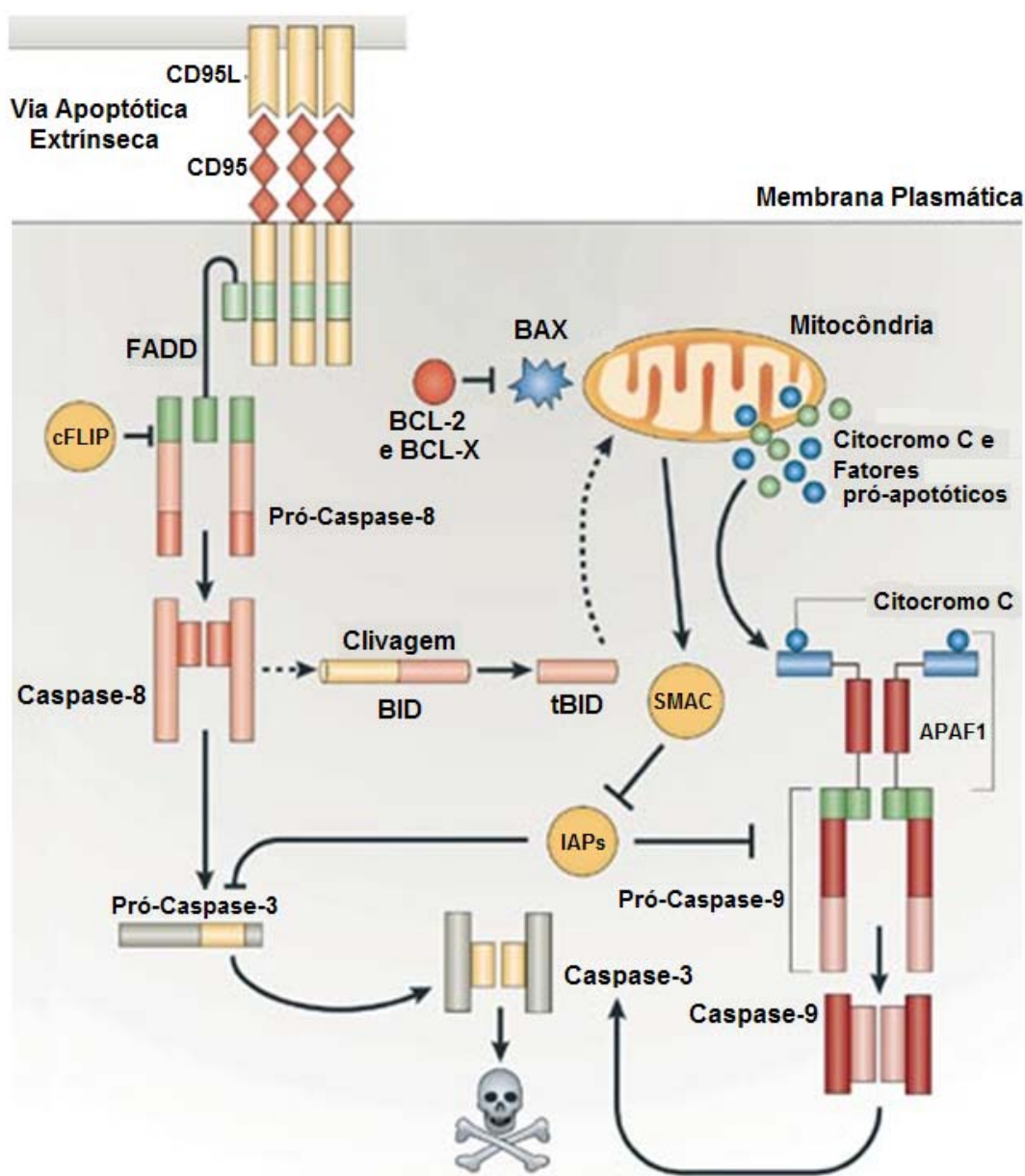


Figura 3 – Via intrínseca e extrínseca da apoptose (Modificado de Anazetti, 2007).

É provável que todas as células do corpo humano possuam a capacidade intrínseca de sofrer apoptose. Isto sugere que todas as estruturas e processos requeridos em pelo menos uma via de apoptose estão presentes na célula e provavelmente sejam necessários à sua sobrevivência (Moraes et al., 2007).

Pesquisas realizadas na década de 1990 têm demonstrado que a morte celular provocada pelas drogas quimioterápicas ocorre principalmente por indução de apoptose. Esta classe de drogas tem o potencial de restabelecer a apoptose celular, processo que se encontra alterado em células cancerígenas (Huschtscha et al., 1998; Guchelaar et al., 1998; Huang & Oliff, 2001; Fesik et al., 2005; Moraes et al., 2007).

