



UNIVERSITÄT  
HEIDELBERG  
ZUKUNFT  
SEIT 1386



**Serviço Público Federal**  
**Universidade Federal de Goiás**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE PROTÓTIPOS À BASE DE RUTÊNIO PARA O  
TRATAMENTO DO CÂNCER UTILIZANDO METODOLOGIAS ALTERNATIVAS AO  
USO DE MAMÍFEROS**

**Thallita Monteiro Teixeira**

**Goiânia, 2020.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

[ ] Dissertação [ X ] Tese

#### 2. Nome completo do autor

Thallita Monteiro Teixeira

#### 3. Título do trabalho

Avaliação toxicológica de protótipos à base de rutênio para o tratamento do câncer utilizando metodologias alternativas ao uso de mamíferos

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [ X ] SIM [ ] NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Elisângela De Paula Silveira Lacerda, Professor do Magistério Superior**, em 01/02/2021, às 09:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **THALLITA MONTEIRO TEIXEIRA, Discente**, em 01/02/2021, às 10:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do

[https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_imprimir\\_web&acao\\_origem=arvore\\_visualizar&id\\_documento=1984586&infra\\_sistema=1...](https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=1984586&infra_sistema=1...) 1/2

01/02/2021

SEI/UFG - 1837065 - Termo de Ciência e de Autorização (TECA)



[Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1837065** e o código CRC **76451166**.

Referência: Processo nº 23070.041947/2020-02

SEI nº 1837065

**THALLITA MONTEIRO TEIXEIRA**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE PROTÓTIPOS À BASE DE RUTÊNIO PARA O  
TRATAMENTO DO CÂNCER UTILIZANDO METODOLOGIAS ALTERNATIVAS AO  
USO DE MAMÍFEROS**

**Tese de Doutorado apresentada à  
Coordenação do Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas  
da Universidade Federal de Goiás como  
requisito básico para obtenção do título  
de doutor.**

**Área de concentração: Oncologia  
Experimental e Farmacogenética.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisângela de  
Paula Silveira Lacerda**

**Goiânia**

**2020**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Monteiro Teixeira, Thallita

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE PROTÓTIPOS À BASE DE RUTÊNIO PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER UTILIZANDO METODOLOGIAS ALTERNATIVAS AO USO DE MAMÍFEROS [manuscrito] / Thallita Monteiro Teixeira, Elisângela de Paula Silveira Lacerda, Thomas Braunbeck. - 2020.

CXV, 115 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira-Lacerda.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Câncer. 2. Complexos de Rutênio. 3. Quimioterapia. 4. Segurança toxicológica. I. Silveira-Lacerda, Elisângela de Paula. II. Braunbeck, Thomas. III. Silveira-Lacerda, Elisângela de Paula, orient. IV. Título.

CDU 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

**ATA DE DEFESA DE TESE**

Ata nº 32 da sessão de Defesa de Tese de Thallita Monteiro Teixeira, estudante de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aos vinte e nove dias do mês de setembro de dois mil e vinte, a partir das 14:00 horas, no Google Meet, realizou-se a sessão pública de defesa de tese de doutorado intitulada "Avaliação toxicológica de protótipos à base de rutênio para o tratamento do câncer utilizando metodologias alternativas ao uso de mamíferos". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Elisângela de Paula Silveira Lacerda ICB/UFG - cuja participação ocorreu por meio de videoconferência, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Leonardo Pereira Franchi - ICB/UFG - cuja participação ocorreu por meio de videoconferência, Professora Doutora Mônica Rodrigues Ferreira Machado - ICB/UFG - cuja participação ocorreu por meio de videoconferência, Professor Doutor Cesar Koppe Grisolia - UnB, e Professora Doutora Vivianne de Souza Veloso Sá - ICB/UFG. Após a arguição da candidata, a Banca Examinadora se reuniu em sessão secreta, a fim de concluir o julgamento da tese em andamento, tendo sido a candidata aprovada em sua defesa de tese. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Elisângela de Paula Silveira Lacerda ICB/UFG - cuja participação ocorreu por meio de videoconferência, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e nove dias do mês de setembro de dois mil e vinte.

**TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA**



Documento assinado eletronicamente por **Elisângela De Paula Silveira Lacerda, Professora do Magistério Superior**, em 30/09/2020, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Pereira Franchi, Professor do Magistério Superior**, em 01/10/2020, às 10:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **VIVIANNE DE SOUZA VELOZO SÁ, Usuário Externo**, em 01/10/2020, às 17:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Monica Rodrigues Ferreira Machado, Professor do Magistério Superior**, em 05/10/2020, às 10:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cesar Koppe Grisolia, Usuário Externo**, em 19/10/2020, às 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

[https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento\\_imprimir\\_web&acao\\_origem=arvore\\_visualizar&id\\_documento=1706517&infra\\_sistema=1...](https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=1706517&infra_sistema=1...) 1/2

01/02/2021

SEI/UFG - 1580242 - Ata de Defesa de Tese



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1580242** e o código CRC **018FB28C**.

Referência: Processo nº 23070.041947/2020-02

SEI nº 1580242

V

*“Dedico este trabalho à minha família que muito contribuiu para minha formação e sem o apoio de todos nada disso seria possível”.*

*“An Professor Prof °. Dr °. Thomas Braunbeck; der mich in seinem Forschungslabor in Deutschland willkommen geheißen hat, wo ich neue Methoden gelernt habe; Vielen Dank für das Vertrauen, für die Lehren und dafür, dass Sie immer dafür gesorgt haben, dass meine Daten bestmöglich erhalten wurden”.*

Goiânia

2020

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Francilene e meu pai, pelas ricas contribuições de conhecimento, experiência, companheirismo e amadurecimento. Sem vocês seria impossível;

Aos meus irmãos Priscila e Egberto pelo afeto e cumplicidade. E à minha linda sobrinha Laura;

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Elisângela de Paula Silveira Lacerda, pela confiança, dedicação e por sempre me apoiar e acreditar no meu potencial durante todos esses 10 anos de pesquisa no laboratório;

Ao professor Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Thomas Braunbeck; que me acolheu em seu laboratório de pesquisa na Alemanha, onde aprendi novas metodologias; obrigada pela confiança, pelos ensinamentos e por sempre garantir que meus dados fossem obtidos da melhor forma possível;

Ao Professor Dr<sup>o</sup>. César Koppe Grisólia e sua equipe pela grande oportunidade de realizar os experimentos iniciais em Brasília;

A Universidade Federal de Goiás pela oportunidade de ter estudado desde a graduação até o doutorado;

À Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg pela oportunidade de ser aluna por um ano letivo, onde aprendi diferentes metodologias e adquiri um conhecimento imenso o qual carregarei por toda minha vida;

A todos os amigos que fiz na Alemanha: Stefan, Élise, Liviu, Jonas, Jose, Adam, Ilja, Frieda, Yutao, Bahar, Adnan, Nils;

Ao meu namorado Tom Bettens por sempre me incentivar e auxiliar na confecção de figuras apresentadas neste trabalho;

Aos meus amigos do grupo Aquatox: Lisa Baumann, Nadine, Susana, Lucas, Chris, Rebeca, Katherina, Lisa H, Florian, Carola, Patrick, Eliana, Anki, Nuncia;

Aos meus amigos de laboratório; Rebeca, Elisângela, Gabrielly, Adriano, Eduardo, Paula, Bruno, Davi, Isabela, Thais, em especial minha amiga Jordana pela amizade sincera durante todos esses anos de Laboratório;

À FAPEG, pela bolsa de doutorado no Brasil e à CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche PDSE na Alemanha.

*“Die Naturwissenschaft braucht der Mensch zum Erkennen, die Religion zum Handeln, weil wir mit unseren Willensentscheidungen nicht warten können, bis die Erkenntnisse vollständig, und bis wir allwissend geworden sind”. (A ciência precisa que os seres humanos reconheçam que a religião precisa agir, pois não podemos esperar apenas com nossas decisões que o conhecimento esteja completo e que nos tornemos também oniscientes). (Max Planck).*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Objetivos da política dos 3R's aplicada a testes em animais .....	19
<b>Tabela 2</b> - Complexos de rutênio avaliados. ....	31
<b>Tabela 3</b> - Intervalo de concentrações utilizados nos experimentos independentes. ....	41
<b>Tabela 4</b> - Efeitos Letais, Sub letais e teratogênicos.....	42
<b>Tabela 5</b> - Concentrações inibitórias (IC50), em $\mu\text{M}$ , e Índice de seletividade (IS) dos complexos de rutênio RuLap e RuLau frente a diferentes linhagens celulares. ....	48
<b>Tabela 6</b> - Concentrações inibitórias (IC50), em $\mu\text{M}$ , e Índice de seletividade (IS) dos complexos de rutênio RuLap e RuLau frente às linhagens celulares V79 e HeLa. ....	49
<b>Tabela 7</b> - Avaliação da atividade genotóxica dos compostos RuLap e RuLau em linhagem celular não tumoral de Vero.....	51
<b>Tabela 8</b> - Média dos valores de EC e LC em mg/L após realização do FET. ....	62

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. ....	2
<b>Figura 2-</b> Estrutura da Cisplatina. ....	4
<b>Figura 3 -</b> Estrutura dos complexos de platina análogos da cisplatina.. ....	5
<b>Figura 4 -</b> Hipótese do mecanismo de ativação por redução de complexos de rutênio (III) frente células tumorais.....	8
<b>Figura 5 -</b> Estrutura química de complexos de rutênio em fase pré-clínica de estudo.....	9
<b>Figura 6 -</b> Estrutura química de complexos de rutênio em triagem de fase clínica II. *NAMI-A atualmente descontinuado. ....	10
<b>Figura 7 -</b> Vantagens e desvantagens das espécies utilizadas nos ensaios pré-clínicos .	14
<b>Figura 8 -</b> Esquema da formação dos micronúcleos em células.....	15
<b>Figura 9 -</b> Representação de um cometa: Cabeça e cauda.....	18
<b>Figura 10 -</b> Embrião de Zebrafish 24 horas pós fertilização (hpf).. ....	20
<b>Figura 11 -</b> Peixe zebra/ zebrafish. ....	22
<b>Figura 12 -</b> Formação dos somitos no embrião de zebrafish. ....	23
<b>Figura 13 -</b> Larva de zebrafish. ....	23
<b>Figura 14 -</b> Estrutura da retina. ....	25
<b>Figura 15 -</b> Estrutura da retina de Zebrafish. ....	25
<b>Figura 16 -</b> Estruturas dos complexos de rutênio coordenados a naftoquinonas RuLap e RuLau. ....	30
<b>Figura 17 -</b> Micronúcleo detectado em célula binucleada de linfócito humano. ....	35
<b>Figura 18 -</b> Representação dos componentes de um cometa.....	36
<b>Figura 19 -</b> Aquários contendo peixes zebra laboratório “Aquatische Ökologie und Toxikologie” (Aquatox) localizado no “Center for Organismal Studies” (COS) da Ruprecht-Karls- Universität Heidelberg, na cidade de Heidelberg na Alemanha. ....	38

<b>Figura 20</b> - Esquema 1 (menor aquário para aproximadamente 5 casais) e Esquema 2 (para aproximadamente 15 casais) de “Sex on the beach” para obtenção de ovos fecundados. ....	39
<b>Figura 21</b> - Esquemática do Fish Embryos Test (FET). ....	40
<b>Figura 22</b> - Parâmetros utilizados para avaliação da toxicidade de retina. ....	42
<b>Figura 23</b> - Representação esquemática do teste de toxicidade de retina.....	44
<b>Figura 24</b> - Disposição ventral das larvas de zebrafish em agarose para análise confocal.. .....	44
<b>Figura 25</b> - Reação da tiocolina e do íon ditiobisnitrobenzoato.....	45
<b>Figura 26</b> - Esquemática da placa de proteína do ensaio AchE.....	46
<b>Figura 27</b> - Avaliação da antigenotoxicidade dos compostos de RuLau e RuLap pelo ensaio do cometa em células VERO, pré-tratadas, usando o parâmetro de % de DNA na cauda. .....	54
<b>Figura 28</b> - Distribuição percentual dos efeitos subletais (A) e letais (B) do composto RuLap após 96hpf de tratamento frente a embriões de Zebra Fish. ....	56
<b>Figura 29</b> - Distribuição percentual dos efeitos subletais do composto RuLau após 96hpf em embriões de Zebra Fish. ....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> 57
<b>Figura 30</b> - Porcentagem de efeitos subletais do composto de RuLau em embriões de zebrafish nos tempos de exposição de 24h a 96h. ....	58
<b>Figura 31</b> - Porcentagem de efeitos subletais do composto de RuLap em embriões de zebrafish nos tempos de exposição de 24h a 96h....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b> 59
<b>Figura 32</b> - Porcentagem de efeitos letais do composto de RuLap em embriões de zebrafish nos tempos de exposição de 24h a 96h. ....	61
<b>Figura 33</b> - Embriões de zebrafish que eclodiram após 72hpf. ....	62
<b>Figura 34</b> - Embrião de zebrafish em processo de decomposição antes mesmo da completa eclosão. ....	63
<b>Figura 35</b> - Efeitos retino morfológicos de embriões de zebrafish expostos a diferentes concentrações dos complexos de rutênio RuLau, corados com cumarina 6. As fotos foram tiradas a 72 hpf com um microscópio laser confocal.. ....	64

Figura 36 - A: Avaliação da área da CPI em embriões de zebrafish expostos a 72hpf e 96hpf. B: Avaliação da espessura da CPI em embriões de zebrafish expostos a 72hpf e 96hpf ao complexo de rutênio RuLau. ....	65
<b>Figura 37 - Atividade da enzima acetilcolinesterase em porcentagem..</b> .....	67

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\Delta E$  : Densidade óptica

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3Rs: Reduction, Refinement e Replacement (Redução, Refinamento e Substituição)

A549: Carcinoma de pulmão humano

Ach: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterase

Aquatox: Aquatische Ökologie und Toxikologie (Ecologia e Toxicologia Aquática)

B16F10: Melanoma murino

BSA: Reagente de Bradford

BtChE: Butirilcolinesterase

CaCl<sub>2</sub>: Cloreto de cálcio

CNI: Camada Nuclear Interna

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COS: Center for Organismal Studies (Centro de Estudos Organizacionais)

CPI: Camada Plexiforme Interna

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Meio Eagle modificado por Dulbecco)

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DO: Densidade Óptica

DTNB: 5: 5-ditiobis-2- (nitrobenzoato) (I)

DU-145: Carcinoma de próstata

EC<sub>10</sub>: Concentração do composto para qual 10% do efeito é observado

EPC: Eritrócito Policromático

EPCMN: Eritrócito Policromático Micronucleado

EPR: Epitélio Pigmentado Da Retina

EtOH: Etanol

FET: Fish Embryos Test (Teste de Embriões de Peixes)

FFC14A: [trans-RuCl<sub>4</sub>(1H-indazol)<sub>2</sub>]

GCL: Camada De Células Ganglionares

Graphpad prism versão 5.0: Software usado na análise do MTT

Hela: Adenocarcinoma cervical humano

HCL: Ácido clorídrico

Hpf: Horas após a fertilização

IC<sub>25</sub>: Concentração em µM que inibe 25%

IC<sub>50</sub>: Concentração em µM que inibe 50%

IC<sub>75</sub>: Concentração em µM que inibe 75%

IC<sub>80</sub>: Concentração em µM que inibe 80%

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

INCA: Instituto Nacional de Câncer

IS: Índice de Seletividade

K562: Leucemia mielóide crônica humana

KCL: Cloreto de potássio

KP1339: {Na[trans-RuCl<sub>4</sub>In<sub>2</sub>]}

L929: Fibroblasto murino

LC/LC<sub>50</sub>: Dose letal mediana

LGMC: Laboratório de Genética Molecular e Citogenética

µM: Micromolar

m: mol

MCF-7: Adenocarcinoma de mama humano

MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de magnésio

MN: Micronúcleo

MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium

NaOH: Hidróxido de sódio

NaHCO<sub>3</sub>: Bicarbonato de sódio

NAMI-A: trans-RuCl<sub>4</sub>(1H-imidazol)

NO: Nervo Óptico

OECD: Organization for Economic Cooperation and Development (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

OMS: Organização Mundial da Saúde

ONL: Camada Nuclear Externa

OPL: Camada Plexiforme Externa

PBS: Tampão Fosfato-Salino

PTU: Feniltiouréia

p/v: Peso/Volume

RAPTA-C: ( $\eta^6$ -p-MeC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Pri)Ru(pta)Cl

RAPTA-T: Ru(II)Cl<sub>2</sub>( $\eta^6$ -toluene)(PTA)

RENAMA: Rede Nacional de Métodos Alternativos

RM175: [( $\eta^6$ -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)Ru(en)Cl]+PF<sub>6</sub>

RPMI 1640: Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640

RuLap: [Ru(lap)(dppb)(fen)]PF<sub>6</sub>

RuLau: [Ru(lau)(dppb)(fen)]PF<sub>6</sub>

SDS: Dodecil Sulfato De Sódio

Sigmaplot: Software usado na análise do FET

SigmaStat: Software usado na análise do Micronúcleo

ToxRat®: Software usado para análise do vermelho neutro

UFG: Universidade Federal de Goiás

v/v: Volume/Volume

V79: Fibroblasto de pulmão de hamster

VERO: Célula não-tumoral de rim de macaco verde africano

ZFIN: The Zebrafish Information Network (Rede de Informações ZebraFish)

## RESUMO

Em decorrência do aumento no número de casos de câncer no mundo, os complexos de rutênio têm se mostrado como promissores agentes quimioterápicos, já que apresentam baixa toxicidade e são mais seletivos para os tecidos tumorais. Os complexos de rutênio RuLap e RuLAu foram testados frente a diversas linhagens celulares tumorais e não tumorais para se avaliar a citotoxicidade *in vitro* através do teste de viabilidade celular (MTT) e do teste vermelho neutro. Dentre os complexos testados, os complexos RuLap e RuLau apresentaram maior índice de seletividade de 1,17 e 10,91, respectivamente para a linhagem tumoral HeLa. Desta forma, estes compostos foram selecionados para estudos mais aprofundados da segurança toxicológica. Na avaliação do teste do micronúcleo *in vitro*, o composto RuLau foi o que apresentou menor potencial genotóxico, o qual apresentou genotoxicidade significativa apenas na concentração de 2 mg.L (0,8µM). No ensaio cometa *in vitro*, ambos os compostos RuLap e RuLau apresentaram potencial genotóxico em todas as concentrações testadas, não apresentando diferença entre os tempos de exposição de 24h e 48h. Nos testes de toxicidade aguda em embriões de *zebrafish*, o composto RuLau apresentou efeitos subletais menos acentuados quando comparados ao composto RuLap. O composto RuLau não provocou a morte dos embriões em nenhuma das concentrações testadas. O composto RuLap foi o único composto que se mostrou mais tóxico, levando a um atraso na eclosão dos embriões e causando letalidade nos animais, antes mesmo de eclodirem. No teste de avaliação do potencial neurotóxico por meio do teste de retina em embriões de *zebrafish*, não houve diminuição significativa da área da Camada Plexiforme Interna (CPI) quando testadas nas concentrações mais baixas ( $\frac{1}{2}EC_{10}$  e  $EC_{10}$ ), apresentando alterações apenas na concentração mais alta ( $2x EC_{10}$ ). Na avaliação da espessura da retina, houve um aumento significativo nessa espessura quando testada na concentração mais baixa do composto (0,25µM). Já no teste de inibição da acetilcolinesterase, nenhum dos dois compostos testados induziram a inibição da enzima, podendo estar relacionado com a não indução de efeitos neurotóxicos. Diante dos dados observados, o complexo de rutênio RuLau apresenta maior segurança toxicológica entre os demais por apresentar maior seletividade para linhagens tumorais e menor potencial tóxico quando avaliado frente à embriões de *zebrafish*.

**Palavras-chave:** câncer, complexos de rutênio, quimioterapia, segurança toxicológica.

## ABSTRACT

Due to the increase in the number of cancer cases in the world, ruthenium complexes have shown to be promising chemotherapeutic agents, since they present low toxicity and are more selective for tumor tissues. The RuLap and RuLau ruthenium complexes were tested against several tumor and non-tumor cell lines to evaluate in vitro cytotoxicity through the MTT test and also neutral red. The RuLau complex showed a selectivity index of 1,17 to 10.91 for the HeLa tumor line. In the evaluation of the in vitro micronucleus test, the RuLau compound was the one with the lowest genotoxic potential, which showed significant genotoxicity only at a concentration of 2 mg / L. In the comet in vitro assay, both RuLap and RuLau compounds showed genotoxic potential, with no difference between the 24h and 48h exposure times. In acute toxicity tests on zebrafish embryos, the RuLau compound showed less pronounced sublethal effects compared to the RuLap compound. The RuLau compound did not cause the embryos to die even at the highest concentrations. The RuLap compound was the only compound that was actually more toxic, leading to a delay in the hatching of the embryos and also causing their lethality, even before they hatch. In the neurotoxic potential assessment test using the retinal test in zebrafish embryos, there was no significant decrease in the area of the inner plexiform layer (CPI) at the lowest concentrations ( $\frac{1}{2}$  EC10 and EC10), showing changes only at the highest concentration (2x EC10), and when retinal thickness was assessed, there was a significant increase in retinal thickness at the lowest concentration. In the acetylcholinesterase inhibition test, none of the tested compounds induced the enzyme inhibition, not even the RuLau compound, which may be related to the non-induction of neurotoxic effects. The RuLau ruthenium complex then presents greater selectivity for tumor strains and less toxic potential when evaluated against zebrafish embryos.

**Keywords:** cancer, chemotherapy, ruthenium complexes, toxicological safety.

## ABSTRAKT

Aufgrund der weltweit zunehmenden Zahl von Krebsfällen haben sich Rutheniumkomplexe als vielversprechende Chemotherapeutika erwiesen, da sie eine geringe Toxizität aufweisen und selektiver für Tumorgewebe sind. Die RuLap- und RuLau-Rutheniumkomplexe wurden gegen mehrere Tumor- und Nicht-Tumorzelllinien getestet, um die In-vitro-Zytotoxizität durch den MTT-Test und auch Neutralrot zu bewerten. Der RuLau-Komplex zeigte einen Selektivitätsindex von 1,17 bis 10,91 für die HeLa-Tumorlinie. Bei der Auswertung des In-vitro-Mincronukleus-Tests war die RuLau-Verbindung diejenige mit dem niedrigsten genotoxischen Potential, die nur bei einer Konzentration von 2 mg / l eine signifikante Genotoxizität zeigte. Im Kometen-In-vitro-Assay zeigten sowohl RuLap- als auch RuLau-Verbindungen eine genotoxische Wirkung Potenzial, ohne Unterschied zwischen den Belichtungszeiten von 24 Stunden und 48 Stunden. In akuten Toxizitätstests an Zebrafischembryonen zeigte die RuLau-Verbindung im Vergleich zur RuLap-Verbindung weniger ausgeprägte subletale Wirkungen. Die RuLau-Verbindung ließ die Embryonen selbst bei den höchsten Konzentrationen nicht sterben. Die RuLap-Verbindung war die einzige Verbindung, die tatsächlich toxischer war, was zu einer Verzögerung des Schlupfes der Embryonen führte und auch deren Letalität verursachte, noch bevor sie schlüpften. Im neurotoxischen Potentialbewertungstest unter Verwendung des Netzhauttests bei Zebrafischembryonen gab es bei den niedrigsten Konzentrationen ( $\frac{1}{2}$  EC10 und EC10) keine signifikante Abnahme im Bereich der inneren plexiformen Schicht (CPI), was nur bei der höchsten Konzentration Veränderungen zeigte (2x EC10), und als die Netzhautdicke bewertet wurde, gab es eine signifikante Zunahme der Netzhautdicke bei der niedrigsten Konzentration. Im Acetylcholinesterase-Hemmungstest induzierte keine der getesteten Verbindungen die Enzymhemmung, nicht einmal die RuLau-Verbindung, die möglicherweise mit der Nichtinduktion neurotoxischer Wirkungen zusammenhängt. Der RuLau-Rutheniumkomplex zeigt dann eine größere Selektivität für Tumorstämme und ein geringeres toxisches Potential, wenn er gegen Zebrafischembryonen bewertet wird.

