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

Manuela da Rocha Matos Rezende

Avaliação da Atividade Citotóxica, Clastogênica e Genotóxica do Composto ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio(III) em Linfócitos do Sangue Periférico Humano

---

Goiânia

2010

MANUELA DA ROCHA MATOS REZENDE

Avaliação da Atividade Citotóxica, Clastogênica e Genotóxica do Composto ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio(III) em Linfócitos do Sangue Periférico Humano

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

Orientadora: Profª. Drª. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Goiânia

2010

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

Rezende, Manuela da Rocha Matos.
R467a Avaliação da atividade citotóxica, clastogênica e genotóxica do composto ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio(III) em linfócitos do sangue periférico humano [manuscrito] / Manuela da Rocha Matos Rezende. - 2010.
xiii, 76 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Elisângela de Paula Silveira Lacerda
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2010.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. Câncer 2. Ditionato de *cis*-tetraamino (oxalato) rutênio (III) 3. Índice Mitótico 4. Aberração Cromossômica - Ensaio Cometa. I. Título.

CDU: 616-006.04

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
da Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: MANUELA DA ROCHA MATOS REZENDE

Orientador: Profa. Dra. ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA LACERDA

MEMBROS:

1. Heloísa Helena Rodrigues de Andrade – ULBRA/Canoas

2. Kênia Silva Cunha – ICB/UFG

3. Elisângela de Paula Silveira Lacerda – ICB/UFG

OU

4. Salvador de Carvalho – ICB/UFG

5. Lee Chen Chen – ICB/UFG

Data: 24/02/2010

Dedico este trabalho...

Ao meu marido Flávio, pelo amor, paciência, cooperação e apoio.

A minha filha Priscilla por ser meu bem mais precioso, minha fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por mais esta etapa de aprendizagem em minha vida.

Ao meu marido Flávio pelo incentivo e compreensão.

A minha Orientadora Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira- Lacerda, exemplo de pesquisadora a ser seguida, a quem dedico admiração e respeito, por minha formação profissional e pessoal.

A toda equipe do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, em especial a Aliny, Alessandra, Flávia, César e Hugo, obrigado pelo auxílio durante o Mestrado e acima de tudo, pela amizade.

Ao Prof. Dr. Salvador de Carvalho pelo apoio e incentivo.

A todos os estagiários que me auxiliaram em partes da pesquisa.

Aos meus pais, Manoel e Neuza pela ajuda e compreensão dispensada.

"A educação faz com que as pessoas sejam fáceis de guiar, mas difíceis de arrastar; fáceis de governar, mas impossíveis de escravizar. "

(Henry Peter).

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA..... iv

AGRADECIMENTOS..... v

LISTA DE FIGURAS E TABELAS DA INTRODUÇÃO GERAL..... viii

LISTA DE FIGURAS E TABELAS DO ARTIGO 1..... ix

LISTA DE ANEXOS..... x

SIGLAS E ABREVIATURAS..... xi

RESUMO..... xii

ABSTRACT..... xiii

1.0 INTRODUÇÃO..... 14

1.1 Câncer..... 14

1.2 Drogas antitumorais..... 17

1.3 Quimioterápicos organometálicos..... 18

1.4 Complexos de rutênio e mecanismo de ação..... 20

1.5 Citotoxicidade e genotoxicidade..... 24

2.0 JUSTIFICATIVA..... 28

3.0 OBJETIVOS..... 29

3.1 OBJETIVO GERAL..... 29

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 29

4.0 METODOLOGIA..... 30

4.1 Laboratório de Genética Molecular e Citogenética/UFG (LGMC/UFG)..... 30

4.2 Droga teste..... 30

4.3 Droga controle..... 32

4.4 Grupo amostral e coleta das amostras..... 33

4.5 Cultura de linfócitos..... 33

4.6 Tratamento das culturas de linfócitos..... 33

4.7 Preparo e análise das laminas para aberração..... 34

4.8 Ensaio Cometa..... 35

4.9 Análise estatística..... 37

5.0 PRODUÇÃO CIENTÍFICA..... 38

6.0 CONCLUSÕES..... 63

7.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 64

8.0 REFERÊNCIAS..... 65

ANEXOS..... 71

LISTA DE FIGURAS E TABELAS DA INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1 - Estimativas, para o ano 2008 válido também para o ano de 2009, do número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária..... 15

Figura 1- Estrutura química da cisplatina..... 19

Figura 2 - Estrutura química do KP1019 e RM175..... 21

Figura 3 – Mudança do estado de oxidação do complexo de rutênio em um ambiente celular tumoral..... 23

Figura 4- Estrutura química do complexo cloreto de *cis*-*t*etraaminodiclororutênio (III)... 23

Figura 5 - Modelos de aberrações cromatídicas..... 26

Figura 6 - Modelos de aberrações cromossômicas..... 26

Figura 7 – Fluxograma abordando o local e as metodologias utilizadas neste trabalho..... 31

Figura 8– Estrutura química do composto ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio(III) {*cis*-$[Ru(C_2O_2)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$}..... 32

Figura 9 – Estrutura química do Cloridrato de doxorrubicina..... 32

Figura 10 – Delineamento experimental..... 34

Figura 11 – Esquema do Ensaio Aberração Cromossômica..... 35

Figura 12 – Esquema do Ensaio Cometa..... 36

Figura 13 – Classificação de leitura para o Ensaio Cometa..... 37

LISTA DE FIGURAS E TABELAS DO ARTIGO 1

Table 1. Cytogenetic Analysis of peripheral human blood lymphocytes treated with different concentrations of cis-Tetraammine(oxalato)Ruthenium(III) Dithionate..... 56

Table 2. Frequency of Cell Nuclei Found in each Class of the Comet Assay Using Human Peripheral Blood Lymphocytes with no Treatment (Negative Control), Treated with Four Different Concentrations of *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ and (Positive Control)Treated with Doxorubicin (DXR)…… 57

Fig. 1. Mitotic index of peripheral human blood lymphocytes exposed to different concentrations of cis-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate. C-: negative control; *p<0.01..... 58

Fig.2. Chromosome aberrations observed on Metaphase of peripheral human blood lymphocytes. **A.** Control - Normal metaphase; **B.** Cells treated with doxorrubicin (Chromatidic break); **C.** Cells treated with *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate ant concentration of 7.5 µM (1 - Chromatidic gap; 2 - Chromatidic break)……..... 59

Fig. 3. Chromosome aberrations observed on Metaphase of peripheral human blood lymphocytes treated with *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ at concentration of 7.5 µM (Chromatidic exchange – triradiate asymmetric figure)..... 60

Fig. 4 - Representative comet assay images using human peripheral blood lymphocytes with no treatment (negative control), treated with four different concentrations of *cis*-tetraamine(oxalate)ruthenium(III) dithionate. Class 0 control cell with no DNA damage and no tail (intact nuclei); Class 1 comet cell with a short tail length smaller than the diameter of the head; Class 2 comet cell with a tail longer than the diameter of the head and a low level of DNA damage; Class 3 comet cell with a tail longer than the diameter of the head and a high level of DNA damage; Class 4 comet cell with a tail longer than the diameter of the head, high level of DNA damage..... 61

Fig. 5 Relationship between head and tail length of human peripheral blood lymphocytes nuclei according to the following treatments: C- Culture medium (negative control); DXR-Doxorrubicin (positive control); *p<0.01……..…… 62

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido..... **72**

Anexo 2 – Parecer Consubstanciado (Comitê de Ética)..... **73**

SIGLAS E ABREVIATURAS

µg.mL^{-1}	Micrograma por mL
µM	Micromolar
ACs	Aberrações Cromossômicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CPP	Células Pequenas de Pulmão
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DXR	Doxorrubicina
EC	Ensaio Cometa
FDA	Food and Drug Administration
HPV	Papilomavírus
IM	Índice Mitótico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KP1019	*trans*-[tetraclorobisindazolrutênio (III)]
LGMC	Laboratório de Genética Molecular e Citogenética
NAMI-A	(IMH)trans-[Ru(Im)(Me_2SO)Cl_4]
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RESUMO

Estudos de citoxicidade e genotoxicidade têm sido realizados para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer com maior seletividade e menores efeitos colaterais de agentes antitumorais convencionais. Neste trabalho, foram avaliadas as propriedades citotóxicas, clastogênicas e genotóxicas do composto ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio(III), {*cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$}, em cultura de linfócitos de sangue periférico humano *in vitro*. Foram analisados os parâmetros índice mitótico (IM), aberrações cromossômicas (ACs) e danos induzidos no DNA detectados pelo ensaio cometa. O IM de cultura de linfócitos de sangue periférico humano tratados com 0,0075; 0,075; 0,75 e 7,5µM de {*cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$} foram 6,1; 3,9; 3,2 e 0,2%, respectivamente. A menor concentração 0,0075 não apresentou atividade citotóxica comparada ao controle negativo. As ACs derivadas das concentrações 0,0075; 0,075 e 0,75, apresentaram frequência de 1,5; 1,6 e 2,3 %, respectivamente, não manifestando atividade clastogênica comparadas ao contole negativo e somente na concentração de 7,5µM, demonstrou atividade clastogênica, predominando quebras e falhas cromatídicas. Os dados obtidos por meio do ensaio cometa, utilizando {*cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$}, sugerem que este composto não apresenta atividade genotóxica em concentrações menores que 0,0075 µM. Os resultados desses estudos demonstram que {*cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$} não possui potencial citotóxico, clastogênico e genotóxica in vitro em concentrações menor ou igual a 0,0075 µM.

Palavras chaves: Câncer; Ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio(III); Índice Mitótico; Aberração Cromossômica; Ensaio Cometa.

ABSTRACT

Chemotherapy agents are increasingly being utilized due to their promising effects in cancer treatment. The desired actions of these drugs are obtained at the cost of frequent and severe side effects. It is essential that drugs utilized for cancer treatment are tested in relation to not only their cytotoxic, but also their clastogenic and genotoxic potentials to establish their clinical risk. Thus, there is increased interest in searching for new metallic compounds presenting antitumor activity with therapeutic potential and reduced side effects, such as those containing platinum (Pt), iron (Fe), titanium (Ti), rhodium (Rh), gold (Au) and ruthenium (Ru). In this work, the cytotoxic, clastogenic and genotoxic properties of *cis*-tetraamine(oxalato)ruthenium(III) dithionite, *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$, were evaluated in peripheral human blood lymphocytes *in vitro*. Mitotic index (MI), chromosomal aberrations (CA) and DNA damage were analyzed by comet assay. The MI values of human peripheral blood lymphocyte cultures treated with 0.0075, 0.075, 0.75 and 7.5 µM *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ were 6.1, 3.9, 3.2 and 0.2%, respectively. The lowest concentration 0.0075 did not show cytotoxic activity compared to negative control. The CA values obtained for the 0.0075, 0.075 and 0.75 µM concentrations presenting low frequency (1.5, 1.6 and 2.3%, respectively) not expressing clastogenic activity compared to negative control and only at the highest concentration 7.5 µM, showed clastogenic activity, predominantly chromatid breaks and gaps. The data obtained by the comet assay, using *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$, suggest that this compound does not show genotoxic activity at concentrations lower than 0.0075 µM. The results of these studies show that *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ has no potential cytotoxic, clastogenic and genotoxic in vitro at concentrations less than or equal to 0.0075 µM.

Keywords: Cancer; ditionato de *cis*-tetraamine(oxalate)ruthenium(III) ditionate; Mitotic index; Chromosome aberrations; Comet assay

1.1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer está associado com alterações genéticas que se acumulam progressivamente no material genético (DNA) de uma célula normal. Cada nova alteração é acompanhada de uma onda de expansão clonal e, ao final desse processo, surge uma população celular com grande potencial de crescimento e invasão, um tumor maligno. Assim sendo, o câncer pode ser considerada uma doença genética complexa que resulta de alterações simultâneas em genes geralmente relacionados à proliferação, diferenciação e morte celular (GRIFFITH *et al.*, 2001; PARMIGIANI & CAMARGO, 2004; ALBERTS, *et al., 2004*).

As razões que levam os genes que regulam o ciclo celular a perderem suas funções são complexas e multifatoriais. Estas alterações genéticas podem ser hereditárias ou adquiridas, através dos chamados fatores ambientais, que são classificados em químicos, físicos e biológicos. Como agentes químicos destacam-se o tabaco, a dieta inadequada (rica em gordura e proteína animal, hipercalórica, com excesso de carnes vermelhas, salgadas ou artificialmente conservadas, pobre em produtos vegetais), o álcool e vários agentes ocupacionais, como solventes orgânicos, anilina e pesticidas. Os agentes físicos principais são a irradiação solar e a de aparelhos de radiodiagnóstico e de radioterapia. Os agentes biológicos principais são os vírus das hepatites B e C, que causam câncer de fígado, o papilomavírus (HPV), principal responsável pelo câncer de colo uterino e o *Helicobacter pylori* (que pode causar tumores no estômago) (RIBEIRO & MARQUES, 2003).

Agentes físicos e químicos usados como citostático têm demonstrado capacidade de induzir dano cromossômico, tanto em experimentos *in vitro*, como em estudos de monitoramento de pacientes tratados com este tipo de terapia (MIGLIORE *et al*., 1991 a; GREEN *et al*., 1991).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, no Brasil (INCA), as estimativas projetadas para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele, serão os

cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e colo do útero no sexo feminino (Tabela 1).

Tabela 1: Estimativas, projetadas para o ano de 2009, 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	49.530	-	49.530
Mama Feminina	-	49.400	49.400
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	9.460	27.270
Cólon e Reto	12.490	14.500	26.990
Estômago	14.080	7.720	21.800
Colo do Útero	-	18.680	18.680
Cavidade Oral	10.380	3.780	14.160
Esôfago	7.900	2.650	10.550
Leucemias	5.220	4.320	9.540
Pele/Melanoma	2.950	2.970	5.920
Outras Localizações	55.610	62.270	117.880
Subtotal	175.970	175.750	351.720
Pele/não-Melanoma	55.890	59.120	115.010
Todas as Neoplasias	231.860	234.870	466.730

Fonte: MS/Instituto Nacional de Câncer – INCA

Cada tipo de câncer pode ter várias abordagens terapêuticas, dependendo do seu estágio de desenvolvimento, bem como das condições de saúde do paciente. Em alguns casos, a combinação de diferentes terapias, aumenta as chances de cura e diminui a possibilidade de reincidência.

Existem quatro principais modalidades terapêuticas para o câncer:

cirurgia - A cirurgia é a mais antiga e mais definitiva quando o tumor é localizado e nas condições anatômicas mais favoráveis, sendo um meio simples e seguro para remover tumores sólidos quando o tumor é confinado a um local anatômico de origem. Entretanto, no caso de alguns tumores sólidos, a maioria dos pacientes já tem doença metastática na época da apresentação (SALMON & BERTINO, 1996);

radioterapia - A radiação pode ser curativa para alguns locais específicos, enquanto preserva a estrutura e funcionamento de um órgão ou tecido. Na maioria das situações, o tratamento radioterápico é bem tolerado pelos

pacientes. Suas reações são dependentes da região em que está sendo realizada, do volume tecidual incluído, da dose de fatores individuais de maior ou menor sensibilidade à radioterapia (SALMON & BERTINO, 1996);

quimioterapia - A quimioterapia consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou em combinação, com o objetivo de tratar as neoplasias malignas. São drogas que atuam a nível celular interferindo no seu processo de crescimento e divisão. A maioria dos agentes antineoplásicos não possui especificidade, ou seja, não destrói seletiva e exclusivamente as células tumorais. Em geral, são tóxicos aos tecidos de rápida proliferação caracterizados por uma alta atividade mitótica e ciclos celulares curtos. As drogas antineoplásicas agem especialmente em células que estão em processo de divisão ativa; portanto, são mais eficazes quando utilizadas precocemente (BONASSA, 1996).

Segundo INCA (2008), existe basicamente quatro formas de quimioterapia:

curativa – tem como objetivo o controle completo do tumor, como por exemplo: Doença de Hodgkin, leucemias agudas, carcinomas de testículos, coriocarcinoma gestacional;

adjuvante – atua esterelizando células residuais locais ou circulantes, diminuindo incidências de metástases à distância, por exemplo: Câncer de mama em estádio II;

neoadjuvante ou prévia – atua reduzindo parcial do tumor, por exemplo: Quimioterapia pré-operatória aplicada em caso de sarcomas de partes moles e ósseos;

paliativa – tem o objetivo de promover qualidade de sobrevida. Exemplo: Carcinoma.

Terapia Biológica - A terapia biológica para câncer inclui além do transplante de medula óssea, os novos usos de modificadores de resposta biológica como as linfocinas ou anticorpos monoclonais e agentes como ácido retinóico que podem fazer com que as células tumorais sofram diferenciação e se tornem inofensivas (BENNETT & PLUM, 1996).

1.2 Drogas Antitumorais

As drogas antitumorais são utilizadas de forma crescente devido aos promissores resultados apresentados no tratamento do câncer. As ações desejadas destas drogas são obtidas à custa de efeitos colaterais frequentemente severos. Por isso, torna-se essencial que as drogas utilizadas para o tratamento do câncer sejam testadas, não somente com relação ao seu potencial citotóxico, mas também genotóxico, tentando estabelecer o risco potencial do seu uso clínico (CUNHA & LEHMANN, 2003).

Os primeiros agentes antitumorais, por volta da década de 1940, interagiam com o DNA e seus precursores, inibindo a sua síntese ou causando lesões irreparáveis no DNA celular, levando a morte da célula. Atualmente, a busca de novos compostos, naturais ou sintéticos, com potencial antitumoral, visa encontrar novas substâncias capazes de atuar em regiões específicas do DNA como as bases nitrogenada, bem como explorar outros alvos celulares, destacando-se as topoisomerases e as proteínas do fuso mitótico (CUNHA & LEHMANN, 2003).