2.3. Quimioterapia antineoplásica

A quimioterapia, tratamento que envolve drogas citotóxicas, tem sido considerada como uma das principais ferramentas sistêmicas de combate ao câncer. Pode ser aplicada em diferentes situações clínicas, como no tratamento primário de neoplasias avançadas, sendo denominada, neste caso, de quimioterapia de indução. Pode também ser utilizada como tratamento sistêmico após o controle do tumor primário por cirurgia ou radioterapia. Sempre, no entanto, deve ser considerada a eficácia da droga em relação ao tipo de tumor (El-Deiry, 1993; Burns & El-Deiry, 1999).

Dentre as principais formas de tratamento do câncer, para os quimioterápicos há as seguintes classificações: (1) agentes alquilantes, que atuam por meio da formação de ligações covalentes com o DNA, impedindo sua replicação; (2) antimetabólicos, que bloqueiam ou subvertem uma ou mais vias metabólicas envolvidas na síntese do DNA; (3) medicamentos obtidos por produção natural ou

alcalóides; (4) hormônios, dos quais os mais importantes são os esteróides, isto é, glicocorticóides, estrogênios e androgênios e fármacos que suprimem a secreção de hormônios ou antagonizam sua ação; (5) imunoterápicos, embora ainda incipiente; (6) antibióticos, grupo de substâncias com estrutura química diversa, que interagem com o DNA e inibem a síntese de proteínas; (7) inibidores mitóticos, que levam à paralisação da divisão celular em metáfase ao atuar sobre a tubulina, proteína formadora do fuso; (8) outros agentes, com mecanismos de ação que não permitem a inclusão nos grupos apresentados anteriormente, como, por exemplo, a dacarbazina, indicada no tratamento do melanoma avançado, sarcomas de partes moles e linfomas (Rang, 2001; Goodman & Gilman, 2002; INCA, 2007).

No entanto, é importante salientar que os quimioterápicos antineoplásicos podem atuar indistintamente em células saudáveis e tumorais, acarretando significativos efeitos colaterais. As células do tecido hematopoiético, germinativo, aparelho gastrointestinal e folículo piloso, devido à sua característica de rápida divisão celular, são particularmente sensíveis a essas drogas. Assim, para favorecer a análise padronizada desses efeitos, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI - *National Cancer Institute*) desenvolveu, no ano de 1982, o *Common Toxicity Criteria* (Critérios comuns de toxicidade) para reportagem de efeitos e estudo de novas drogas (Nicolini, 1988).

O *Common Toxicity Criteria* estrutura-se em apresentar efeitos adversos e categorias em que encaixam esses efeitos: alérgicos/imunológicos, infecções, auditivos, linfáticos, sangüíneos/da medula óssea, metabólicos, de musculatura estriada esquelética, cardiovasculares, neurológicos, de coagulação, oculares, dores, sintomas constitucionais, dermatológicos, pulmonares, endócrinos,

renais/geniturinários, gastrintestinais, malignidades secundárias, hemorragias, funções sexuais/reprodutivas, hepáticas, e síndromes (NCI, 1999).

Na prática, tem sido difícil estabelecer uma dose efetiva que leve à máxima destruição das células tumorais, induzindo, no hospedeiro, uma toxicidade reversível e tolerável. Para a maioria desses quimioterápicos a margem entre a dose efetiva e a tóxica é estreita, o que parece estar relacionado ao metabolismo da droga, rota e protocolo de administração, além da sensibilidade intrínseca do tumor à droga. Sendo que os efeitos colaterais mais comumente observados são toxicidade hematológica, toxicidade gastrintestinal, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, toxicidade pulmonar, disfunções reprodutivas, toxicidade vesical e renal, toxicidade dermatológica, anafilaxia, neurotoxicidade e alterações metabólicas (Silva et al., 2003).

Com relação ao metabolismo, as alterações mais comumente verificadas são hipomagnesemia; hiponatremia – devido à síndrome da excreção inapropriada de hormônio vasopressina, além de efeitos colaterais primários de alguns medicamentos, como vômitos persistentes e diurese (Gaffey et al., 1993).

A erradicação completa das células tumorais é consequência de múltiplos fatores que refletem as interações entre o tumor e o hospedeiro, a toxicidade cumulativa do medicamento, limitando seu uso, a presença de tumor em locais de difícil acesso ao quimioterápico, o estado geral debilitado do paciente, não permitindo doses adequadas, alterações na velocidade de crescimento do tumor e desenvolvimento de resistência adquirida pelo tumor ao quimioterápico, entre outros (Gaffey et al., 1993; Menezes, 2007).