**Schlüsselwörter:** Chemotherapie, Krebs, Rutheniumkomplexe, toxikologische Sicherheit.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XVI</b>
<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>XVII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 O CÂNCER .....	1
1.2 TERAPIAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DO CÂNCER .....	2
1.3 METALOFÁRMACOS NA QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA .....	3
1.4 TOXICIDADE DOS COMPLEXOS DE PLATINA NA TERAPIA ANTINEOPLÁSICA .....	6
1.5 NOVOS COMPOSTOS BASEADOS EM RUTÊNIO E SEU USO NA QUIMIOTERAPIA .....	6
1.6 SEGURANÇA TOXICOLÓGICA DE NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS.....	12
1.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO ATRAVÉS DO TESTE DO MICRONÚCLEO .....	14
1.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA.....	16
1.9 BEM ESTAR ANIMAL NOS ENSAIOS <i>IN VIVO</i> E A POLÍTICA DOS 3R'S .....	18
1.10 A BUSCA PELA SUBSTITUIÇÃO DE METODOLOGIAS CONVENCIONAIS POR METODOLOGIAS ALTERNATIVAS AO USO DE ANIMAIS .....	19
1.11 O <i>ZEBRAFISH (DANIO RERIO)</i> COMO ORGANISMO MODELO PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA .....	21
1.12 EMBRIÕES DE <i>ZEBRAFISH (DANIO RERIO)</i> COMO ORGANISMO MODELO PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROTÓXICO ATRAVÉS DO TESTE DE RETINA .....	24
1.13 EMBRIÕES DE <i>ZEBRAFISH (DANIO RERIO)</i> COMO ORGANISMO MODELO PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROTÓXICO ATRAVÉS DO TESTE DE ACETILCOLINA .....	26
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29

<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 SÍNTESE E PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS BASEADOS EM RUTÊNIO .....	30
4.2 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> .....	31
4.2.1 Linhagens celulares e manutenção do cultivo celular .....	31
4.2.2 Teste de viabilidade celular pelo método de redução do MTT .....	32
4.2.3 Teste de viabilidade celular pelo ensaio do vermelho neutro .....	33
4.2.4 Avaliação do potencial genotóxico para análise do dano cromossômico: teste do micronúcleo .....	34
4.2.5 Avaliação do potencial genotóxico para análise do dano na molécula de DNA: ensaio cometa .....	35
4.3 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> .....	37
4.3.1 Embriões de peixes zebra .....	37
4.3.2 Avaliação do potencial de toxicidade aguda em embriões de <i>zebrafish</i> .....	39
4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE RETINA EM EMBRIÕES DE <i>ZEBRAFISH</i> .....	42
4.4.1 Avaliação do potencial neurotóxico em embriões de <i>zebrafish</i> : teste da acetilcolinesterase .....	44
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	46
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
5.1 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA CITOTOXICIDADE E ÍNDICE DE SELETIVIDADE.....	48
5.2 TESTE DO MICRONÚCLEO PARA AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO POTENCIAL GENOTÓXICO .....	51
5.3 ENSAIO COMETA PARA AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E GENOTÓXICO .....	54
5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES DE <i>ZEBRAFISH</i> .....	55
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>69</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>70</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>71</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O Câncer

A definição de câncer consiste no grupo de doenças de etiologia multifatorial, cuja origem provém de uma predisposição genética e/ou a exposição à fatores carcinogênicos como: fatores físicos, químicos ou biológicos, estando diretamente relacionados aos hábitos de vida diários, como falta de atividade física, tabagismo, consumo excessivo de álcool, exposição a radiações ionizantes e a agentes infecciosos, alimentação inadequada, dentre outros (JEMAL et al., 2014). O câncer também se caracteriza pela perda de controle da proliferação celular e ganho da capacidade de invadir tecidos e/ou provocar metástases (PINTO & FELZENSZWALB, 2003; PARMIGIANI & CAMARGO, 2004; NUSSBAUM et al., 2008).

O câncer representa a segunda maior causa de mortes no mundo, de acordo com levantamento divulgado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que mais de 8 milhões de pessoas morrem de câncer, por ano - a maioria em países de baixa e média rendas. A estimativa mundial para o ano de 2018, mostra que ocorreram 18.078.975 milhões de casos de câncer (17 milhões sem contar os casos de câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de óbitos (9,5 milhões excluindo os cânceres de pele não melanoma). O câncer de pulmão é o mais incidente no mundo (2,1 milhões/ ano) seguido pelo câncer de mama (2,1 milhões/ ano), cólon e reto (1,8 milhão/ano) e próstata (1,3 milhão/ ano) (IARC, 2020).

No Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (INCA, 2020). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (176.930 casos), seguido pelos cânceres de mama e próstata (65.840 casos), cólon e reto (40.990 casos), pulmão (30.200 casos) e estômago (21.230 casos) (INCA, 2020). Apesar desses dados, o Ministério da Saúde publicou em outubro de 2019, uma nota onde mostra que o Brasil está situado na segunda faixa mais baixa de mortalidade em relação a outros países como por exemplo EUA, Canadá, Austrália, França e Reino Unido

(MS, 2019). A Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020, são mostrados na tabela abaixo, distribuídos por sexo (Figura 1).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Tráqueia, brônquio e pulmão	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Estômago	7.870	3,5%
Esôfago	8.690	3,9%			Ovário	6.650	3,0%
Bexiga	7.590	3,4%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Laringe	6.470	2,9%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%
Leucemias	5.920	2,6%					

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

**Figura 1-** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: Estimativa 2020-Incidência de câncer no Brasil. <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>

## 1.2 Terapias utilizadas no tratamento do câncer

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, quimioterapia, imunoterapia, hormonioterapia, radioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade, levando em consideração de que a escolha do tratamento mais adequado depende do tipo de tumor e de seu estágio de desenvolvimento (INCA, 2019).

A remoção localizada do tumor, ou seja, excisão cirúrgica é uma modalidade terapêutica que surgiu há muitos anos, porém que depende de inúmeros fatores, como por exemplo: tipo de câncer, localização do tumor, histórico clínico do paciente, dentre outros. As cirurgias são mais indicadas para tumores primários. Já os tumores caracterizados por lesões metastáticas não podem ser retirados facilmente, e por isso recomenda-se tratamento com uso de outras terapias (WYLD et al., 2015).

A utilização da radiação ionizante para eliminar células tumorais através do dano no material genético (DNA) destas, consiste na terapia denominada radioterapia. Essa terapia inibe a divisão celular e proliferação. Apesar da técnica não distinguir células normais de células tumorais, as células cancerígenas têm uma maior dificuldade no reparo de danos causados pela radiação (BASKAR et al., 2012). Como os tumores possuem antígenos que podem desencadear respostas imunes, a imunoterapia age no sentido de promover a intensificação da resposta do sistema imune no combate à doença (INCA, 2017).

A quimioterapia consiste na utilização de substâncias químicas com o objetivo de tratar tumores. O *Boom* da quimioterapia se deu com a descoberta da capacidade do gás mostarda em eliminar células que se proliferam de forma acelerada (GILMAN, 1963; CHABNER e ROBERTS JR, 2005; SUDHAKAR, 2009). Atualmente, a quimioterapia é um dos métodos mais utilizados no tratamento de pacientes com câncer e consiste no uso de agentes citotóxicos, provocando morte celular, diminuindo assim o crescimento acelerado e evitando a proliferação desordenada das células cancerígenas (CHABNER, 2011). É importante ressaltar que a descoberta da quimioterapia aumentou consideravelmente as chances de curas de diversos tipos de tumores (CHU & SARTORELLI, 2006).

Sabe-se que as transformações sociais, envelhecimento da sociedade, mudança nos hábitos de vida e até mesmo a urbanização, são fatores que fizeram com que a doença ganhasse mais visibilidade e, portanto, mostrando-se mais frequente (PICKSTONE, 2007; CANTOR, 2004; TEIXEIRA e FONSECA, 2007). Entretanto, apesar de ser um problema a nível mundial, o câncer não representa mais uma sentença de morte para quem é diagnosticado com a doença, graças ao avanço das tecnologias de diagnóstico precoce e principalmente ao avanço da qualidade dos medicamentos que garantem um tratamento mais eficaz (OMS, 2019). Ainda assim, a quimioterapia não está completamente isenta de provocar ao paciente, alterações metabólicas, neurológicas, cardíacas, renais, hematológicas, dentre outras. Desse modo, observa-se a grande importância em melhorar cada vez mais a qualidade dos medicamentos usados na quimioterapia, por exemplo (FERREIRA et al., 2018). Buscar o refinamento das técnicas de desenvolvimento de novos fármacos, bem como controlar os efeitos tóxicos que estes oferecem ao paciente, são hoje, partes fundamentais na pesquisa de desenvolvimento de novos quimioterápicos (SCHEIN et al., 2006).

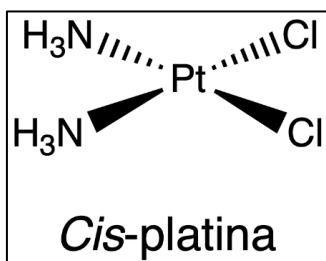
### **1.3 Metalofármacos na quimioterapia antineoplásica**

Com o surgimento da quimioterapia, diversos fármacos baseados em metais foram desenvolvidos ao longo do tempo. Com a incessante busca por novos tratamentos quimioterápicos, o mecanismo de ação de complexos metálicos foram muitos estudados graças as suas vantagens apresentadas como menor tamanho das moléculas e por serem altamente citotóxicos quando testados em tecidos tumorais (CLARKE et al., 1999). Grande parte dos medicamentos quimioterápicos disponíveis no mercado são baseados em

substâncias metálicas, e por isso, química medicinal investe cada vez mais no desenvolvimento destes tipos de complexos. Esse interesse nessa categoria de fármacos, baseia-se no amplo espectro e geometria de coordenação, cinética e mecanismo de ação que muitas vezes os complexos orgânicos não podem oferecer.

Complexos metálicos como os baseados em ferro, cobalto, ouro, titânio e gálio já mostraram resultados satisfatórios em pesquisas pré-clínicas quando testados (OTT e GUST, 2007). Apesar dos inúmeros tipos de complexos metálicos que foram investigados como agentes antitumorais, a classe de agentes mais estudada consiste em metais do grupo principal como bismuto e estanho (CHAUDHARY et al., 2006) e também dos metais de transição como por exemplo vanádio, ródio, cério e rutênio (KATSAROS e ANAGNOSTOPOLOU, 2002; MANOLOV et al., 2000).

O interesse em fármacos antitumorais baseados em metais sofreu um avanço, quando em 1844 o químico italiano Michele Peyrone sintetizou a cisplatina (KAUFFMAN, 2010) e sua atividade citotóxica foi logo depois identificada por Rosenberg e Van-Camp em 1969, quando este complexo inorgânico começou a ser utilizado no tratamento do câncer (ROSENBERG & CAMP, 1969) (Figura 1).

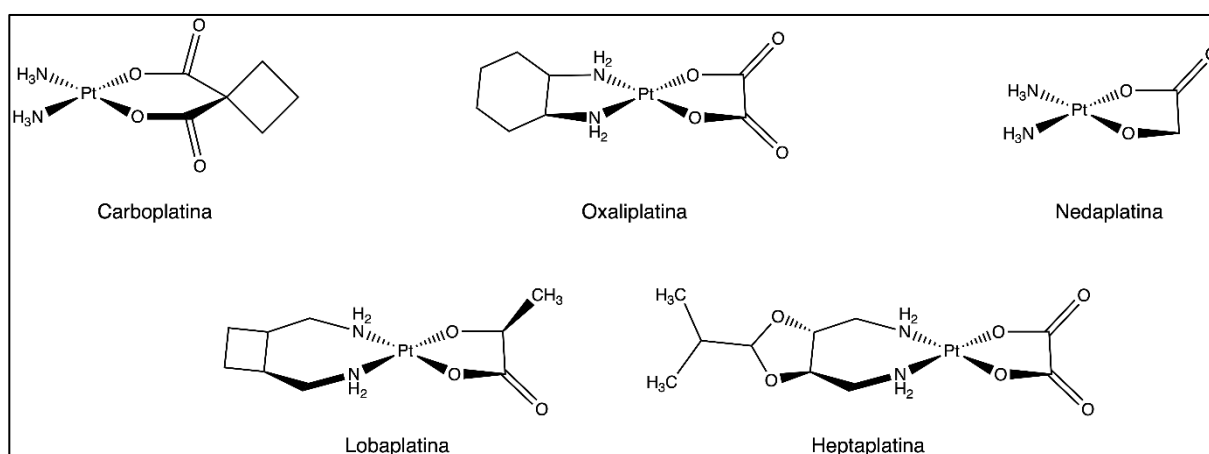


**Figura 2-** Estrutura da Cisplatina. Fonte: Elaborado por Tom Bettens, 2019. Com base nos dados de Peyrone, 1844.

O mecanismo de ação da cisplatina consiste em formar ductos com cadeias do DNA para impedir sua replicação (TRUDU et al., 2015). Tendo em vista os problemas deste medicamento, cujo mecanismo de ação provoca toxicidade tanto nas células normais quanto nas células cancerígenas, ele continuou sendo um dos agentes anticâncer mais amplamente utilizados e eficazes para o tratamento do câncer. Diferentes tipos de câncer incluindo mama, fígado, pulmão, ovário, testículo, bexiga, cabeça e pescoço são tratados com este agente antineoplásico (WHEATE et al., 2010 e ALI et al., 2013). Porém, a

distribuição não-seletiva da cisplatina entre o tecido normal e tumoral e sua ação inespecífica sobre o ciclo celular, leva a um aumento no impacto dos efeitos colaterais, como por exemplo nefrotoxicidade aguda, mielossupressão e neurotoxicidade crônica e ototoxicidade (DILRUBA & KALAYDA, 2016; KATANIĆ et al., 2017). Ainda assim, provocando fortes efeitos colaterais e muitas vezes provocando resistência tumoral, a cisplatina ainda é um dos medicamentos mais utilizados no tratamento de vários tipos de câncer (PIZARRO & SADLER, 2009 e WONG & GIANDOMENICO, 1999).

É importante ressaltar que de fato, o uso da cisplatina impulsionou o desenvolvimento de novos fármacos baseados em metais, e por isso, os complexos inorgânicos têm alavancado a pesquisa e aplicação desses fármacos no uso da medicina quimioterápica (REISNER et al., 2004). Após descoberta da cisplatina, devido seus problemas de toxicidade provocados nos pacientes, no final do século XX, alguns análogos da cisplatina foram sintetizados na tentativa de se obter um complexo mais específico e que desencadeasse efeitos colaterais mínimos. Esses compostos; carboplatina, oxaliplatina, nedaplatina, lobaplatina e heptaplatina são amplamente utilizados no mundo todo na terapia anticâncer (KELLAND, 2007 & TRUDU et al., 2015) (Figura 3).



**Figura 3** - Estrutura dos complexos de platina análogos da cisplatina. Fonte: Elaborado por Tom Bettens, 2019. Com base nos dados de Hartinger et.al., 2008.

A carboplatina que foi o primeiro análogo a ser utilizado, não se mostrou tão ativa quanto a cisplatina, apesar de ser uma molécula mais estável. Mesmo assim a carboplatina foi utilizada nos tratamentos de câncer mais avançados e metastatizados, porém com uma grande desvantagem: a incapacidade de contornar problemas de resistência. Portanto logo após, tem-se o surgimento da oxaliplatina, como fármaco alternativo capaz de eliminar os

problemas de resistência. Entretanto, apesar de ter se mostrado menos tóxico que a cisplatina e carboplatina, a oxaliplatina foi responsável por desencadear neuropatias sensoriais severas (TRUDU et al., 2015; PEREIRA, 2016).

#### **1.4 Toxicidade dos complexos de platina na terapia antineoplásica**

Apesar de ter inovado a quimioterapia, o uso da cisplatina e seus análogos acabou se tornando bastante limitado, tanto pelas resistências geradas nas células tumorais, quanto por seus graves efeitos tóxicos como: nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, toxicidade ocular e hepática (CHEN et al., 2017; NAUGHTON, 2008; dos SANTOS et al., 2012). Sabe-se que nefrotoxicidade da cisplatina é atribuída às altas concentrações de cisplatina nos rins e à interferência desta no sistema de transporte renal. Mesmo acumulada em níveis não tóxicos no sangue, esta pode chegar a níveis tóxicos nos rins (PERES & JUNIOR, 2013).

Frente a estas diferentes limitações da cisplatina e seus análogos, diversos grupos de pesquisa têm voltado sua atenção para investigação de novos compostos baseados em diferentes outros tipos de metais como por exemplo ferro, cobre, paládio, ouro, tungstênio, ósmio e rutênio (VALENTE & GARCIA, 2014) na tentativa de se obter uma atividade mais específica e toxicidade sistêmica menor (MELLO, 2014), visando um melhor bem estar dos pacientes que fazem uso de quimioterápicos.

#### **1.5 Novos compostos baseados em rutênio e seu uso na quimioterapia**

Neste contexto, é importante ressaltar que os complexos de rutênio vêm então conquistando interesse de diversos pesquisadores, uma vez que os resultados de triagens recentes de complexos baseados em rutênio vem se mostrando um tanto quanto promissores, como por exemplo triagens pré-clínicas realizadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética (LGMC) em Goiânia, Goiás, Brasil. O atual grupo de pesquisa LGMC têm estudado nos últimos anos as principais características de complexos baseados em rutênio.

Trabalhos que buscam esclarecer questões como: o tipo de mecanismo de morte celular induzida por complexos de rutênio frente a diferentes linhagens tumorais, estudo do potencial citotóxico, genotóxico desses complexos, bem como o estudo do perfil

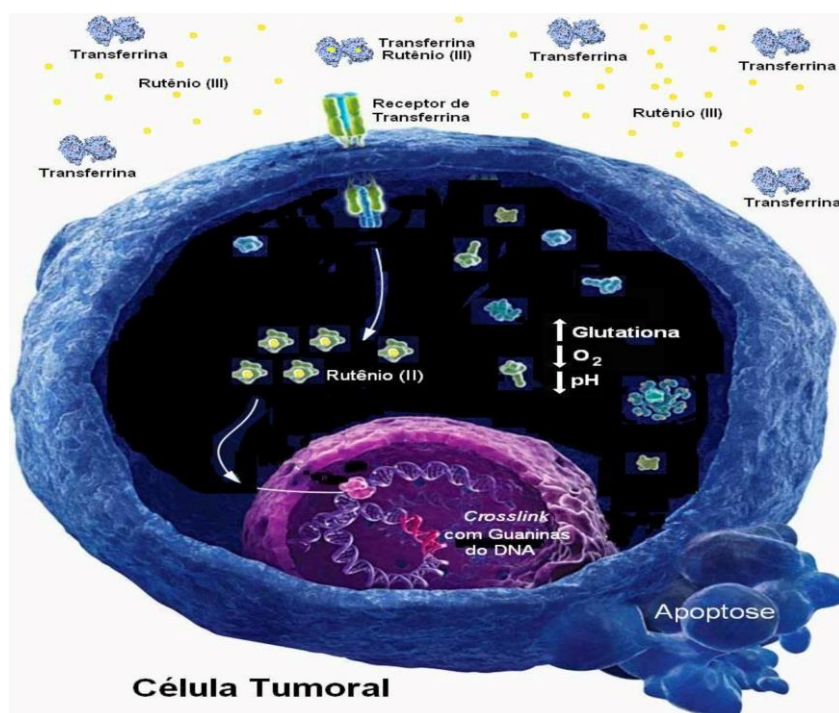
toxicológico dos complexos de rutênio em experimentos *in vitro* e *in vivo*, trouxe ao grupo, alguns protótipos que se mostraram mais seletivos e portanto mais promissores (FARIA et al., 2020; VELOZO-SÁ et al., 2019; LIMA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2017; LIMA et al., 2014; PORTO et al., 2014; VILANOVA-COSTA et al., 2015; PEREIRA et al., 2014; MAGALHAES et al., 2017; MELO-ANDRADE et al., 2018; PIRES et al., 2018). Como estes estudos realizados, o grupo de pesquisadores do LGMC acredita que estes complexos que se mostraram mais promissores seriam então os mais fortes candidatos para um estudo mais aprofundado quanto à segurança farmacológica e toxicológica destes futuros fármacos baseados em rutênio.

Sabe-se que o rutênio atualmente é um dos metais de transição mais estudados e investigados quanto ao seu potencial terapêutico. O elemento químico rutênio hoje protagoniza diversos estudos científicos quanto a sua atividade antibiótica, antiviral, antimalárica e principalmente quanto à sua atividade antitumoral (MEDICI et al., 2015). Com uma geometria octaédrica, os complexos de rutênio apresentam uma cinética de oxidação semelhante à dos complexos de platina, sendo mais lentas e se assemelhando mais com processos celulares, sendo então mais indicados para aplicações biológicas. A facilidade e versatilidade de troca de ligantes nesses complexos representam também um fato determinante para a ação antineoplásica destes fármacos, já que estes consistem num grupo de complexos metálicos que exibem eficientes afinidades de ligação ao DNA, bem como alcançam seu alvo biológico de uma forma mais seletiva e se acumulam mais frequentemente nas células cancerígenas do que se comparado à complexos de platina (FURRERA & SÜSS-FINK, 2016). Os complexos baseados em rutênio têm demonstrado efeito inibitório da enzima topoisomerase e também indução de espécies reativas de oxigênio (MARKOWSKA et al., 2015; ZENG et al., 2016).

Complexos que apresentam o elemento rutênio como centro da molécula apresentam baixa toxicidade quando testado tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Isso pode ser explicado pelo fato de que este metal estabelece ligações com várias biomoléculas, como por exemplo a albumina sérica e a transferrina. E isso acontece devido à grande similaridade do rutênio com o ferro, e sabendo-se que as células tumorais apresentam uma maior necessidade de ferro, estas expressam, em sua superfície de membrana, um maior número de receptores de transferrina, o que leva ao acúmulo do rutênio em massas tumorais (ANTONARAKIS & EMADI, 2010). Sendo assim, uma vez circulante no organismo, ele se liga ao receptor de transferrina, onde é levado para os tecidos e liga se

então à superfície das células tumorais através desses receptores (SAVA & BERGAMO, 2000; BULLOCK et al., 2014).

O ambiente intracelular destas células tumorais apresenta baixa concentração de oxigênio (situação de hipóxia), sendo responsável pela redução do rutênio III a rutênio II, se tornando citotóxico e promovendo a apoptose celular e até mesmo indução da autofagia (ALLARDYCE & DYSON, 2001 e BLAZEVIC et al., 2017). O fato das células tumorais apresentarem um consumo elevado de ferro, oxigênio, outros nutrientes e também a formação de novos vasos sanguíneos, faz com que as células cancerígenas dependam da glicose como forma de energia, provocando então um excesso de ácido láctico, diminuindo o pH intracelular (BUSTAMANTE et al., 2009) (Figura 4).

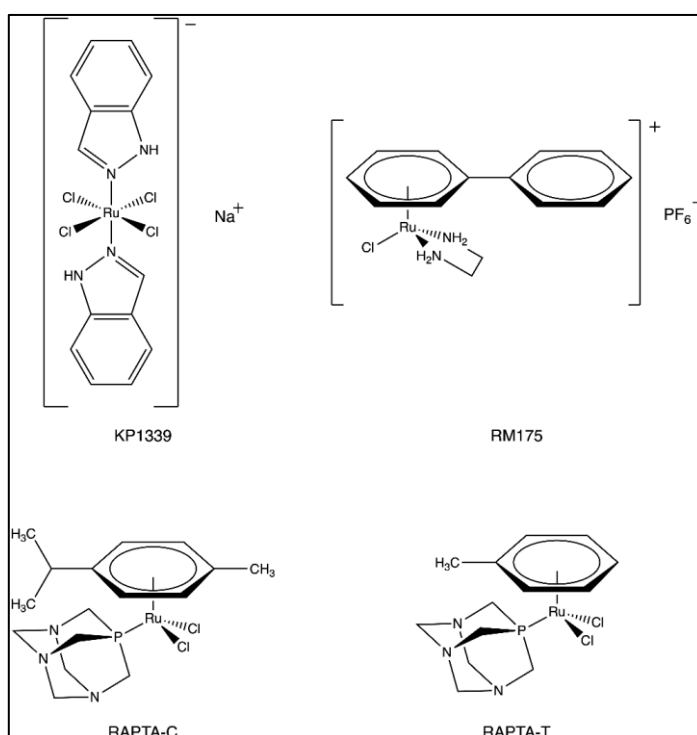


**Figura 4** - Hipótese do mecanismo de ativação por redução de complexos de rutênio (III) frente células tumorais. Fonte: Elaborado por Vilanova-Costa, 2011. Com base na figura de Allardyce e Dyson, 2001.

Juntamente com uma das principais características do rutênio que consiste na mimetização do ferro, as condições intracelulares contribuem então para que os complexos de rutênio se acumulem nos tecidos alvos. Por isso, resultados encontrados na literatura vão ao encontro das evidências que salientam que compostos baseados em rutênio, atuam de forma seletiva, voltando seus alvos para células tumorais (BERGAMO & SAVA, 2015).

Portanto, os complexos de rutênio têm surgido como alternativa a diversos tipos de cânceres não responsivos e/ou resistentes à platina devido às suas propriedades bioquímicas distintas e versáteis (HARTINGER et al., 2013; ZENG et al., 2016).

Atualmente existem alguns complexos de rutênio em fase de triagem pré-clínica. Os que tem mais se destacado são: o RAPTA-T ([Ru(II)Cl<sub>2</sub>(η<sup>6</sup>-toluene)(PTA)], RAPTA-C [(η<sup>6</sup>-p-MeC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Pri)Ru(pta)Cl], RM175 ([[(η<sup>6</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)Ru(en)Cl]+PF<sub>6</sub><sup>-</sup> e o KP1339 {Na[trans-RuCl<sub>4</sub>In<sub>2</sub>]} (Figura 5).

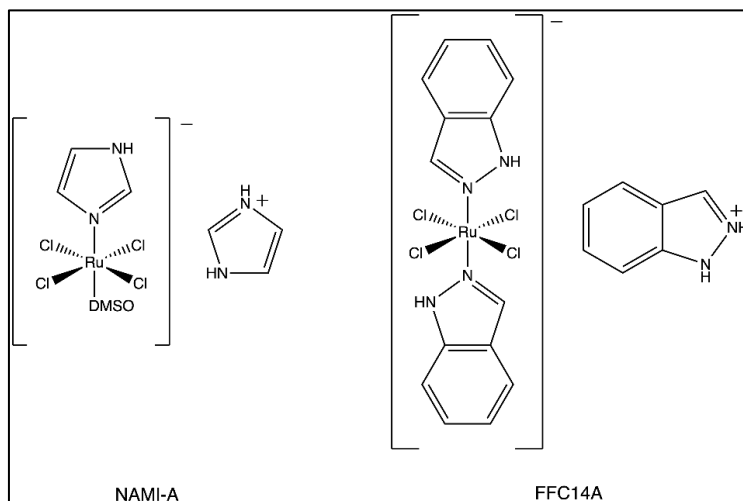


**Figura 5** - Estrutura química de complexos de rutênio em fase pré-clínica de estudo. Fonte: Elaborado por Tom Bettens, 2019. Com base nos dados de Bergamo et.al., 2012.

O complexo RAPTA-T tem a capacidade de alterar o citoesqueleto das células tumorais, mudando o comportamento dessas quanto à migração e metástase. Porém, apesar de atuar mais seletivamente em células cancerígenas, sua atividade citotóxica ainda é considerada baixa (BERGAMO et al., 2012). O complexo RAPTA-C apresenta uma alta seletividade e eficiência em metástases. É um complexo muito solúvel, porém está limitado pelas altas doses requeridas para um tratamento efetivo (BLUNDEN & STENZEL, 2013). Enquanto isso, o complexo RM175 apesar de ter forte tendência a se ligar ao DNA e de inibir o crescimento das células tumorais e acelerar o processo de apoptose, ainda

apresenta problemas para contornar as resistências (SREEKANTH et al., 2018; BERGAMO et al., 2009). Já o complexo KP1339, que entrou para substituir seu homólogo KP1019 (que apresentou problemas de baixa solubilidade), tem grande eficiência contra tumores sólidos (TRONDL et al., 2014) e atua de forma sinérgica com o medicamento Sorafenibe (que inibe a tirosina quinase) que é muito utilizado no tratamento do câncer de fígado e de cólon (HEFFETER et al., 2013).