Segundo Jemal *et al.,* (2004) quatro grandes grupos de substâncias antineoplásicas destacam-se como drogas de escolha em diferentes protocolos de tratamento:

inibidores das enzimas topoisomerases - enzimas atuam através da quebra e religação sequencial de uma fita (topoisomerase I) ou das duas fitas do DNA (topoisomerase II). Apesar de catalisarem reações essenciais para a célula, elas são capazes de gerar grandes danos ao genoma de um organismo;

agentes alquilantes - compostos eletrofílicos que reagem com o DNA, substituindo um átomo de hidrogênio por um grupo alquila em condições fisiológicas;

compostos antimitóticos – drogas capazes de interferir nos processos de polimerização e despolimerização dos microtúbulos, durante a divisão celular, bloqueando a progressão das células em fase G2 e M do ciclo celular;

antimetabólitos – São antineoplásticos estruturalmente semelhante aos compostos naturais encontrados em nosso organismo, como amino ácidos, precursores do DNA, vitaminas, etc.. Afetam o funcionamento celular, impedindo ou dificultado sua reprodução.

O tratamento do câncer com agentes alquilantes causa o aumento na freqüência de aberrações cromossômicas. Com isso, os pacientes elevam as chances de desenvolver uma segunda neoplasia, limitando o tratamento. Desta forma, estudos de citotoxicidade e genotoxicidade têm sido realizados para a caracterização de novos agentes anticâncer com uma maior seletividade e menores efeitos colaterais (SÁNCHEZ-SUÁREZ *et al.*, 2008; MANJULA *et al.*, 2009).

1.3 Quimioterápicos baseados em metais

Uma característica dos metais que os torna importantes como componentes (funcionais e estruturais) dos seres vivos é sua propensão de perder elétrons formando íons com cargas positivas, que tendem a ser solúveis em fluidos biológicos. É na forma catiônica que os metais desempenham suas principais funções biológicas (CASTILLO-BLUM & BARBA-BEHRENS, 2000; BENITE, MACHADO & BARREIRO, 2007.)

Enquanto os íons metálicos apresentam-se deficientes de elétrons, biomoléculas tais como proteínas e DNA são ricas em elétrons. A atração entre estas oposições de cargas conduz a uma tendência geral de "íons metálicos interagirem com moléculas biológicas" (BENITE, MACHADO & BARREIRO, 2007).

Sendo assim, estudos recentes associaram as propriedades medicinais de drogas metálicas com suas propriedades biológicas (ALLARDYCE & DYSON, 2001). Dentre os complexos metálicos apenas os de platina têm sido utilizados na clínica médica (HALL & HAMBLEY, 2002).

A introdução, a partir de 1978, do complexo *cis*-diaminodicloroplatina (II), de nome comercial “cisplatina”, na quimioterapia do câncer, representou um marco na história da Química Inorgânica Medicinal, e constituiu um importante avanço no tratamento de diversos tipos de tumores (WOZNIAK,

CZECHOWSKA & BLASIAK, 2004) (Figura 1)**.** A cisplatina segundo Wozniak, Czechowska & Blasiak, (2004) é aplicada no tratamento de câncer de cabeça e pescoço, testículo e ovário, e células pequenas de pulmão (CPP). Também é efetiva frente à indução viral, indução química e animais com tumores transplantados.

O sucesso da cisplatina como agente anticâncer é devido ao seu perfil de toxicidade aceitável e atividade antitumoral aumentada (BRABEC & NOVÁKOVÁ, 2006).

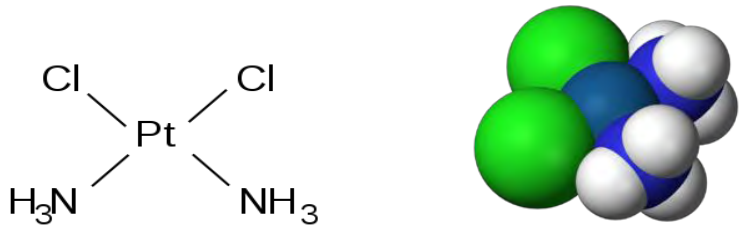

Figura 1 – Estrutura química da cisplatina (ALAMA *et al., 2009)*.

Segundo Bugarcic *et al*., (2008), o tipo de aducto formado no DNA por agentes anticâncer, pode ser o responsável pela inibição de células tumorais. De fato, a atividade anticâncer da cisplatina resulta de interações com o DNA. A droga se liga a posição N7 das bases purinas formando monoaductos. Os aductos de cisplatina-DNA podem inibir processos celulares fundamentais, incluindo replicação, tradução e reparo (WOZNIAK; CZECHOWSKA & BLASIAK, 2004).

Desde então, desenvolveu-se uma intensa busca por novos complexos metálicos que também apresentassem atividade antitumoral, com potência terapêutica aumentada e efeitos colaterais reduzidos, o que levou à descoberta de outros complexos de platina que atualmente são utilizados em clínica médica (FONTES, CÉSAR & BERALDO, 2005).

Por exemplo, compostos de ródio contendo ligantes carboxilatos são muito estudados, apresentando atividade antitumoral relevante. Compostos de ouro, como a auranofina têm sido utilizados há muito tempo para o tratamento de artrite reumatóide, mas são também investigados quanto às suas propriedades antitumorais (MCKEAGE, MAHARA & BERNERS-PRICE, 2002).

Vários compostos organoestânicos, como por exemplo, os de polioxalquilcarboxilatos mostraram atividade antitumoral *in vitro*. Alguns

compostos organoestânicos com tiossemicarbazonas são ativos como agentes citotóxicos em células de tumores mamário, renal e melanomas, em doses até cem vezes inferiores àquelas de algumas drogas orgânicas usadas na clínica (FARRELL, 2002).

Outros compostos inorgânicos têm sido investigados quanto às suas propriedades citotóxicas e antitumorais. Dentre eles podemos citar os de ouro, ferro, cobre, ródio, rutênio, titânio (MENEZES, *et al.,* 2007; SILVEIRA-LACERDA *et al.,* 2009 a).

O mecanismo de ação desses compostos encontra-se em fase de investigação (FARRELL, 2002).

1.4 Complexos de rutênio e mecanismo de ação

Os complexos de rutênio são bastante promissores, apresentando propriedades antimetastática seletiva e baixa citotoxicidade quando comparados com a cisplatina (KOSTOVA, 2006; ALAMA *et al.*, 2009).

Complexos de rutênio contendo imidazol, como por exemplo, o *trans*-[(Im)2Cl4Ru], são efetivos contra câncer de cólon, e seu mecanismo de ação pode estar relacionado a reações redox envolvendo espécies de rutênio(III) e rutênio(II), que podem provocar quebra das fitas de DNA (BERALDO & GAMBINO, 2004).

Adicionalmente, complexos de Rutênio (III) $K_2[Ru(sar)Cl_4]\cdot H_2O$ e $K[Ru(dmgly)_2Cl_2]\cdot 3H_2O$ apresentaram atividade seletiva antiproliferativa e antimetastática frente a adenocarcinomas (Hela), leucemia mielóide humana (K562), carcinoma humanos (MDA-MB-361 e MB-453), assim com atividade imunocompetente em células mononucleares do sangue periférico(PBMC) (DJINOVIC *et al*., 2009).

Os mais divulgados complexos de rutênio III são KP1019 e NAMI-A (NAMI-A-[ImH][trans-RuCl4(dimethyl sulfoxide (DMSO))(Im)]) (SAVA *et al., 1998; SAVA, et al.,*1999; ALAMA *et al.*, 2009) (Figura 2). O NAMI-A tem atividade seletiva frente a metástase de pulmão em ratos (SAVA, *et al., 1998;* SAVA *et al.,*1999) com toxicidade relativamente baixa em camundongos e cachorros (BERGAMO *et al*., 2000; SAVA & COCCHIETTO, 2000). Além disso,

Sava *et al*.,(1992) verificou a atividade antimetastática do NAMI-A também em melanomas e câncer mamários.

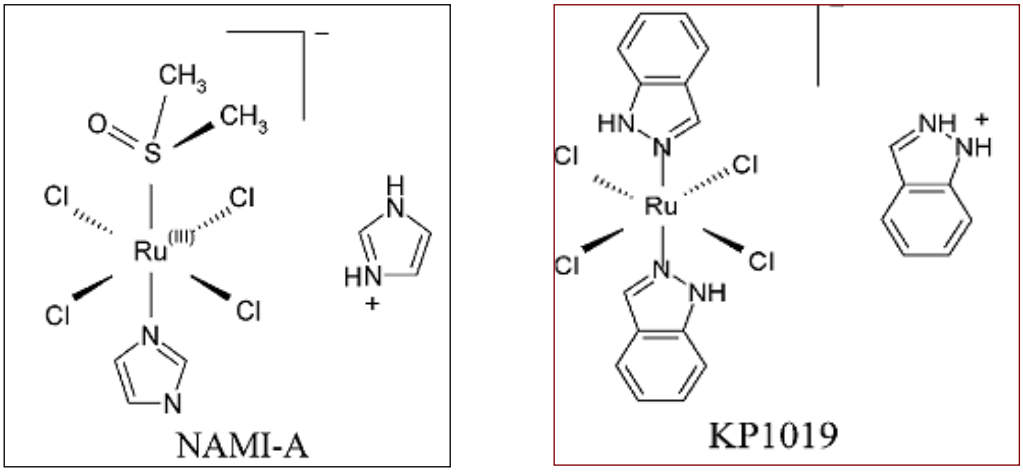

Figura 2- Estrutura química do KP1019 (acima à esquerda), e de RM175 (acima à direita) (ALAMA *et al.,* 2009*)*.

A administração de KP1019, em oito pacientes com tumores sólidos, estabilizou a doença em 5 paciente em dez semanas (HARTINGER, *et al*., 2006). Já a infusão de NAMI-A em vinte quatro pacientes com câncer de pulmão demonstrou-se seguro e apenas um paciente teve a estabilização da doença em vinte e uma semanas (RADEMAKER-LAKHAI *et al*., 2004).

Os dois complexos de rutênio, NAMI-A e KP1019, completaram a primeira fase de triagem clínica estando programada a segunda fase de triagem clínica (HARTINGER *et al.,* 2006; JAKUPEC *et al., 2005).*

Segundo Allardyce & Dyson (2001), Clarke (2003) e Dougan *et al.,* (2008) os complexos de rutênio apresentam 3 propriedades que fazem com que seus derivados sejam bem apropriados para aplicações biológicas:

- **troca de ligante** – os complexos de rutênio Ru (II) e Ru (III) apresentam cinética de troca de ligante similar aos compostos de platina (II), que é importante para as drogas atingirem o alvo biológico sem serem modificadas;

- **estados de oxidação** – o elemento rutênio é o único entre o grupo de metais em que o estado de oxidação é acessível em condições fisiológicas de hipóxia, baixo pH e altos níveis de glutationa, próprios de áreas tumorais.

- **mimetização do ferro** - a baixa toxicidade dos complexos 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. Considerando que as células tumorais apresentam um requerimento nutricional elevado, favorecido pela angiogênese, isto promove um aumento do fluxo sanguíneo resultado numa maior captação de nutrientes, e consequentemente, em um aumento do número de receptores para transferrina. Sendo assim, em tecidos saudáveis, a concentração da droga será mais baixa e menos ofensiva (Figura 3).

Diversos estudos sobre complexos de rutênio corroboram a baixa citotoxicidade associada a atividade antimetástatica. O composto Cloreto de *cis*-tetraaminodiclororutênio(III) ou *cis*-$[RuCl_2(NH_3)_4]Cl$ (Figura 4) foi avaliado em camundongos Balb/c, transplantados via subcutânea na virilha com células Sarcoma-180 (S-180), comprovando que o composto reduz o volume e peso tumoral e aumenta a sobrevida dos animais tratados, embora tenha apresentado citotoxicidade em doses superiores às testadas quanto à atividade antitumoral (MENEZES *et al.,* 2007).

Segundo Silveira-Lacerda *et al.*, (2009 a e b) o *cis*-$[RuCl_2(NH_3)_4]Cl$ apresentou atividade citostática significante, em estudos realizados em células tumorais humanas (Jurkat, SK-BR-3), e de camundondos (A-20, S-180). Esse complexo atuou como droga citostática ao impedir a progressão do ciclo celular das células tumorais e induzir a apoptose. Observou-se também que a atividade citostática do composto de rutênio em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foi menor quando comparada à atividade citostática em células tumorais. Foi necessária uma alta dose da droga, cerca de 8000 µM para que houvesse ação citotóxica**.**

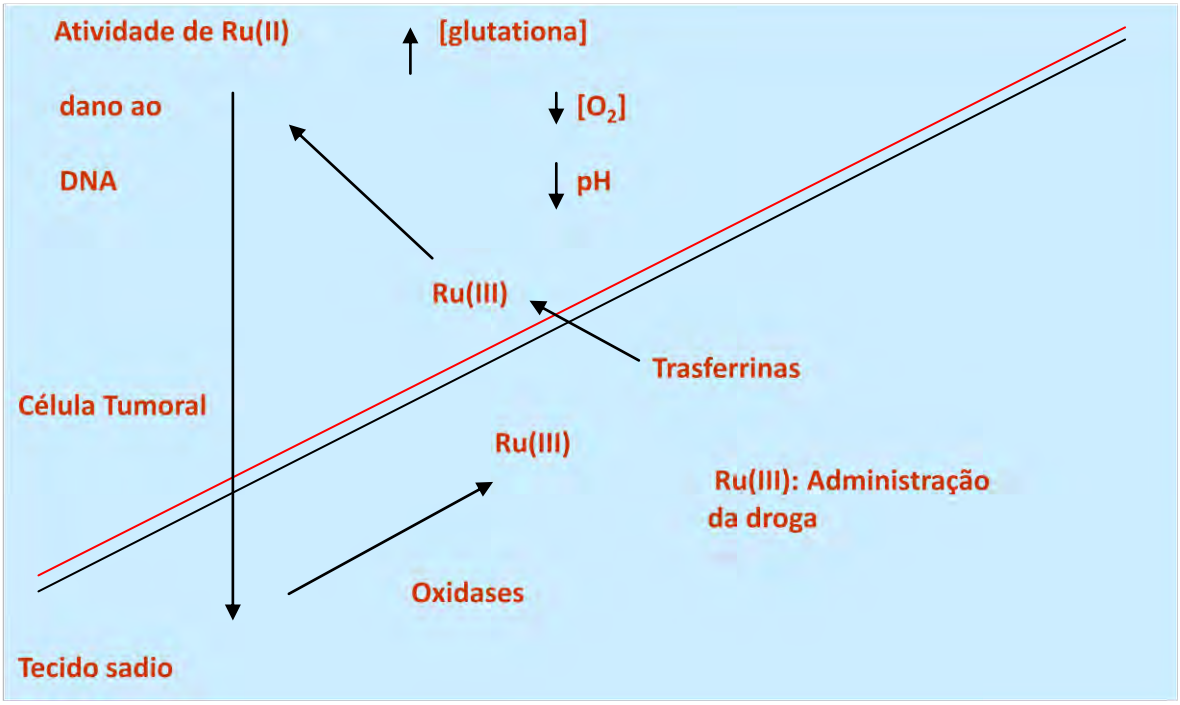

Figura 3 - Mudança do estado de oxidação do complexo de rutênio em um ambiente celular tumoral. Fonte: ALLARDYCE e DYSON (2001), modificado.

Ribeiro *et al.*, (2009) foi um dos primeiros trabalhos a avaliar o potencial genotóxico de compostos de rutênio frente a células normais humanas. Nenhum trabalho até então havia abordado o grau de segurança em relação às células normais do organismo. Ribeiro *et al.*, (2009) também trabalhou com o composto *cis*-[$RuCl_2$(NH3)4]Cl e verificou que este composto não induziu danos no DNA de linfócitos do sangue periférico humano.

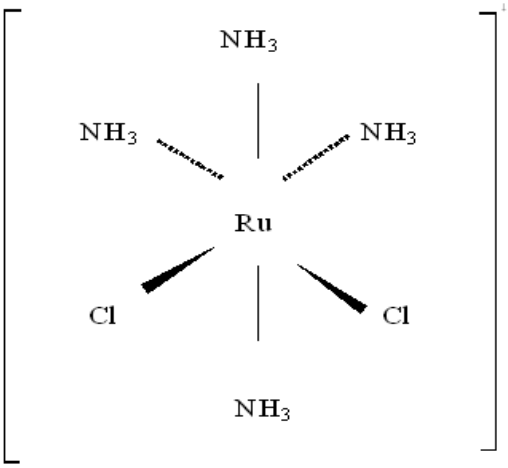

Figura 4 – Estrutura química do Cloreto de *cis*-tetraaminodiclororutênio (III)

Segundo Barbosa (2007), o composto de rutênio, Ditionato de *cis*-tetra(amino)oxalatorutênio(III) c*is*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$, apresentou atividade antitumoral *in vivo* frente ao Sarcoma 180 (tumor assístico) adicionalmente Pereira *et al*., (2008) constataram a ausência da atividade citotóxica e genotóxica significativa em células meristemáticas de *Allium cepa.*

1.5 Citotoxicidade e Genotoxicidade

Toxicidade é um evento *in vivo*, onde pode haver dano celular direto, como uma droga antitumoral citotóxica, efeitos fisiológicos como transporte através de membrana do fígado, neurotoxicidade no cérebro, efeitos inflamatórios e outros efeitos sistêmicos.Testes de citotoxicidade é um ensaio *in vitro*, que são desenvolvidos para determinar os efeitos a nível celular tendo em vista que é difícil monitorar os efeitos sistêmicos e fisiológicos (FLINT, 1998 apud SILVEIRA-LACERDA, 2003).