2.4. Compostos baseados em metal usados na terapia antitumoral

Metais preciosos já eram usados para propostas medicinais a.C. (há mais de 3500 anos atrás). O ouro foi utilizado em várias áreas da medicina na Arábia e China. Naquela época, metais nobres eram confiáveis para beneficiar a saúde, pela sua raridade, contudo, pesquisas recentes têm associado as propriedades medicinais de drogas inorgânicas com suas propriedades biológicas específicas (Allardice & Dyson, 2001).

Compostos baseados em metal ampliam a possibilidade de construir moléculas com ligações mais adequadas para os objetivos específicos da biologia. Na verdade, íons metálicos apresentam uma grande variedade de números de coordenação e geometrias, que permitem organizar os ânions nos mais diferentes ligantes orgânicos (com suas propriedades químicas e biológicas) de forma mais adequada à distribuição espacial, proporcionando melhor modalidades de ataque às moléculas alvo (Pizarro et al., 2009).

Em meados dos anos 1960, Rosenberg e colaboradores, descobriram, por acaso, as propriedades anticancerígenas da cisplatina $\{cis-[PtCl_2(NH_3)_2]\}$ (Figura 4), durante as investigações do efeito de campos elétricos sobre o crescimento de *Escherichia coli*. Os pesquisadores estavam usando eletrodos de platina em uma solução contendo cloreto de sódio e sais de amônio, entre outros constituintes, quando observaram um evento inesperado, as bactérias tornaram-se longos filamentos e passaram a não se replicar. A divisão celular de *E. coli* havia sido inibida. Uma análise mais extensa desta observação levou à conclusão de que o ciclo replicativo bacteriano foi inibido por complexos amino-platina formados por eletrólise (Pizarro et al., 2009).

Hoje, mais de 40 anos após a sua aprovação como um agente quimioterápico pela *Food and Drug Administration* norte-americana (FDA), drogas à base de cisplatina ainda são os anticancerígenos mais utilizados do mundo. A quimioterapia à base de cisplatina é responsável pela cura de mais de 90% dos casos de câncer testicular e desempenha um papel importante em alguns tratamentos contra o câncer de cabeça e pescoço, de ovário, câncer cervical, câncer de bexiga, colo do útero, melanoma e linfomas (Pizarro et al., 2009).

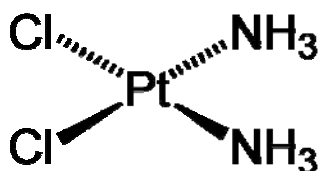


Figura 4 – Estrutura química da Cisplatina (Pizarro et al., 2009).

Vários análogos de cisplatina, como a *cis*-diamina (ciclobutano-1,1-dicarboxilato)-platina(II), ou carboplatina, a oxaliplatina(I-OHP), a nedaplatina, a heptaplatina (SKI), a lactato 1,2-di(aminometil)ciclobutanoplatina(II), ou lobaplatina, e seus derivados (Figura 5), têm sido estudados em tumores que exibiram resistência à cisplatina. Estes compostos são chamados de “geração secundária” dos compostos de platina (Calamai et al., 1998; Pizarro et al., 2009).

A carboplatina entrou em triagem clínica em 1980, e tem sido eficaz contra câncer de ovário. Embora seu mecanismo de ação seja similar ao da cisplatina, ao formar ligações cruzadas entre DNA-DNA, DNA-proteína, e interferir com a replicação e a transcrição do DNA, sua toxicidade e cinética são bastante diferentes (Calamai et al., 1998; Pizarro et al., 2009).