Já na triagem clínica de fase II, dois outros complexos de rutênio, o complexo NAMI-A [trans-RuCl<sub>4</sub>(1H-imidazol)] e o complexo FFC14A [trans-RuCl<sub>4</sub>(1H-indazol)<sub>2</sub>] (Figura 6), que apesar de bastante difundidos atualmente, apresentam ainda alguns obstáculos. O complexo FFC14A por exemplo, apesar de contornar problemas de resistência, não se mostrou tão citotóxico frente a linhagens celulares tumorais e apresentou baixa solubilidade (TRONDL et al., 2014). Já o NAMI-A, apesar de prevenir e tratar metástases, apresenta o mesmo problema da baixa citotoxicidade (MORRIS et al., 2001). Apesar do composto NAMI-A ter demonstrado desde início excelente atividade seletiva contra metástases pulmonares de vários tumores sólidos e apresentar baixa toxicidade quando testado *in vitro* e *in vivo*, esse complexo foi descontinuado da triagem clínica fase 2, devido a várias controvérsias (ALESSO et al., 2017) acerca do seu perfil tóxico e falta de resultados preliminares convincentes de eficácia (LEIJEN et al., 2014).



**Figura 6** - Estrutura química de complexos de rutênio em triagem de fase clínica II. \*NAMI-A atualmente descontinuado. Fonte: Elaborado por Tom Bettens, 2019. Com base nos dados de Kamatchi et al., 2013.

No estudo de Lima et al. (2014), o complexo de rutênio coordenado com aminoácido testado,  $[\text{Ru}(\text{Gly})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ , mostrou-se um potente inibidor da viabilidade celular de células tumorais de Sarcoma 180, bem como mostrou indução do tipo de morte celular por apoptose. No estudo de Pires et al. (2014), os complexos de rutênio coordenados a ligantes de bipyridina  $[\text{Ru}(\text{pys})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{bipy})(\text{dppp})]\text{PF}_6$  indicaram exposição da fosfatidilserina, indicando o tipo de morte celular por apoptose bem como induziu danos ao DNA de células de sarcoma 180 tratadas. Complexos de rutênio (II) ligados à aminoácidos:  $[\text{Ru}(\text{L-Met})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ ;  $[\text{Ru}(\text{L-Trp})(\text{bipy})(\text{dppb})]\text{PF}_6$ , mostraram-se mais potentes que a cisplatina, além de não apresentarem efeitos genotóxicos e ausência de perfil tóxico quando testados frente à células de tumor ascítico de Ehrlich e em embriões de *zebrafish* respectivamente (MELLO-ANDRADE et al., 2014).

Alguns de nossos compostos utilizados neste estudo já foram previamente avaliados *in vitro*, quanto ao seu mecanismo de ação, bem como quanto ao tipo de morte celular desencadeado. Os complexos de rutênio *cis*- $[\text{RuLau}_2(\text{PPH}_3)_2(\text{phen})]$  (CwPhen) e *cis*- $[\text{RuLau}_2(\text{PPH}_3)_2(\text{bipy})]$  CwBipy, ambos coordenados à lausona por exemplo, mostraram em um estudo anterior, atividade antitumoral relacionada a outros alvos biológicos como por exemplo às topoisomerasas e cinases (OLIVEIRA et al., 2017). Apesar da sua fraca interação com DNA, se comparado a outros complexos de rutênio com os ligantes bipyridina e trifenilfosfina (KOCK et al., 2019), estes complexos apresentam atividade antitumoral relacionada a outros alvos biológicos como por exemplo às topoisomerasas e cinases (OLIVEIRA et al., 2017), responsáveis por promover quebras na cadeia dupla de DNA, e afetando então a replicação celular (CALDERON-MONTANO et al., 2014).

Os complexos baseados em rutênio e coordenados à lausona *trans*- $[\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2(\text{N-N})]$ , *trans*- $[\text{Ru}(\text{law})(\text{PPh}_3)_2(\text{N-N})]\text{PF}_6$ , *trans*- $[\text{Ru}(\text{law})(\text{PPh}_3)_2(\text{bipy})]\text{PF}_6$ , *trans*- $[\text{Ru}(\text{law})(\text{PPh}_3)_2(\text{mebipy})]\text{PF}_6$ , *trans*- $[\text{Ru}(\text{law})(\text{PPh}_3)_2(\text{phen})]\text{PF}_6$ , *trans*- $[\text{Ru}(\text{PPh}_3)_2(\text{law})(\text{phen})]\text{PF}_6$  foram muito ativos contra as células tumorais (principalmente frente à linhagem celular de carcinoma de pulmão humano - A549) e menos tóxicos para linhagens não tumorais. Essa seletividade provavelmente se deve a presença do ligante 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (fenfen) nos complexos coordenados a rutênio e lausona (OLIVEIRA et al., 2017).

Esses complexos mostraram em seus resultados de citotoxicidade, supressão do crescimento e proliferação celular. Quanto ao ensaio de migração celular, os complexos de

rutênio se mostraram como potentes inibidores da linhagem celular testada A549. Quanto à análise do ciclo celular, sugere-se que os efeitos antiproliferativos dos compostos frente às células A549 ocorram por apoptose, uma vez que o número de células na fase S diminuiu, bem como houve parada do ciclo na fase sub G1, que é um indicativo de apoptose e dano celular (PIRES, 2014). Quanto ao tipo de mecanismo de morte celular, os resultados sugerem que os complexos induzem morte celular por apoptose, uma vez que as células quando em estágio inicial de apoptose apresentavam-se positivas para Anexina-V e negativas para Iodeto de propídeo (OLIVEIRA et al., 2017).

### **1.6 Segurança toxicológica de novos candidatos a fármacos**

Na busca pela síntese de novos complexos de rutênio com atividade antitumoral, observa-se que a grande maioria dos complexos sintetizados se mostraram na maioria das vezes bastante ativos contra células tumorais, em contrapartida, estes ainda não podem prosseguir para triagem clínica, devido às suas propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas e portanto devem ser submetidos a ensaios preliminares com objetivo de se garantir sua segurança toxicológica (BECCENERI et al., 2018; ZENG et al., 2017).

Tendo em vista que atualmente, diversos grupos de pesquisa vem trabalhando com complexos baseados em rutênio, tem-se disponível na literatura uma infinidade de publicações nas quais esses complexos se mostram bastante promissores, de forma que atuam inibindo de maneira específica, o crescimento celular tumoral de diferentes linhagens celulares, induzindo apoptose dessas células, bem como provocando danos ao DNA (dos SANTOS et al., 2018; MELLO-ANDRADE et al., 2018; PORTO et al., 2015; VELOZO-SÁ et al., 2019).

Apesar de em um estudo de potencial genotóxico de alguns complexos de rutênio ligados à fosfinas e biperidina não apresentarem genotoxicidade significativa frente a células não tumorais de V79, apresentarem genotoxicidade em uma concentração de 1,25mM em células de HepG2 (CARNIZELLO et al., 2018). Outros estudos mostram que estes complexos não estão livres de toxicidade, e podem, portanto, causar danos renais bem como hepáticos (MENEZES et al., 2007; WANG et al., 2017). Apesar disso, análises histopatológicas do fígado e rins, mostram que os complexos de rutênio não apresentaram efeitos embriotóxicos ou tóxicos quando testados em camundongos e *zebrafish* e

comparados à cisplatina, mesmo quando utilizadas altas concentrações dos compostos (MELLO-ANDRADE et al., 2017; VELOZO-SÁ et al., 2019).

Sendo assim, em posse desses resultados, sugere-se que esses novos complexos de rutênio sejam uma grande promessa no ramo farmacoterápico, podendo contornar o grande problema de segurança toxicológica presente hoje nos quimioterápicos utilizados no tratamento anticâncer, uma vez que para o registro desses futuros fármacos, devem ser realizados inúmeros outros testes adicionais garantindo avaliação da genotoxicidade, mutagenicidade, bem como avaliação da toxicidade aguda e crônica destes compostos (ABID, 2016).

As etapas que envolvem o desenvolvimento de novos fármacos consistem num processo que envolve desde a síntese das substâncias até a realização de ensaios pré-clínicos e clínicos até sua completa disponibilização no mercado e comércio (HORNBERG et al., 2004). Ensaios pré-clínicos são de extrema importância e são realizados com objetivo de se avaliar os diversos efeitos e riscos desses candidatos a fármacos (EMA, 2013), reduzindo assim a probabilidade de falhas desses fármacos nas etapas mais finais do processo de desenvolvimento de fármacos (DORATO e BUCKLEY, 2006).

Com isso, em meados dos anos 50, a toxicologia farmacêutica teve grande avanço após tragédias que envolveram escassez ou mesmo falhas nos processos de avaliação da segurança toxicológica de fármacos que foram disponibilizados no mercado. Um grande exemplo disso, foi o caso da talidomida que ocasionou o nascimento de crianças com malformações graves (GALLO, 2001). Sendo assim, a realização de testes pré-clínicos para avaliar o potencial toxicológico de candidatos a fármacos ganhou força, tendo em vista sua necessidade. Estes testes pré-clínicos são conduzidos usando-se tanto testes *in vitro* quanto *in vivo*. Dentre os vários testes de avaliação do potencial tóxico de novos fármacos, os ensaios de genotoxicidade oferecem uma importante informação acerca da capacidade dessas novas substâncias: a capacidade de um novo fármaco induzir mutações no DNA e acarretar em alterações cromossômicas (KIRKLAND et al., 2011; NICOLETTE, 2013).

Baseando-se nisso, e na necessidade de se otimizar testes de genotoxicidade, os ensaios que apresentam curta duração, acessibilidade e menor custo para implementação são cada vez mais procurados por pesquisadores. Além disso, a necessidade pela busca de novas metodologias que sejam alternativas ao uso de animais, como por exemplo testes *in vitro* em cultura de células estão sendo cada vez mais realizados nesse tipo de pesquisa. Isso deve-se à grande problemática que envolve o uso de animais em pesquisas (Figura 7).

ESPÉCIES	VANTAGENS	DESVANTAGENS
<b>Camundongo/ Rato</b>	Tamanho reduzido diminui custos dos testes	Menor volume de sangue Requer uso de coortes para avaliar parâmetros toxicocinéticos
	Fácil manusear	
	Múltiplas vias de administração	
<b>Cão (raça Beagle)</b>	Vários modelos disponíveis	Grandes dimensões aumentam o custo Propensão ao vômito
	Fácil reprodução	
	Fácil manusear	
<b>Macaco</b>	Múltiplas vias de administração	Requer técnicas especiais de manuseamento
	Elevado grau de semelhança com o ser humano	
	Modelo mais relevante para os testes dermatológicos	
<b>Porco</b>	Possibilidade de administração por via oral	Grandes dimensões aumentam o custo Requer técnicas especiais de manuseamento
<b>Coielho</b>	A sensibilidade da derme é muito maior que no homem	Propensão ao stress, que muitas vezes o mata

**Figura 7** - Vantagens e desvantagens das espécies utilizadas nos ensaios pré-clínicos (modificado, conforme tabela de Denny e Stewart, 2013).

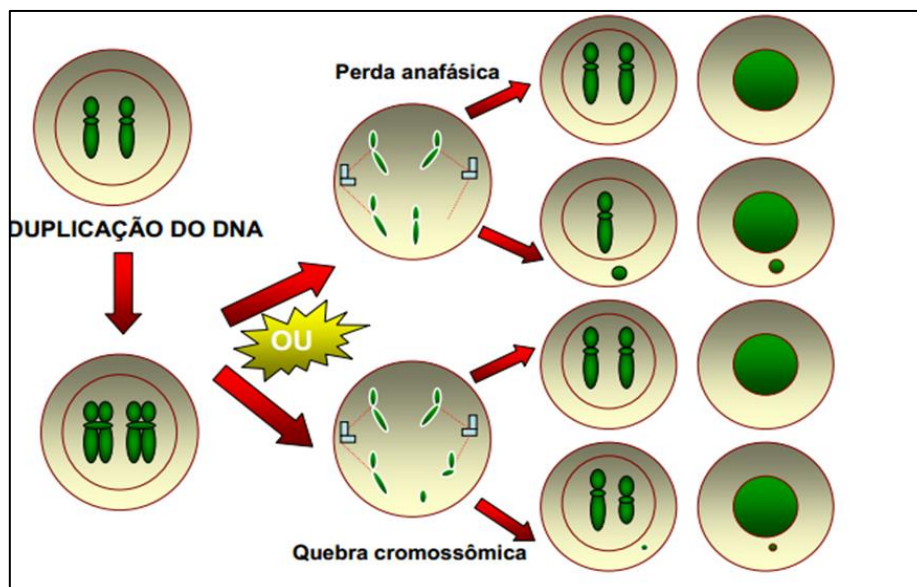
Além das desvantagens oferecidas pelas diversas espécies de animais usados em experimentos, como observado na tabela acima, os órgãos mundiais que regulam o uso destes em pesquisa, buscam cada vez mais garantir o bem estar animal, sendo assim, os testes de genotoxicidade *in vitro* estão sendo cada vez mais utilizados (BEDNARCZUK et al., 2010)

### 1.7 Avaliação do potencial genotóxico através do teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo consiste em um ensaio amplamente empregado e aceito pela comunidade científica e agências reguladoras, para se avaliar e registrar diversos novos fármacos e demais produtos químicos (MATEUCA et al., 2006). A princípio, é um método

que consiste em avaliar a capacidade que a substância teste tem de induzir danos cromossômicos estruturais ou numéricos, ambos associados com o surgimento ou progressões de tumores (HAYASHI et al., 2007). O teste do micronúcleo (MN) baseia-se na observação de células que sofrem alterações na distribuição ou quebra de suas cromátides, devido à ação de agentes genotóxicos. Quando um fármaco testado promove o aumento da frequência de eritrócitos micronucleados, há a indicação de que ele interfere na divisão nuclear dos eritroblastos da medula óssea, quebrando cromossomos ou interferindo no fuso mitótico (NEPOMUCENO & SILVA, 2010).

Durante a anáfase, os fragmentos oriundos das quebras ou cromossomos inteiros, não acompanham a migração para as regiões polares da célula, portanto na fase seguinte, a telófase, os fragmentos cromatídeos não são inclusos nos núcleos das células filhas, formam um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células que podem ser detectados (NEPOMUCENO & SILVA, 2010) (Figura 8). Os MN são analisados nas células binucleadas (FENECH et al., 2003), onde após a contagem é estimada a razão entre o total de micronúcleos e o total de células binucleadas (ZEIGER, 2001).



**Figura 8** - Esquema da formação dos micronúcleos em células. Fonte: <<https://bioafgj.wordpress.com/projeto/>>2019.

O estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) ou aneugênicos (que induzem segregação cromossômica anormal), defeitos genéticos nos pontos de checagem do ciclo celular e/ou nos genes de reparo do DNA e também pela deficiência de nutrientes requeridos como cofatores no metabolismo do DNA e erros na maquinaria da segregação cromossômica, são eventos que levam ao

surgimento de MN (BONASSI et al., 2006) Portanto, resultados negativos do teste do micronúcleo, mostram que a substância teste não é clastogênica nem aneugênica. Por outro lado, quando os resultados são positivos, indicam que o composto teste apresenta efeito genotóxico (RIBEIRO et al, 2003).

O teste do micronúcleo foi descrito pela primeira vez por Schimidt em 1975 e foi realizado em mamíferos (*in vivo*). Este teste detecta alterações cromossômicas durante a divisão celular, provocadas por substâncias mutagênicas (FLORES & YAMAGUCHI, 2008), formando uma porção citoplasmática de cromatina de forma redonda menor que o núcleo, porém ao seu lado. A formação do micronúcleo (MN) resulta de uma lise na molécula de DNA, dias ou semanas após a ação de carcinógenos quando as células da camada basal estão em divisão. A constituição dos MNs são fragmentos de cromátide ou cromossomos acêntricos ou que não foram incluídos no núcleo principal após o fim da mitose (Figura 19).

Se os compostos testados provocam formação de micronúcleos, estes são visualizados após exposição celular à citocalasina B, que se liga à actina dos microfilamentos presentes no citoesqueleto, inibindo desta forma sua polimerização durante a formação do anel contrátil, conseqüentemente levando o bloqueio da citocinese. Portanto visualiza-se uma única célula com o conteúdo citoplasmático de duas células-filhas. Uma grande vantagem da utilização deste método é a sua habilidade de mensurar de forma apurada e objetiva a frequência de defeitos no DNA, já que o micronúcleo aparece após o dano, antes mesmo de qualquer alteração pré-maligna clínica ou até mesmo histológica, detectando danos irreversíveis, o que não ocorre no teste do cometa.

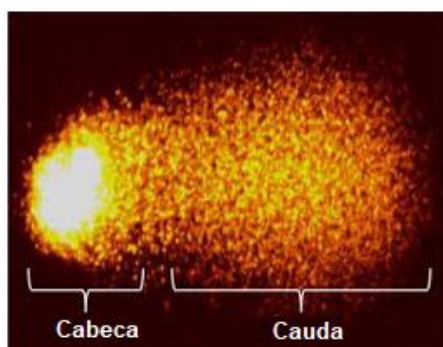
### **1.8 Avaliação do potencial genotóxico através do Ensaio cometa**

O ensaio cometa ou *Single Cell Gel Eletrophoresis Assay* (SCGE) é um teste de genotoxicidade com finalidade de detecção de danos na molécula de DNA induzidos por agentes alquilantes, oxidantes e intercalantes, como quebras simples e duplas e sítios alcalilábeis (ERDTMANN, 2003). Este teste foi inicialmente descrito por Ostling e Johanson em 1984, quando foi reconhecido como um “estudo microeletroforético” de danos no DNA em células individuais (WONG et al., 2005). A técnica do cometa não é utilizada para detectar mutações, mas sim lesões genômicas, que após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferentemente das mutações, as lesões detectadas neste ensaio são

passíveis de correção (DHAWAN et al., 2009; COLINS, 2014), levando então à formação de lesões pré-mutagênicas (ARALDI et al., 2015; WITTE et al., 2007).

Em geral, o ensaio cometa vem sendo apresentado na literatura de maneira combinada ao ensaio do micronúcleo, uma vez que suas ações se mostram complementares e úteis na avaliação do dano e reparo de DNA (KIMURA et al., 2013; ARALDI et al., 2015). Dentre as inúmeras vantagens do ensaio cometa, podemos citar sua versatilidade quanto ao tipo de célula a ser analisada, além da necessidade de apenas um pequeno número de células, que não precisam estar em divisão, o teste também apresenta alta sensibilidade na detecção de danos no DNA e a rapidez na obtenção de resultados (COLLINS et al., 1997; GONTIJO & TICE, 2003). Grande praticidade e baixo custo desse teste determinam a sua ampla aplicabilidade como um ensaio de avaliação genotóxica (ARALDI et al., 2015).

Para o ensaio cometa, as células são incluídas em gel de agarose e dispostas em uma fina camada de gel sobre lâminas histológicas. Após o tratamento com soluções determinadas anteriormente, as membranas das células, núcleos e organelas são rompidas. Com isso, os componentes citoplasmáticos e as proteínas nucleares são removidas, e o material genético restante é submetido então à eletroforese. A partir do núcleo, fragmentos de DNA migram no sentido do ânodo. Quanto mais intensa for a indução de quebras, menores serão os fragmentos e maior a extensão de migração. Após coloração específica, o DNA da célula que não apresenta dano migra de forma homogênea formando um círculo. Entretanto, o DNA danificado forma fragmentos de diversos tamanhos, originando um formato similar ao de um cometa, com a cauda correspondendo aos fragmentos que migraram. O dano pode ser quantificado em células individuais, permitindo avaliar o potencial genotóxico das amostras. Para interpretação dos resultados, o cometa é dividido entre cabeça e cauda (Figura 9). Portanto, as células sem ou com pouco dano no DNA, não apresentam cauda, enquanto as células com mais danos apresentam caudas maiores (GONTIJO & TICE, 2003).



**Figura 9** - Representação de um cometa: Cabeça e cauda. Fonte: ScienceDirect, 2014.

### **1.9 Bem estar animal nos ensaios *in vivo* e a política dos 3R's**

Tendo em vista que alguns complexos baseados em rutênio têm demonstrado baixa toxicidade sistêmica quando comparados aos complexos de platina (MELLO-ANDRADE et al., 2018), o aperfeiçoamento da elaboração e padronização de novos testes visando o uso de métodos alternativos vem ganhando destaque. Com isso, os ensaios com roedores estão cada vez mais sendo substituídos e criticados no meio científico devido ao grande número de animais que são usados diariamente nas pesquisas, além do sofrimento causado a estes.

Visando o bem estar animal antes e durante os experimentos, e a redução do número de animais utilizados, diversos órgãos de fomento, indústrias e órgãos governamentais pressionam cada vez mais da sociedade científica para que ocorra a substituição dos ensaios *in vivo* utilizando mamíferos por metodologias alternativas (BEDNARCZUK et al., 2010). Em decorrência de vários fatores que influenciam os experimentos *in vivo* como: idade, peso corporal, temperatura, fatores genéticos, nutrição e patologia do animal, sabe-se que esses ensaios *in vivo* ainda não podem ser completamente substituídos (CAZARIN et al., 2004). Por isso, hoje a sociedade científica preza pela utilização da política dos 3R's (*Reduction, Refinement e Replacement*) a qual está apresentada na tabela abaixo (Tabela 1).

**Tabela 1** - Objetivos da política dos 3R's aplicada a testes em animais

 <b>REDUÇÃO</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Elaborar novos protocolos em que se use o menor número de animais por experimento.</li><li>• Evitar as replicatas conduzidas nos estudos <i>in vivo</i>.</li><li>• Priorizar estudos com relevância e que possam ser extrapolados para espécie humana.</li><li>• Desenvolver novas metodologias e modelos de triagem.</li><li>• Aperfeiçoar a qualidade dos ensaios.</li><li>• Diminuir o número de animais em testes retirando do ensaio o maior número de informações possíveis.</li></ul>
 <b>REFINAMENT</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Valorizar os avanços científicos empregando essas novas metodologias padronizadas.</li><li>• Preocupar-se com o bem estar dos animais, reduzindo o sofrimento dos mesmos.</li></ul>
 <b>REPOSIÇÃO</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Desenvolver novas metodologias que possam substituir os ensaios <i>in vivo</i>.</li><li>• Métodos <i>in vitro</i> e alternativos, assim como aqueles que se fazem uso de células humanas devem ser priorizados.</li></ul>

Fonte: Elaborado pela autora. Com base nos dados de CAZARIN et al., 2004.

Lembrando-se que para aqueles ensaios *in vivo*, que não podem ser substituídos completamente, deve-se ao menos respeitar o programa dos 3R's, pois o simples fato de se reduzir o número de exemplares/replicatas a serem utilizados nos testes já configura a política dos 3R's. Em vista disso, nos estudos realizados para elaboração deste trabalho, o uso dos 3R's foi priorizado. Como exposto acima, durante a fase de *screening* foi utilizada linhagens celulares humanas normais e tumorais e nos ensaios de avaliação da segurança toxicológica onde normalmente fazia-se uso de animais, optamos pela utilização também das técnicas de cultivo celular combinadas com uso de embriões de peixes zebra, ou comumente denominados *zebrafish*, para os demais testes.

### **1.10 A busca pela substituição de metodologias convencionais por metodologias alternativas ao uso de animais**

Uma regulamentação Nacional expedida pela Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) e pelo Conselho Nacional de Experimentação Nacional (CONCEA), através da Resolução Normativa N.17 de 03 de julho de 2014, que dispõe sobre o reconhecimento no Brasil de métodos alternativos validados que tenham por finalidade a redução, substituição ou refinamento do uso de animais em atividade de pesquisa,

estabeleceu o prazo de até cinco anos como limite para a substituição obrigatória do método original pelo método alternativo disponível e reconhecido pelo CONCEA.

Atualmente, 24 métodos foram reconhecidos pelo CONCEA, os quais estão disponíveis nas OECD's (Organization for Economic Cooperation and Development), cujo objetivo visa reduzir o uso de métodos que utilizem animais, substituir os métodos existentes por outros que sejam igualmente ou mais eficientes, e refinar os métodos já consagrados para que se reduza o impacto das pesquisas no uso de animais.

Os animais mais utilizados em pesquisas são os roedores, sendo os camundongos e ratos os mais frequentes. Contudo, atualmente, um novo vertebrado foi inserido no cenário científico, o *zebrafish*, um peixe pequeno de aproximadamente 4cm, da espécie *Dano rerio*, que vive em água doce. Esse peixe foi inicialmente introduzido na pesquisa pelo biólogo e pesquisador George Streisinger em 1981 para realização de testes genéticos (STREISINGER et al., 1981). Logo após, em 1960 esse peixe foi utilizado pela primeira vez na pesquisa do câncer, quando Stanton et al. (1965) avaliou agentes cancerígenos.

Algumas características do *zebrafish*, tais como: transparência dos embriões (Figura 10), grande quantidade de ovos obtidos após fertilização (cerca de 600-800 ovos por aquário) e desenvolvimento rápido (cerca de 48h/ 72 horas após fertilização hpf, o ovo eclode) são atributos aproveitados para utilizar o *zebrafish* no desenvolvimento de fármacos, avaliação da toxicologia ambiental e humana e até mesmo investigação de doenças humanas (WESTERFIELD, 2007).



**Figura 10** - Embrião de zebrafish 24 horas pós fertilização (hpf). Fonte: Thomas Braunbeck/ Univeristät Heidelberg <[https://www.researchgate.net/figure/Figura-6-Linfocitos-binucleados-humanos-con-y-sin-MN\\_fig4\\_240639401](https://www.researchgate.net/figure/Figura-6-Linfocitos-binucleados-humanos-con-y-sin-MN_fig4_240639401)>.