Os efeitos colaterais que mais se destacam são: toxicidade hematológica, toxicidade gastrintestinal, cardioxicidade, hepatotoxicidade, toxicidade pulmonar, disfunções reprodutivas, toxicidade vesical e renal, toxicidade dermatológica, anafilaxia, neurotoxicidade, e alterações metabólicas. Em relação ao metabolismo, as alterações mais comuns são: hipomagnesemia – decorrentes de tumores que secretam hormônio antidiurético ou do uso da cisplatina; hiponatremia – síndrome da excreção inapropriada de hormônio diurético, também desencadeado por tumores que produzem hormônio antidiurético; além de efeitos colaterais primários de alguns medicamentos, como vômitos persistentes e diurese (SAPOLNIK, 2003; SILVEIRA-LACERDA, 2003; MENEZES *et al.,* 2007).

As aberrações cromossômicas estão relacionadas a doenças como neoplasia, na qual se verifica uma correlação entre freqüência de aberrações cromossômicas nos linfócitos e o desenvolvimento de câncer (NATARAJAN, 2002). A presença de aberrações numéricas e estruturais em células germinativas pode levar para a mortalidade perinatal ou malformações congênitas nos sobreviventes (CHANDLEY,1981; SANKARANARAYANAN,1982). Em células somáticas eles fazem parte do

processo de formação do câncer. O papel das aberrações cromossômicas nas neoplasias tem sido estudado como potenciais oncogenes (proto-oncogenes) e se ocorrer translocações nos sítios destes genes suas expressões podem ser trocadas como uma conseqüência de suas re-locações (MINDEN,1987). As deleções cromossômicas e rearranjos ou perda total de cromossomos pode levar a inativação de genes supressores de tumor, resultando em câncer (PHILLIPS,1987).

Testes de aberrações cromossômicas *in vitro* utilizam células somáticas de mamíferos, e o mais conhecidos são os linfócitos do sangue periférico (MADLE & OBE,1980). A cultura de linfócitos do sangue periférico constitui um ótimo sistema para se testar a capacidade de um agente (físico ou químico), quanto a capacidade de causar danos no DNA e também ser utilizada no monitoramento de indivíduos expostos (RABELLO-GAY *et al.*, 1991). Uma grande variedade de ensaios citogenéticos é usada com sucesso no monitoramento de populações expostas a agentes mutagênicos e as aberrações cromossômicas são de grande importância, por avaliarem a possibilidade da ocorrência de câncer na população (TAWAN & WHITEHOUSE, 2001; AU *et al.*, 2001).

Segundo Shaffer, Slovak & Campbell, (2009) as aberrações dividem em: aberrações cromatídicas e aberrações cromossômicas.

As aberrações cromatídicas envolvem somente uma cromátide , e pode ser classificada em: falha cromatídica (lesão cromatídica de uma única cromátide, é um desalinhamento mínimo da cromátide) (Figura 5 A); quebra cromatídica (é a descontinuidade de uma única cromátide, é um deslinhamento apagado de uma das cromátides) (Figura 5 B) e troca cromatídica (é o resultado de duas ou mais lesões cromatídicas e o subseqüente rearranjamento do material cromatídico (Figura 5 C). Estas trocas podem ser entre cromátides de diferentes cromossomos (intertrocas) ou entre a mesma cromátide de um cromossomo (intratroca). No caso de intertrocas, geralmente já pode ser suficiente para indicar se a configuração é trirradial – (forma três braços), quadrirradial (quando forma quatro braços padrão) ou complexas (quando formam mais de quatro braços padrão). Quando necessário as trocas podem ser classificadas em mais detalhes, como por exemplo, trocas assimétricas (resulta na formação de fragmentos de tamanhos diferentes) e

trocas simétricas (resulta na formação de fragmentos do mesmo tamanho) (SHAFFER, SLOVAK & CAMPBELL, 2009).

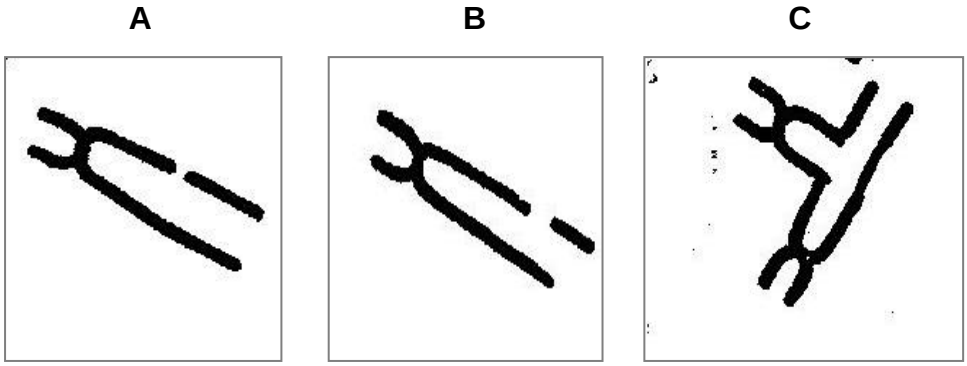

Figura 5 – Modelos de aberrações cromatídicas. **A-** falha cromatídica; **B-** quebra cromatídica e **C-** troca cromatídica (figura trirradial) (TAWAN & WHITEHOUSE, 2001, com modificações).

As aberrações cromossômicas envolvem ambas cromátides , e podem ser classificados como: falha cromossômica (lesão cromatídica de ambas cromátide, é um desalinhamento mínimo das cromátide) (Figura 6 A) ; quebra cromossômica (a descontinuidade de ambas cromátides, é um deslinhamento apagado de ambas cromátides) (Figura 6 B) e troca cromossômica (é o resultado de duas ou mais lesões cromossômicas e subseqüente recolocação de ambas cromátides de um único cromossomo em uma nova posição de um mesmo ou de outro cromossomo) (Figura 6 C) (SHAFFER, SLOVAK & CAMPBELL, 2009).

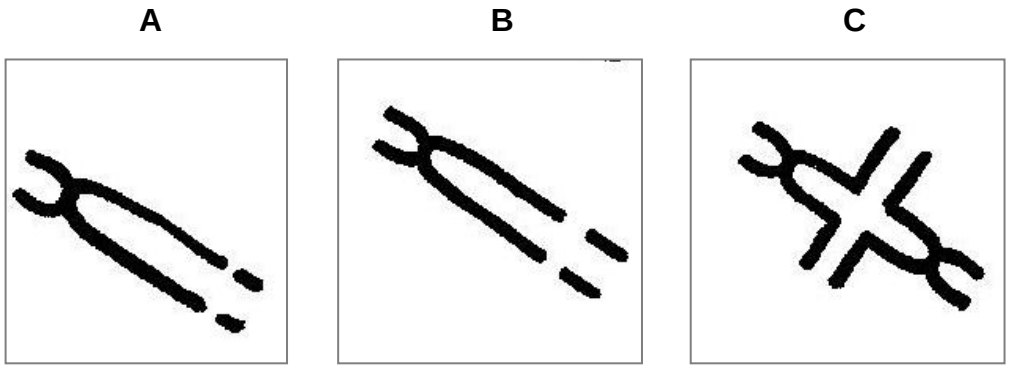

Figura 6 – Modelos de aberrações cromossômicas. **A-** falha cromossômica; **B-** quebra cromossômica e **C-** troca cromossômica (figura quadrirradial) (TAWAN & WHITEHOUSE, 2001, com modificações).

Como dito anteriormente, o complexo de rutênio (III) tem sido estudado por possuir propriedades favoráveis contra o câncer, com um menor índice de toxicidade comparado a outros antineoplásicos. Desta forma, o complexo de rutênio (III) possui um grande potencial de se tornar um novo antineoplásico, havendo a necessidade da realização de testes citotóxicos e genotóxicos, como testes estabelecidos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para liberação de novos fármacos (DIAS, 2002).

Existe também o FDA (Food and Drug Administration), que é um órgão governamental dos Estados Unidos da América que estabelece no título 21 do "Code of Federal Regulations", parte 820 - imperativa para todas as empresas de manufatura de dispositivos médicos - que os produtos farmacêuticos e dispositivos médicos assegurem a adequação aos sistemas de qualidade. Sendo assim, é um regulamento, que trás muitos benefícios, dentre eles, a validação de todos os estágios do ciclo de vida do medicamento – desde o desenvolvimento até o lançamento- a conformidade dos produtos, a redução de riscos atuando em ações preventivas, como por exemplo, a realização de triagens de fármacos frente à atividade genotóxica, verificando a probabilidade de danos estruturais no DNA. Qualquer novo medicamento, sob a sua supervisão, é minuciosamente testado e estudado antes de ter a sua comercialização aprovada (FDA, 2009).

2.0. JUSTIFICATIVA

O uso de medicamentos antineoplásicos atuais requer o conhecimento de sua citotoxicidade, clastogênicidade e genotoxicidade, a fim de obter tratamentos com uma maior seletividade e menor efeito colateral.

Com o desenvolvimento da síntese de compostos de rutênio para a utilização em várias áreas de pesquisa, o composto ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio(III) tem sido estudado pelo nosso grupo de pesquisa e tem se destacado por apresentar um grande potencial de se tornar um novo antineoplásico, havendo assim, a necessidade de estudar sua atividade citotóxica, clastogênica e genotóxica em linfócitos do sangue periférico humano em concentrações diferentes. Estes testes fazem parte da primeira fase pré-clínica dos estudos necessários para a liberação de novos medicamentos no mercado, exigidos pela ANVISA e FDA.

Espera-se com esta pesquisa a obtenção de uma droga mais eficiente e segura, sendo menos prejudicial ao ser humano e útil nos métodos de quimioterapia. Assim sendo, buscamos neste estudo a realização de testes que possibilitem uma melhor visão deste composto de rutênio que é o resultado de um amplo estudo de modificações da molécula base de rutênio.

3.0. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- ✓ Invesitigar os efeitos citotóxicos, clastogênicos e genotóxicos do composto Ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio (III) c*is*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ em cultura de linfócitos de sangue periférico humano *in vitro*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a atividade citotóxica do composto ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio (III) em linfócitos do sangue periférico por meio da avaliação do índice mitótico;

- ✓ Avaliar a atividade clastogênica do composto ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio (III) sobre cultura de linfócitos de sangue periférico por meio do teste de aberração cromossômica;

- ✓ Avaliar a atividade genotóxica (fragmentação na molécula de DNA) do composto ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio (III) sobre cultura de linfócitos de sangue periférico por meio do teste cometa.

4.0. METODOLOGIA

O presente estudo tem a aprovação do comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás/Hospital das Clínicas, protocolo n° 043/2007 (ANEXO 1).

O estudo apresentou três eixos temáticos distintos: a parte experimental (**1**), em que foi coletado o material biológico, onde as culturas primárias foram cultivadas para realização dos ensaios de AC e cometa, (**2**) análise das lâminas em microscópio óptico (ensaio de AC); microscópio de fluorescência (Zeiss) com filtro de 515-560nm, filtro de barreira de 590nm e objetiva de 40x (ensaio cometa) e análise através do Software Comet Score 15, e a parte de análise estatística e teórica (**3**).

4.1 Laboratório de Genética Molecular e Citogenética/UFG (LGMC/UFG)

O trabalho foi realizado no LGMC o qual possui infra-estrutura adequada e toda a aparelhagem necessária para trabalhar com a parte celular da pesquisa, tais como: câmara de fluxo laminar, estufa para cultura primária (BOD), cubas eletroforéticas, freezers, geladeiras, dentre outros equipamentos.

Na Figura 5 é mostrado fluxograma abordando o local e as metodologias seguidas neste trabalho.

4.2 Droga teste

O composto de ditionato de *cis*-tetra(amino)oxalatorutênio(III) {c*is*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$} (Figura 6), foi sintetizado pelo Laboratório Supramolecular de Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, seguindo os procedimentos de (Pavanin, Giesbrecht and Tfouni, 1985) e encaminhados ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética (LGMC) para estudos citogenéticos. O composto *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ liofilizado foi pesado e dissolvido em meio RPMI incompleto. O tratamento foi feito após 24 horas de cultura nas concentrações (0,0075; 0,075; 0,75 e 7,5 µM) em todos os testes.

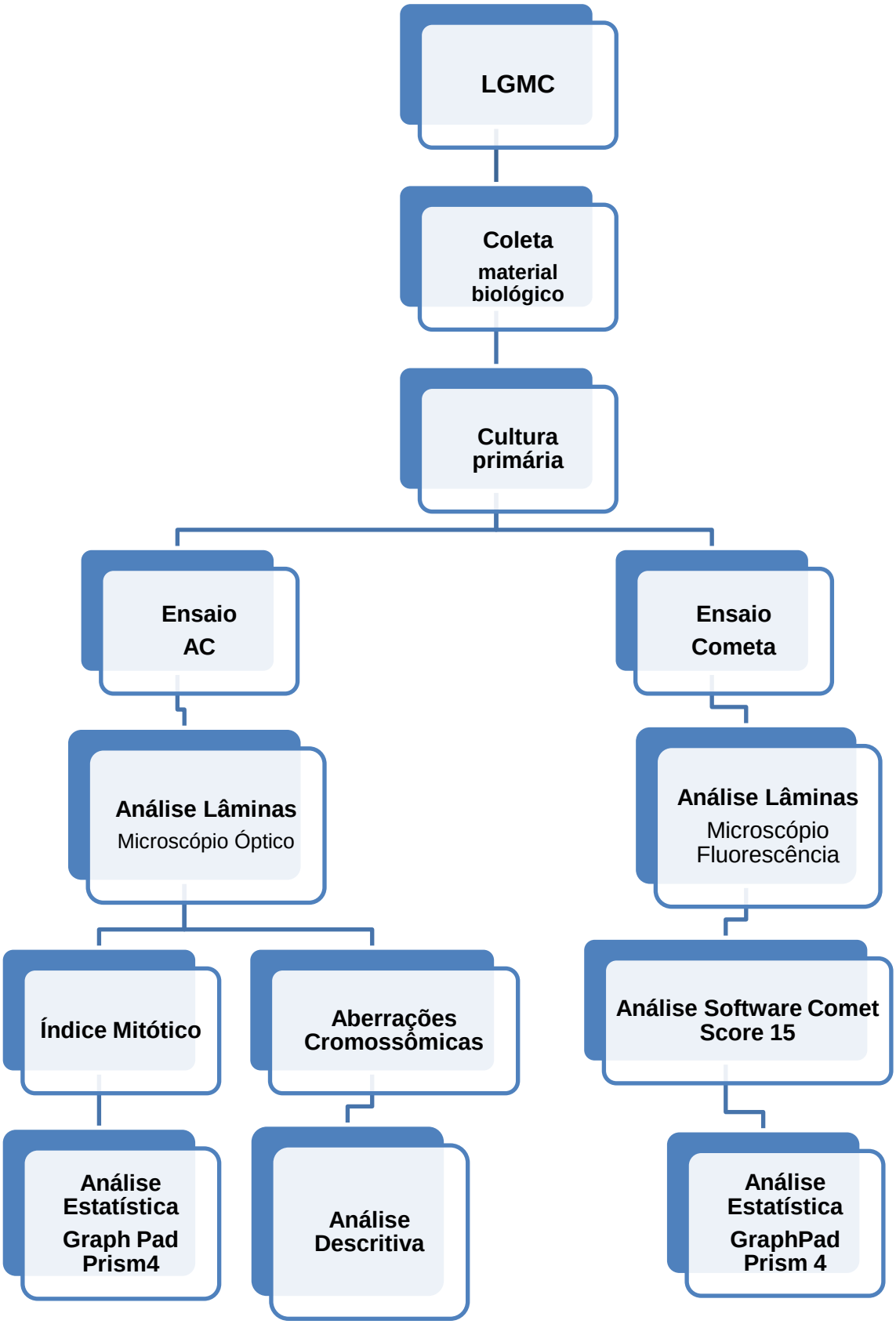

Figura 7 - Fluxograma abordando o local e as metodologias utilizadas neste trabalho.

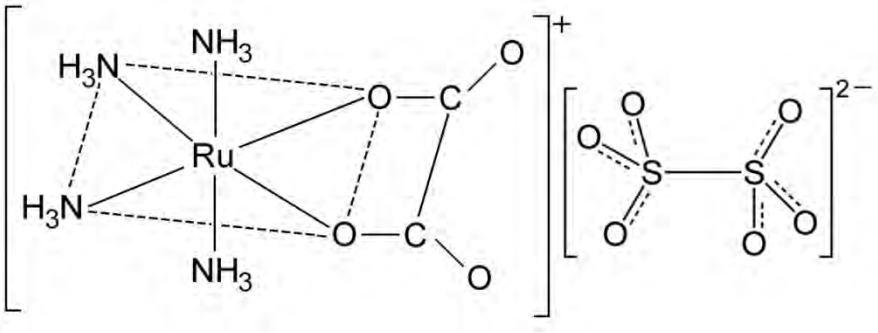

Figura 8 - Estrutura química do Ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio(III) {*cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$}.

4.3. Droga controle

Como controle positivo foi utilizado a droga Andriblastina (Cloridrato de doxorrubicina 10mg da Pfizer®)(DXR), solução em pó liófilo, injetável (10mg), obtida comercialmente. A droga foi dissolvida em meio incompleto a uma concentração final de 0,002 µM em todos os ensaios citogenéticos.

O cloridrato de doxorrubicina é um antibiótico antineoplásico, derivado da antraciclina e usada no tratamento de tumores sólidos (CHABNER et al., 1996), originalmente obtido do fungo *Streptomyces peucetius* var. *caesius.* A intercalação ao DNA inibe a replicação nucleotídica e pode desencadear a quebra do DNA pela topoisomerase-II, originando distúrbios sérios na estrutura terciária do DNA, levando à formação de quebras duplas e simples da cadeia do DNA e, consequentemente, à morte celular (HURLEY, 2002).