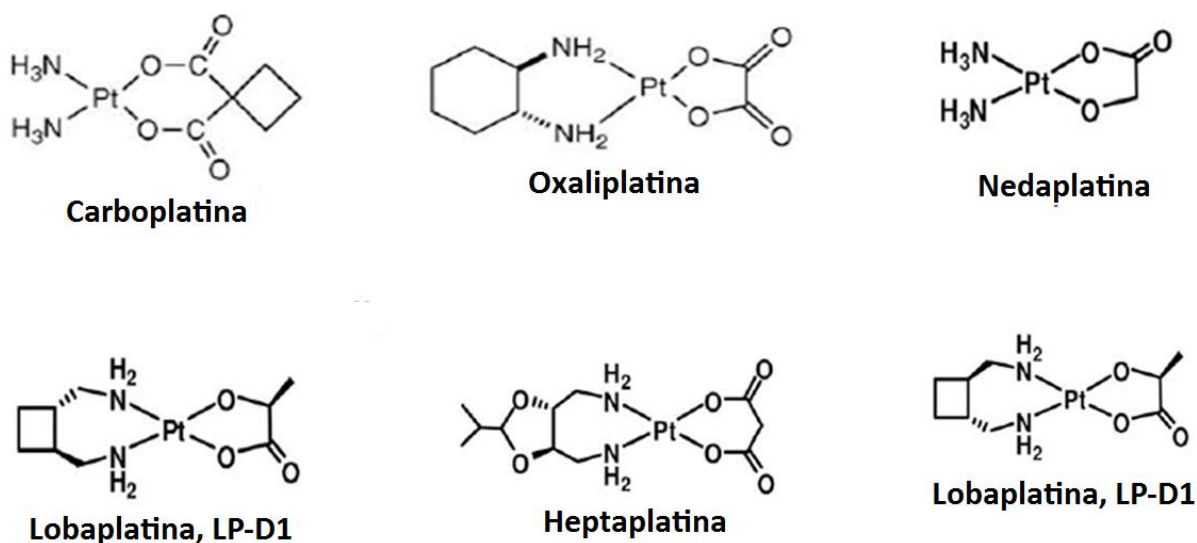


Figura 5 – Estrutura química de antitumorais a base de platina (Lookich & Anderson, 1998).

Depois de administrada intravenosamente e absorvida por difusão passiva para o interior das células, a *cis*-Pt (II) adquire carga positiva durante uma reação de ativação e reage, rapidamente, com bases púricas de nucleotídeos di- e trifosfatos, formando ligações cruzadas com GpG e ApG (Figura 6). A posição do N7 das guaninas é mais reativa do que a da adenina e provém um forte sítio na fita de DNA para ataques nucleofílicos pelos produtos de hidrólise do complexo de platina (Bakhtiar & Ochiai, 1999).

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

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

Apesar do sucesso da cisplatina e medicamentos à base de platina, o mercado de drogas ainda é acessível para novas drogas à base de metal que oferecem uma melhor viabilidade, tais como a administração oral, o que pode ajudar a diminuir os efeitos colaterais graves e custos clínicos. Além disso, novos estudos concentram-se na investigação de novas drogas com maior eficácia, ou seja, drogas que interajam de forma diferente com o DNA, o que pode levar à superação da resistência inata ou adquirida de certos tipos de tumores (Pizarro et al., 2009) . Alguns resultados promissores foram obtidos com derivados de diferentes metais, como Pt, Ti, Rh, Au e Ru (Katsaros & Anagnostopoulou, 2002; Cabrera et al., 2004; Kostova, 2006)

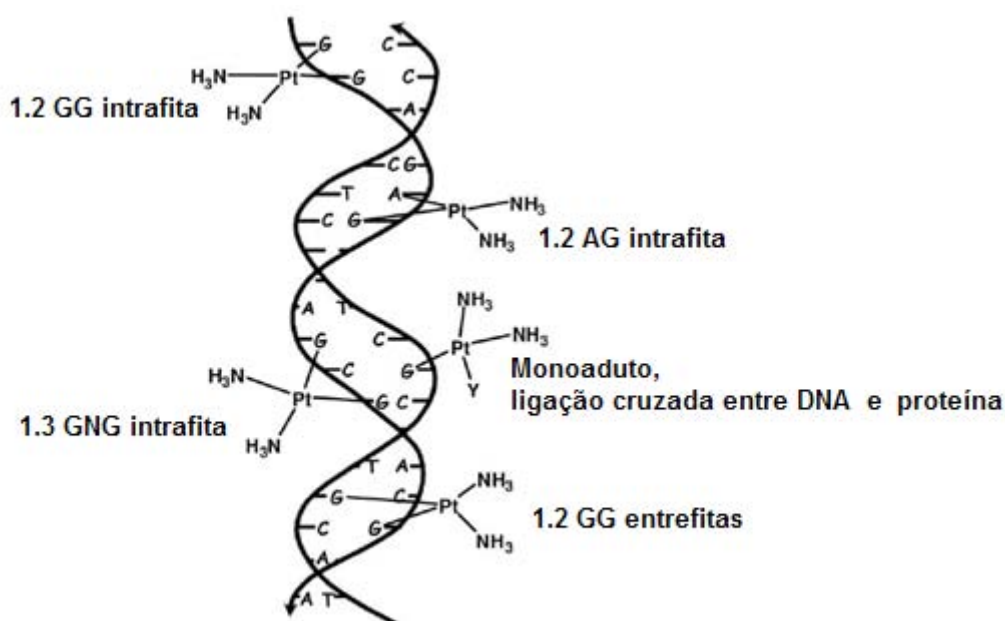


Figura 6 - Diferentes tipos de adutos DNA-cisplatina, para uma dada sequência aleatória. O aduto intrafita 1,2-GG (superior esquerdo) é considerado uma lesão crítica (Adaptado de Bakhtiar & Ochiai, 1999).

Em 1970, Clarke et al., relataram que pentamino-(purina)-rutênio(III) é capaz de inibir a síntese de DNA e proteínas em células de carcinoma de nasofaringe *in vitro*, o que desencadeou o interesse em complexos de rutênio como potenciais