O *zebrafish* é extensamente utilizado na área de pesquisa toxicológica, já que é possível se observar efeitos de desenvolvimento de alguns órgãos desse peixe após sua exposição a substâncias a qual busca-se estudar seu potencial toxicológico (BILOTTA et al., 2004). Pesquisas sobre doenças hepáticas e biliares (MATTHEWS et al., 2011), como esteatose hepática e atresia biliar, bem como estudo dos mecanismos moleculares que envolvem a esteatose hepática, também foram descritas na literatura usando-se este animal como modelo (SADLER et al., 2005).

Devido ao seu grande destaque na importância para a pesquisa no mundo, o *zebrafish* hoje dispõe de uma plataforma especializada a qual aborda todos assuntos que envolvem o uso desse animal. O site “ZFIN” *The Zebrafish Information Network* (<http://zfin.org>), consiste numa plataforma de dados onde são depositadas todas as informações necessárias para o seu uso (SANT’ANNA et al., 2009). Não somente a plataforma *ZFIN* disponibiliza conteúdo acerca desses animais, como também pesquisadores da América Latina, que demonstraram seu interesse nessa espécie, compartilham dados na plataforma *LAZEN* (*Latin American Zebrafish Network*) (ALLENDE et al., 2011).

A fácil manutenção e o baixo custo de sua criação, juntamente com seu tamanho corporal relativamente pequeno, os tornam uma verdadeira alternativa aos modelos de roedores, que geralmente requerem maior tempo, maior investimento financeiro e maior número de replicatas em experimento (MOURA et al., 2019).

### **1.11 O *zebrafish* (*Danio rerio*) como organismo modelo para avaliação da toxicidade aguda**

A partir do final do século 20, o peixe-zebra, ou peixe paulistinha, assim chamado devido ao seu padrão de listras (Figura 11) tem se mostrado bastante popular no que diz respeito aos estudos de toxicologia avançada, pois sua semelhança com outros modelos de vertebrados o torna um organismo ideal para se trabalhar (SPITSBERGEN & KENT, 2000). Diversas pesquisas relacionadas com genes humanos são cada vez mais desenvolvidas utilizando este modelo, já que seu genoma apresenta aproximadamente 78% de similaridade com o genoma de humanos (BARBAZUK et al., 2000).

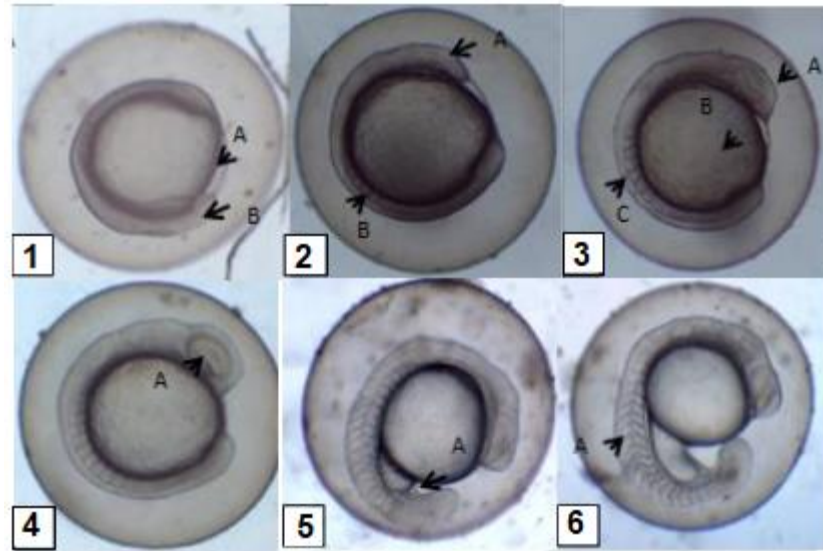


**Figura 11** - Peixe zebra/ *zebrafish*. Fonte: <<http://www.abc.net.au/news/2017-04-11/zebrafish/8433206>>.

Devido aos seus mecanismos genéticos e bioquímicos evolutivamente conservados, o uso do *zebrafish* na triagem reduz o uso de animais de maior tamanho, em uma primeira instância, bem como a quantidade de compostos necessários para os ensaios (CABALLERO & CANDIRACCI, 2018). Além disso, o córion é permeável à maioria das moléculas, incluindo DMSO (KAIS et al., 2015) e pode ser removido, se necessário, permitindo fácil administração de fármacos simplesmente por imersão em uma solução aquosa (CHHETRI et al., 2014).

A morfologia básica da retina e lente do *zebrafish* é altamente análoga à morfologia de outros vertebrados, devido sua anatomia e estrutura de tecidos e células do humor aquoso, retina e lente similares (ANGUEYRA & KINDT, 2018; GLASS, DAHM, 2004; GRAY et al., 2009) incluindo seres humanos, devido à distribuição semelhante de bastões e cones (ANGUEYRA & KINDT, 2018). Isso portanto, faz do *zebrafish* um organismo modelo bem adequado também para avaliar o desenvolvimento e até mesmo doenças oculares.

Geralmente a eclosão do embrião de *zebrafish* ocorre após 48 horas pós-fertilização (hpf), apesar de sua histogênese da maioria dos sistemas estar completa já nas 24 hpf. As divisões mitóticas começam após 40 horas após a fertilização e se aceleram originando os blastômeros (KIMMEL et al., 1995). Após isso, inicia-se o processo de gastrulação onde são formados somitos, placa neural, cartilagem vertebral e vesículas ópticas, sendo que após as 24h esse embrião já está praticamente formado (KIMMEL et al., 1995; GILBERT et al., 1994) (Figura 12).



**Figura 12** - Formação dos somitos no embrião de *zebrafish*. Escala 500  $\mu$ m. 1: 11 hpf, A (pólo vegetal) e B (cauda). 2: 12 hpf, A (cabeça) e B (somitos). 3: 14 hpf, A (cabeça), B (saco vitelínico) e C (somitos). 4: 16 hpf, A (vesícula óptica). 5: 19,5 hpf, A (desprendimento caudal). 6: 21 hpf, A (somitos). Fonte: Figura modificada baseada na elaboração de Reis (2018).

A partir das 48hpf, são desenvolvidos os arcos faríngeos e otólitos, também é possível visualizar a pigmentação de melanócitos na cabeça, cauda e tronco. Ainda neste período são formados as nadadeiras e o esqueleto axial, bem como a formação do sistema circulatório, câmaras cardíacas e desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico (KIMMEL et al., 1995; KAGUE et al., 2012) (Figura 13).



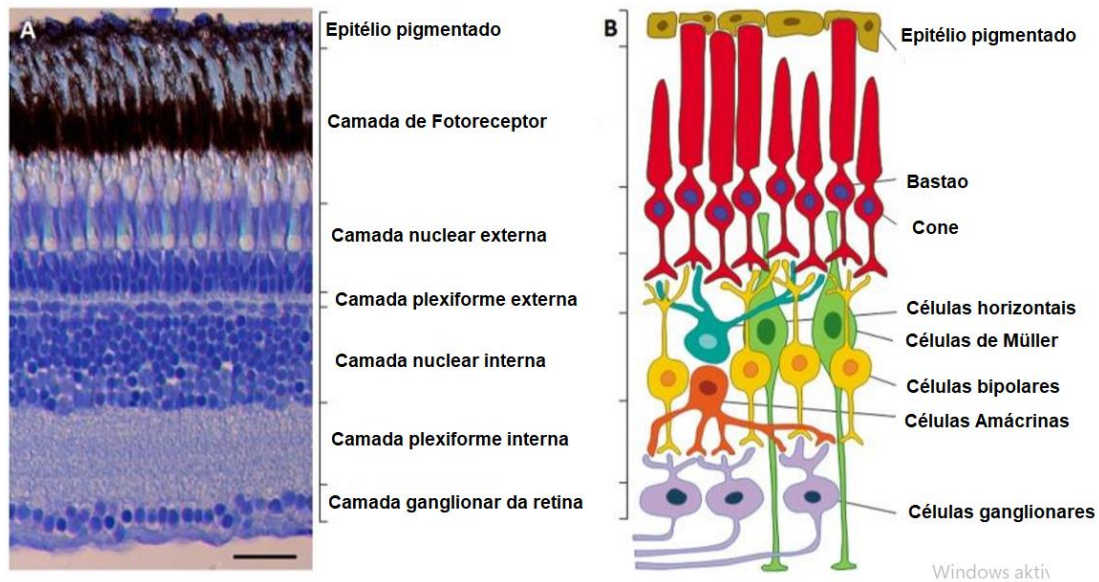
**Figura 13** - Larva de *zebrafish*. A: Olho, B: coração, C: saco vitelínico, D: orifício anal, E: nadadeira caudal, F: Cauda, G: circulação caudal, H: otólito, I: melanócitos, J: cabeça. Fonte: Figura modificada baseada na elaboração de Reis (2018).

### **1.12 Embriões de *zebrafish* (*Danio rerio*) como organismo modelo para avaliação do potencial neurotóxico através do teste de retina**

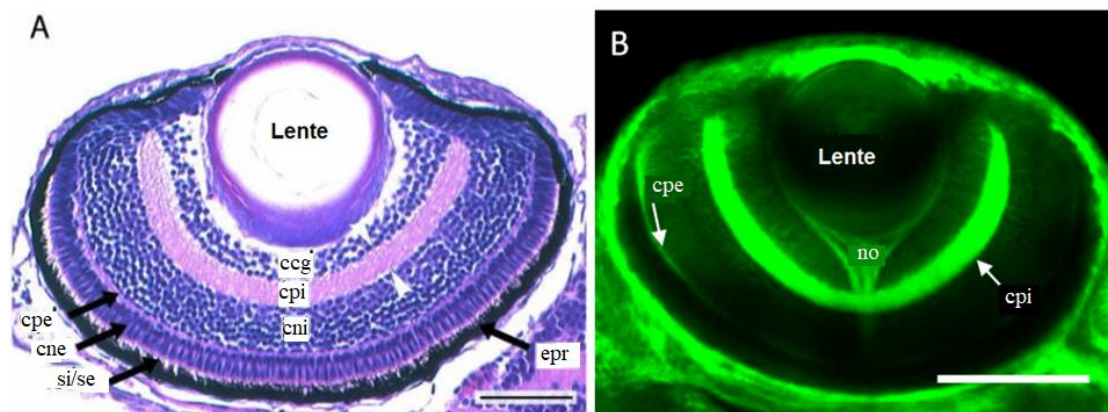
Metodologias para estudo do potencial neurotóxico para estudos farmacológicos vem sendo desenvolvidos e vários modelos experimentais *in vivo* foram desenvolvidos para se estudar o potencial neurotóxico de novos fármacos. Estudo da angiogênese da retina por exemplo, são realizados em animais. Entretanto, as limitações como complexidade do manuseio de animais, limite da quantidade de animais, bem como adequação ao princípio dos 3R's, mencionado anteriormente, fez com que testes em mamíferos fossem substituídos por testes oculares em embriões de *zebrafish* por exemplo (WELLS, 2011 e REZZOLA et al., 2013). Com isso, vários modelos para se avaliar danos na retina foram descritos em embriões de *zebrafish* (BERNARDOS et al., 2007; FIMBEL et al., 2007; SHERPA et al., 2007; OTTESON & HITCHCOCK, 2003; YURCO & CAMERON, 2005; FAUSETT & GOLDMAN, 2006).

Como os órgãos sensoriais dos peixes são diretamente expostos à solução contendo o fármaco a ser testado, eles podem ser usados como excelentes *endpoints* para se avaliar a neurotoxicidade de substâncias químicas e poluentes ambientais, que podem ser absorvidos diretamente do meio. Todos os sistemas sensoriais, como a visão e a linha lateral, são extremamente importantes para o desempenho e a sobrevivência dos peixes. Por esse motivo, o olho é usado na toxicologia para estudo dos efeitos morfológicos diretos de diversos compostos, bem como suas consequências para o desenvolvimento e comportamento futuros (GADE, 2019).

O desenvolvimento ocular pode ser observado a partir de 20 hpf, com o órgão sendo totalmente desenvolvido a 96 hpf (GLASS & DAHM, 2004), que, em comparação com outros organismos vertebrados modelo, é bastante rápido (VACARU et al., 2014). A diretiva N.63 da União Europeia de 2010, afirma que o desenvolvimento da retina já está em um status completo às 120 hpf (STRÄHLE & BRAUNBECK, 2012). Isso significa que é possível utilizar embriões a 72 hpf e 96 hpf, permitindo métodos de alto rendimento, minimizando o grande uso de mamíferos em testes adicionais. A retina é um órgão em camadas, como pode ser visto nas figuras 14 e 15, com cada camada compreendendo um tipo de célula diferente e, portanto, um estágio diferente no processamento visual (GRAMAGE et al., 2014).



**Figura 14** - Estrutura da retina. A – Secção transversal da retina de um peixe adulto mostrando as camadas celulares. B – Esquemática do circuito neural da retina. Fonte: Adaptado pela autora, com base nos dados de Gramage et al. (2014).



**Figura 15** - Estrutura da retina de *zebrafish*. A – Secção histológica do olho de um embrião de *zebrafish* após 120 hpf tratado com phenol red. **ccg** (camada de células ganglionares); **cni** e **cne** (camada nuclear interna e externa, respectivamente); **cpi** e **cpe** (camada plexiforme interna e externa respectivamente); **epr** (epitélio pigmentado da retina); **si** (segmento interno) e **se** (segmento externo). Barra de escala: 50 µm (Duffy et al., 2005). B - Imagem confocal por varredura a laser de um olho de embrião de *zebrafish* saudável a 96 hpf corado com cumarina 6. O nervo óptico (**no**) é claramente visível, bem como a **cpi**, **cpe** e a **lente**. Barra de escala: 50µm. Fonte: DUFFY et al., 2005. Disponível em: <gki799.pdf (nih.gov)>.

Essa estrutura depende de um desenvolvimento impecável e qualquer interrupção resulta em más-formações nas camadas complexas. A camada de células ganglionares (ccg) compreende células ganglionares que enviam seus axônios para fora do olho através dos discos ópticos e eventualmente formam o nervo óptico. A camada nuclear interna (CNI)

contém células horizontais, de células de *Müller glia*, células bipolares e células amácrinas (interneurônios da retina, que interagem com células ganglionares da retina e/ou com células bipolares) que transmitem, integram e regulam sinais dos fotorreceptores para as células ganglionares. A camada plexiforme interna (cpi) está localizada entre esses dois locais de processamento e os conecta com axônios e sinapses, tornando-o altamente lipofílico devido à quantidade de axônios e respectivas bainhas de mielina que compõem sua estrutura. Esse caráter lipofílico, bem como seu posicionamento central na retina, torna a cpi um ponto final interessante, pois pode ser corado com corantes lipofílicos apropriados (WATANABE et al., 2010) e observado como uma estrutura única, com bordas e formas claras.

O teste de retina de embriões de *zebrafish* utiliza a integridade estrutural da cpi para avaliar as propriedades neurotóxicas do desenvolvimento de substâncias como uma alternativa aos ensaios de neurotoxicidade já estabelecidos. Até agora, o mebendazol tem sido usado como controle positivo, pois é conhecido por interromper o desenvolvimento normal da cpi, levando a buracos e destruição completa dessa camada (NISHIMURA et al., 2015). Para poder observar qualquer alteração retinomorfológica, a pigmentação do peixe deve ser interrompida usando feniltiourea (PTU) em concentrações padrão de 30,4 mg L<sup>-1</sup> (~ 200 µM), permitindo a obtenção da imagem confocal de varredura a laser sem a presença de melanócitos que possam porventura serem confundidos com alterações (SCHULLER, 2019).

### **1.13 Embriões de *zebrafish* (*Danio rerio*) como organismo modelo para avaliação do potencial neurotóxico através do teste de acetilcolina**

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor excitatório que atua nas junções neuromusculares, na memória e em áreas do cérebro relacionadas com o aprendizado (BAYNES & DOMINICZAK, 2014). Está diretamente envolvida com atenção, memória, aprendizagem, dor, locomoção e controle de funções autonômicas (HERLENIUS & LAGERCRANTZ, 2004). É sintetizada nos neurônios colinérgicos e logo liberada para a fenda sináptica para transmitir o sinal. Logo após a transmissão, a ACh é degradada pelas enzimas responsáveis, as colinesterases (HOWLAND & MYCEK, 2007).

A acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BtChE), degradam a acetilcolina gerando colina e ácido acético. A degradação pela AChE é feita nas fendas

sinápticas, nas hemácias e nos músculos estriados enquanto a BtChE está presente no plasma, no fígado, no pâncreas e no intestino (SENGER et al., 2006). Interessantemente, o *zebrafish* apresenta uma situação única entre os vertebrados uma vez que apenas o gene que codifica para a AChE está presente em seu genoma (BERTRAND et al., 2001). Sendo assim, qualquer influência no sistema colinérgico deste organismo pode ser avaliada pela atividade da AChE, tornando-o um modelo ímpar.

Os receptores da acetilcolina podem ser classificados farmacologicamente como muscarínicos ou nicotínicos, devido aos efeitos sofridos por estes sob a ação da muscarina e da nicotina, respectivamente. Os muscarínicos são receptores metabotrópicos e estão presentes em maior quantidade na região do cérebro, enquanto os nicotínicos são ionotrópicos e se encontram na junção neuromuscular (BAYNES & DOMINICZAK, 2007). Os receptores de acetilcolina estão presentes em todo o sistema nervoso. O sistema colinérgico tem sido amplamente utilizado como parâmetro para avaliar a ação de agentes tóxicos e alteração de padrões comportamentais. Uma vez inibida a AChE, a acetilcolina não é degradada, causando um acúmulo deste neurotransmissor nas sinapses nervosas e junções musculares, gerando um aumento excitatório. Este pode levar a alterações comportamentais, como hiperatividade, asfixia e até a morte (SILVA et al., 2008).

A AChE como biomarcador de toxicidade em *zebrafish* já foi demonstrada por alguns estudos envolvendo o cádmio e zinco (SENGER et al., 2006), o etanol (GERLAI et al., 2006; RICO et al., 2007) e o metanol (RICO et al., 2006). Vários estudos têm demonstrado que altos níveis de inibição da AChE são necessários para provocar uma mortalidade significativa nas espécies aquáticas (VAN DER WEL & WELLING, 1989; LEGIERSE, 1998).

## 2. JUSTIFICATIVA

Desde suas primeiras utilizações na quimioterapia, a cisplatina já era capaz de induzir lesões microscópicas nos rins, causando algumas vezes necrose e degeneração tubular aguda. Sabe-se que nefrotoxicidade da cisplatina é atribuída às altas concentrações de cisplatina nos rins e à interferência desta no sistema de transporte renal. Mesmo acumulada em níveis não tóxicos no sangue, a cisplatina pode chegar a níveis tóxicos nos rins. Portanto, o foco no desenvolvimento de novos compostos quimioterápicos baseados em rutênio, um metal pesado, que tem sido alvo de diversas pesquisas, precisa ser avaliado de forma mais ampla a segurança toxicológica, já que eles apresentam menor potencial toxicológico em mamíferos.

Tendo em vista portanto, as limitações de eficácia e segurança dos medicamentos utilizados na quimioterapia, a busca por novas fármacos quimioterápicos preza cada vez mais pela segurança toxicológica. A novidade, portanto, do *screening* do ponto de vista toxicológico destes novos protótipos consiste em levar em conta principalmente o bem estar animal. Por isso, atualmente, o uso cada vez mais frequente das metodologias alternativas mostram o auge da nova era do *screening* de novas protótipos.

Se comparados aos ensaios *in vivo* em que normalmente se faz uso de animais, os métodos alternativos são relativamente econômicos, mais rápidos e que permitem uma correlação com ensaios *in vivo* de modelos convencionais. Além disso, sabe-se que o uso dessas metodologias alternativas reduz o uso de animais em experimentos, evitando questões éticas. Contudo, espera-se com este trabalho, a obtenção de um fármaco mais eficiente, mais seguro e menos tóxico, com aplicação de metodologias refinadas que contornem a problemática do uso de animais em experimentos.

Muitos complexos de rutênio têm sido desenvolvidos e testados pelo nosso grupo de pesquisa LGMC, desde 2008. Dentre eles, vários já tiveram seus destaques em relação aos resultados das pesquisas relacionadas com a atividade antitumoral. Baseando-se nestes dados, a possibilidade de modelagem dos complexos de rutênio se torna cada vez mais diversa, de forma que diferentes tipos de moléculas com diferentes tipos de ligantes podem ser desenhadas, o que atrai cada vez mais grupos de pesquisas interessados no desenvolvimento de promissores novos fármacos antitumorais.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVOS GERAIS**

Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antitumoral de complexos de rutênio coordenados com mercaptos e complexos de rutênio coordenados a naftoquinonas e selecionar o melhor composto que apresente um índice de seletividade adequado para se avaliar então a segurança toxicológica utilizando metodologias alternativas ao uso de mamíferos.

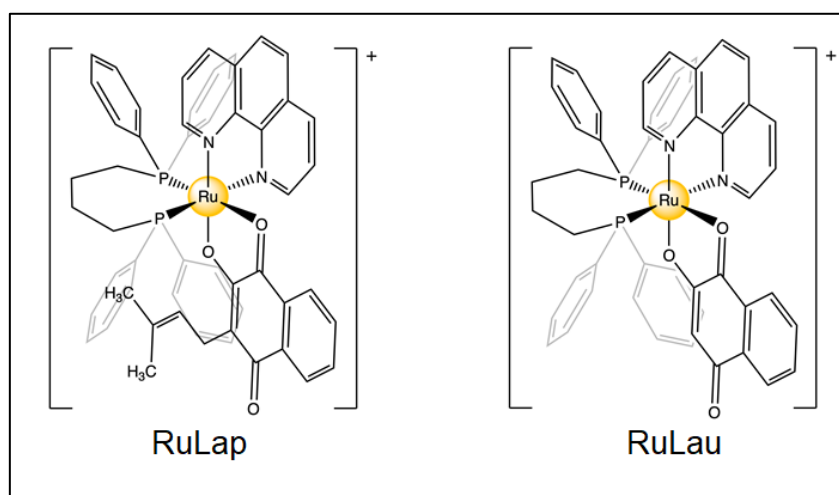
#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a potencial citotóxico de oito complexos de rutênio frente à linhagens celulares tumorais e não tumorais, calculando a concentração que inibe em 50% o crescimento celular ( $IC_{50}$ );
- Determinar o índice de seletividade dos compostos de rutênio *in vitro*;
- Avaliar o potencial genotóxico dos complexos de rutênio frente as células normais de rins de macaco, nos tempos de exposição de 24h e 48h;
- Avaliar o potencial de toxicidade aguda dos complexos de rutênio em embriões de peixe zebra no período de exposição de 96h;
- Avaliar o potencial neurotóxico dos complexos de rutênio usando o teste de toxicidade de retina e o teste de acetilcolinesterase em embriões de peixe zebra nos períodos de exposição de 72h e 96h;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Síntese e preparação dos complexos baseados em rutênio

Os dois complexos de rutênio (II), coordenados a naftoquinonas [Ru(lap)(dppb)(fen)]PF<sub>6</sub> (RuLap), [Ru(lau)(dppb)(fen)]PF<sub>6</sub> (RuLau), os quatro os complexos de rutênio (II) coordenados a mercaptos [Ru(pyAC)(bipy)(dppf)]PF<sub>6</sub> (RuAc), [Ru(dmp)(bipy)(dppf)]PF<sub>6</sub> (RuDia), [Ru(2TU)(bipy)(dppf)]PF<sub>6</sub> (RuTiu) e [Ru(6m2TU)(bipy)(dppf)]PF<sub>6</sub> (RuMTiu) (Apêndice 1) e os dois complexos de rutênio (II) coordenados a fosfina *cis*-[RuLau<sub>2</sub>(PPH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(phen)] (RuCwphen) e *cis*-[RuLau<sub>2</sub>(PPH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(bipy)] (RuCwbipy) (Apêndice 1) foram sintetizados no Laboratório de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos (LERC) do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos sob a coordenação do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista e encaminhados ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética (LGMC) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Goiás (UFG) para realização dos ensaios necessários ao desenvolvimento deste trabalho. As estruturas dos complexos de rutênio testados estão apresentadas na figura abaixo (Figuras 16) bem como suas fórmulas e massas moleculares (Tabela 2). Apesar da similaridade destes dois compostos, observa-se que o composto RuLap apresenta uma cadeia carbônica adicional em relação ao RuLau.



**Figura 16** - Estruturas dos complexos de rutênio coordenados a naftoquinonas RuLap e RuLau. Fonte: Elaborado por Tom Bettens, 2019.

**Tabela 2** - Complexos de rutênio com suas siglas, ligantes e massa moleculares correspondentes.

<b>FÓRMULA GERAL DOS COMPLEXOS</b>	<b>SIGLA</b>	<b>TIPO DE LIGANTE</b>	<b>MASSA MOLECULAR (g mol<sup>-1</sup>)</b>
[Ru(pyAC)(bipy)(dppf)]PF <sub>6</sub>	RuAc	Mercapto	1110,78
[Ru(dmp)(bipy)(dppf)]PF <sub>6</sub>	RuDia	Mercapto	1097,78
[Ru(2TU)(bipy)(dppf)]PF <sub>6</sub> *	RuTiu	Mercapto	1083,75
[Ru(6m2TU)(bipy)(dppf)]PF <sub>6</sub> *	RuMTiu	Mercapto	1097,78
[Ru(lap)(dppb)(fen)]PF <sub>6</sub> *	RuLap	Naftoquinona	1093,97
[Ru(lau)(dppb)(fen)]PF <sub>6</sub> *	RuLau	Naftoquinona	1025,85
<i>cis</i> -[RuLau <sub>2</sub> (PPH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (phen)] *	CwPhen	Fenantrolina e trifenilfosfina	1123,96
<i>cis</i> -[RuLau <sub>2</sub> (PPH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (bipy)] *	CwBipy	Bipiridina e trifenilfosfina	1099,93

\*: Complexos testados. (Apêndice 1).