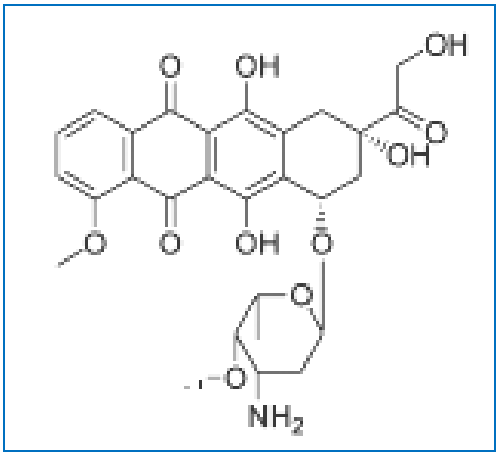

Figura 9 - Estrutura química do Cloridrato de doxorrubicina.

Devido ser um bom indutor de danos no DNA, a DXR é utilizada em vários estudos como controle positivo nos ensaios citogenéticos (ANTUNES *et al*., 2007). A fórmula estrutural da DXR é $C_{27}H_{29}NO_{11}$ e sua estrutura química é mostrada na Figura 9.

4.4. Grupo amostral e coleta das amostras

Foram selecionados 6 doadores entre 20 e 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumantes, que não possuíam vícios, não eram consumidores de álcool, que não estavam tomando medicamentos ou que trabalhassem em laboratórios (BURIN et al., 2001). As amostras de sangue periférico foram coletadas no total de 5 mL no laboratório, por punção venosa com seringas e tubos vacuntainer heparinizadas.

4.5. Cultura de Linfócitos

A cultura de linfócitos foi realizada com base na metodologia desenvolvida por Moorhead et al. (1960), com modificações. O meio de cultura consistiu em meio RPMI 1640 (80%), soro fetal bovino (20%), fitohemaglutinina (2%) e antibióticos (0,01mg.mL^{-1} de penicilina e 0,005mg.mL^{-1} de estreptomicina). Os frascos foram incubados por 24 horas em uma estufa, a 37°C e com 5% de CO_2 e 95% de umidade.

4.6. Tratamentos das Culturas de Linfócitos

As amostras foram previamente incubadas na estufa por 24 horas e tratadas com as diferentes concentrações do c*is*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$. A DXR foi utilizada como controle positivo e para o controle negativo, foi utilizado meio RPMI incompleto (Figura 10).

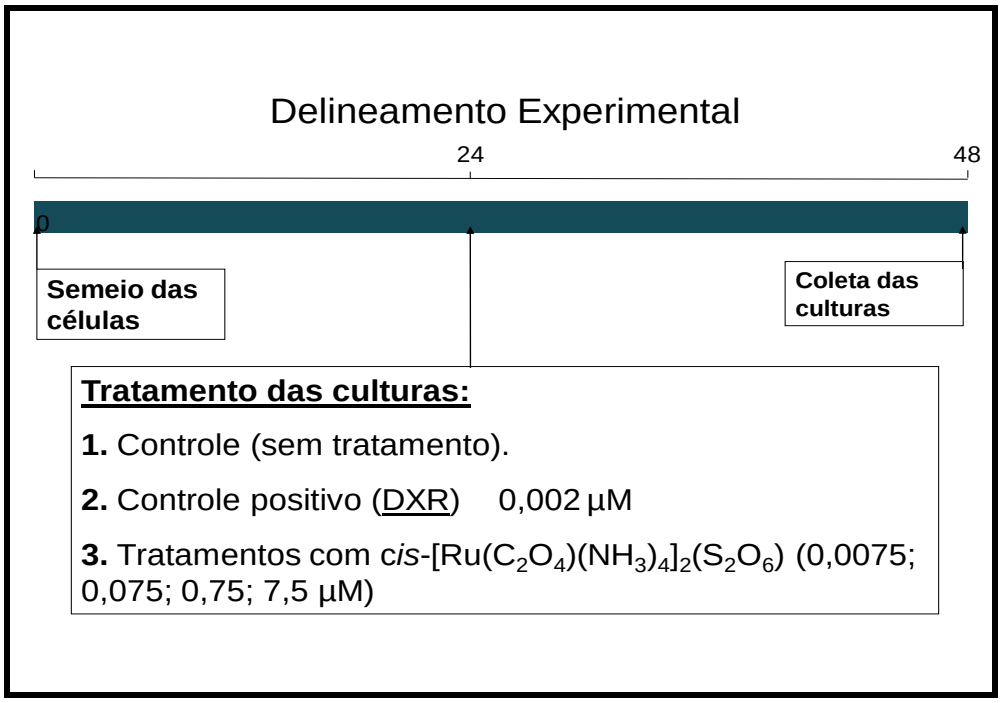

Figura 10: Delineamento Experimental (RIBEIRO *et al*., 2009*).*

4.7. Preparo e análise das lâminas para aberração cromossômica

Para obter um número suficiente de metáfases para análise, colchicina foi adicionada 1h e 30m antes de completar 48 horas, em uma concentração de 0,0016%. Após este período as células foram centrifugadas e tratadas com 0,075 M de KCl a 37ºC durante 20 minutos. As células foram centrifugadas e fixadas em solução de ácido acético: metanol (1:3). As lâminas foram preparadas, secadas e colocadas em solução de Giemsa (pH 6,8) por 5 minutos (Figura 11) (MOORHEAD *et al*., 1960).

As lâminas foram analisadas sob microscópia óptica (Olympus) e objetiva de imersão de 100x, visando o encontro de metáfases de células tratadas com o complexo de rutênio e seus respectivos controles positivo e negativo. As freqüências das aberrações cromossômicas (AC) foram determinadas mediante a análise de 100 metáfases por tratamento e o índice mitótico (IM) determinado pelo número de metáfases em 5000 linfócitos contados (TAKAHASHI, 2003).

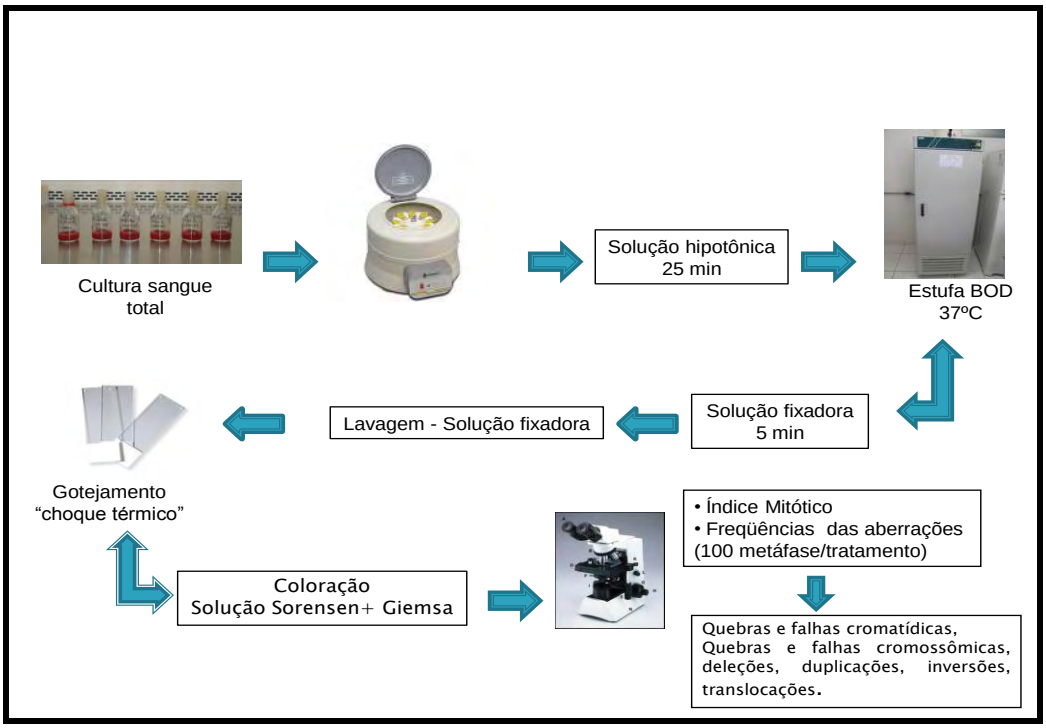

Figura 11- Esquema do Ensaio Aberração Cromossômica

4.8. Ensaio Cometa

O teste do cometa é utilizado para detecção de lesões genômicas que, após serem processadas podem resultar em mutação. Segundo Gontijo *et al.,* (2001), uma vez que danos no DNA são freqüentes em células e tecidos específicos, isto permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula.

O ensaio de cometa foi descrito por Singh et al., (1988) com modificações. 24h após o tratamento das culturas, estas foram homogenizadas, misturadas em agarose low-melting (baixa fusão) e imediatamente colocadas em uma lâmina previamente preparada com gel de agarose a 1%. A lâmina com as duas camadas de agarose foi colocada a 4°C por 5 minutos. Após essa etapa, as lâminas foram incubadas em uma solução de lise (2,5M NaCl, 10mM Tris, 100mM EDTA, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH10,0) e colocada a 4°C por duas horas para remover proteínas e membranas. Posteriormente, as lâminas foram colocadas na eletroforese com tampão (300mM NaOH, 1mM EDTA, pH > 13,0). A corrida de eletroforese foi por 20 minutos, a 0,9 V/cm, 300 mA e a 4°C. Todo o procedimento foi feito no

escuro para prevenir danos no DNA. As lâminas foram mergulhadas em solução de neutralização (0,4M Tris, pH 7,5), lavada com água destilada e secas a temperatura ambiente (Figura 12).

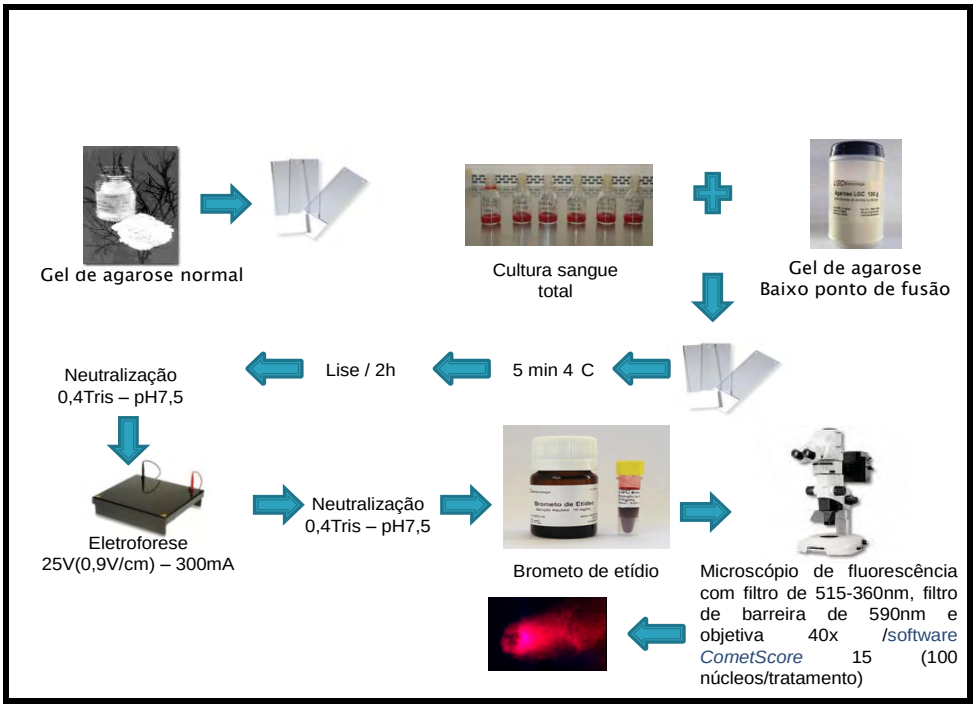

Figura 12 - Esquema do Ensaio Cometa

As lâminas foram preparadas em duplicatas e analisadas 100 células, 50 células em cada lâmina. Foi usado o microscópio de fluorescência (Zeiss) com filtro de 515-560nm, filtro de barreira de 590nm e objetiva de 40x.

Para interpretação dos resultados, o “cometa” é dividido em duas partes: “cabeça” e “cauda”. Assim, células sem ou com pouco dano no DNA não apresentam cauda, permanecendo similares aos nucleóides, enquanto células com mais danos apresentam caudas maiores (OLIVE, 1999). Sendo assim, os cometas foram classificados em classes de acordo com o tamanho da cauda (0, 1, 2, 3, 4), sendo classe 0 para normal e classe 4 para degradado através do Software Comet Score (Figura 13).

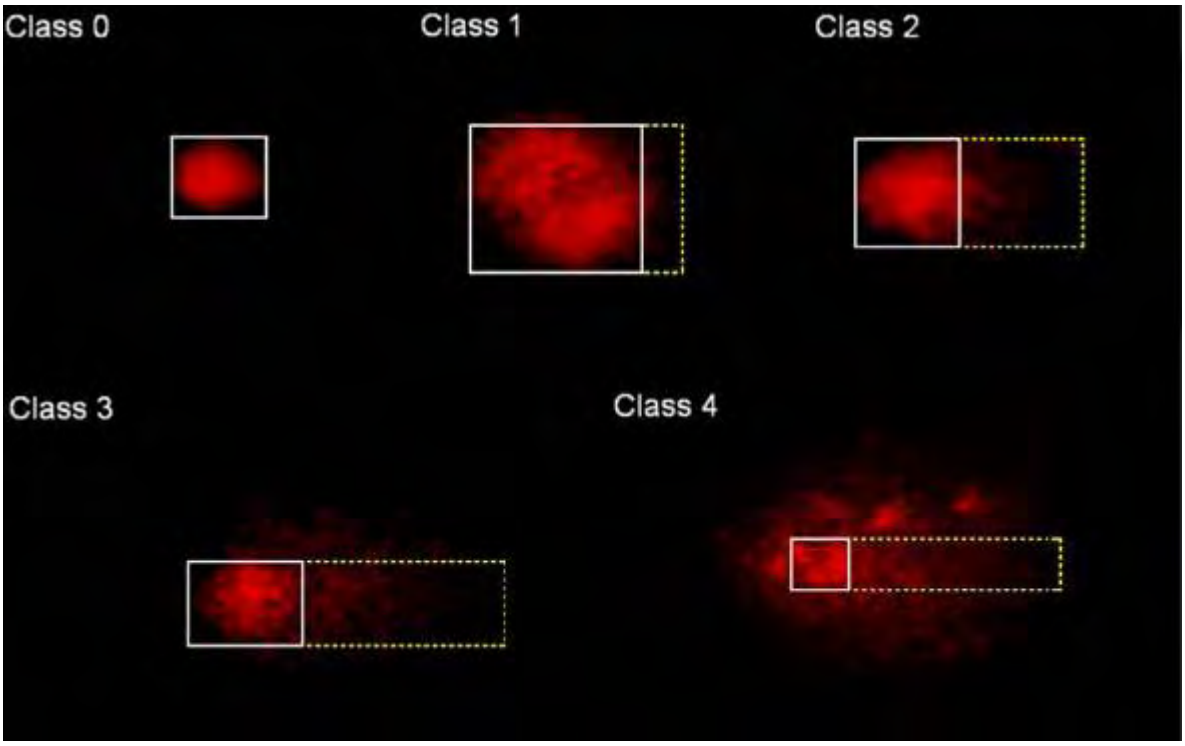

Figura 13- - Classificação de leitura para o ensaio cometa (Ribeiro, *et al.* 2009).

4.9. Análises Estatísticas

Os valores significativos e o desvio padrão foram obtidos da análise de 100 núcleos por tratamento para cada concentração de *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$. A correlação dos testes foi realizada para determinar efeitos das concentrações do complexo de rutênio sobre o índice mitótico e as aberrações cromossômicas. A análise de variância e o teste de Tukey foram usados para determinar diferenças significativas ($p<0,05$) entre grupos expostos ao composto de rutênio, doxorrubicina (controle positivo), e somente ao meio de cultura RPMI (controle negativo). A análise estatística foi realizada e os gráficos foram feitos usando Graph Pad Prism 4 software.

5.0. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

ARTIGO 1 – **Mutagenic, Clastogenic and Genotoxic Effects of *cis*-(Oxalate)tetraaminеruthenium(III) Ditionate on Human Peripheral Blood Lymphocytes**

Autores - Manuela da Rocha Matos Rezende, Alessandra de Santana Braga Barbosa Ribeiro, Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa, Elisângela P. Silveira- Lacerda

Periódico Científico - Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.

Qualis Capes – B1 para Ciências Biológicas I.

Situação – Submetido ao periódico.