Todos os complexos de rutênio da Tabela 1 foram utilizados nos testes *in vitro* e foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração final de 0,5% (p/v). Os complexos selecionados para os testes *in vivo*, os testes em embriões de peixes zebra, foram utilizados dissolvidos na concentração final de 0,001% de DMSO (p/v).

## **4.2 EXPERIMENTOS *IN VITRO***

### **4.2.1 Linhagens celulares e manutenção do cultivo celular**

As linhagens celulares tumorais utilizadas foram: A549 (ATCC® CCL-185™) – Carcinoma de pulmão humano, K562 (ATCC® CCL-243™) – Leucemia mielóide crônica humana, B16F10 (ATCC® CCL-6475™) – melanoma murino e Hela (ATCC® CCL-2™) – adenocarcinoma de cérvix humano, enquanto que as linhagens celulares não tumorais

utilizadas foram: L929 (ATCC® CCL-6364™) fibroblasto murino, V79 (ATCC® CCL-93™) – fibroblasto de pulmão humano e Vero (ATCC® CCL-81™) – Epitélio de rins de macaco.

Todas as linhagens celulares foram mantidas em meios de cultura de acordo com suas específicas necessidades, podendo variar entre meio RPMI 1640 ou meio DMEM (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO), respectivamente, suplementados com 10% de soro fetal bovino, 2,5 mL de penicilina e 2,5 mL de estreptomicina, 4,5 mL de L- Glutamina e 4,5 mL de Piruvato (Sigma Aldrich Corp. St. Louis, MO) para uma quantidade de 50mL de meio. Além disso as células foram incubadas em estufa (Thermo Scientific) a 37°C, a 5% de CO<sub>2</sub> segundo protocolo estabelecido pela American Type Culture Collection com modificações (ATCC, Rockville, MD, EUA).

#### 4.2.2 Teste de viabilidade celular pelo método de redução do MTT

Para avaliar a atividade citotóxica dos complexos de rutênio, foi utilizado o método colorimétrico do MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium]. O princípio deste método descrito por Mosman (1983), consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Para o teste do MTT, 1 x 10<sup>5</sup> de células K562 e 2 x 10<sup>4</sup> de células A549, B16F10, HeLa, L929, V79 e Vero. Após confluência total em garrafas, todas as linhagens celulares foram semeadas em microplacas de 96 poços na ausência e presença dos complexos de rutênio RuLap, RuLau, RuAc, RuDia, RuTiu, RuMTiu, RuCwPhen e RuCwBipy diluídos em seis concentrações diferentes (6,25 µM; 12,5 µM; 25 µM; 50 µM; 100 µM e 200 µM). Após tratamento de 48h as células foram incubadas e após isso foi adicionado aos poços de cultivo celular 10 µL de MTT na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup> e com concentração final no poço de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Após 3h de incubação com o MTT, foram acrescentados 50 µL SDS a 10% diluído em HCL/0,01N. A quantificação da densidade óptica (DO) foi medida em espectrofotômetro (Awareness Technology INE/ Stat Fax 2100). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \text{Absorbância do Tratamento} / \text{Absorbância do controle negativo} * 100$$

O valor de IC<sub>50</sub> (concentração em µM que inibe 50% da viabilidade celular) foi determinado por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### 4.2.3 Teste de viabilidade celular pelo ensaio do vermelho neutro

O ensaio de citotoxicidade baseado no teste do vermelho neutro é utilizado para detectar a viabilidade celular ou citotoxicidade *in vitro*. O vermelho neutro é um corante que “pigmenta” lisossomos em células viáveis. Essas células viáveis são capazes de absorver o vermelho neutro por transporte ativo e incorporar o corante em seus lisossomos. Em contrapartida, as células não viáveis não conseguem absorver esse cromóforo. Sendo assim, após lavagem, as células viáveis podem liberar o corante incorporado em condições acidificadas. A quantidade de corante liberado pode ser usada para determinar o número total de células viáveis ou citotoxicidade do medicamento (HEINRICH et al., 2016).

Essa quantidade de corante é lida em espectrofotômetro com filtro de 540nm. Neste teste foram semeadas  $2 \times 10^4$  de células por poço, em placas de 96 poços nas 14 concentrações que variaram entre 0,01 e 100 µM. Essa técnica foi utilizada somente na linhagem celular tumoral Hela e a linhagem celular não tumoral V79. Após tratamento, as células foram incubadas por 24h e foi adicionado 100 µL de solução de vermelho neutro diluído em meio na proporção de 1/80 (80mg L<sup>-1</sup>), e após 3 h de incubação, essa solução foi descartada e a placa foi lavada com 100 µL de PBS. Após lavagem, foram acrescentados 200 µL de tampão de extração (50 % EtOH, 49 % aqua bideest, 1% Ácido acético a 10%) e as placas foram agitadas em agitador por 15min. A leitura foi feita em espectrofotômetro (marca) com filtro de 540nm. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada com uso da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \text{Absorbância do Tratamento} / \text{Absorbância do controle negativo} * 100$$

Os valores de IC<sub>50</sub> (concentração em µM que inibe 50% da viabilidade celular) foram determinados por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico SigmaPlot (versão 2019).

#### 4.2.4. Índice de seletividade (IS) e seleção dos compostos promissores

O índice de seletividade (IS) para cada complexo foi calculado pela fórmula previamente determinada por Osti et al. (2012). O IS dos compostos foram obtidos através da razão entre os valores da Concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) da célula não tumoral e da concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) da célula tumoral, expresso na equação abaixo:

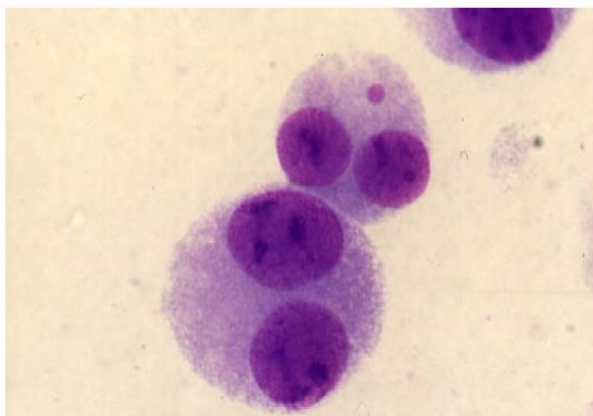
$$IS = \frac{IC_{50} \text{ da célula não tumoral}}{IC_{50} \text{ da célula tumoral}}$$

sendo considerado significativo quando SI  $\geq 2,0$ . Para a realização dos próximos testes de segurança toxicológica, dois compostos com melhor resultado de Índice de Seletividade foram escolhidos e selecionados.

#### 4.2.5. Avaliação do potencial genotóxico para análise do dano cromossômico: teste do micronúcleo

Células não tumorais Vero na concentração de  $4 \times 10^4$  foram plaqueadas em placas de 6 poços nas concentrações de  $\frac{1}{2}IC_{50}$ ,  $IC_{50}$  e  $2 \times IC_{50}$  dos complexos de rutênio RuLap e RuLau, de forma a se obter quatro replicatas de cada concentração incluindo controle negativo (ausência de composto) e controle positivo (Doxorrubicina a  $5,8 \text{ mg L}^{-1}$ , conforme protocolo baseado na OECD 487 com algumas modificações). Após 24h de exposição das células aos compostos de rutênio, as células foram lavadas com PBS 1x na própria placa. Após PBS, foi adicionado  $100 \mu\text{L}$  de Citocalasina B na concentração de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  em cada poço. Após 24h, a citocalasina B foi removida e foi adicionado então  $100 \mu\text{L}$  de formol a 10% PBS e deixado *overnight*.

No dia seguinte o formol foi retirado e as células foram lavadas novamente com PBS e foi aplicado o corante Giemsa. Após 30 minutos de incubação do corante, os poços foram analisados, e 2 mil células binucleadas foram contadas para observação da presença ou não dos micronúcleos (Figura 17). Após a contagem do número de micronúcleos, foi feita análise estatística por meio do teste do Chi-quadrado.



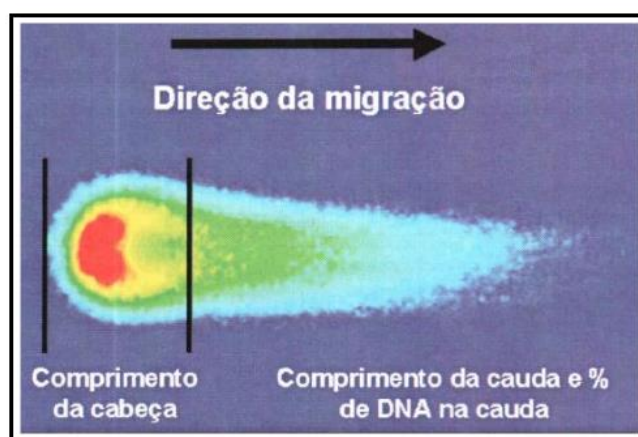
**Figura 17** - Micronúcleo detectado em célula binucleada de linfócito humano. Fonte: <[https://www.researchgate.net/figure/Figura-6-Linfocitos-binucleados-humanos-con-y-sin-MN\\_fig4\\_240639401](https://www.researchgate.net/figure/Figura-6-Linfocitos-binucleados-humanos-con-y-sin-MN_fig4_240639401)>.

#### **4.2.6. Avaliação do potencial genotóxico para análise do dano na molécula de DNA: ensaio cometa**

Para o ensaio cometa, uma quantidade de  $5 \times 10^4$  células não tumorais Vero foram incluídas em gel de agarose e dispostas em uma fina camada de gel sobre lâminas histológicas após tratamento com os compostos selecionados. O experimento foi conduzido em triplicata, nas concentrações de  $\frac{1}{2}IC_{50}$  e  $IC_{50}$  dos complexos de rutênio RuLap e RuLau e da doxorubicina [ $2,9 \text{ mg L}^{-1}$ ] que equivale a  $\frac{1}{2} IC_{50}$  como controle positivo nos tempos de exposição de 24h e 48h. Após esse período, as lâminas foram então transferidas para uma cuba para eletroforese horizontal, contendo solução alcalina (300mM NaOH) gelada previamente resfriada em geladeira por pelo menos 12h, onde permaneceram por 30 minutos para o desenrolamento do DNA. Lembrando que a cuba permaneceu dentro de uma geladeira durante todas as etapas da eletroforese. A seguir, as lâminas foram submetidas à eletroforese a 25 V, com corrente elétrica ajustada para 300mA, na ausência de luz, durante 30 minutos. Após eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com tampão de neutralização (0,4M, Tris-HCl, pH 7,5) por três vezes, com intervalo de 5 minutos entre cada neutralização. Após isso as lâminas foram fixadas em etanol 100% por 5 minutos e deixadas no suporte vertical para lâminas para secagem a temperatura ambiente. Essas lâminas puderam ser armazenadas até 4 meses após fixadas.

Para a análise em microscópio de fluorescência (Leica®, usando o software Lucia®, com um filtro de excitação de 510-560 nm e um filtro barreira de 590 nm, a um aumento de 200 X), as lâminas foram coradas com 20 $\mu$ L de solução de brometo de etídio (0,02mg mL<sup>-1</sup>

1) e cobertas com uma lamínula. Cem nucleoides foram analisados por tratamento. O software CometScore™ (versão1.5) foi utilizado para avaliar os danos genômicos. Nesse software, a intensidade de pixels nas imagens de nucleoides fornecem valores correspondentes à estimativa de danos genômicos. Nucleoides com “cabeças” completamente fragmentadas não foram incluídos na contagem. Entre os 17 parâmetros de danos fornecidos pelo software, somente o Olive tail moment (OTM) foi selecionado para o presente estudo, pois ele tem sido o parâmetro mais amplamente utilizado para quantificar danos no DNA via ensaio cometa, e corresponde ao produto do comprimento da cauda pela intensidade de DNA na cauda (COLLINS, 2014) (Figura 18).



**Figura 18** - Representação dos componentes de um cometa. Fonte: (GONTIJO & TICE, 2003).

Durante este ensaio, os componentes citoplasmáticos e as proteínas nucleares são removidos, e o material genético restante é submetido então à eletroforese. A partir do núcleo, fragmentos de DNA migram no sentido do ânodo. Quanto mais intensa for a indução de quebras, menores serão os fragmentos e maior a extensão de migração. Após coloração específica, o DNA da célula que não apresenta dano migra de forma homogênea formando um círculo.

Entretanto, o DNA danificado forma fragmentos de diversos tamanhos, originando um formato similar ao de um cometa, com a cauda correspondendo aos fragmentos que migraram. O dano pode ser quantificado em células individuais, permitindo avaliar o potencial genotóxico de amostras. Para interpretação dos resultados, o cometa é dividido entre cabeça e cauda como apresentado na figura abaixo (Figura 20). Portanto, as células sem ou com pouco dano no DNA, não apresentam cauda, enquanto as células com mais danos apresentam caudas maiores (GONTIJO & TICE, 2003).

O ensaio cometa foi realizado conforme protocolo modificado, criado pela autora, baseado no protocolo proposto por Singh et al. (1988). Lâminas de microscopia foram previamente lavadas com água e sabão e embebidas em uma solução de álcool 70% e deixadas *overnight*. Após isso foram revestidas com 1,5% de agarose de ponto de fusão normal e secadas a temperatura ambiente e mantidas na geladeira. Posteriormente, uma solução contendo 30µL de células de rim de macaco (VERO ATCC® CCL-81™) e 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% e 37°C, foram colocadas sobre as lâminas pré-cobertas. As lâminas foram então mantidas na geladeira, dentro de porta lâminas revestidas com papel alumínio, contendo solução de lise (Triton X-100, DMSO e solução de lise estoque), *overnight*.

Após esse período, as lâminas foram então transferidas para uma cuba para eletroforese horizontal, contendo solução alcalina (300 mM NaOH) gelada previamente resfriada em geladeira por pelo menos 12h, onde foi realizada a eletroforese alcalina, e as células expostas foram analisadas posteriormente em microscópio de fluorescência.

### **4.3. EXPERIMENTOS *IN VIVO***

#### **4.3.5. Embriões de peixes zebra**

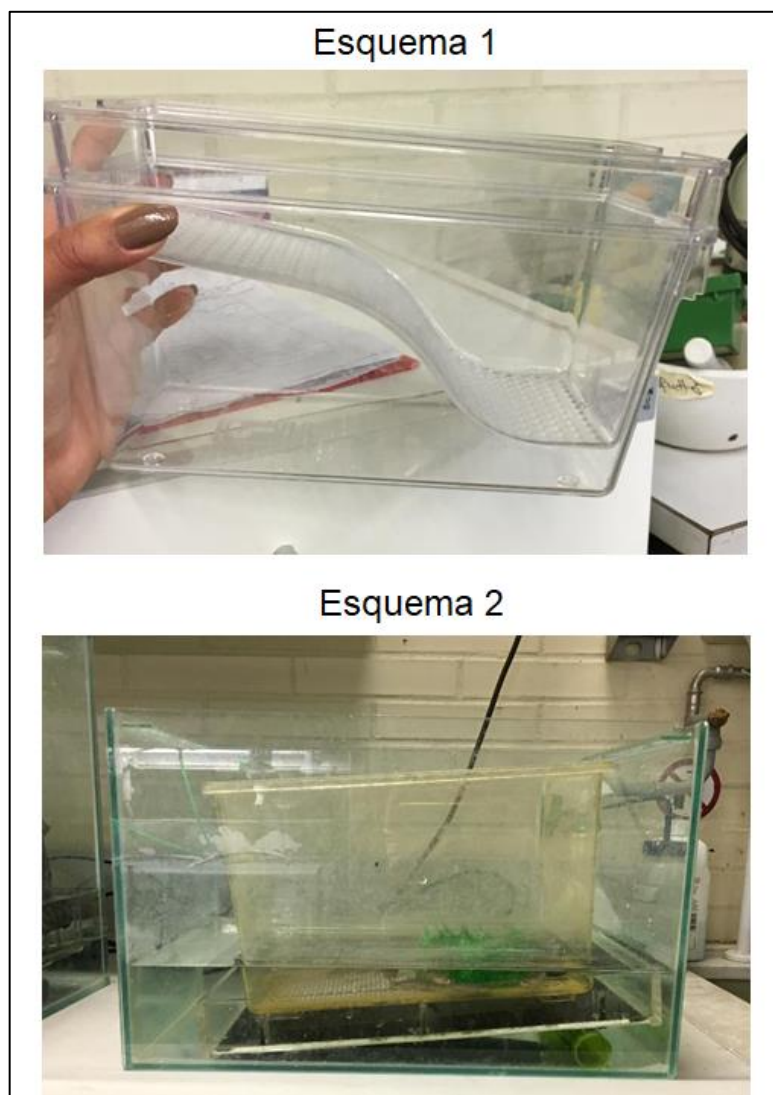
Os embriões de *zebrafish* foram fornecidos pelo laboratório “*Aquatische Ökologie und Toxikologie*” (Aquatox) localizado no “*Center for Organismal Studies*” (COS) da *Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg*, na cidade de Heidelberg na Alemanha. Os peixes permaneceram em aquários, com tamanho de 60 cm x 35 cm x 16 cm, com capacidade para aproximadamente 30 peixes conforme mostra a Figura 19. Foram utilizados, aproximadamente, 15 machos e 15 fêmeas, mantidos juntos durante o período experimental (não houve separação). Os aquários de manutenção utilizados são adaptados com sistema de recirculação de água, com temperatura de 28,5°C em ciclo de 12h claro e 12h escuro. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração seca “*TetraMin Hauptfutter*” e uma vez ao dia com *Artemia salina*.

Para acasalamento, os peixes foram colocados em tanques de reprodução “*Sex on the beach*” (Figura 20), no final da tarde anterior ao dia da reprodução. No dia seguinte, portanto, eram coletados os ovos fertilizados após o acasalamento, os quais eram transferidos para placas de petri, em água artificial “*Kunstwasser (KW Wasser)*”

reconstituída contendo sais  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KCl}$  e pH neutro ( $7,75 \pm 0,02$ ), temperatura de  $27^\circ\text{C}$  e oxigenação suficiente. Todos os procedimentos experimentais, tanto para a reprodução quanto para os testes toxicológicos, foram realizados conforme as especificações da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD).



**Figura 19** - Aquários contendo peixes zebra no laboratório “Aquatische Ökologie und Toxikologie” (Aquatox) localizado no “Center for Organismal Studies” (COS) da Ruprecht-Karls- Universität Heidelberg, na cidade de Heidelberg na Alemanha. Fonte: Acervo pessoal da própria autora, 2019.



**Figura 20** - Esquema 1 (menor aquário para aproximadamente 5 casais) e Esquema 2 (para aproximadamente 15 casais) de “*Sex on the beach*” para obtenção de ovos fecundados. Fonte: Acervo pessoal da própria autora, 2019.

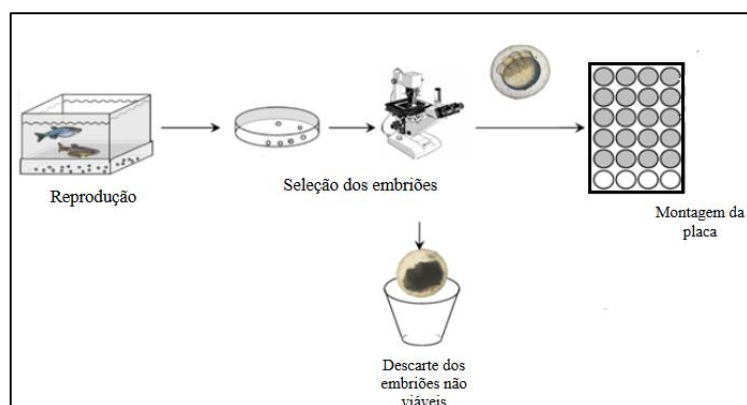
#### **4.3.6. Avaliação do potencial de toxicidade aguda em embriões de *zebrafish***

O teste para avaliação do potencial de toxicidade aguda em embriões de peixe (OECD TG 236) é uma alternativa aos testes de toxicologia animal aquática, no qual o desenvolvimento do embrião de peixe-zebra é observado para quaisquer anomalias de desenvolvimento visíveis (LAMMER et al., 2009). Para isso, placas de 24 poços foram pré-incubadas por 24 horas com as respectivas concentrações (estabelecidas nas tabelas 3 e 4 adiante) dos complexos de rutênio RuLap e RuLau para assegurar saturação completa de possíveis locais de ligação na superfície de poliestireno. Adicionalmente os complexos de rutênio RuAc, RuDia, RuTiu, RuMTiu, RuCwPhen e RuCwBipy também foram testados

e os resultados se encontram no Apêndice 1. Os ovos fertilizados foram coletados dos tanques de desova e transferidos para placas de vidro com água artificial e com as concentrações correspondentes antes de serem colocados nos poços individualmente. Quaisquer ovos não fertilizados, assim como os coagulados ou deformados, foram descartados nesta fase. Foram plaqueados um ovo por poço, e foram utilizados 20 ovos fertilizados para cada concentração, e também para controles negativo e positivo. Esses experimentos foram realizados em triplicata, portanto o saldo final de animais utilizados foi sempre de 60 animais por concentração.

Os complexos de rutênio foram diluídos em DMSO a 0,001% e adicionados na água artificial. Para o controle positivo foi utilizado DCA (3,4-dicloroanilina - Sigma-Aldrich®) na concentração de 4mg L<sup>-1</sup> e uma placa para controle do solvente, contendo apenas DMSO 0,001% também foram feitas. O DCA foi utilizado como controle positivo para confirmar a validade do teste de toxicidade (OECD 236, 2013) e armazenada a 4<sup>o</sup>-C, de acordo com as recomendações do fabricante. A solução estoque (200mg L<sup>-1</sup>) foi produzida com água artificial e armazenada a 4<sup>o</sup>-C. A concentração final utilizada foi de 4mg L<sup>-1</sup>.

Ao final as placas foram seladas com folha auto-adesiva (EXCEL Scientific, Victorville, EUA) antes de serem incubadas a 26<sup>o</sup>-C. O meio foi renovado a cada 24 horas e os embriões foram inspecionados e avaliados quanto a qualquer desenvolvimento interrompido que se desviasse do desenvolvimento padrão descrito por Kimmel et al., (1995) (Figura 21). Para a avaliação da toxicidade, foi utilizado um microscópio invertido CKX4-1 (Olympus, Hamburgo, Alemanha), equipado com câmera digital de zoom amplo Olympus C5060 e o software correspondente é o AnalySIS. Às 96 horas após a fertilização (hpf), os embriões foram eutanaziados com etanol e descartados apropriadamente.



**Figura 21** - Esquemática do *Fish Embryos Test* (FET) Fonte: Adaptado, conforme dados da OECD TG 236.

O *Fish Embryos Test* (FET) foi utilizado para avaliar o potencial de toxicidade aguda dos compostos de rutênio, pois este teste permite a observação de efeitos (sub) letais de produtos químicos no embrião de peixe-zebra, além de ser comparável à toxicidade aguda testes realizados com peixes adultos (LAMMER et al., 2009). As concentrações dos compostos de rutênio que apresentaram efeito tóxico em 10% dos embriões expostos, foram classificadas como as concentrações de EC<sub>10</sub>, enquanto concentrações que causam pontos de extremidade letais em 50% dos embriões foram usadas para calcular as concentrações de LC<sub>50</sub> (OECD 2013). As concentrações testadas nos experimentos foram detalhadas na tabela abaixo (Tabela 3).

**Tabela 3** - Intervalo de concentrações utilizados nos experimentos independentes.

COMPOSTOS (RuLap e RuLau)			
EXPERIMENTO 1 ( <i>Range Finding</i> )	EXPERIMENTO 2 (FET)	EXPERIMENTO 3 (FET)	EXPERIMENTO 4 (FET)
20µM/ 50mg L <sup>-1</sup>	0,8µM/ 2,0mg L <sup>-1</sup>	0,8µM/ 2,0mg L <sup>-1</sup>	0,8µM/ 2,0mg L <sup>-1</sup>
10µM/ 25,0mg L <sup>-1</sup>	0,4µM/ 1,8mg L <sup>-1</sup>	0,4µM/ 1,8mg L <sup>-1</sup>	0,4µM/ 1,8mg L <sup>-1</sup>
5µM/ 10,0mg L <sup>-1</sup>	0,2µM/ 1,6mg L <sup>-1</sup>	0,2µM/ 1,6mg L <sup>-1</sup>	0,2µM/ 1,6mg L <sup>-1</sup>
2,5µM/ 5,0mg L <sup>-1</sup>	0,1µM/ 1,4mg L <sup>-1</sup>	0,1µM/ 1,4mg L <sup>-1</sup>	0,1µM/ 1,4mg L <sup>-1</sup>
1,25µM/ 2,5mg L <sup>-1</sup>	0,05µM/ 1,2mg L <sup>-1</sup>	0,05µM/ 1,2mg L <sup>-1</sup>	0,05µM/ 1,2mg L <sup>-1</sup>
0,625µM/ 1,25mg L <sup>-1</sup>	0,025µM/ 1,0mg L <sup>-1</sup>	0,025µM/ 1,0mg L <sup>-1</sup>	0,025µM/ 1,0mg L <sup>-1</sup>

\* O experimento 1 (*Range Finding*) foi realizado com 10 embriões por concentração (1 placa para cada 2 concentrações), enquanto os testes FET seguintes foram realizados com 20 embriões por grupo de exposição.

Após realização de um experimento de *Range Finding* e três experimentos independentes de FET, dados das más formações (Tabela 4) dos embriões expostos aos compostos, foram analisados no ToxRat® e depois no programa *Sigmaplot*, para obtenção dos dados de letalidade e sub letalidade. O experimento de *Range finding* é aquele no qual, uma primeira tentativa em se obter um intervalo de concentrações a serem testadas é feita. Portanto, esse teste pode ser realizado uma vez, ou até mesmo várias vezes até que se encontre o intervalo de concentrações ideal.

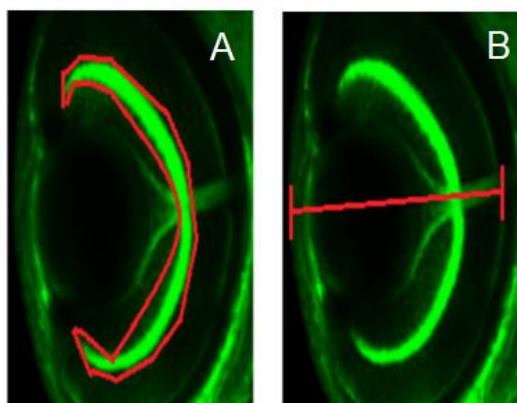
**Tabela 4 - Efeitos Letais, Sub letais e teratogênicos.**

EFEITOS LETAIS	CÓDIGO	EFEITOS TERATOGENICOS	CÓDIGO	EFEITOS SUB LETAIS	CÓDIGO
Coagulacao	K	Malformacao da cabeca	KD	Cauda encurtada	TS
Sem batimentos cardíacos	H	Malformacao dos olhos	AD	Reducao dos Batimentos cardíacos	H-
Sem somitos	S	Malformacao dos otólitos	OD	Falta de circulacao sanguínea	BL
Cauda Nao detectada	SW	Malformacao dos somitos	SD	Reducao da circulacao sanguínea	BL-
		Malformacao do coracao	HD	Pigmentacao de células sanguíneas	Häm
		Malformacao da Chorda	WS	Edema pericárdico	Pö
		Malformacao da cauda	TD	Edema de saco vitelíneo	ö
		Malformacao da Nadadeira	FD	Edema de cavidade corporal	Lö
		Escoliose	W	Pigmentacao corporal	P
		Deformidade do saco vitelíneo	DD	Pigmentacao dos olhos	Pa
				Movimentos espontaneos	SB
				Inflacao da bexiga natatória	Swim
				Espasmos	Z
				Problema de equilibrio	B

\*Para embriões normais não-eclodidos considerou-se o código "N" (*Normal*) e para embriões normais eclodidos considerou-se o código "G" (*Geschlüpft*).

#### 4.4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE RETINA EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH

O teste para avaliação da toxicidade de retina de embriões *zebrafish* é um método inteiramente novo que visa investigar a neurotoxicidade do desenvolvimento inicial, utilizando o desenvolvimento correto da retina como um *endpoint*. A camada plexiforme interna (CPI) foi escolhida como objeto de interesse, uma vez que manchas se acumulam principalmente nas membranas celulares que são abundantes dentro da CPI. Este último tem um propósito de conexão, pois contém os axônios e sinapses entre as células amácrinas e as bipolares. Uma simples coloração e exame com um microscópio confocal fornecem uma visão da condição geral do CPI sem muitos detalhes fornecidos por exemplo, pelas avaliações histológicas (Figura 22).



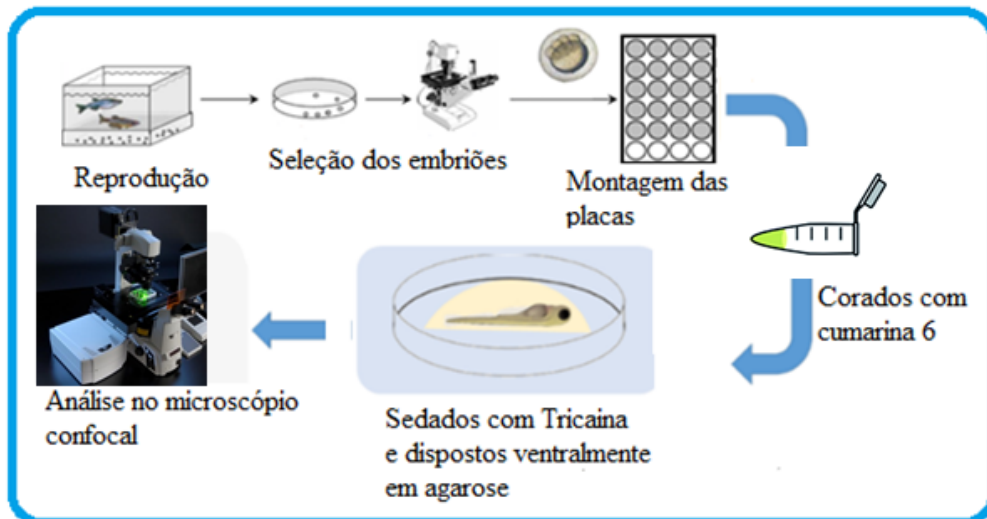
**Figura 22** - Parâmetros utilizados para avaliação da toxicidade de retina. Legenda: A (Área da CPI) e B (Espessura da CPI). \*Camada Plexiforme Interna (CPI)

A visão detalhada sobre a abundância ou a falta de tipos celulares específicos não é possível, nem uma verificação do caminho correto dos neurônios. No entanto, as razões mencionadas acima indicam fortemente que uma formação correta é suscetível a rupturas que justificam seu uso para quantificações. Semelhante ao procedimento operacional padrão para o teste FET, as placas de 24 poços foram pré-incubadas com as concentrações de  $\frac{1}{2}EC_{10}$ ,  $EC_{10}$  e  $2xEC_{10}$  dos complexos de rutênio RuLap e RuLau para garantir a saturação total dos possíveis locais de ligação na superfície do poliestireno.

Os ovos fertilizados foram coletados dos tanques de desova e transferidos para as placas de vidro com água artificial (“Kw”) como mencionado anteriormente com as concentrações correspondentes antes de serem colocados nos poços individualmente. Foram utilizados 20 embriões por concentração, e os experimentos eram conduzidos em triplicata, totalizando 60 embriões por concentração. Os embriões eram colocados em cada poço da placa já contendo a substância a ser testada, diluída em DMSO 0,001%, plaqueada pelo com pelo menos 24h de antecedência. Para o controle positivo foi utilizado o mebendazol a  $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ .

As placas foram seladas com papel autoadesivo (EXCEL Scientific, Victorville, EUA) antes de serem incubadas a  $26^{\circ}\text{C}$ . O meio foi renovado a cada 24 horas. Após 72 horas de fertilização (hpf), 10 embriões eclodidos, por placa, foram selecionados e lavados quatro vezes em água artificial “Kw” antes de serem colocados em uma solução de coloração de cumarina 6 por 30 minutos (Figura 23).

As larvas de *zebrafish* foram então lavadas três vezes por 10 minutos cada um antes de serem sedados com uma solução de triclaína a  $160 \text{ mg L}^{-1}$  e montados em gel de agarose a 1% (contendo triclaína a 0,016%), expondo seu lado ventral (Figura 24). Os embriões restantes foram tratados com cumarina 6 após 96 hpf. As imagens foram obtidas através da análise em microscópio confocal de varredura a laser (Nicon Eclipse 90i) e o software utilizado foi o *Nicon Imaging Software (Elements NIS)*.



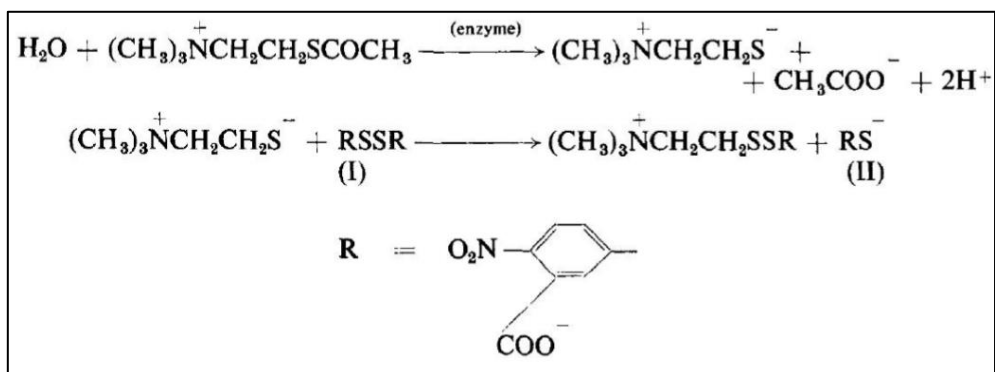
**Figura 23** - Representação esquemática do teste de toxicidade de retina. Fonte: GADE, 2019.



**Figura 24** - Disposição ventral das larvas de zebrafish em agarose para análise confocal. Fonte: GADE, 2019.

#### 4.4.5. Avaliação do potencial neurotóxico em embriões de *zebrafish*: teste da acetilcolinesterase

O princípio básico da medição da atividade enzimática é o aumento da cor amarela como produto da reação da tiocolina e do íon ditiobisnitrobenzoato. A taxa na qual a acetilcolinesterase converte o substrato iodito de acetiltiocololina em iodito de tiocolina e acetato é determinada em detalhes. No entanto, a medição é realizada indiretamente, com base na reação contínua do tiol com o íon 5: 5-ditiobis-2- (nitrobenzoato) (I) (DTNB). Essa reação leva à formação do ânion amarelo do ácido 5-tio-2-nitro-benzóico (II) (Figura 25).



**Figura 25** - Reação da tiocolina e do íon ditiobisnitrobenzoato. Fonte: KÜSTER, 2005.

A taxa de conversão ou formação do ânion do ácido 5-tio-2-nitro-benzóico (II) é cineticamente medida pelo aumento da densidade óptica no comprimento de onda de 412 nm no fotômetro / leitor. A conversão do substrato ocorre em rápida sucessão e fornece resultados em alguns minutos. Como resultado, a mudança na extinção (taxa de reação) é obtida como uma mudança na densidade óptica por minuto  $\Delta E = OD/min$ .

Com a ajuda da lei de Lambert-Beer,  $\Delta E = \varepsilon \times d \times \Delta C$ , a quantidade de substrato  $\Delta C$  convertido pode ser determinada em  $mol/L \times min$ . Com base na quantidade de substrato convertido, a atividade enzimática resulta em  $\mu mol/min = U$  (unidades). A atividade enzimática específica ( $U/mg$ ) é determinada como o substrato convertido em  $\mu mol$  por minuto =  $U$  com base no teor total de proteínas da amostra em  $mg/L$ . (ELLMAN et al., 1961). Nas etapas a seguir, o método foi modificado de acordo com Küster (2005).

Foram analisadas três amostras por concentração de  $\frac{1}{2}EC_{50}$ ,  $EC_{50}$  e  $2x EC_{50}$  dos complexos de rutênio RuLap e RuLau. Cada amostra foi composta por um conjunto de 5 embriões em triplicata. Resumidamente, após congelados pelo menos por 24h em nitrogênio líquido, o conjunto de 5 embriões foi homogeneizado em 0,5 ml de tampão fosfato de sódio gelado (0,1 M, pH 7,4 e 0,1% v/v Triton X-100). A homogeneização foi realizada por 60 segundos usando o *Tissuelizer* da Qiagen®. Os homogenatos foram centrifugados a 4 ° C por 15 min a 10.000g. O *pellet* foi excluído e o sobrenadante foi armazenado em novos *ependorfs* a 4° C no gelo triturado. As amostras juntamente com os reagentes foram plaqueadas de forma ordenada e após isso foi realizada leitura das placas, de acordo com o método espectrofotométrico de Ellman et al. (1961), adaptado. A cinética da alteração da densidade óptica com o tempo (DO/min) foi registrada a 412 nm por 3 min. A concentração de proteínas das amostras foi determinada também em triplicata a 690 nm.

O método *Lowry* (kit de proteínas DC, Biorad, Munique) é usado para determinar a quantidade de proteína. A curva padrão é fornecida em tubos *Eppendorf* de 1,5 ml com 6 níveis de diluição + branco com 4 medições paralelas (7 tubos). Foi feita uma série de diluições 1:2 (ao total 7 diluições com tampão de amostra) preparadas a partir da solução mãe de 4 mg mL<sup>-1</sup> de BSA. A orientação da placa se deu conforme a Figura 26.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Branco	CN	2mg/L									
B		↓	↓									
C		↓	↓									
D		↓	↓									
E		4mg/L	1,0 mg/L									
F		↓	↓									
G		↓	↓									
H		↓	↓									

**Figura 26** - Esquemática da placa de proteína do ensaio. AchE. Fonte: Stengel, 2014

#### 4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises de MTT e vermelho neutro foram feitas utilizando uma transformação de  $X = \text{Log}X$  para que os valores de DO fossem expressos em Logaritmo. Para a transformação de Y foi feito com base em uma fórmula ( $Y = Y / \text{Média dos valores de DO do Controle negativo} * 100$ ). Após as transformações de X e Y, foram analisados por curve fit (curva de regressão não linear). Para apresentar a curva e os valores de IC<sub>50</sub> foi selecionado a curva dose-resposta sigmoideal (*variable slope*), utilizando-se o software *Graphpad prism* versão 5.0.

Para as análises do teste de Mincronúcleo foram realizados os testes One-Way Anova e posteriormente o teste de Tukey, utilizado-se o Software *SigmaStat* (versão 3.5). Para as análises do ensaio cometa também foram realizados os testes One-Way Anova e teste de Tukey utilizando-se o software *CometScore*. E para as análises de FET, teste de toxicidade de retina e acetilcolinesterase, todos os gráficos e análises estatísticas foram realizados com o *SigmaPlot* 13.0 (Statsoft-Jandel Scientific,

Erkrath, Alemanha). Foram criados gráficos utilizando o Excel™ 2010 (Microsoft, Redmond, EUA) e o *SigmaPlot* 13.0. Os valores de CL<sub>50</sub> e EC<sub>10</sub> foram calculados usando o *ToxRat Professional* (*ToxRat Solutions*, Alsdorf, Alemanha) com base na regressão linear de máxima verossimilhança. Todas as réplicas foram analisadas de forma independente, a fim de excluir a influência da variabilidade biológica entre os diferentes grupos de desova, para garantir uma interpretação precisa dos dados. O teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* (ANOVA unidirecional nas fileiras) foi utilizado para comparar os dados que não apresentaram distribuição normal. Os testes de *Dunn* foram utilizados como método *post-hoc* para determinar grupos diferentes do controle negativo com significância de pelo menos  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ÍNDICE DE SELETIVIDADE

A Tabela 5 demonstra os valores de  $IC_{50}$  por meio do ensaio de MTT dos compostos rutênio RuLap e RuLau frente às linhagens tumorais A549, K-562 e B16F10 e a linhagem não tumoral L-929. Os resultados demonstraram que os novos compostos de rutênio apresentaram citotoxicidade significativa nas linhagens tumorais testadas. Os valores de  $IC_{50}$  encontrados para os compostos de rutênio frente diferentes linhagens tumorais testadas variaram de 0,68 a 2,14 $\mu$ M, enquanto que na linhagem não tumoral L-929, os valores de  $IC_{50}$  variaram de 0,94 a 1,30  $\mu$ M. Ainda na mesma tabela, à direita, pode se observar o valor do Índice de seletividade (IS) referente as linhagens celulares testadas e mostradas abaixo.

**Tabela 5** - Concentrações inibitórias ( $IC_{50}$ ), em  $\mu$ M, e Índice de seletividade (IS) dos complexos de rutênio RuLap e RuLau frente a diferentes linhagens celulares testados pelo teste de MTT.

	IC50 ( $\mu$ M)				IS		
	L929	A549	K562	B16-F10	A549	K562	B16-F10
<b>RuLap</b>	0,94 $\pm$ 0,01	0,99 $\pm$ 0,24	1,67 $\pm$ 0,86	2,14 $\pm$ 1,19	0,94	0,56	0,43
<b>RuLau</b>	1,30 $\pm$ 0,17	1,16 $\pm$ 0,38	0,68 $\pm$ 0,40	1,92 $\pm$ 0,17	1,12	1,91	0,67

O IS pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal (BOGO, 2012).

É considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 para indicar se o composto é duas vezes mais ativo em células tumorais do que células normais (OSTI et al., 2012). Esse parâmetro que avalia se há diferença na nocividade entre linhagens de células normais e células tumorais, indica o potencial uso deste composto em futuros testes clínicos. Nos resultados apresentados acima portanto, observa-se que o composto RuLap não apresenta diferença significativa por apresentar IS abaixo de 1,0, segundo considerado pelo autor Osti et al. (2012). Já o composto RuLau apresentou significante diferença

estatística, já que o valor de IS se encontra bem próximo de 2,0 (OSTI et al., 2012), ou seja, este composto é aproximadamente duas vezes mais ativo na linhagem tumoral do que na linhagem de células normais.

A Tabela 6, mostra os valores de IC<sub>50</sub> obtidos a partir do teste do vermelho neutro, onde foram testados para os compostos RuLap e RuLau frente à linhagem celular tumoral HeLa e à linhagem celular não tumoral V79. Foram testados adicionalmente os compostos de rutênio: RuAc, RuDia, RuTiu, RuMTiu, RuCwphen e RuCwbipy onde os resultados se encontram no Apêndice 2.

**Tabela 6** - Concentrações inibitórias (IC<sub>50</sub>), em μM, e Índice de seletividade (IS) dos complexos de rutênio RuLap e RuLau frente às linhagens celulares V79 e HeLa pelo método Vermelho Neutro.

	IC <sub>50</sub> (M)		IS
	V79	HeLa	HeLa
<b>RuLap</b>	3,42	2,9	1,17
<b>RuLau</b>	16,7	1,53	10,91*

\*: IS ≥ 2,0.

Pode-se observar que para os dois compostos de rutênio testados para a linhagem tumoral HeLa, os valores de IC<sub>50</sub> são menores que os valores obtidos para a linhagem normal V79, com exceção do complexo RuLap. Ainda na mesma tabela, observam-se os valores de IS obtidos, onde o complexo RuLau mostrou-se mais seletivo para a linhagem tumoral HeLa, uma vez que seu valor de IS estava acima de 2. Portanto, o composto RuLau, mostrou-se mais promissor em relação ao composto RuLap.

Esses valores vão ao encontro com os dados encontrados por Oliveira et al. (2017), que utilizaram ensaios de citotoxicidade testando compostos de rutênio similares a esses testados em nosso trabalho. Os autores testaram complexos de rutênio coordenados a Lausona semelhantes, frente às linhagens tumorais de carcinoma de próstata humano (DU-145), tumor de mama humano (MCF-7) e carcinoma de pulmão humano (A549) e os valores de IC<sub>50</sub> encontrados foram 1,10 μM; 2,59 μM e 2,54 μM respectivamente. Sabendo-se que os compostos RuLau e RuLap são análogos aos compostos descritos por Oliveira et al. (2017) (RuLap apresenta uma cadeia carbônica adicional), acredita-se que apesar do

composto RuLap ter uma maior interação com DNA quando comparado ao composto RuLau, este último se mostra mais promissor, considerando seu valor do índice de seletividade (OLIVEIRA et al., 2017). Em outros estudos obtidos na literatura, é possível observar que os compostos de rutênio tem mostrado seu efeito citotóxico seletivo para linhagens tumorais, mesmo quando desenhados com diferentes tipos de aminoácidos ligantes (LIMA et al., 2012; LIMA et al., 2014; MELLO et al., 2018; PORTO et al., 2014; PEREIRA et al., 2014).

Quando comparamos as tabelas 5 e 6, observa-se que na avaliação da citotoxicidade através do método do MTT não se observa seletividade em nenhum dos compostos, diferente dos dados encontrados após realização do teste do vermelho neutro. Isso deve se ao fato de que o teste do MTT é considerado um ensaio menos sensível quando comparado ao teste do vermelho neutro (DENIZOT e LANG, 1986). A menor sensibilidade do ensaio do MTT pode ser devido à baixa solubilização do produto formazan, bem como também ao fato de que a quantidade de corante vermelho neutro absorvido pelos lisossomos é um pouco maior que a quantidade de sal de tretazólio reduzida por mitocôndrias. A retenção de formazan nas células pode levar muitas vezes a uma incapacidade de se medir a sobrevivência celular em condições altamente tóxicas. E já que o ensaio do MTT não inclui uma etapa de fixação, assim as células tendem a se desprender da superfície da placa de cultura durante o procedimento de solubilização do formazan (BOREFREUND et al., 1988). Apesar de que, no estudo de Putnam et al. (2002), o teste do vermelho neutro foi relatado ser mais sensível para tempos de exposição moderados (entre 3 e 6 horas de exposição). Bacanli et al. (2017) mostrou em seu estudo que ambos os testes de citotoxicidade se mostraram semelhantes em tempos de exposição que variaram de 18 a 48 horas, não mostrando diferença entre os testes.

No estudo de Gomez Peres et al. (2017), mostram que os resultados do teste de vermelho neutro se diferem do teste do MTT, mostrando-se mais sensível já que no teste do vermelho neutro os compostos metálicos não interagem com o corante. Os autores explicam que no teste do MTT, uma possível interação entre o complexo metálico estudado (cobre) não deve ser excluída. Além disso os autores levantam a hipótese de que se talvez a placa de células tratada fosse lavada várias vezes antes de se adicionar o MTT, isso talvez poderia remover quaisquer compostos residuais do complexo metálico que pudessem interferir. Entretanto, os autores também explicitam o fato de que culturas de células não suportariam as extensas lavagens.

## 5.2. TESTE DO MICRONÚCLEO PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL GENOTÓXICO

O teste do micronúcleo foi realizado com os compostos RuLap e RuLau, considerando-se três concentrações de cada;  $\frac{1}{2}IC_{50}$ ,  $IC_{50}$  e  $2x IC_{50}$ . Conforme a Tabela 7, pode-se observar que a média de Células Vero Binucleadas e Micronucleadas (CVBMN) variou entre 3,0 a 7,7 para o composto de RuLap, sendo considerados estatisticamente significativos em relação ao CN e ao RuLau nas mesmas concentrações de 1,0 e 2,0mg L<sup>-1</sup>. Já para o composto RuLau a variação foi um pouco menor, encontrando entre 1,5 a 3,0 CVBMN's nos 3 tratamentos.

**Tabela 7** - Avaliação da atividade genotóxica dos compostos RuLap e RuLau em linhagem celular não tumoral de Vero.

Tratamento	CVBMN/2000CVB (Média e Desvio padrão)
CN	0,5 ± 0,58
CP Doxorrubixina [10,33 µM/ 5,8 mg L <sup>-1</sup> ]	8,0 ± 1,41
RuLap [0,2 µM/ 0,5 mg L <sup>-1</sup> ]	3,0 ± 0,81* †
RuLap [0,4 µM/ 1,0 mg L <sup>-1</sup> ]	6,5 ± 1,29* # †
RuLap [0,8µM/ 2,0 mg L <sup>-1</sup> ]	7,7 ± 0,95* # †
RuLau [0,2µM/ 0,5 mg L <sup>-1</sup> ]	2,5 ± 0,57
RuLau [0,4µM/ 1,0 mg L <sup>-1</sup> ]	1,5 ± 0,57#
RuLau [0,8mM/ 2,0 mg L <sup>-1</sup> ]	3,0 ± 0,81* #

CVBMN: Células Vero Binucleadas Micronucleadas; CVB: Células Vero Binucleadas. \*Significativo comparado com o controle negativo ( $p < 0,05$ ). C.N: controle positivo. C.P: controle positivo. # Significativo comparado entre as mesmas concentrações em compostos diferentes ( $p < 0,05$ ). † Significativo entre diferentes concentrações do mesmo composto ( $p < 0,05$ ).

Sendo assim, a avaliação do potencial genotóxico *in vitro* dos compostos analisados revelaram que o composto RuLau se mostrou menos genotóxico (principalmente em baixas concentrações) que o composto RuLap, uma vez que a presença desses CVBMN's foi significativa em todas as concentrações para o complexo RuLap. Apesar de se observar um aumento do número de CVBMN's nas concentrações de 0,5mg L<sup>-1</sup> e 1,0mg L<sup>-1</sup> do composto RuLau em relação ao controle negativo, este aumento não foi considerado estatisticamente significativo. Quando as mesmas concentrações dos dois compostos foram comparadas, observou-se diferença significativa entre a concentração 1,0 mg L<sup>-1</sup> entre RuLap e RuLau e também entre as concentrações de 2,0 mg L<sup>-1</sup>, sugerindo um maior potencial genotóxico para o composto RuLap. Quando se comparou os resultados entre as diferentes concentrações de um mesmo composto, para o composto de RuLau, não houve diferença significativa entre nenhuma das concentrações de RuLau testadas. Porém quando o complexo RuLap foi avaliado, observou-se diferença significativa entre as concentrações de 0,5 mg L<sup>-1</sup> e 2,0 mg L<sup>-1</sup> e também entre as concentrações de 0,5 mg L<sup>-1</sup> e 1,0 mg L<sup>-1</sup>, sugerindo que a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> apresenta menor potencial genotóxico se comparado a concentração mais alta.

Como já observado na literatura, protótipos antineoplásicos com presença de ligantes de naftoquinonas, apresentam baixa toxicidade quando expostos à eritrocitos humanos. Este mecanismo seletivo capaz de não afetar linhagens celulares não tumorais, pode ser explicado pelo fato que esses ligantes estão ligados diretamente com a inibição das topoisomerases, desencadeando a apoptose celular, interferindo assim no desenvolvimento das neoplasias (MENG e DING, 2001). Esses dados corroboram com dados já obtidos na literatura, onde compostos de rutênio coordenados a aminoácidos foram submetidos ao teste do micronúcleo e em baixas concentrações não induziram dano genotóxico (CARNIZELLO et al., 2018 e CHEQUER, 2008). Em um estudo realizado por Souza (2014), observa-se que os compostos de rutênio (descrever as fórmulas) similares aos aqui testados também não induziram dano genotóxico quando testados na linhagem não tumoral V79, uma vez que a frequência dos MN's foi quase nula.

Em contrapartida, o complexo RuLap, apesar de muito similar ao composto RuLau, apresenta uma pequena diferença em sua estrutura molecular, que consiste em uma cadeia carbônica adicional, e como mencionado anteriormente, em testes previamente realizados por Oliveira et al. (2017), esta cadeia carbônica sugere uma maior interação com o DNA celular. Apesar da forte interação com DNA, se comparado ao complexo baseado em

Lausona, o complexo coordenado à Lapachol, confere maior toxicidade quando testado frente às linhagens não tumorais (OLIVEIRA et al., 2017), assim como observado no composto anteriormente citado, KP1019, que mostrou forte interação com DNA, provocando lesões diferentes daquelas promovidas pela cisplatina, o que também pode explicar sua forte ação citotóxica (ALESSIO et al., 1997; MALINA et al., 2001).