Citotoxic and genotoxic effects of *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate on human peripheral blood lymphocytes

Manuela da Rocha Matos Rezende[a] (mannuellarocha@yahoo.com.br)
Alessandra de Santana Braga Barbosa Ribeiro[a] (agarbio@gmail.com)
Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa[a] (vilanovacosta@gmail.com)
Elisângela de Paula Silveira Lacerda[a,*] (silveiralacerda@gmail.com)

[a]Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia, Goiás, Brazil;

*Corresponding author: Elisângela de Paula Silveira Lacerda,
e-mail: silveiralacerda@gmail.com
Laboratório de Genética Molecular e Citogenética
Instituto de Ciências Biológicas - ICB I - Sala 200
Universidade Federal de Goiás
Campus Samambaia (Campus II)
Cx. Postal: 131
Goiânia-GO, Brasil -74001-970
Phone/Fax +55-62-3521-1481
Cell Phone +55-62-9293-3121

Abstract

Chemotherapy agents are increasingly being utilized due to their promising effects in cancer treatment. The desired actions of these drugs are obtained at the cost of frequent and severe side effects. It is essential that drugs utilized for cancer treatment are tested in relation to not only their cytotoxic, but also their clastogenic and genotoxic potentials to establish their clinical risk. Thus, there is increased interest in searching for new metallic compounds presenting antitumor activity with therapeutic potential and reduced side effects, such as those containing platinum (Pt), iron (Fe), titanium (Ti), rhodium (Rh), gold (Au) and ruthenium (Ru). In this work, the cytotoxic, clastogenic and genotoxic properties of *cis*-tetraamine(oxalato)ruthenium(III) dithionite, *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$, were evaluated in peripheral human blood lymphocytes *in vitro*. Mitotic index (MI), chromosomal aberrations (CA) and DNA damage were analyzed by comet assay. The MI values of human peripheral blood lymphocyte cultures treated with 0.0075, 0.075, 0.75 and 7.5 µM *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ were 6.1%, 3.9%, 3.2% and 0.2%, respectively. Doxorubicin hydrochloride was used as the positive control. The MI results suggest that the Ru compound does not have cytotoxic activity when compared to the negative control. The CA values obtained for the 0.0075, 0.075 and 0.75 µM concentrations were defined as spontaneous, presenting low frequency (1.5, 1.6 and 2.3%, respectively) and chromatic failure when compared to the negative controls. Clastogenic activity was only observed for treatment with the higher concentration (7.5 µM), where chromatic failure and breaks were predominant. The comet assay suggests that *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ does not have genotoxic activity, as high concentrations, even higher than in the positive control, did not cause DNA damage. These results demonstrate that *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ does not have cytotoxic and clastogenic activate but it presentes genotoxic potential in 0.75 and 7.5 µM concentrations *in vitro*.

Keywords: Cancer; *cis*-tetraamine(oxalate)ruthenium(III) ditionate; Mitotic index; Chromosome aberrations; Comet assay

Introduction

One of the most relevant and promising therapeutic applications of metallic compounds such as those containing Pt, Fe, Ti, Rh, Au and Ru is in cancer treatment [1,2]. Since the introduction of cisplatin as a highly efficacious chemotherapeutic agent in the treatment of several neoplasias, and the discovery of its limitations due to its side effects [3-5] the understanding of pharmacological mechanisms of other metallic compounds has become essential for development of more efficient and safe drugs that also present antitumor activity [6].

The objective of therapy that utilizes metallic compounds as anti-cancer agents is to destroy malignant cells while maintaining the integrity of the normal cells [7]. Ruthenium-containing complexes are very promising, because they present low cytotoxicity when compared to cisplatin [8- 10]. The antitumor activity of ruthenium complexes is due to a ligand kinetic change favored by the octahedral molecular form; specifically, such activity is linked to the capacity to mimic iron in binding to biological molecules and to the reduction of the oxidative state of ruthenium III (RuIII) to ruthenium II (RuII), which is favored in hypoxic environments with low pH and high levels of glutathione. Such environments are characteristic of tumoral areas [11- 13].
The physiologic state in which cancer cells are found gives ruthenium the ability to become activated and to effectively link to DNA [14].

The most published ruthenium III compounds that already are in clinical screening are KP101 and NAMI-A [9, 15, 16]. In the administration of KP1019 to eight patients with solid tumors, five patients showed stabilization of the disease within approximately 10 weeks [17]. The infusion of NAMI-A in twenty-four lung cancer patients was safe, but only one case showed stabilization of the disease after 21 weeks [18].

Cancer treatment with alkylating agents results in an increased frequency of chromosomal aberrations. This, in turn, elevates the chances of the patient developing a second neoplasia [7]. For detection of clastogenic agents in peripheral human blood lymphocytes, it is necessary that chromosomal aberrations are analyzed in detail [19].

Ruthenium complexes show antitumor properties with low toxicity. In normal cells (mononuclear cells of the peripheral blood), a high concentration of *cis*-(dichloro)tetraamineruthenium(III) chloride complex (8000 µM) was necessary for

cytotoxicity to occur [21]. According to Ribeiro *et al.*, (2009), the *cis*-(dichloro)tetraamineruthenium(III) complex does not cause DNA damage in human lymphocytes [20]. However, the *cis*-tetraamine(oxalato)ruthenium(III) dithionite complex c*is*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ presented antitumor activity *in vivo* when tested with sarcoma 180 cells (a solid tumor line) [22]. Pereira et al. (2008) also evaluated the *cis*-tetraamine(oxalato)ruthenium(III) dithionite complex in *Allium cepa* cells, and verified the absence of significant genotoxic activity [23].

Continuing the work cited above, the objective of the present study was to investigate the cytotoxic, clastogenic and genotoxic effects of c*is*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ in peripheral human blood lymphocytes *in vitro* using IM and CA; additionally, the comet assay was used to analyze DNA damage.

Materials and Methods

Cells and Medium

Human peripheral blood was collected using heparinized vials from six healthy donors aged 20–30 years with no history of smoking, drinking, or chronic drug use. Lymphocytes were isolated with plasma and cultured in RPMI-1640 medium (Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 20% fetal calf serum (Gibco®), penicillin (5 µg mL^{-1}), streptomycin (10 µg mL^{-1}), and 2% phytohemagglutinin serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil).

The protocol (N. 043/2007) of these experiments was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Goiás, and prior to joining the study, all blood donors signed an informed consent.

Chemicals

The c*is*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ was synthesized at the Universidade Federal de Uberlândia following a standard protocol [24]. The cytotoxic and mutagenic agent doxorubicin (Oncodoxdoxorubicin chloridate 50 mg Meizler®) was used as the positive

control for lymphocyte cultures at a concentration of 0.2 µg mL^{-1}, both dissolved in complete medium prior to use.

Treatments and Biological Tests

Human PBL were grown in RPMI 1640 medium according to standard procedures (Moorhead *et al.*, 1960). A sample of 5 mL of venous blood was collected from each donor into heparinized vial (5,000 IU mL^{-1}; Liquemine, Roche, São Paulo. SP. Brazil), and the cells were incubated (37°C, 5% CO^2) for 24h before drug treatment. After that, the cells were treated with c*is*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ at four concentrations (0.0075, 0.075, 0.75 and 7.5 µM) and doxorubicin (0.002 µM) and incubated for another 24 h. Untreated cells were used as control.

Cytogenetic Studies

In order to obtain a sufficient number of analyzable metaphases, colchicine was added at a final concentration of 0.0016% 1 h prior to harvesting. Cells were harvested by centrifugation (800 rpm), treated with 0.075 M KCl at 37°C for 20 min, centrifuged (800 rpm) again, and fixed in 1:3 (v/v) acetic acid–methanol. Finally, slides were prepared, air-dried, and stained with 3% Giemsa solution (pH 6.8) for 5 min [25]. Slides were then analyzed with a light microscope, and structural (chromosome/chromatid gaps and breaks) and numerical CA were examined in ruthenium complex-treated cultures and respective control metaphases.

The frequencies of CA (in 100 metaphases per culture 6×100) and MI (number of metaphases per 5.000 lymphoblasts per culture 6×5.000) were determined.

Comet Assay

An aliquot of 300 µL from each culture was taken after 48 h incubation for the alkaline version of the comet assay [26]. The compound *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ was studied at four concentrations (0.0075, 0.075, 0.75 and 7.5 µM). Briefly, 300 uL of the cell suspension was centrifuged for 5 min (500 rpm) in a refrigerated microcentrifuge (Eppendorf).

The resulting pellet was homogenized with 80 µL of a low melting point agarose (0.5%), spread onto microscope slides pre-coated with a normal melting point agarose (1.5%), and covered with a cover slip. After 5 min at 4°C, the cover slip was removed, and the slides were immersed in cold lysis solution (2.4 M NaCl, 100 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 10 mM Tris, 10% DMSO, and 1% Triton-X, pH 10) for 24 h.

Electrophoresis

After lysis, the slides were placed in an electrophoresis chamber and covered with electrophoresis buffer (300 mM NaOH per 1 mM EDTA, pH>13) for a remaining 20 min to allow DNA unwinding. The electrophoresis proceeded for 20 min (25 V and 300 mA). Afterwards, the slides were submerged for 15 min in a neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5), dried at room temperature, and fixed in 100% ethanol for 5 min. All the steps were conducted in the dark to prevent additional DNA damage.

Slide Scoring

Slide staining was performed immediately before analysis using ethidium bromide (20µg mL^{-1}). Slides were prepared in duplicate, and 100 cells were screened per sample (50 cells from each slide) in a fluorescent microscope (Zeiss, Germany) equipped with an excitation filter of 515–560 nm and a barrier filter of 590 nm using a ×40 objective. The nucleus was classified according to the migration of the fragments using the software CometScore 15 in: class 0 (no damage); class 1 (little damage with a short tail length smaller than the diameter of the nucleus); class 2 (medium damage with a tail length once or twice the diameter of the nucleus); class 3 (significant damage with a tail length between two and a half to three times the diameter of the nucleus); class 4 (significant damage with a tail longer than three times the diameter of the nucleus) [27].

Statistical Analysis

The values of mean and standard deviation (SD) were obtained from the results of 100 nuclei for each treatment concentration of *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$. Correlation tests were performed to determine effects of concentration of ruthenium

complex on mitotic index and chromosome aberrations. One-way analysis of variance and Tukey's t test were used to determine significant difference ($p<0.05$) among groups exposed to ruthenium complex, Doxorrubicin (positive control) and culture medium (negative control). Statistical analyses were performed, and graphics were done using GraphPad Prism 4 software (1992-2005 GraphPad Software).

Results

The effects of *cis*-tetraamine(oxalato)ruthenium(III) dithionite *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ in peripheral human blood lymphocytes were determined by analyzing the mitotic index (MI), total number of chromosomal aberrations (CA) and comet assay.

The mitotic index of human lymphocytes treated with the control drug (doxorubicin) was 2.9% and that of the negative control was 5.6%. Samples treated with 0.75, 0.075 and 0.0075 µM ruthenium presented MIs of 3.2, 3.9 and 6.1% respectively (Fig. 1). The 0.0075 µM concentration was not cytotoxic when compared to the negative control. At the highest concentration of cis-tetraamine(oxalato)ruthenium(III) dithionite tested, 7.5 µM, there was a significant reduction in the MI (0.2 % ,*$p<0.01$; Fig. 1).

The results of the chromosomal aberration assay at four different concentrations of *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ (i.e., 0.0075, 0.75, 0.75 and 7.5 µM) and the respective controls are shown in Table 1.

For assessment of chromosomal aberrations, one hundred cells were analyzed per treatment. The samples treated with ruthenium complex at concentrations of 0.0075, 0.075 and 0.75 µM presented values close to the negative control value, with frequencies of 1.5, 1.6 and 2.3, respectively did not demonstrate statistically significant with negative contral ($p>0,01$). The 7.5 µM concentration demonstrated clastogenic activity when compared to the negative control, predominantly by chromatic failure ($p<0,01$); Fig. 2). In addition, chromosome rearrangement was observed at the same concentration, arising from chromatid breaks that generated trirradial figures (Fig. 3).

The DNA damage index obtained through the comet assay is classified into (0, 1, 2, 3 a 4) classes; greater DNA damage receives a higher ranking (Fig. 4).

Table 2 shows the frequency of cells found in each class of the comet assay in peripheral human blood lymphocytes treated with the four different concentrations of

cis-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ and their controls. Only a small quantity of cells with DNA damage was found in the negative control. The positive control (doxorubicin) presented the highest DNA damage index (Fig. 5).

The 0.0075 and 0.075 µM concentrations of *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ did not demonstrate statistically significant DNA damage when compared to the negative control. However, only the 0.75 and 7.5 µM concentrations presented genotoxic activity (*$p<0.01$; Fig. 5).

Discussion

Cytotoxicity and genotoxicity studies have been done for the development of new antitumor agents with higher selectivity and without many of the side effects experienced with conventional antitumor agents [28].

Cytogenetic methods are used in clinical screening to evaluate primary DNA damage caused by chemical and physical agents. The most utilized methods include CA and the comet assay [29-39].

Many types of cancer are associated with specific types of CA, and it is therefore important that the different aberration types are classified. Karyotyping studies are still the traditional methodology applied in human genetics to detect numeric and structural chromosomal alterations.[40]. Peripheral human blood lymphocyte cultures constitute an excellent method for testing the capacity of chemical agents to cause DNA damage [41]. All methods utilized in the primary evaluation of DNA damage include the comet assay, which has the potential to detect cytotoxic and genotoxic activity. [27, 42- 44]

According to Djinovic *et al.* (2009), although cisplatin has made a significant contribution in the field of antitumor chemotherapy agents, complete success in treatment has not been achieved, and the search continues for new metallic complexes that are capable of bypassing the resistance problem, reducing side effects and selecting only tumoral cells [10]. In particular, ruthenium complexes have exhibited a number of interesting properties.

Because of the promising results from previous *cis*-tetraamine(oxalato)ruthenium(III) dithionite studies presented by Barbosa et al, 2007, the necessity for research into possible cytotoxic, clastogenic and genotoxic effects of this complex in peripheral human blood lymphocytes *in vitro* has emerged [22, 23].

For evaluation of the effect of *cis*-tetraamine(oxalato)ruthenium(III) dithionite on the mitotic index of human lymphocytes, we used four concentrations of the complex, varying between 0.0075 to 7.5 µM, as well as a positive control, doxorubicin at 0.002 µM. The MI for the 0.0075 µM concentration of ruthenium complex did not demonstrate cytotoxicity towards human lymphocytes, but actually resulted in increased proliferation. At the 0.075 and 0.75 µM concentrations, a reduction of MI was observed; however, there was no cytotoxic activity, but did not did not demonstrate statistically significant with negative control ($p>0,01$). In contrast, the 7.5 µM concentration resulted in a significant reduction of MI when compared to the negative control, indicating cytotoxic activity. In previous studies utilizing another ruthenium complex, *cis*-$[RuCl_2(NH_3)_4]Cl$, inhibition of cellular division (MI=0%) was observed when mononuclear cells of the peripheral blood where treated with complex concentrations higher than 380 µM. [20] Such results could have been caused by the possible interference of the complex with checkpoints of the cell cycle, probably between the S and G2 phases, thus hindering cell division.

Recently, Silveira-Lacerda *et al.* (2009) demonstrated that the *cis*-(dichloro)tetraammineruthenium(III) chloride complex *cis*-$[RuCl_2(NH_3)_4]Cl$ presents a selective cytotoxicity towards Jurkat human tumor cells (acute T cell leukemia), SK-BR-3 (human breast adenocarcinoma) and A-20 murine cells (B cell lymphoma), and S-180 (sarcoma 180) cells [21, 46]. The IC_{50} values (concentration required for 50 % inhibition of cellular growth) were 13.53 µM, 13 µM and 63 µM, respectively, for the human tumor cells. Flow cytometry analyses of A-20 cells demonstrated the capacity of this complex to blocking the cell cycle during G0/G1. Jurkat tumor cells treated with the same complex showed blockade of the cell cycle at G2/M. Additionally, the cytotoxic activity of the ruthenium complex *cis*-(dichloro)tetraammineruthenium(III) chloride in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was lesser than that in tumor cells, presenting a high IC_{50} of 8157 µM. This demonstrates the higher selectivity of this ruthenium complex towards tumor cells versus normal and healthy cells. These results corroborate the findings of the present study, as increased concentrations of the dithionite ruthenium complex were necessary for cytotoxicity in peripheral human blood lymphocytes.

Pereira (2010) and Silveira-Lacerda *et al.* (2009 a and b) demonstrated that the *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ and *cis*-$[RuCl_2(NH_3)_4]Cl$ complexes, respectively, exhibited high selectivity for tumoral cells such as Jurkat, A549 (alveolar lung

carcinoma, S180 and K562 (chronic myeloid leukemia) with IC_{50} of 18.6 µM, 19.1 µM, 24.5 µM and 29.2 µM, respectively. [21, 46, 47] In contrast to the verified cytotoxicity in tumor cells, the present study demonstrated that much higher concentrations than that of the positive control (doxorubicin) were necessary for cytotoxic effects in normal cells. Cytotoxic properties of other ruthenium complexes have been investigated in relation to tumor and normal cells; these complexes are selective for tumor cells when compared to normal cells [10].

Published data by Pereira *et al.* (2009), in which meristematic cells of *Allium cepa* roots were treated with *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$, demonstrate that a high concentration of the complex was necessary for significant reduction of MI (380 µM), and even at high concentrations, significantly increased CA was not observed [23].

The CA analysis of 100 metaphases after treatment demonstrate that 0.0075, 0.075, and 0.75 µM ruthenium dithionite did not induce CA, instead presenting values similar to the negative control. The positive control group (doxorubicin) presented a high frequency of CA (19%, Table 1), predominantly chromatin failures and breaks. It is important to remember that doxorubicin is a DNA damage-inducing agent that has been used as a positive control in cytogenetic assays. [45]. The success of doxorubicin in cancer therapies comes from its ability to intercalate the DNA and inhibit topoisomerase II [48].

In a *cis*-$[RuCl_2(NH_3)_4]Cl$ study, Ribeiro *et al.* (2009) did not verify any metaphase at the highest concentration of 380 µM, probably because the cell cycle was blocked at interphase, thus interfering with the repair mechanism and blocking mitosis [20]. In our results, the highest dose used for treatment was not possible to analyze total 600 metaphases were analyzed only 195 Metaphases. In a study with *cis*-$[RuCl_2(NH_3)_4]Cl$, increased CA frequency was not observed on comparison with a commonly used chemotherapy agent, i.e., cisplatin [49].

In the present study, the CA assay did not reveal cytotoxic and clastogenic effects in human lymphocytes that had been submitted to different concentrations of *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$. These data agree with previous studies about the selectivity if the ruthenium (III) complex, in which cytotoxicity was demonstrated in tumor but not normal cells [12].

The CA frequency in negative control human lymphocytes was 2.0% which is within the level of healthy individuals (around 2%) [50]. The 0.0075 µM, 0.075 µM and

0.75 µM concentrations of the complex also did not demonstrate clastogenic effects when compared to the negative control.