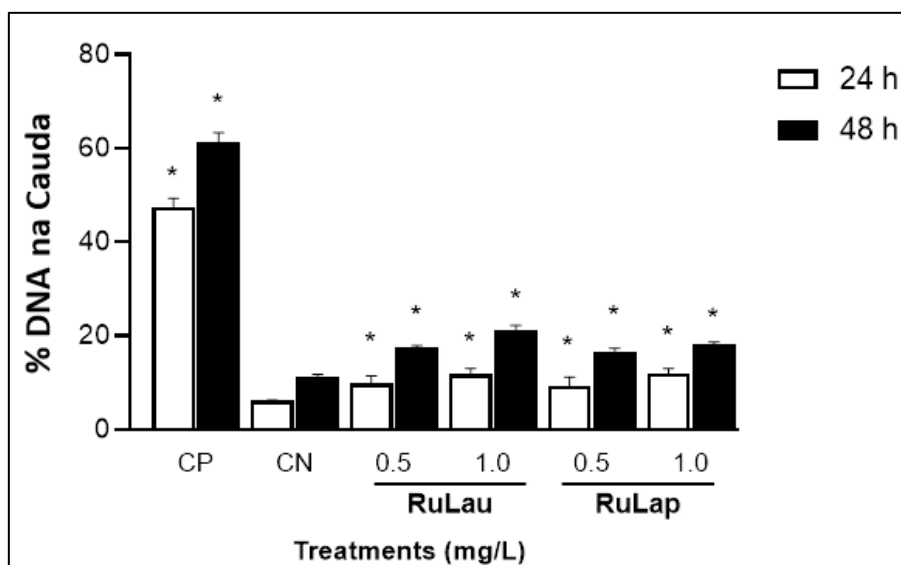
Um dos principais fatores que podem modificar os genes responsáveis pelo reparo do DNA, são mutações resultantes da quebra cromossômica devido ao não reparo ou reparo incorreto de lesões do DNA (FENECH, 2005 e BONASSI et al., 2007). A relação entre formação de MN e o desenvolvimento de câncer é apoiada por inúmeras observações, tais como: uma maior frequência deste biomarcador em pacientes com câncer não tratados e em indivíduos afetados por doenças congênitas propensas ao câncer (FENECH, 2002); a presença de frequências elevadas de MNs na mucosa oral, utilizada como biomarcador de câncer em exames clínicos quimiopreventivos (VAN SCHOOTEN, 2002); a correlação existente entre agentes genotóxicos indutores de MN e carcinogênese, por exemplo, radiação ionizante e ultravioleta (CHANG, 1997), e por fim, a correlação inversa entre a frequência de MN e a concentração sanguínea e/ou dieta ingerida de certos micronutrientes, associados com risco reduzido de câncer, tais como folato, cálcio, vitamina E e ácido nicotínico (FENECH et al., 2005).

A alta confiabilidade e o baixo custo da técnica do MN têm contribuído para o uso desta Técnica cada vez mais (BONASSI et al., 2006). Em estudos atuais, observa-se que a frequência de micronúcleo não é somente um indicativo de dano genético, mas também um marcador precoce de carcinogênese (BONASSI et al., 2007).

Dentro deste contexto, é clara a importância do estudo do potencial genotóxico dos diversos compostos aos quais os organismos podem se expor durante a quimioterapia. Obviamente, um evento mutagênico não necessariamente leva ao desenvolvimento do câncer, porém, a detecção da atividade mutagênica é um importante indício para a avaliação do risco à doença de forma precoce.

### 5.3. ENSAIO COMETA PARA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL GENOTÓXICO

Os resultados obtidos da avaliação da atividade genotóxica dos compostos RuLau e RuLap pelo ensaio do cometa, estão mostrados na figura 27 abaixo.



**Figura 27** - Avaliação da antigenotoxicidade dos compostos de RuLau e RuLap pelo ensaio do cometa em células Vero, pré-tratadas, usando o parâmetro de % de DNA na cauda. Legenda: CP controle positivo ( $\frac{1}{2}$ IC50 doxorubicina =  $[2,9 \text{ mg L}^{-1}]$ ); CN controle negativo. \* $p < 0,001$  comparado ao controle positivo; \* $p < 0,05$  comparado ao controle negativo

As células não tumorais Vero expostas às concentrações de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  do complexo RuLau mostraram 9,8% e 11,8% de danos do DNA, respectivamente, no tempo de exposição de 24h, enquanto o controle negativo apresentou apenas 6,22%, com dados estatisticamente significantes em relação ao controle negativo. Para este mesmo composto, sob as concentrações de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  e no tempo de exposição de 48h, as células expostas mostraram 17,4% e 21,1% de danos ao DNA, respectivamente, enquanto o controle negativo apresentou 11,2%.

Já para o complexo de RuLap, as células expostas às concentrações de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  mostraram 9,4% e 12,03% de danos no DNA, respectivamente, no tempo de exposição de 24h, enquanto que o controle negativo apresentou 6,22% de dano. Para este mesmo composto, as células expostas às concentrações de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  mostraram 16,7% e 18,1% de danos no DNA, respectivamente, no tempo de exposição de 48h.

No ensaio cometa portanto, observou-se atividade genotóxica tanto do complexo RuLau quanto do complexo RuLap, devido ao aumento significativo da porcentagem de danos no DNA para as diferentes concentrações testadas em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). Também foi realizada análise comparativa entre os dois compostos nas mesmas concentrações e não se observou diferença significativa entre os compostos.

Em todos os tratamentos, pode-se observar que houve dano à molécula de DNA das células testadas com os compostos RuLau e RuLap. Ambos os complexos induziram lesões significativas no DNA das células não tumorais de VERO quando testados através do ensaio cometa. Este ensaio é considerado um teste sensível e de custo relativamente baixo, capaz de avaliar a genotoxicidade que detecta danos primários ao DNA induzidos por uma série de agentes químicos, como agentes intercalantes, alquilantes e oxidantes (WONG et al., 2005; COLLINS, 2004).

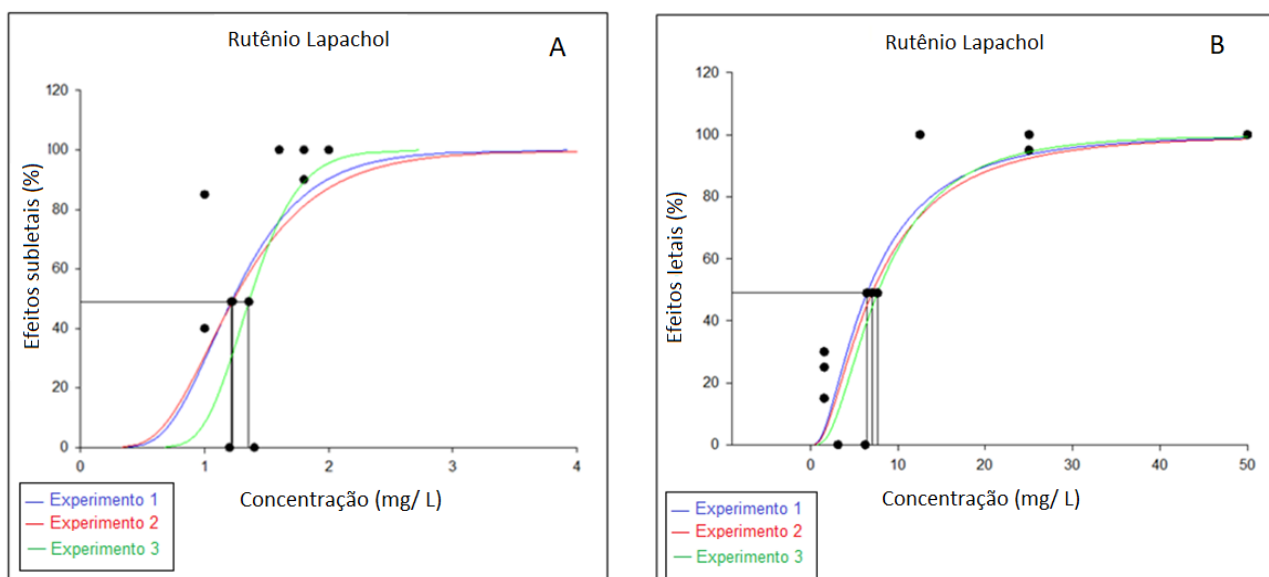
Em alguns trabalhos, complexos de rutênio (II) coordenados a aminoácidos induziram dano à molécula de DNA (LI et al., 2012; WU et al., 2012; FRIDMAN e LOWE, 2003), assim como os resultados obtidos no presente estudo. Já, em resultados provenientes de estudos anteriores do mesmo grupo de pesquisa, os quais avaliam o potencial genotóxico de complexos de rutênio (II), frente à células não tumorais de linfócitos humanos, o complexo de rutênio cis-[Ru(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sub>2</sub>(S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), por exemplo, causou danos ao DNA em concentrações de 0,15 µM, 1,5 µM e 150 µM (Veloza-Sá et al., 2020). Também no estudo de Mello-Andrade et al. (2018), complexos de rutênio [Ru(L-Met)(bipy)(dppb)]PF<sub>6</sub> e [Ru(L-Trp)(bipy)(dppb)]PF<sub>6</sub> testados em células sanguíneas de camundongos não mostraram diferença significativa de porcentagem de DNA na cauda dos animais tratados com ambos os complexos nas concentrações de 2 mg. Kg<sup>-1</sup> e 6 mg. Kg<sup>-1</sup> se comparados ao controle negativo.

#### **5.4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH**

Após realização dos testes de MTT e teste do vermelho neutro, teste de micronúcleo, e teste cometa, testes de segurança toxicológica usando-se *zebrafish* foram realizados com os complexos RuLap e RuLau. O FET foi utilizado para registrar a mortalidade e os efeitos sub-letais provocados por diferentes concentrações dos compostos. Para os compostos RuLap e RuLau, as concentrações testadas no experimento, foram: 1,0 mg L<sup>-1</sup>; 1,2 mg L<sup>-1</sup>; 1,4 mg L<sup>-1</sup>; 1,6 mg L<sup>-1</sup>; 1,8 mg L<sup>-1</sup> e 2,0 mg L<sup>-1</sup>, correspondendo a 0,025 µM, 0,05 µM, 0,1 µM,

0,2  $\mu\text{M}$ , 0,4  $\mu\text{M}$  e 0,8  $\mu\text{M}$  respectivamente. Lembrando que todas essas faixas de concentrações foram determinadas para os testes, após um primeiro experimento de cada composto, denominado *Range finding*, todas inicialmente baseadas nos valores de  $\text{IC}_{50}$ . Foi realizado adicionalmente, teste de toxicidade aguda com embriões de *zebrafish*, frente à exposição dos compostos RuAc, RuCwPhen e RuCwbipy (Apêndice 3).

Na figura 28, observa-se o percentual de efeitos subletais após 96hpf do composto RuLap, onde foram plotadas 3 diferentes curvas, que consistem na realização de três experimentos independentes (Experimento 1, Experimento 2 e Experimento 3). Lembrando que os resultados foram bastante similares, já que houve sobreposição das curvas, conforme mostrado na figura abaixo.

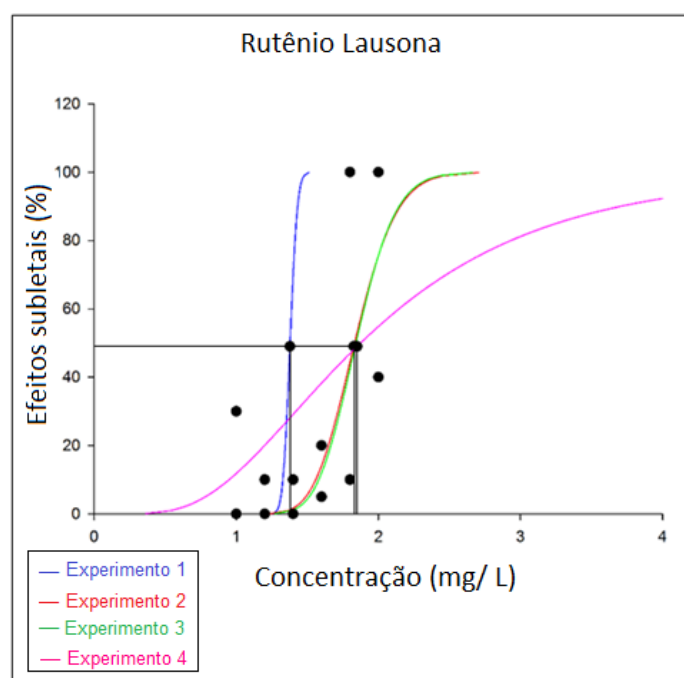


**Figura 28** - Distribuição percentual dos efeitos subletais (A) e letais (B) do composto RuLap após 96hpf em embriões de *Zebrafish*. ( inserir A e B nas figuras)

Observa-se na figura 28 A, que composto RuLap apresentou aproximadamente 50% dos efeitos subletais malformações na concentração de  $1,32 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0,53 \mu\text{M}$ ) e provocou morte de 50% desses embriões testados na concentração de  $7,2 \text{ mg L}^{-1}$  ( $2,88 \mu\text{M}$ ) em todos os três experimentos independentes realizados (Experimento 1, Experimento 2 e Experimento 3). Isso nos mostra que mesmo em concentrações reduzidas, o composto é capaz de provocar malformações bem como provocar morte desses embriões. Em contrapartida, no estudo realizado por Velozo-Sá et al. (2019), observou-se que os complexos de rutênio coordenados com as fosfinas  $[\text{Ru}(\text{N-S})(\text{dppm})_2]\text{PF}_6$  (1),  $[\text{Ru}(\text{N-}$

S)(dppe)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (2), [Ru(N-S)<sub>2</sub>(dppp)] (3) e [Ru(N-S)<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (4), que foram testados, semelhantes às fosfinas ligantes ao complexo de rutênio deste estudo, não foram capazes de causar mortalidade de forma significativa nem mesmo na maior concentração utilizada a 100 mg L<sup>-1</sup> (88 μM), não sendo possível calcular o valor LC<sub>50</sub>. As concentrações testadas por Velozo-Sá et al. (2019) responsáveis por causar 50% da morte dos embriões foi sempre acima de 100 mg L<sup>-1</sup> (88 μM), ou seja, concentrações bem maiores em relação às testadas neste trabalho. Concentrações elevadas também foram observadas no estudo de Mello-Andrade et al. (2018), no teste de FET, no qual complexos de rutênio coordenados a aminoácidos apresentaram valores de LC<sub>50</sub> em torno de 46 μM após 72hpf.

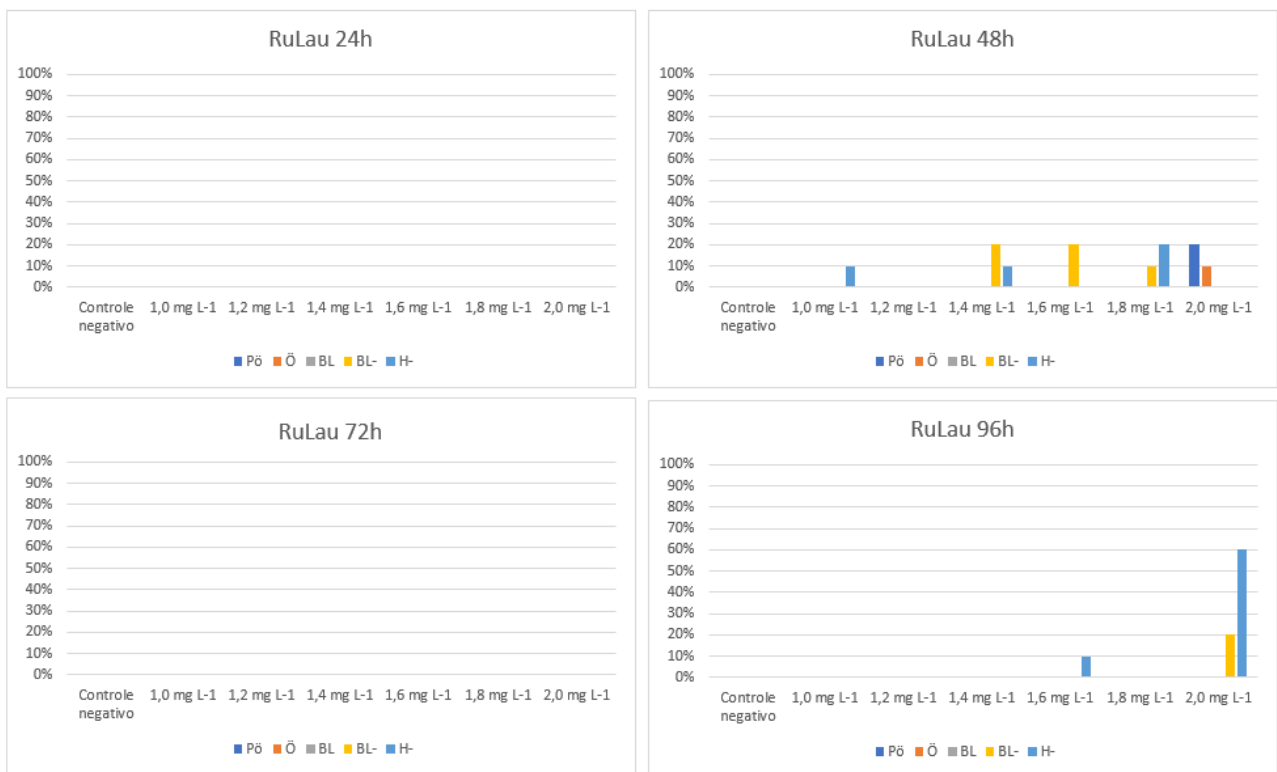
Para o complexo de RuLau, foi possível observar efeitos subletais em embriões testados somente nas concentrações de 10% e 50% (EC<sub>10</sub> e EC<sub>50</sub> respectivamente) conforme figura 29, não sendo possível estabelecer um gráfico contendo valores da porcentagem de efeitos letais, uma vez que o composto não causou letalidade dos embriões testados.



**Figura 29-** Distribuição percentual dos efeitos sub-letais do composto RuLau após 96hpf em embriões de *Zebrafish*.

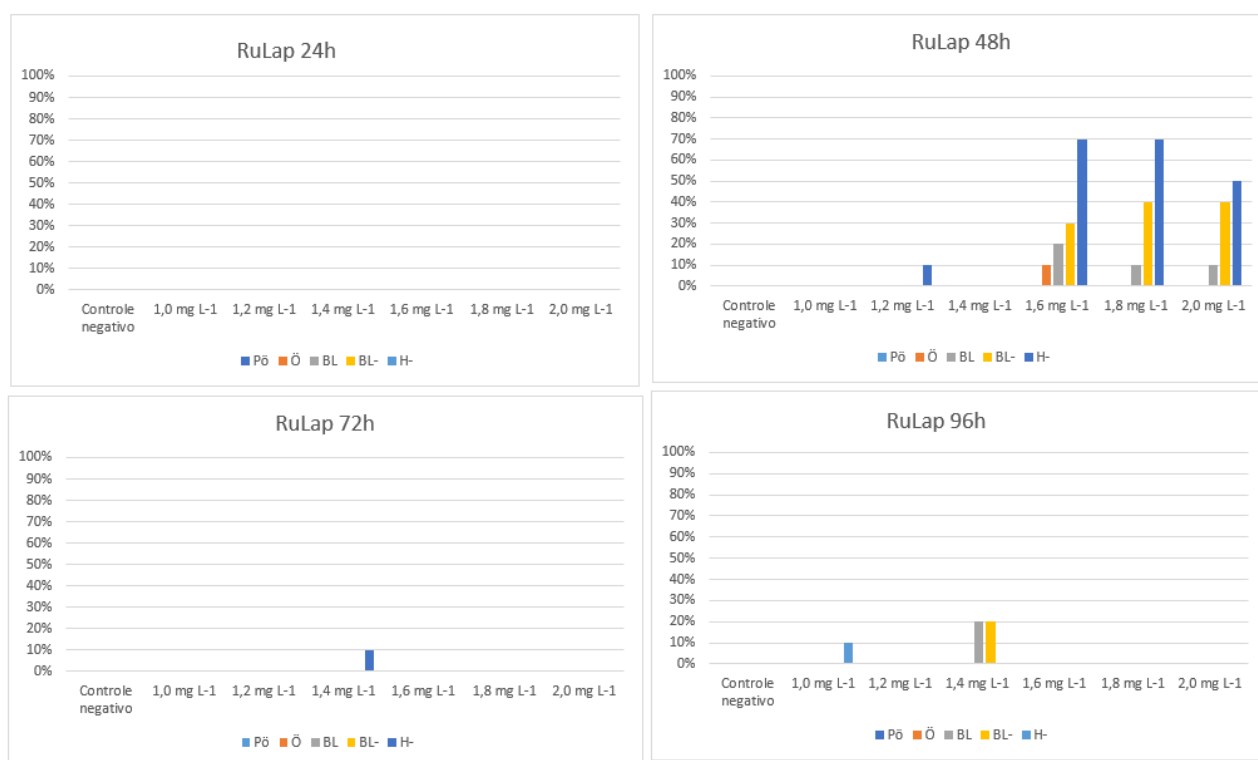
A figura 30 mostra o percentual de efeitos subletais encontrados nos embriões tratados com RuLau em 24, 48, 72 e 96 horas. Nos períodos de 24h e 72h, não foi observado nenhum efeito subletal nos embriões. No tempo de 48h, os efeitos subletais

foram observados entre 10 a 20% dos embriões expostos, sendo os efeitos subletais mais frequentes, a diminuição dos batimentos cardíacos em 3 concentrações diferentes, 1,0; 1,4 e 1,8 mg L<sup>-1</sup> apresentando os percentuais de 10%, 10% e 20%, respectivamente e a diminuição da circulação sanguínea nas concentrações de 1,4; 1,6 e 1,8 mg L<sup>-1</sup> apresentando os percentuais de 20%, 20% e 10% respectivamente. Já no tempo de exposição de 96h, apenas 10% dos embriões expostos apresentaram diminuição dos batimentos cardíacos na concentração de 1,6 mg L<sup>-1</sup>, porém na concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup>, esse mesmo efeito subletal ocorreu em 60% dos embriões expostos. Para este complexo, não foi observada diferença estatística entre os eventos em nenhum dos tempos de exposição. Quanto aos efeitos letais, o complexo de RuLau não apresentou letalidade sobre os embriões em nenhuma das concentrações testadas.



**Figura 30** - Porcentagem de efeitos subletais do composto RuLau em embriões de zebrafish nos tempos de exposição de 24h a 96hpf. Legenda: Pö (Edema de pericárdio); Ö (Edema de saco vitelínico); BL (Parada da circulação sanguínea); BL- (diminuição da circulação sanguínea) e H- (diminuição dos batimentos cardíacos).

Conforme a figura 31, o composto RuLap apresentou efeitos subletais a partir do período de exposição de 48h em todas as repetições dos testes, sendo que no tempo de exposição de 72h, o único efeito subletal observado foi a diminuição dos batimentos cardíacos em 10% dos embriões na concentração de 1,4 mg L<sup>-1</sup>. No período de 48h foram observados quatro tipos de efeitos subletais. Na concentração de 1,2 mg L<sup>-1</sup>, foi observado somente a diminuição dos batimentos cardíacos em 10% dos embriões e esse efeito subletal atingiu 70% dos embriões testados com o composto RuLap nas concentrações de 1,6 e 1,8 mg L<sup>-1</sup> e caiu para 50% na última concentração testada de 2,0 mg L<sup>-1</sup>. Com a diminuição dos batimentos cardíacos, consequentemente houve a diminuição da circulação sanguínea atingindo 30%, 40% e 40% dos embriões testados nas mesmas concentrações 1,6, 1,8 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>. Já no tempo de exposição de 96h, apenas 10% dos embriões expostos apresentaram diminuição dos batimentos na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup>, e na concentração de 1,4 mg L<sup>-1</sup>, 20% dos embriões sofreu diminuição da circulação sanguínea.



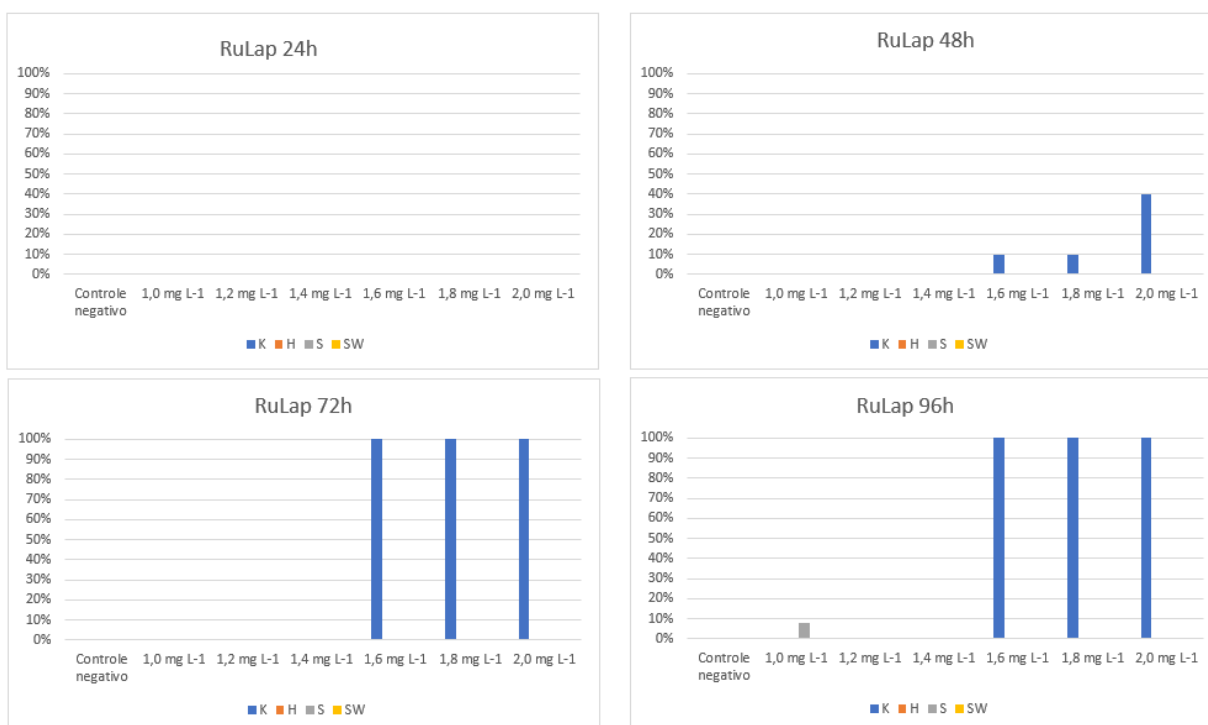
**Figura 31** - Porcentagem de efeitos subletais do composto RuLap em embriões de zebrafish nos tempos de exposição de 24h a 96h. Legenda: Pö (Edema de pericárdio); Ö (Edema de saco vitelínico); BL (Parada da circulação sanguínea); BL- (diminuição da circulação sanguínea) e H- (diminuição dos batimentos cardíacos).