However, there was an increase in the clastogenic activity of ruthenium dithionite (III) in the human lymphocytes when the 7.5 µM concentration was used, predominantly manifesting as chromatic breaks and failures, and when this concentration were observed and analyzed 195 metaphases, differing from the other concentrations, which were observed in 600 metaphases per treatment (Table 1).

It is known that in normal cells, the quantity of membrane transferrin receptors is smaller than in tumor cells. When the ruthenium complex is in an environment with normal oxygen levels, pH and glutathione, the reduction of ruthenium (III) to ruthenium (II) is not probable; only ruthenium (II) has the ability to bond to the DNA. Thus, it can be suggested that high concentrations of the complex may lead to oxidative stress, in turn, generating oxygen reactive species that can interact with the DNA and induce molecular lesions [46, 51].

The present study also used the comet assay to evaluate DNA damage. This test is a sensitive method for detection of simple breaks, double breaks and crosslinking of DNA [42]. The comet assay provides the opportunity for correlation of levels of DNA damage with administered therapeutic dosage, and for the modulation of dose to allow reduced genotoxicity.[52, 53]. It has been suggested that the degree of DNA damage in peripheral human blood lymphocytes can indicate the chemotherapy response [54, 55, 56, 57].

In this study, low concentrations (0.0075 and 0.075 µM) of *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ complex did not demonstrate any statistically significant DNA damage when compared to the negative control. However, the 0.75 and 7.5 µM concentrations, which are 370 and 3700 times higher that of than the positive control, presented genotoxic activity (Figure 2). At the 0.75 µM concentration, DNA damage was detected in the comet assay but not in the CA assay. This might be because the comet assay is more sensitive [7].

Therefore, the *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ complex be used at concentrations lower than 0.0075 mM for appears to be a safe drug for healthy cells, with tolerable cytotoxicity, clastogenicity and genotoxicity, and DNA damage occurring only at high concentrations.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of Research and Projects Financing (FINEP) (Grant No.01.06.0941.00/CT-Saúde to Elisângela de Paula Silveira-Lacerda). Coordination for the Advancement of Higher Education Staff (CAPES) through fellowship to Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding sources

There are no financial or personal interests that might be viewed as inappropriate influences on the work presented herein. This manuscript was completely financed by governmental and nonprofit institutions, Brazilian National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Research and Projects Financing (FINEP) and Coordination for the Advancement of Higher Education Staff (CAPES).

References

[1] C.S.R. Menezes, L.C.G.P. Costa, V. de M.R. Ávila, M.J. Ferreira, C.U. Vieira, L.A. Pavanin, M.I. Homsi-Brandeburgo, A. Hamaguchi, E.P. Silveira-Lacerda, Analysis in vivo of antitumor activity, cytotoxicity and interaction between plasmid DNA and the cis-dichlorotetraammineruthenium(III) chloride, Chemico-Biol. Int. 167 (2007) 116–124.

[2] A. Cuin, A.C. Massabni, C.Q.F. Leite, D.N. Sato, A. Neves, B. Szpoganicz, M.S. Silva, A.J. Bortoluzzi, Synthesis, X-ray structure and antimycobacterial activity of silver complexes with a-hydroxycarboxylic acids, J. Inorg. Biochem. 101 (2007) 291–296.

[3] J.B. Helms, L. Huang, R. Price, B.P. Sullivan, B.A. Sullivan, Coordination Chemistry of Tropolone-Based Antimitotic Drugs and the Antineoplastic Behavior of Some Ruthhhenium(II) and Platinum(II) Derivates, Inorg. Chemistry. 34 (1995) 5335-5340.

[4] K. Wozniak, A. Czechowska, J. Blasiak, Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571, Chemico-Biol. Int. 147 (2004) 309–318.

[5] S.K. Pang, C.W. Yu, S.C.F. Au-Yeung, Y.P. Ho, DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes, Biochem. And Biophys. Res. Commun. 363 (2007) 235-240.

[6] V. Brabec, O. Nováková, DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity, Drug Resist. Updat. 9 (2006) 111–122.

[7] P. Sánchez-Suárez, P.Ostrosky-Wegman, F Gallegos-Hernández, R Peñarroja-Flores, J Toledo-Garcia, J.L.Bravo, E.R.d. Castillo, L. benítez-Bribiesca, DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer, Mutat. Res. 640 (2008) 8-15.

[8] I. Kostova, Ruthenium complexes as anticancer agents, Curr. Med. Chem. 13 (2006) 1085–107.

[9] A. Alama, B. Tasso, F. Novelli, F. Sparatore, Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotins as antitumor agents, Drug Disc. Tod. 14 (2009) 9-10.

[10] V.M. Djinovic, T. Todorovic, Z. Zizak, T.J. Sabo, Z.D. Juranic, 'Ru(III) complexes derived from N-methyl derivatives of glycine and 1,3-propylenediamine-N,N'-diacetato ligands and their activities against HeLa, K562 cell lines and human PBMC', Journal of Coordination Chemistry. 62:2 (2009) 328 - 336.

[11] C.S. Allardyce, P.J. Dyson, Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects, Plat. Met. Rev. 45 (2001) 6–69.

[12] M.J. Clarke, Ruthenium metallopharmaceuticals, Coord. Chem. Rev 236 (2003) 209–233.
[13] Dougan SJ, Habtemariam A, McHale SE, Parsons S, Sadler PJ Catalytic organometallic anticancer complexes, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 105 (2008) 11628–11633.

[14] F. R. Keene, J. A. Smitha, J. G. Collins, Metal complexes as structure-selective binding agents for nucleic acids, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 2021–2035.

[15] G. Sava, I. Capozzi, V. Clerici, G. Gagliardi, E. Alessio, G. Mestroni, Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex, Clin. Exp. Metast. 16 (1998)371–379.

[16] G. Sava, E. Alessio, A. Bergamo, G. Mestroni, Sulfoxide ruthenium complexes: non-toxic tools for the selective treatment of solid tumour metastases, in: M.J. Clarke and P.J. Sadler (Eds.), Topics in biological inorganic chemistry, v. 1, Springer, Berlin, 1999, pp. 143–169.

[17] Hartinger, C.G. et al. From bench to bedside-preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachloro bis(1Hindazole) ruthenate(III)] (KP1019 or FFC144, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 891–904.

[18] J.M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J.H. Beijnen and J.H.M. Schellens, A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent, Clin. Cancer Res. 10 (2004) 3717–3727.

[19] R.J. Albertini, D. Anderson, G.R. Douglas, L. Hagmar, K. Hemminki, F. Merlo, A.T. Natarajan, H. Norppa, D.E. Shuker, R. Tice, M.D. Waters, A. Aitio, IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety, Mutat. Res. 463 (2000)111–172.

[20] A. S. B. B. Ribeiro, C. C. Silva, F.C. Pereira, A. P. Lima, C.A.S.T. Vilanova-Costa, S.S.Aguiar, L. A. Pavanin, A. D. Cruz, E. P. Silveira-Lacerda, Mutagenic and Genotoxic Effects of cis-(Dichloro) tetraammineruthenium(III) Chloride on Human Peripheral Blood Lymphocytes, Biol.Trace Elem. Res. (2009) doi:10.1007/s12011-009-8334-9.

[21] E.P. Silveira-Lacerda, C.A.S.T. Vilanova-Costa, F.C. Pereira, A. Hamaguchi, L. A. Pavanin, L.R. Goulart, M. I. Homsi-Brandenburg, A.M. Soares, W.B. Santos, A. Nomizo, The Ruthenium Complex cis-(Dichloro) Tetraammineruthenium(III) Chloride Presents Immune Stimulatory Activity on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, Biol.Trace Elem. Res. (2009) doi: 10.1007/s12011-009-8440-8 a.

[22] C.E.S. Barbosa, Evaluation of acute toxicity and antitumor effect of cis-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate in murine sarcoma 180. Master's Thesis—Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil, (2007).

[23] F.C. Pereira, C.A.S.T. Vilanova-Costa, A.P. Lima, A.S.B.B. Ribeiro, H.D. da Silva, L.A. Pavanin, E.P. Silveira-Lacerda, Cytotoxic and genotoxic effects of cis-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate on the root meristem cells of Allium cepa. Biol Trace Elem Res 128(3) (2009) 258–268.

[24] L.A. Pavanin, E. Giesbrecht, E. Tfouni, Synthesis and properties of the ruthenium(I1) complexes cis-Ru(NH3)Isn)L2+. Spectra and reduction potentials, Inorganic Chemistry, 24 25 (1985) 4444–4446.

[25] P.S. Moorhead, P.C. Nowell, J. Mellman, D.M. Batipps, D.A. Hungerford, Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood, Exp. Cell Res. 20 (1960) 613–616.

[26] N.P. Singh, M.T. Mccoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, Exp. Cell Res. 175 (1988) 184–191.

[27] B. Burlinson, R.R. Tice, G. Speit, E. Agurell, S.Y. Brendler-Schwaab, A.R. Collins, P. Escobar, M. Honma, T.S. Kumaravel, M. Nakajima, Y.F. Sasaki, V. Thybaud, Y. Uno, M. Vasquez and A. Hartmann, Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup, Mutat. Res. 627 (2007)31–35.

[28] S.N. Manjula, N. Malleshappa Noolvi, K. Vipan Parihar, S.A. Manohara Reddy, Vijay Ramani, Andanappa K. Gadad, Gurdial Singh, N. Gopalan Kutty, C. Mallikarjuna Rao, Synthesis and antitumor activity of optically active thiourea and their 2-aminobenzothiazole derivatives: A novel class of anticancer agents, Med. Chem. 44 (2009) 2923–2929.

[29] M. Fenech, A.A. Morley, Measurement of micronuclei in lymphocytes, Mutat. Res. 147 (1985) 29–36.

[30] K.W. Kohn, Assessment of DNA damage by filter elution assays. In: Simic, M.G., Grossman, L., Upton, A.C. (Eds.), Mechanisms of DNA Damage and Repair. Plenum Press, New York, 1986, pp. 101–118.

[31] M.A. Bender, R.J. Preston, R.C. Leonard, B.E. Pyatt, P.C. Gooch, M.D. Shelby, Chromosomal aberration and sister-chromatid exchange frequencies in peripheral blood lymphocytes of a large human population sample, Mutat. Res. 204(3) (1988) 421–433.

[32] A. Collins, M. Dusinská, M. Franklin, M. Somorovská, H. Petrovská, S. Duthie, L. Fillion, M. Panayiotidis, K. Raslová, N. Vaughan, Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. Environ. Mol.Mutagen. 30 (1997a) 139–146.

[33] A.R. Collins, D.L. Mitchell, A. Zunino, J. de Wit, D. Busch, UV-sensitive rodent mutant celllines of complementation groups 6 and 8 differ phenotypically from their human counterparts. Environ. Mol. Mutagen. 29 (1997b)152–160.

[34] M. Wojewódzka, M. Kruszewski, T. Iwanenko, A.R. Collins, I. Szumiel, Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. I. Strand breakage. Mutat. Res. 416 (1998).21–35.

[35] P.L. Olive, DNA damage and repair in individual cells: aplications of the comet assay in radiobiology. Int. J. Radiat. Biol. 75 (4) (1999) 395–405.

[36] M. Fenech, The in vitro micronucleus technique, Mutat. Res. 455 (2000) 81–95.

[37] A. Hartman, U. Plappert, F. Poetter, W. Suter, Comparative study with thealkaline comet assay and the chromosome aberration test, Mutat. Res. 536 (2003) 27–38.

[38] A.R. Collins, Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations, Mol. Biotechnol. 26 (2004) 249–261.

[39] N.P. Singh, Apoptosis assessment by the DNA diffusion assay, Methods Mol. Med. 111 (2005) 55–67.

[40] R.L. Nussbaum, R.R. McInnes and H.F. Willard, Thompson & Thompson, Genetics in Medicine. 6th Ed. Philadelphia: Saunders, 2001.

[41] P.D.L. Lima, D.S.Leite, M.C. Vasconcellos, B.C. Cavalcanti, R.A. Santos, L.V. Costa-Lotufo, C. Pessoa, M.O. Moraes, R.R.Burbano, Genotoxic effects of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treatedbin different phases of cell cycle, Food Chem. Toxicol. 45 (2007) 1154–1159.

[42] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlison, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. Ryu, Y. Susaki, Single cell/ gel comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, Environ. Mol. Mutagen. 35 (2000)206-221.

[43]P.L. Olive, G. Frazer, J.P. Banáth, Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay, Radiat. Res. 136 (1993) 130–136.

[44] A.R. Trzeciak, J. Barnes, K.M. Evans, A modified alkaline comet assay for measuring DNA repair capacity in human population, Radiat. Res. 169 (2008) 110–121.

[45] L.M.G. Antunes, R.B.L. Bueno, F.L. Dias, M.L.P Bianchi, Acetylsalicylic acid exhibits anticlastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin. Mut. Res. 626 (2007) 155-61.

[46] E.P. Silveira-Lacerda, C.A.S.T. Vilanova-Costa, A. Hamaguchi, L. A. Pavanin, L.R. Goulart, M. I. Homsi-Brandenburg, W.B. Santos, A.M. Soares, A. Nomizo, 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. (2009) DOI 10.1007/s12011-009-8498-3 b.

[47] F.C. Pereira, Citotoxic, genotoxic and antitumor activity of *cis*-tetraamine(oxalato)ruthenium (III) on different cell lines. Master's Thesis—Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil, (2010).

[48] H. Mizutani, S. Tada-Oikawa, Y. Hiraku, M. Kojima, S. Kawanishi, Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide, Life Sci. 76 (2005) 1439–1453.

[49] V. Brabec, J. Kasparkova, Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs, Drug Resist. Updat. 8 (2005)131–146.

[50] R.J. Preston, J.R. San Sebastian, A.F. McFee, The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents, Mutat. Res. 189 (1987) 175–183.

[51] S. Kapitza, M.A. Jakupecb, M. Uhla, B.K. Kepplerb, B. Mariana, The heterocyclic ruthenium(III) complex KP1019 (FFC14A) causes DNA damage and oxidative stress in colorectal tumor cells, Cancer Let. 226 (2005) 115-121.

[52] Y. Miyamae, K. Zaizen, K. Ohara, Y. Mine, Y.F. Sasaki, Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell electrophoresis (comet) assay: relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens, Mutat. Res. 415 (1998) 229-235.

[53] C.Alapetite, P.Thirion, A.De la Rochefordiere, J.M. Cosset, E.Moutacchi, Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of cancer patients, Int. J. Cancer 83 (1999) 83-90.

[54] R. Tice, H.S.G. Strauss, W.P. Peters, High-dose combination alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer: preliminary

assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay, Mutat. Res. 271 (1992) 101-113.

[55] P.Jaloszynski, M. Kujawski, M. Czub-Swierczek, J. Markowska, K. Szyfter, Bleoycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancernpatients studies by comet assay, Mutat. Res. 385 (1997) 223-233.

[56] J. Blasiak, M. Arabsk, R. Krupa, K. Wozniak, j. rykala, A. Kolacinska, Z. Morawiec, J. Drzewoski, M. Zadrozny, Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer, Mutat. Rs. 554 (2004) 139-148.

[57] S.B. Nadin, L.M. Vargas-Roing, g. Drago, J. Ibarra, D.R. Ciocca, DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and cancer patients: a pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy, Cancer Lett. 239 (2006) 84-97.

Table 1. Cytogenetic Analysis of peripheral human blood lymphocytes treated with different concentrations of *cis*-Tetraammine(oxalato)Ruthenium(III) Dithionate.

Concentration	MI(%)	Ctg	Ctb	Chg	Chb	Total	F(%)
Controle Negativo	5.6	6	4	2	0	12	2.0±0.30
Ru 0.0075 µM	6.1	8	0	1	0	9	1.5±0.32
Ru 0.075 µM	3.9	5	4	1	0	10	1.6±0.26
Ru 0.75 µM	3.2	4	10	0	0	14	2.3±0.43
****Ru 7.5 µM**	*0.2	37	179	24	18	*258	43±0.92
DXR (0.002 µM)	2.9	353	176	149	16	694	115±17.20

For each treatment 100 cells were analyzed; for mitotic index, 5,000 cells were analyzed. Ctg=chromatid gaps, Ctb = chromatid breaks, Chb = chromosome breaks, DXR = doxorubicin . * Indicates significant difference in comparison to negative control group ($p<0.01$). Data are mean ± S.D. ** Frequency estimate a total of 195 metaphases, different from the other concentrations, which were calculated on a total of 600 metaphases per treatment.

Table 2 - Frequency of Cell Nuclei Found in each Class of the Comet Assay Using Human Peripheral Blood Lymphocytes with no Treatment (Negative Control), Treated with Four Different Concentrations of {*cis*-[$Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$} and (Positive Control)Treated with Doxorubicin (DXR)

Frequency of cell nuclei (%)					
Treatment	**Class of comet assay**				
	0	**1**	**2**	**3**	**4**
Control	78	09	10	03	00
Ru (0.0075 µM)	70	24	05	01	00
Ru (0.075 µM)	38	33	21	08	00
Ru (0.75 µM)	11	10	32	46	01
Ru (7.5 µM)	09	12	30	25	24
Doxorrubicin(0.002 µM)	26	24	25	22	03

Nuclei classification according to the migration of the fragments using the software CometScore 15: class 0(no damage); class 1 (little damage, tail length smaller than the diameter of the nucleus); class 2 (medium damage, tail length once or twice the diameter of the nucleus); class 3 (significant damage, tail length between two and a half to three times the diameter of the nucleus); class 4 (significant damage, tail length longer than three times the diameter of the nucleus).

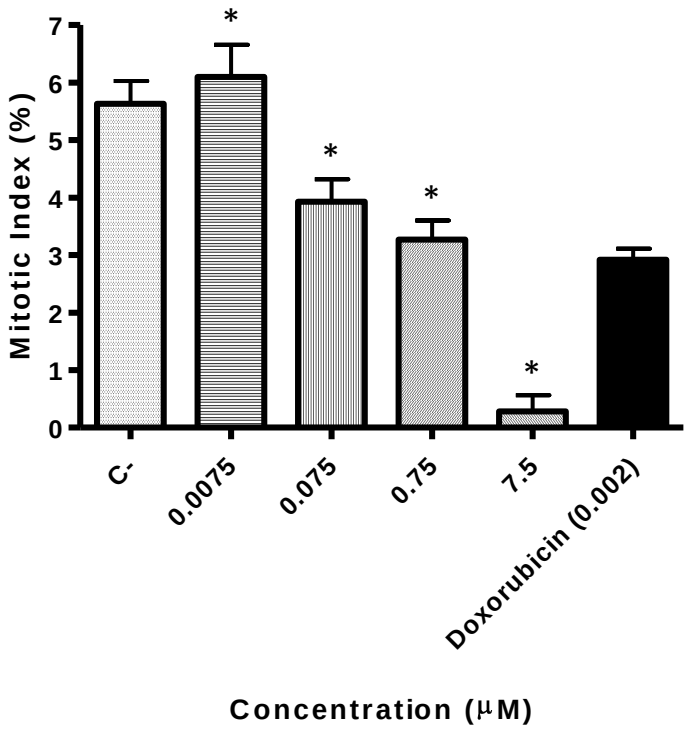

Fig. 1 - Mitotic index of peripheral human blood lymphocytes exposed to different concentrations of *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate. C-: negative control; * Indicates significant difference in comparison to negative control group ($p<0.01$).

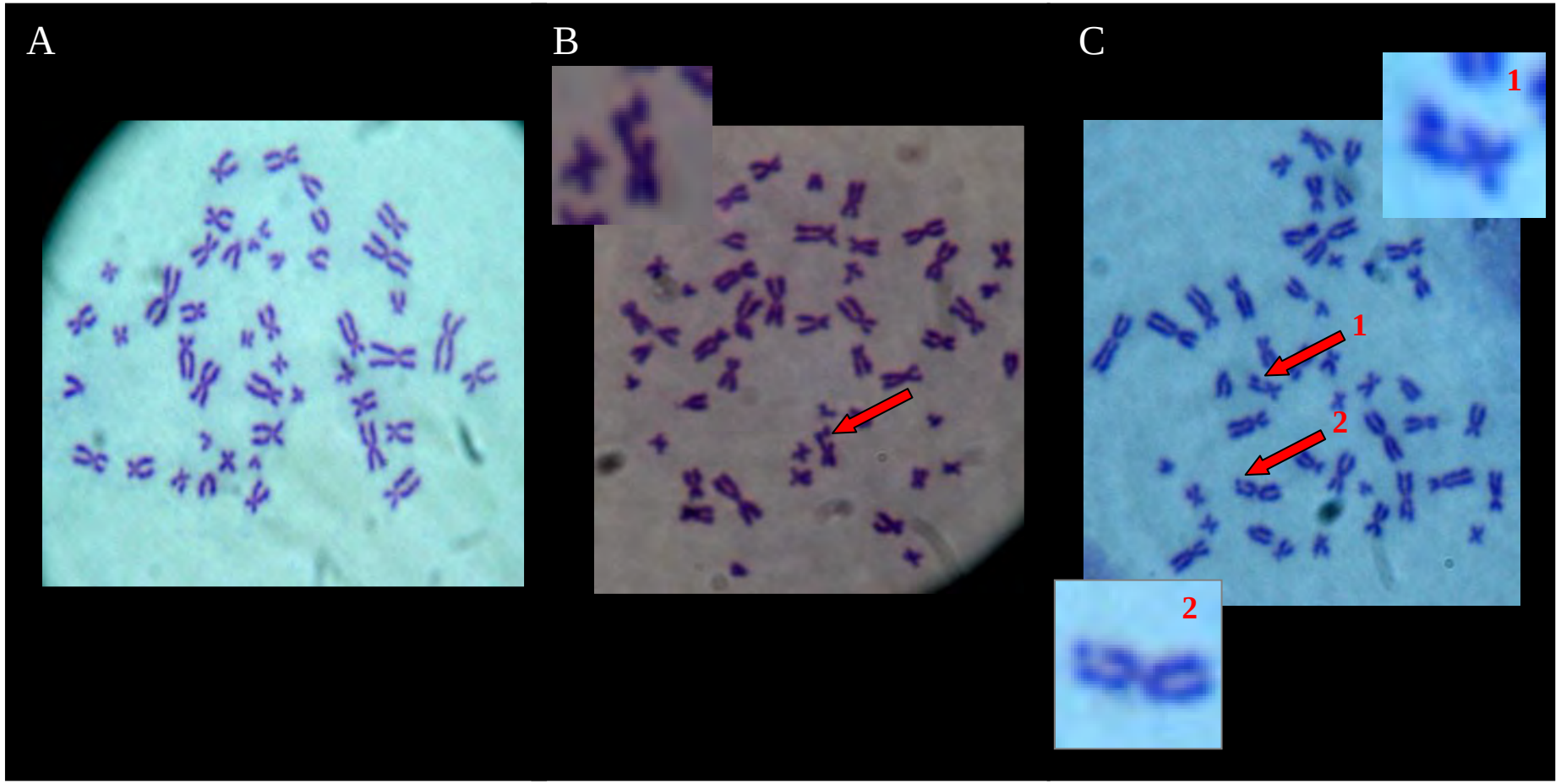

Fig.2. Chromosome aberrations observed on Metaphase of peripheral human blood lymphocytes. **A.** Control - Normal metaphase; **B.** Cells treated with doxorrubicin (Chromatidic break); **C.** Cells treated with *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate ant concentration of 7.5 µM (1 - Chromatidic gap; 2 - Chromatidic break).

Fig. 3. Chromosome aberrations observed on Metaphase of peripheral human blood lymphocytes treated with *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ at concentration of 7.5 µM (Chromatidic exchange – triradiate asymmetric figure).

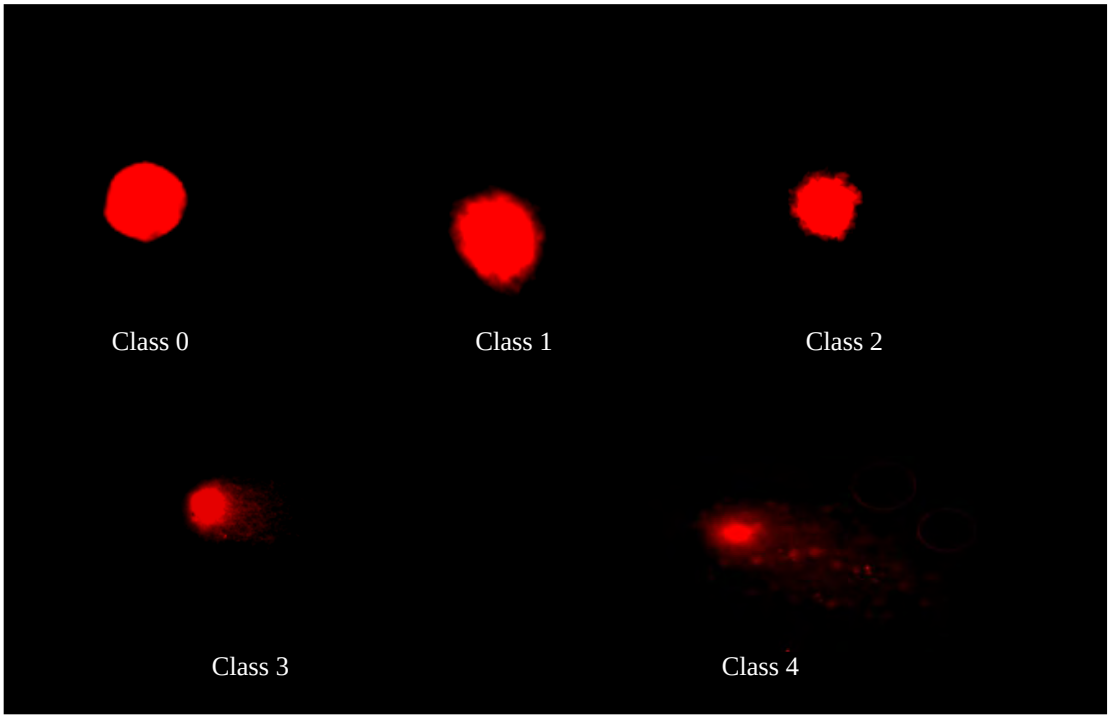

Fig. 4 - Representative comet assay images using human peripheral blood lymphocytes with no treatment (negative control), treated with four different concentrations of *cis*-tetraamine(oxalate)ruthenium(III) dithionate. Class 0 control cell with no DNA damage and no tail (intact nuclei); Class 1 comet cell with a short tail length smaller than the diameter of the head; Class 2 comet cell with a tail longer than the diameter of the head and a low level of DNA damage; Class 3 comet cell with a tail longer than the diameter of the head and a high level of DNA damage; Class 4 comet cell with a tail longer than the diameter of the head, high level of DNA damage.

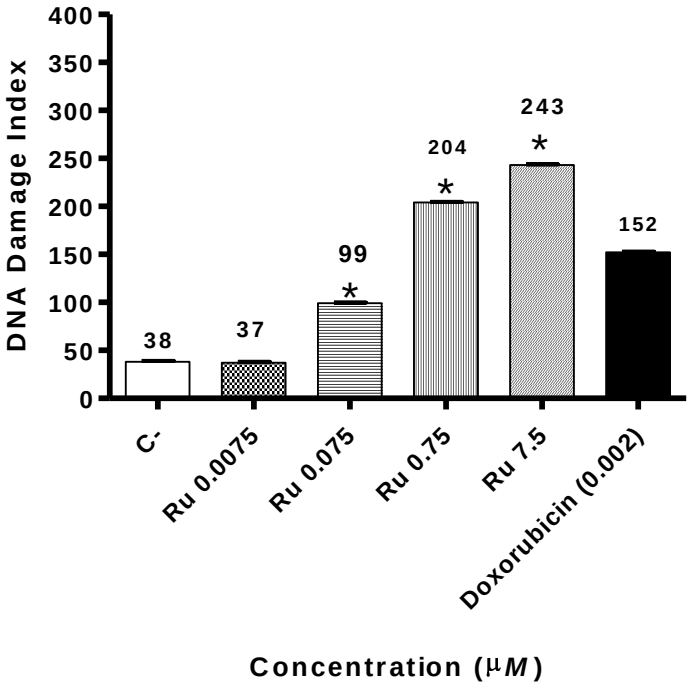

Fig. 5 Relationship between head and tail length of human peripheral blood lymphocytes nuclei according to the following treatments: C- Culture medium (negative control); DXR- Doxorrubicin (positive control); * Indicates significant difference in comparison to negative control group ($p<0.01$).

6.0 CONCLUSÕES

O estudo avaliou os cromossomos humanos em metáfase e possíveis fragmentação de DNA, detecção de aberrações espontâneas e/ou induzidas pelo uso do complexo de rutênio *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ e concluiu que:

- ✓ Os índices mitóticos encontrados nas células tratadas com *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ nas concentrações 0,0075; 0,075; 0,75 e 7,5 µM apresentaram os respectivos percentuais, 6,1; 3,9; 3,2; e 0,2%, indicando que, quanto maior o IM, maior a proliferação celular;

- ✓ Através da análise de frequência de aberrações cromossômicas em cultura de linfócitos periféricos humano do complexo *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$, as AC derivadas das concentrações 0,0075; 0,075; 0,75 µM , apresentaram frequência de 1,5; 1,6 e 2,3%, respectivamente, não manifestando atividade clastogênica comparadas ao controle negativo, e somente na maior concentração 7,5 µM, demonstrou atividade clastogênica, predominando quebras e falhas cromatídicas.

- ✓ Resultados obtidos através do ensaio cometa usando *cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$ sugere que este composto não apresenta atividade genotóxica em concentrações menores que 0,0075 µM.

7.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme apresentamos no decorrer deste trabalho, a descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina e o uso clínico de complexos de platina no tratamento do câncer constituíram um dos maiores sucessos da Química Inorgânica. O interesse gerado por esses complexos levou ao desenvolvimento de várias linhas de pesquisa, que possibilitaram o entendimento do seu mecanismo de ação e de seu comportamento dentro do organismo. Contudo, os agentes quimioterápicos atualmente disponíveis, manifestam toxicidade significativa sobre os tecidos normais, o que acarreta maior complicação do seu uso clínico, levando à profundas reflexões sobre os critérios que se deve considerar acerca dos riscos versus benefícios da quimioterapia.

Sendo assim, no presente estudo utilizamos metodologias que permitiram avaliar os efeitos citotóxicos, clastogênicos e genotóxicos do compostos ditionado de *cis*-tetramino(oxalato)Rutênio (III). Estes testes fazem parte da primeira fase dos estudos necessários para a liberação de novos medicamentos no mercado, exigidos pela ANVISA e FDA.

Os resultados dos ensaios de AC e Cometa permitiram avaliar a atividade citotóxica, clastogênica e genotóxica que o composto de rutênio (III) possa apresentar frente à cultura de linfócitos do sangue periférico humano.

Os resultados indicaram que o composto de rutênio(III) inibiu a proliferação celular em linfócitos humanos do sangue periférico de acordo com a concentração utilizada, sem contudo provocar alterações clastogênicas significativas, bem como genotóxicas, demonstrando que o composto não possui atividade citotóxica, clastogênica e genotóxicas frente a células normais, em concentrações menores que 0,0075 µM.

Enfim, o complexo ditionado de *cis*-tetramino(oxalato)Rutênio(III) {*cis*-$[Ru(C_2O_4)(NH_3)_4]_2(S_2O_6)$} encontra-se em plena fase de investigação, e, baseando nos resultados obtidos até o momento, espera-se que futuramente possa vir a ser utilizado para o tratamento do câncer, tendo em vista sua seletividade a células tumorais e seguro frente as células sadias.

8.0 REFERÊNCIAS

ALAMA, A.; TASSO, B.; NOVELLI, F. and SPARATORE, F. Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotins as antitumor agents, Drug Disc. **Tod**. v.14 p. 9-10, 2009.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. E WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 1313-1362.

ALLARDYCE, C.S. and DYSON, P.J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects, **Plat. Met. Rev**. v.45, p. 6–69, 2001.

ANTUNES, L.M.G.; BUENO, R.B.L.; DIAS, F.L.; BIANCHI, M.L.P. Acetylsalicylic acid exhibits anticlastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin. Mut. Res. v.626, p.155-61, 2007.

AU, W.W.; BADARY, O.A. & HEO, M.Y. Citogenetic assays for monitoring population exposed to environmental mutagens. **Occup. Med**. v.16(2), p.345-357, 2001.

BARBOSA, C. E. S. Avaliação da toxicidade aguda e do efeito antitumoral do *cis*-tetraaminoxalatorutênio(III) sobre o sarcoma 180 em camundongos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás / UFG. 2007.

BENITE, A.M.C.; MACHADO, S.P. & BARREIRO, E.J. Uma Visão da Química Bioinorgânica Medicinal. **Químiva Nova**. V. 30, p. 2062-2067, 2007.

BENNETT, J. C. & PLUM, F. Tratado de Medicina Interna. 20ª ed. vol. 1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 1113-1115.

BERALDO, H. & GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. ***Mini Rev. in Med. Chem.*** v. 4, p. 31-39, 2004.

BERGAMO, A.; ZORZET, S.; GAVA, B.; SORC, A.; ALESSIO, E.; LENGO, E. and SAVA, G. Effects of NAMI-A and some related ruthenium complexes on cell viability after short exposure of tumor cells, Anti Cancer Drugs. v. 11, p.667–672, 2000.

BONASSA, E.M.A. **Enfermagem em Quimioterapia**. São Paulo: Atheneu, 1996, 279p.

BRABEC, V. and NOVÁKOVÁ, O. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity, Drug Resist. **Updat**. V.9, p.111–122, 2006.

BUGARCIC, T.; NOVAKOVA, O.; HALAMIKOVA, A.; ZERZANKOVA, L.; VRANA, O.; KASPARKOVA, J.; HABTEMARIAM, A.; PARSONS, S.; SADLER, P.J. and BRABEC, V. Cytotoxicity, Cellular Uptake, and DNA Interactions of New Monodentate Ruthenium(II) Complexes Containing Terphenyl Arenes ***J. Med. Chem***. v. 51, n. 17, p. 5310-5319, 2008.

BURIN, R.V.; CANALLE, R.; LOPES, J.L.; VICHNEWSSKI, W. and TAKAHASHI, C.S. Assessment of the cytotoxic and clastogenic activities of the sesquiterpene lactone lynchnopholide in mammalian cells in vitro and in vivo. **Cancer Detec. Prev**., v.25(1), p.93-101, 2001.

CASTILLO-BLUM, S.E. & BARBA-BEHRENS, N. Coodination chemistry of some biologically active ligands. ***Coord. Chem. Rev***., v.3, p.*196*, 2000.

CHABNER, B.A., ALLEGRA, C.J., CURT, G.A. and CALABRESI, P. **Antineoplastic agents**. In: Hardman, J.G., Limbird, L.E. (Eds.), 1996.

CHANDLEY, A.C. The origin of chromosomal aberrations in man and their potential for survival and reproduction in the adult human population. **Annals of Genetic**. V.24, p. 5-11, 1981.

CLARKE, M.J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coord Chem Rev**. v. 236, p.209– 233, 2003.

CUNHA, C.S. & LEHMANN, M. **Drogas Anticâncer e seus Efeitos Genotóxicos**. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B. e HENRIQUES, J.A.P. (Org.). Genética toxicológica. Porto Alegre: ALCANCE, 2003, p. 343- 364.

DIAS, H. P. **Direitos e obrigações em saúde** . Brasília, **ANVISA**, 2002. 387 p.

DJINOVIC, V. M.; TODOROVIC, T; ZIZAK, Z.; SABO, T.J. and JURANIC, Z.D. 'Ru(III) complexes derived from N-methyl derivatives of glycine and 1,3-propylenediamine-N,N'-diacetato ligands and their activities against HeLa, K562 cell lines and human PBMC',Journal of Coordination Chemistry. v.62:2. p.328 — 336. 2009.

DOUGAN, S.J.; HABTEMARIAM, A. and MCHALE, S.E. Parsons S, Sadler PJ Catalytic organometallic anticancer complexes. **Proc. Natl. Acad. Sci**. U S A. v.105, p.11628–11633, 2008.

FARRELL, N. Biomedical uses and applications of Inorganic Chemistry. An overview. ***Coord. Chem. Rev***., v. 232, p. 1-4, 2002.

FLINT, O.P. Predicting *in vivo* toxicity. **Toxicology *in vitro***, v.12, p.591-595, 1998.

FONTES, A.P.S.; CÉSAR, E.T. & BERALDO, H. A Química Inorgânica na Terapia do Câncer. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. n. 6, p. 13-18, 2005.
FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) – www.wikipédia.org. Acessado em outubro de 2009.

GONTIJO, A. M; ELIAS, F. N; SALVADORI, D.M. et al. Single-cell gel (comet) assay detects primary DNA damage in nonneoplastic urothelial cells of smokers and ex-smokers. **Cancer Epidemiol. Biomarkers**. V.10. p.987-993. 2001.

GREEN, M.G., ZEVON, M. A., LOWRIE, N. SEIGELSTEIN and HALL, B. Congenital anomalies in children of patients who received chemoterapy for cancer in childhood and adolescence. **N. Eng. J. Med**., v.325(3), p.141-146, 1991.

GRIFFITHS, A.J.F.; LILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. and GELBART, W.M. **Genética Moderna**. First Edition: Editora Guanabara Koogan. 2001, p. 420-440.

HALL, M.D. and HAMBLEY, T.W. Platinum(IV) antitumor compounds. Their ioinorganic Chemistry. ***Coord. Chem. Rev***., v. 232, n. 1, p. 49-67, 2002.

HARTINGER, C.G.; ZORBAS-SEIFRIED, S.; JAKUPEC, M.A.; KYNAST, B.; ZORBAS, H. and KEPPLER, B.K. From bench to bedside—preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachloro bis(1Hindazole) ruthenate(III)] (KP1019 or FFC144). **J Inorg Biochem.** v.100, p.891–904, 2006.

HURLEY, L.H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. v. 2, p.188, 2002.

INCA-2008. http://www.inca.gov.br/cancer/estimativa2008/versãofinal. Acessado em setembro de 2009.

JAKUPEC, M.A.; ARION, V.B.; KAPITZA, S.; REISNER, E.; EICHINGER, A.; PONGRATZ, M.; MARIAN, B.; VON KEYSERLINGK, N.G. and KEPPLER, B.K. KP1019 (FFC14A) from bench to bedside: preclinical and early clinical development: an overview. **Int. J. Clin. Pharm. Ther**. v.43, p.595–596, 2005.

JEMAL, A; TIWARI, R.C. and MURRAY, T. **Cancer statistics**. Cancer J. Clin, v.54, 2004, p.8-29.

KOSTOVA, I. Ruthenium complexes as anticancer agents. **Curr Med Chem**. v.13(9), p.1085-107, 2006.

MADLE, S. & OBE. Methods for analysis of the mutagenicity of indirect mutagens/carcinogens in eukaryotic cells. **Human Genetics**. V.56, p.7-20, 1980.

MANJULA, S.N.; MALLESHAPPA NOOLVI ,N.; VIPAN PARIHAR, K.; MANOHARA REDDY, S.A; VIJAY RAMANI; ANDANAPPA K. GADAD; GURDIAL SINGH; GOPALAN KUTTY, N. and MALLIKARJUNA RAO, C. Synthesis and antitumor activity of optically active thiourea and their 2-aminobenzothiazole derivatives: A novel class of anticancer agents, **Med. Chem**. V.44, p. 2923–2929, 2009.

MCKEAGE, M.J.; MAHARAJ, L. and BERNERS-PRICE, S.J. Mechanism of cytotoxicity and antitumor activity of gold(I) phosphine complexes: the possible role of mitocondria. ***Coord. Chem. Rev.*** v. 232, n. 1, p. 127- 135, 2002.

MENEZES, C.S.R.; COSTA, L.C.G.P.; ÁVILA, V. de M.R.; FERREIRA, M.J.; VIEIRA, C.U.; PAVANIN, L.A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; HAMAGUCHI, A. and SILVEIRA-LACERDA, E.P. Analysis in vivo of antitumor activity, cytotoxicity and

interaction between plasmid DNA and the *cis*-dichlorotetraammineruthenium(III) chloride. **Chemico-Biol**. **Int.** v.167, p. 116–124, 2007.

MIGLIORE, L.; GUIDOTTI, P.; FAVRE, C.; SESSA, M.R. and BRUNORI, E. Micronuclei in lymphocytes of young patients under antileukemic therapy. **Mutation Res.**, v. 263, p.243-248, 1991-a.

MINDEN,M.D. Oncogenes. In: The Basic Sciense of Oncology. Ed. Tannock. I.F and Hill, R. P**. Pergamon Press**, New York, pp.72-88, 1987.
MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, J.; BATIPPS, D.M. and HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparation of leukocytes culture from human peripheral blood. **Exp. Cell Res**. v.20, p.613-616, 1960.

NATARAJAN, A.T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutat. Res**., v. 504, p. 3-16, 2002.

P.L. OLIVE, DNA damage and repair in individual cells: aplications of the comet assay in radiobiology. Int. J. Radiat. Biol. 75 (4) (1999) 395–405.

PAVANIN, L.A.; GIESBRECHT, E. and TFOUNI, E. Synthesis and properties of the ruthenium(I1) complexes *cis*-Ru(NH3)Isn)L2+. Spectra and reduction potentials. **Inorganic Chemistry**. v. 24 25, p. 4444–4446, 1985.

PARMIGIANI, R.B. & CAMARGO, A.A. O Genoma Humano e o Câncer. In: FERREIRA, C.G. e ROCHA, J.C. (Ed.). **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004, p. 3-27.

PEREIRA, F.C.; VILANOVA-COSTA, C.A.S.T.; LIMA, A.P.; RIBEIRO, A.S.B.B.; SILVA, H.D. da; PAVANIN, L.A. and SILVEIRA-LACERDA, E.P. Cytotoxic and genotoxic effects of *cis*-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate on the root meristem cells of Allium cepa, **Biol. Trace Elem. Res.** (2008)., doi:10.1007/s12011-008-8272-y.

PHILLIPS, R.A. The genetic basis of cancer. In: The Basic Sciense of Oncology. Ed, Tannock, I. F and Hill, R. P. **Pergamon Press**, New York, pp.24-51, 1987.

RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.A.; A. & MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. **Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética,** Ribeirão Preto, p.246, 1991.

RADEMAKER-LAKHAI, J.M.; VAN DEN BONGARD, D.; PLUIM, D.; BEIJNEN, J.H. and SCHELLENS J.H.M., A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent, **Clin. Cancer Res.** v.10, p. 3717–3727, 2004.

RIBEIRO, A.S.B.B.; SILVA, C.C.; PEREIRA, F.C.; LIMA, A.P; VILANOVA-COSTA, C.A.S.T.; AGUIAR, S.S.; PAVANIN, L.A.; CRUZ, A.D. and SILVEIRA-LACERDA, E.P. Mutagenic and Genotoxic Effects of *cis*-(Dichloro) tetraammineruthenium(III)

Chloride on Human Peripheral Blood Lymphocytes. **Biol. Trace Elem. Res.** (2009) doi:10.1007/s12011-009-8334-9.

RIBEIRO, L.R. & MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D.M.F. e MARQUES, E.K. (Ed.). Mutagênese Ambiental. Canoas: ULBRA, 2003, p. 21-27.

SALMON, S.E. & BERTINO, J. R. **Fundamentos da Terapia do Câncer**. In: BENNETT, J. C.; PLUM, F. (org). Tratado de Medicina Interna. 20ª Ed. vol. 1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 1145-1147.

SALPONIK, R. Intensive care therapy for câncer patients.**J. Pediatr. (Rio de J.)**. Porto Alegre. Disponível em: www.scielo.br. Acessado em setembro/2009.

SÁNCHEZ-SUÁREZ, P.; OSTROSKY-WEGMAN, P.; GALLEGOS-HERNÁNDEZ, F.; PEÑARROJA-FLORES, R.; TOLEDO-GARCIA, J.; BRAVO, J.L.; CASTILLO, E.R.D. and BENÍTEZ-BRIBIESCA, L. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer, **Mutat. Res**. V.640, p. 8-15, 2008.

SANKARANARAYANAN, K. Genetic effects of ionising radiation in multicellular eukaryocytes and the assessment of genetic radiation hazards in man. Chapter IV. Chromosome Aberrations. **Elsevier Biomedical Press,** Amsterdam. p.151-257, 1982.

SAVA, G; PACOR, S; MESSTRONI, G. and ALESSIO, E. Na[trans-RuCl4(DMSO)Im], a metal complex of ruthenium with antimetastatic propierties. **Clin Exp Metastasis**, v.10, n.4, p.273-80, 1992.

SAVA, G.; CAPOZZI, I.; CLERICI, V.; GAGLIARDI, G.; ALESSIO, E. and MESTRONI, G. Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex. **Clin. Exp. Metast**. V.16, p.371–379, 1998.

SAVA, G.; ALESSIO, E.; BERGAMO, A. and MESTRONI G. Sulfoxide ruthenium complexes: non-toxic tools for the selective treatment of solidtumour metastases, in: M.J. Clarke and P.J. Sadler (Eds.), **Topics in biological inorganic chemistry**, v. 1, Springer, Berlin, pp. 143–169, 1999.

SAVA, G. and COCCHIETTO, M. Blood levels of ruthenium following repeated treatments with the antimetastatic compound NAMI-A in healthy beagle dogs, In Vivo. v.14, p.741–744, 2000.

SHAFFER, L.G.; SLOVAK M.L. and CAMPBELL, L.J. ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomeclature, Karger, 2009, pp.85-87.

SILVEIRA LACERDA, E.P. Avaliação da Atividade Antitumoral do *cis*-$[RuCl_2(NH_3)_4]Cl$ sobre linhagens tumorais humanas e de camundongos. 2003. 67 f. **Tese de Doutorado** – Universidade Federal Uberlândia, Uberlândia.

SILVEIRA-LACERDA, E.P.; VILANOVA-COSTA, C.A.S.T.; HAMAGUCHI, A.; PAVANIN, L. A.; GOULART, L.R.; HOMSI-BRANDENBURG, M. I.; SANTOS, W.B.; SOARES, A.M. and 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.** (2009) DOI 10.1007/s12011-009-8498-3 b.

SILVEIRA-LACERDA, E.P.; VILANOVA-COSTA, C.A.S.T.; PEREIRA, F.C.; HAMAGUCHI, A.; PAVANIN, L.A.; GOULART, L.R.; HOMSI-BRANDENBURG, M.I.; SOARES, A.M.; SANTOS, W.B. and NOMIZO, A. The Ruthenium Complex *cis*-(Dichloro) Tetraammineruthenium(III) Chloride Presents Immune Stimulatory Activity on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, **Biol.Trace Elem. Res.** (2009) doi: 10.1007/s12011-009-8440-8 a.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T; TICE, R.R. and SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, **Exp. Cell Res**. v.175, p. 184–191, 1988.

TAKAHASHI, C. S. **Teste citogenético *in vitro*.** In: RIBEIRO, L.G., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K. Mutagênese Ambiental. Editora da ULBRA. v.1, 356p, 2003.

TAWAN, E.J. and WHITEHOUSE, C.A. **In vivo mutagen-induced chromosome damage in human lymphocytes**, in: D.E. Rooney (Ed.), Human Cytogenetics: malignancy and acquired abnormalities, third ed., Oxford University Press, New York, 2001, pp. 205-216.

WOZNIAK, K. ; CZECHOWSKA, A. & BLASIAK, J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. **Chem. Biol. Inter**. v. 147, n. 3, p. 309-318, 2004.

ANEXOS

Anexo 1

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UFG

PROTOCOLO
043/2007

Goiânia, 02 de outubro de 2007

PARECER CONSUBSTANCIADO

I. IDENTIFICAÇÃO:

Título do projeto: Avaliação do potencial genotóxico dos novos compostos de rutênio utilizando testes cito genéticos in vitro
Pesquisador Responsável: Alessandra de Santana Braga B. Ribeiro- ICB
Pesquisador Participante: Elisângela de Paula Silveira Lacerda- ICB

Local de realização: ICB 1
Área Temática: II

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou,** o projeto de acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões).

Profa Dra Rita Goreti Amaral
Coordenadora do COEP/UFG

Anexo 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

"Avaliação da Atividade Citotóxica, Clastogênica e Genotóxica do Complexo ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio(III) em Linfócitos do Sangue Periférico Humano".

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pessoas para Contato: Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda – (62) 9293-3121
Manuela da Rocha Matos Rezende – (62) 9113-7397

Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Profª Drª Elisângela de Paula Silveira Lacerda, no telefone: (62) 3521-1481. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás pelo telefone: (62) 3269-8338.

Propósito do Estudo: Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. O projeto de pesquisa tem o nome de "Avaliação da atividade citotóxica e genotóxica do composto Ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio(III) em Linfócitos do Sangue Periférico Humano", cuja finalidade é determinar a existência ou não de aberrações cromossômicas, ou seja, alguma alteração na estrutura do cromossomo (verificar se existe uma alteração nas células de seu sangue), estudada por nosso grupo, devido ao uso dos novos compostos de rutênio no tratamento do câncer.

Procedimentos: Você responderá um questionário informando alguns dados pessoais como nome completo, endereço, idade, sexo, se fuma ou bebe, se trabalha em algum laboratório ou afins, se está tomando algum tipo de medicamento nas últimas 48h. Para a realização dessa pesquisa será necessário, ainda, colher uma pequena quantidade do seu sangue (5 mL) retirados por punção venosa na prega do cotovelo direita ou esquerda (assim como é feito para a realização de qualquer exame de sangue que você conhece). As amostras colhidas serão encaminhadas ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética/ICB da Universidade Federal de Goiás, para realização dos da pesquisa.

Riscos ou Desconfortos: Estes procedimentos não lhe acarretarão nenhum risco, prejuízo ou lesões, pois trabalhamos com materiais de coleta de sangue descartáveis e profissionais qualificados. Durante a coleta de sangue, você receberá a picada de uma agulha como aquela que é feita para qualquer paciente que deseja fazer um exame de sangue. Geralmente, esse procedimento não trás complicações para as pessoas, além do desconforto que ocorre no momento em que se pega a veia.

Benefícios: Sua participação nesse estudo será de grande contribuição para a realização da pesquisa, sabendo estaremos participando da descoberta de um novo remédio contra o câncer.

Custos: Você não pagará nada para participar desse estudo e também não receberá pagamentos pela sua participação.

Confidencialidade: Todas as informações prestadas durante a entrevista serão de caráter confidencial e as informações colhidas serão utilizadas somente para fins científicos nesta pesquisa, sem qualquer identificação pessoal.

Participação voluntário-retirada do estudo: A participação nessa pesquisa é de livre e espontânea vontade do paciente. Você está sendo convidado. Caso aceite, e, não desejando mais continuar, poderá, a qualquer momento, sair do estudo, não importa se já respondeu o questionário e colheu sangue para a pesquisa.

Esclarecimento quanto ao uso de material biológico: declaro o compromisso de utilizar tal material biológico (sangue humano) exclusivamente para o projeto de pesquisa proposto e apresentar informação quanto ao armazenamento de material biológico para futuros estudos.

Se possível você será chamado para dar sua autorização para o(s) novo(s) projeto(s). Caso isso seja impossível, seu material biológico somente será utilizado mediante aprovação do novo(s) projeto(s) pelo CEP e ou pela CONEP.

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento que está em duas vias. Uma delas é a sua e a outra do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis acima citados. Se utilizar material biológico, declarar o compromisso do pesquisador de utilizar tal material o(s) novo(s) projeto(s).

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO

Eu, _____, RG _____ CPF n.º _____ abaixo assinado, declaro ter lido o termo que me foi apresentado sobre o projeto de pesquisa "Avaliação da Atividade Citotóxica, Clastogênica e Genotóxica do Complexo ditionato de *cis*-tetraamino(oxalato)rutênio(III) em Linfócitos do Sangue Periférico Humano". Com as explicações que me foram dadas, entendi as informações contidas nesse documento, cuja cópia fica em meu poder, e declaro que estou de acordo em participar do estudo que me foi apresentado, respondendo as perguntas do questionário que me forem apresentadas e permitindo a retirada de sangue conforme explicado.

Goiânia, _____ de _____ de 200__.

_____

Pesquisado

_____

Pesquisador (a) Responsável

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:_____Assinatura:_____

Nome:_____Assinatura:_____

OBS: Esse termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário e outra aos pesquisadores.

Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda.
Manuela da Rocha Matos Rezende

Manuela da Rocha Matos Rezende
Bióloga – Mestranda em Biologia – Universidade Federal de Goiás
Laboratório de Genética Molecular e Citogenética Clínica-Fone-35211481
ICB I – Sala 200. Campus Samambaia II, s/n, Setor Itatiaia. Goiânia - Goiás