No tempo de exposição de 48h foi realizada análise para avaliar a diferença entre os eventos avaliados e observou-se que diminuição da frequência cardíaca e diminuição dos

batimentos foram os mais predominantes, sendo que a diminuição da circulação sanguínea ocorreu com maior frequência. Não foi observada diferença estatística entre os eventos analisados nos tempos de exposição de 24h, 72h e 96h.

O RuLap apresentou toxicidade aguda a partir do período de exposição de 48hpf em todas as repetições dos testes e em todas as concentrações testadas. No período de 24h não foi observado nenhum efeito subletal nos embriões. Já nos tempos de 48h e 72h, menos de 10% dos embriões expostos apresentaram efeitos subletais, sendo que dentre os efeitos subletais avaliados (edema de pericárdio, edema de saco vitelínico, parada total da circulação sanguínea, diminuição da circulação sanguínea e diminuição dos batimentos cardíacos), os efeitos que foram mais frequentes foram diminuição da circulação sanguínea, parada completa da circulação e parada dos batimentos cardíacos, sempre nas concentrações acima de 1,6 mg L<sup>-1</sup>. Na exposição de 96h, os efeitos subletais ocorreram a partir da concentração inicial de 1,0 mg L<sup>-1</sup>, diferentemente dos outros tempos de exposição, salientando ainda que o efeito subletal de diminuição dos batimentos cardíacos foi observado em um pouco mais de 10% dos embriões expostos.

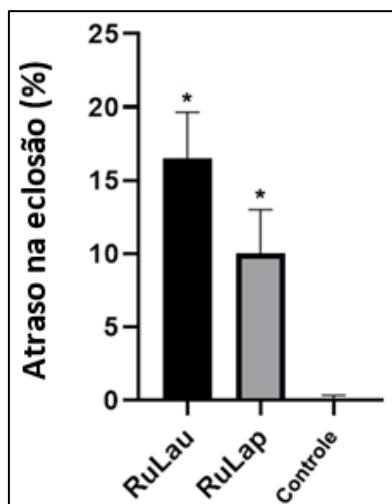
Conforme observado na figura 32, o composto RuLap foi o único composto que apresentou efeitos letais nos embriões testados.



**Figura 32** - Porcentagem de efeitos letais do composto RuLap em embriões de zebrafish nos tempos de exposição de 24h a 96h. Legenda: K (Embrião coagulado); H (Parada dos batimentos cardíacos); S (ausência de somitos) e SW (cauda não detectada).

No tempo de exposição de 48h observa-se que houve morte de 10% embriões a partir da concentração de 1,6 mg L<sup>-1</sup>, e na concentração mais alta (2,0 mg L<sup>-1</sup>), 40% dos embriões morreram. Já nos períodos de 72h e 96h, o composto RuLap provocou 100% de letalidade desses embriões, sendo que na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> após 96h do experimento, não houve formação de somitos em 10% dos embriões. Se considerarmos que na Figura 32, a maioria dos efeitos subletais mostrados sugerem que esses embriões sofreram diminuição da circulação sanguínea e morreram devido à parada cardíaca. Após análise estatística dos eventos ocorridos, observou-se que nos tempos de 72h e 96h, a mortalidade ocorreu de forma frequente nas concentrações testadas, bem como não houve diferença significativa entre a ocorrência de mortalidade e demais efeitos letais ocorridos.

Quanto à taxa de eclosão, ambos os compostos provocaram atraso significativo nas taxas de eclosão, quando comparados ao controle negativo. Aproximadamente 16% dos embriões expostos ao complexo RuLau não eclodiram após 72hpf e para o complexo RuLap, 10% dos embriões não eclodiram após 72hpf, conforme figura abaixo (Figura 33). Observa-se que o complexo de RuLau apresentou maior número de embriões que não eclodiram após 72h, porém deve-se lembrar que essa taxa só foi superior quando comparado ao RuLap, onde os embriões foram expostos ao complexo RuLap e apresentaram 100% de mortalidade após 72h de tratamento.



**Figura 33** - Embriões de zebrafish que eclodiram após 72hpf. \*Significativo comparado com o controle negativo ( $p < 0,05$ ).

No estudo realizado por Haghdoost et al. (2017), os compostos de rutênio areno ( $[\text{Ru}(\eta^6\text{-benzene})(\text{N-O})\text{Cl}]$ ) com o ligante de amina 2-hydroxy-1-naphthaldehyde provocou

morte além de induzir atraso na eclosão desses embriões, na concentração de 40  $\mu\text{M}$ , os quais eclodiam apenas após 72hpf / 96hpf e não a partir de 48hpf, assim como foi observado nos compostos de rutênio testados neste presente estudo. Em outro estudo de Velozo-Sá et al. (2019), compostos de rutênio coordenados a fosfinas [Ru(N-S)(dppm)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (1) e [Ru(N-S)(dppe)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (2), foram testados em embriões de *zebrafish* e provocaram atraso na eclosão, nas concentrações mais altas (41,4 mg L<sup>-1</sup> e 100 mg L<sup>-1</sup>). Porém, apesar disso, ao final do experimento estes embriões eclodiram (VELOSO-SA et al., 2019).

A Tabela 8 descreve as concentrações de EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub>, LC<sub>10</sub> e LC<sub>50</sub> (EC<sub>10</sub> - Concentração do composto para qual 10% do efeito é observado; EC<sub>50</sub> - Concentração do composto para qual 50% do efeito é observado; LC<sub>10</sub> - Dose letal mediana de 10% dos embriões; LC<sub>50</sub> – Dose letal mediana de 50% dos embriões) dos complexos de rutênio RuLap e RuLau, que foram posteriormente utilizadas como concentração de exposição para o ensaio de toxicidade de retina em embriões de *zebrafish*.

**Tabela 8** - Média dos valores de EC e LC em mg L<sup>-1</sup> após realização do FET.

MÉDIA DOS VALORES DE EC E LC				
COMPOSTOS	EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>	LC <sub>10</sub>	LC <sub>50</sub>
RuLap	1,02	1,32	2,53	7,2
RuLau	1,27	1,7	-	-

EC<sub>10</sub> - Concentração do composto para qual 10% do efeito é observado; EC<sub>50</sub> - Concentração do composto para qual 50% do efeito é observado; LC<sub>10</sub> - Dose letal mediana de 10% dos embriões; LC<sub>50</sub> – Dose letal mediana de 50% dos embriões)- : Não foi possível estabelecer o valor de LC, uma vez que o composto não causou letalidade.

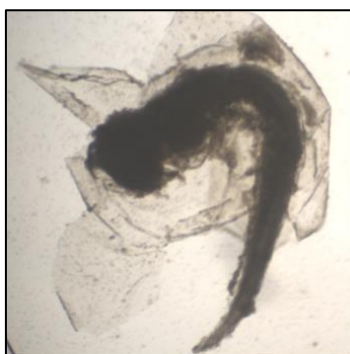
As concentrações de EC e LC mostraram que somente o composto de rutênio RuLap apresentou toxicidade aguda nos embriões. No estudo de Haghdoost et al. (2017), complexos de rutênio ([Ru( $\eta$  6 -benzene)(N-O)Cl]) com o ligante de amina: furfurilamina, hexilamina, ciclohexanometilamina e benzilamina foram testado em embriões de *zebrafish*, e as concentrações de EC e LC encontradas variaram de 1,8 a 20mg L<sup>-1</sup>. Quando comparados à cisplatina, esses dados se tornam mais discrepantes, uma vez que a

cisplatina induziu subletalidade e letalidade em concentrações de até  $5\mu\text{g L}^{-1}$  (HAGHDOOST et al., 2017).

No estudo recente realizado por Velozo-Sá et al. (2019), os complexos de rutênio coordenados à fosfinas  $[\text{Ru}(\text{lap})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$  e  $[\text{Ru}(\text{lau})(\text{dppb})(\text{fen})]\text{PF}_6$  não mostraram toxicidade significativa nos embriões de *zebrafish* testados, mesmo utilizando concentrações mais altas. Estes compostos testados por Velozo-Sá et al. (2019), apresentam estrutura semelhante à estrutura dos compostos RuLap e RuLau testados neste presente estudo, pois ambos apresentam em sua estrutura ligantes de naftoquinonas. Estes ligantes de naftoquinonas apresentam uma fração hidrofílica que leva a um menor impedimento estérico da molécula, o que acaba gerando menor toxicidade aos embriões expostos (WEN et al., 2010). Apesar de não se mostrarem tóxicos, estes complexos de rutênio apresentaram um atraso na sua eclosão (após 72hpf). Nos estudos conduzidos por Brown et al. (2009) e Ou et al. (2007), complexos de rutênio coordenados à naftoquinonas e também complexos de platina, quando testados em embriões de zebrafish, induziram malformações tanto na cabeça quanto nos olhos em concentrações menores que  $50\text{ mg L}^{-1}$ .

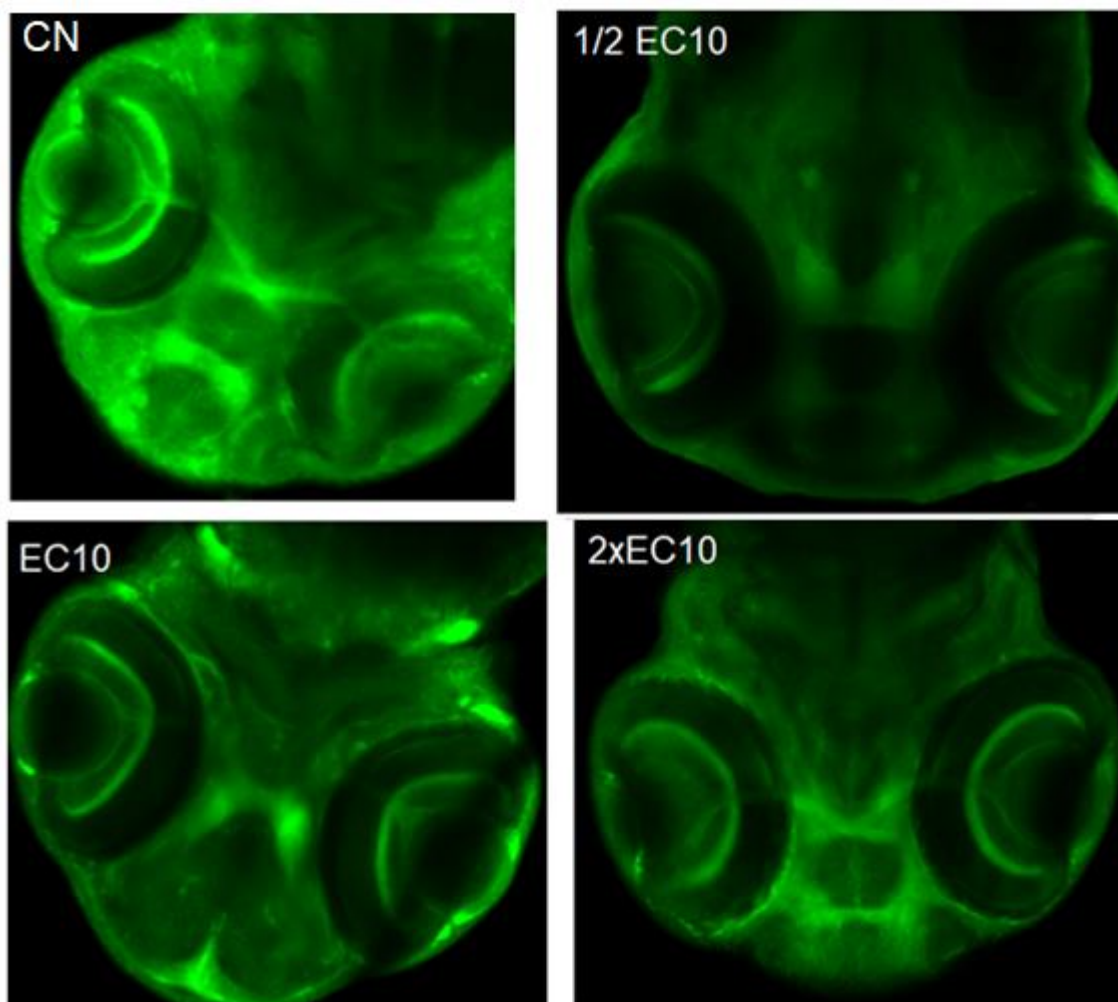
### 5.5. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE RETINA EM LARVAS DE ZEBRAFISH

Para o teste de toxicidade de retina, foram selecionados os compostos de RuLap e RuLau. Para o experimento realizado com o composto RuLap, não foi possível a obtenção de resultados, uma vez que o composto contendo Lapachol mostrou uma interação com a substância PTU que pode ter provocado uma toxicidade suficientemente letal para o embrião, levando-o a morte antes da finalização do experimento (Figura 34).



**Figura 34** - Embrião de zebrafish em processo de decomposição antes mesmo da completa eclosão. \*A morte dos embriões expostos ao composto RuLap ocorreu em todas as concentrações testadas ( $\text{EC}_{25}$ ,  $\text{EC}_{50}$  e  $\text{EC}_{75}$ ). Fonte: Autora.

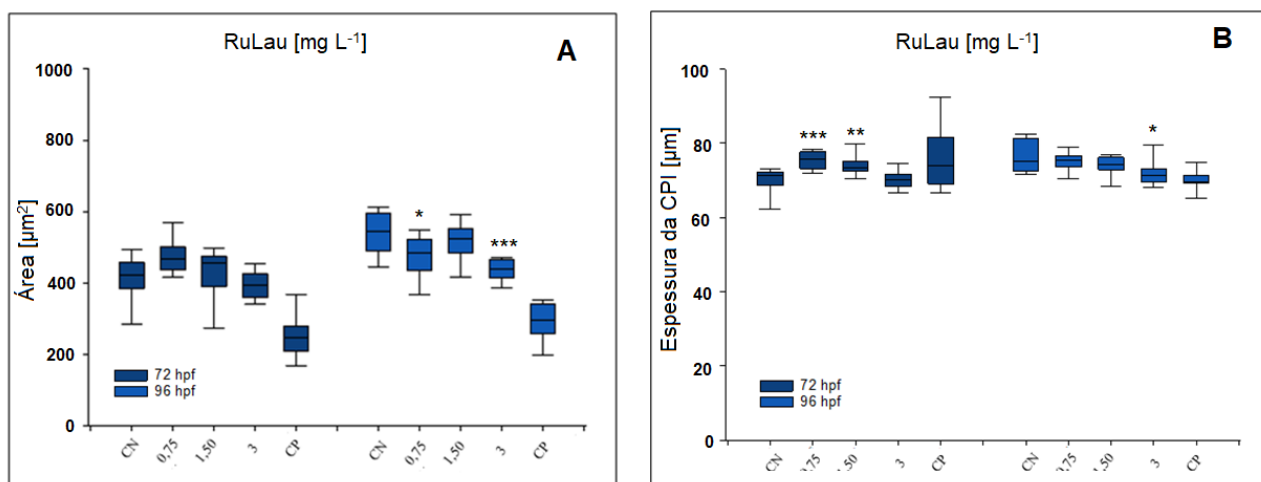
Os resultados do ensaio de retina de embriões de *zebrafish* com RuLau são mostrados na Figura 35 para todas as concentrações testadas ( $\frac{1}{2}EC_{10}$ ,  $EC_{10}$  e  $2x EC_{10}$ ). Nesta figura, o composto RuLau nas duas primeiras concentrações testadas, não apresenta diferença morfológica em relação ao controle negativo.



**Figura 35** - Efeitos retino morfológicos de embriões de *zebrafish* expostos a diferentes concentrações dos complexos de rutênio RuLau, corados com cumarina 6. As fotos foram tiradas a 72 hpf com um microscópio laser confocal. \*Legenda. CN: Controle negativo;  $EC_{10}$ : 1,50 mg/L;  $\frac{1}{2} EC_{10}$ : metade da  $EC_{10}$ ;  $2x EC_{10}$ : dobro da  $EC_{10}$ .

Apesar de que quase nenhuma alteração morfológica e na intensidade de fluorescência foi observada visualmente na figura 35, após análise estatística dos resultados, observaram-se alterações significativas em duas concentrações do composto RuLau quando comparadas ao controle negativo.

A maior concentração testada ( $3 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi a responsável por provocar uma maior alteração morfológica nas retinas dos embriões. Essa alteração consiste em uma redução de aproximadamente  $200 \mu\text{m}^2$  da área da CPI do embrião tratado quando comparado à área da CPI do controle negativo, e apenas no tempo de exposição de 96h, como mostrado na Figura (Figura 36 A). Além da concentração  $3 \text{ mg L}^{-1}$ , a concentração  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  também foi responsável por provocar uma redução de aproximadamente  $100 \mu\text{m}^2$  na área da CPI, no mesmo tempo de exposição. Já na concentração  $\text{EC}_{10}$  não houve alteração significativa da área da CPI.



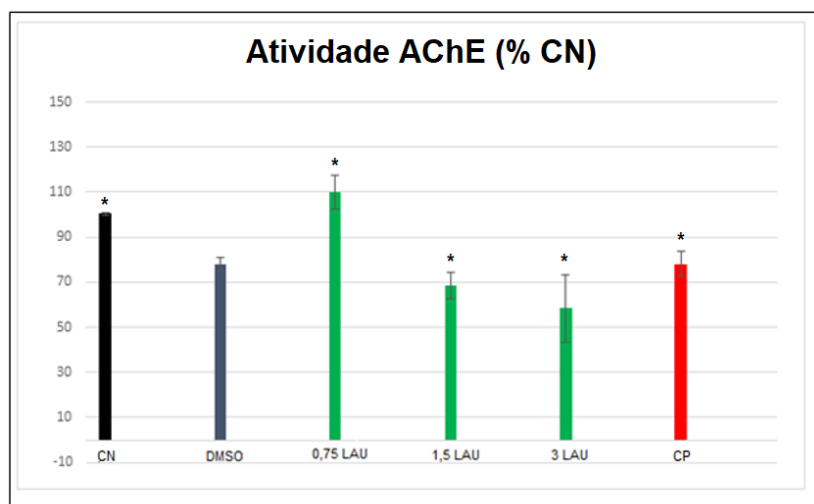
Na Figura 36-B, o composto RuLau provocou alterações significativas da espessura da CPI da retina em duas concentrações do composto. Na concentração de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  observou-se um aumento de  $10 \mu\text{m}^2$  da espessura da CPI quando comparado ao controle negativo, e um aumento de  $20 \mu\text{m}^2$  na concentração de  $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ , ambas as alterações, no mesmo período de exposição de 72h. Com 96h de exposição, houve alteração significativa apenas na concentração mais alta testada, provocando uma redução da espessura da CPI. Quando as diferentes concentrações do composto RuLau foram comparadas entre si, observou-se diferença significativa entre as concentrações de  $0,75 \text{ mg L}^{-1}$  e  $3 \text{ mg L}^{-1}$ ; e também entre as concentrações de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $3 \text{ mg L}^{-1}$ , sugerindo que a concentração de  $3 \text{ mg L}^{-1}$  seja responsável por provocar alterações mais acentuadas na retina dos embriões.

Em um estudo de Stengel et al. (2017), os pesquisadores buscaram padronizar uma técnica para monitorar o potencial neurotóxico de poluentes que estão presentes no ambiente aquático, o qual muitas espécies de animais estão expostas. Nos últimos anos, as técnicas utilizadas para avaliação desse potencial têm frequentemente incluído o *zebrafish* como uma alternativa ao uso de mamíferos (KLÜVER et al., 2015; NOYES et al., 2015; DISHAW et al., 2014; JAREMA et al., 2015), já que os modelos mamíferos exigem maior tempo de exposição bem como o uso de equipamentos e metodologias mais sofisticadas.

Até o momento, sabe-se que o *zebrafish* se mostra como um importante modelo para avaliação do potencial neurotóxico, já que a visualização de mal formações em estruturas presentes nas camadas de células da retina mostram importantes aspectos que caracterizam a neurotoxicidade (KAIS et al., 2015 e STENGEL et al., 2017). Apesar disso, é importante salientar que os testes de neurotoxicidade em peixes ainda não alcançaram a padronização a nível internacional. As alterações morfológicas na arquitetura das células presentes na retina de peixes são raramente documentadas na literatura, mas já se observou que efeitos neurotóxicos estão associados à malformações na estrutura ocular dos peixes (CHANRASEKAR et al., 2011).

## **5.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROTÓXICO EM LARVAS DE ZEBRAFISH**

Os embriões foram expostos aos compostos de rutênio nas concentrações de  $\frac{1}{2}$  EC<sub>10</sub>, EC<sub>10</sub> e 2x EC<sub>10</sub> (0,75 mg L<sup>-1</sup>, 1,5 mg L<sup>-1</sup> e 3 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) conforme determinado no FET realizado. Nenhum desses controles solventes DMSO e NaOH teve influência sobre a acetilcolinesterase. As concentrações dos compostos de teste mostraram efeitos significativos, mesmo que a atividade da acetilcolina permanecesse superior a 50% (Figura 37).



**Figura 37** - Atividade da enzima acetilcolinesterase em porcentagem. Legenda: CN: controle negativo; CP: controle positivo.

Quando comparados ao controle positivo, todas as concentrações dos compostos RuLau testadas mostraram diferença estatisticamente significativa. Comparando as 3 concentrações testadas do mesmo composto, observou-se diferença estatística entre as concentrações 0,75mg L<sup>-1</sup> e 3mg L<sup>-1</sup>; e entre as concentrações 3mg L<sup>-1</sup> e 1,5mg L<sup>-1</sup>, sugerindo que a concentração mais elevada (3mg L<sup>-1</sup>), foi a concentração que mais diminuiu a atividade da acetilcolinesterase.

O teste de avaliação do potencial neurotóxico através da inibição da acetilcolinesterase no *zebrafish* já foi descrito na literatura com uso de peixes adultos (KÜSTER, 2005), porém por uma questão de bem-estar animal, hoje busca-se otimizar metodologias que avaliem esses mesmos aspectos, usando-se embriões, reduzindo assim o número de animais por experimento. Quando o efeito da acetilcolinesterase foi avaliado em exposições de substâncias *in vitro*, nenhum efeito foi observado, em contrapartida, a exposição com as mesmas substâncias em embriões, resultou em inibição acentuada da acetilcolinesterase (STENGEL et al., 2017). Em alguns estudos, autores verificaram que mesmo após exposição de embriões à substâncias, esses não apresentaram alterações nos sistemas visuais e olfativos (ASSIS et al., 2012 e SAMANTA et al., 2014). Porém após realização do teste de AChE, com as mesmas substâncias, mostrou-se mais sensível quando comparado ao teste de retina, mostrando inibição da enzima, evidenciando o potencial de neurotoxicidade de algumas substâncias (BUCK et al., 2012, COFFIN et al., 2010).

Apesar de saber que o sistema visual do *zebrafish* é sensível aos efeitos neurotóxicos, deve-se, portanto, incorporar por exemplo, testes de inibição / estimulação da acetilcolinesterase, bem como avaliar possíveis alterações no órgão sensorial desses peixes, que geralmente é formado na linha lateral deste animal. Não excluindo assim, a necessidade de se aprimorar esses testes, para que esses sejam validados juntamente com testes adicionais que possam avaliar outros *endpoints*.

## 6. CONCLUSÕES

Este trabalho investigou os efeitos de dois promissores protótipos e seus precursores baseados em rutênio quanto às suas propriedades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas, bem como avaliou o perfil da toxicidade aguda em embriões de *zebrafish*, neurotoxicidade e toxicidade de retina, sendo este último um método totalmente novo e desenvolvido por Carola Schuller (2019) na Universität Heidelberg.

Os resultados da avaliação do potencial de citotoxicidade mostraram um melhor índice de seletividade do composto de rutênio RuLau, quando comparado ao composto RuLap, uma vez que RuLau apresentou índice de seletividade de 10,91 para a linhagem tumoral HeLa em relação aos outros compostos.

Na avaliação do teste do minicronúcleo *in vitro*, o composto RuLau foi o que apresentou menor potencial genotóxico. Os resultados mostram que em nenhuma concentração testada este composto apresentou genotoxicidade significativa abaixo da concentração de 2 mg L<sup>-1</sup>.

No ensaio cometa *in vitro*, ambos os compostos RuLap e RuLau apresentaram potencial genotóxico, não apresentando diferença entre os tempos de exposição de 24h e 48h.

Nos testes de avaliação do potencial tóxico agudo em embriões de *zebrafish*, o composto RuLau apresentou efeitos subletais menos acentuados quando comparados ao composto RuLap. O composto RuLau não provocou a morte dos embriões nem mesmo nas concentrações mais altas. O composto RuLap foi o único composto que de fato mostrou-se mais tóxico, levando o atraso na eclosão dos embriões e causando também letalidade dos mesmos, antes mesmo de eclodirem.

Na avaliação do potencial neurotóxico através do teste de retina em embriões de *zebrafish*, não houve diminuição significativa da área da CPI nas concentrações mais baixas ( $\frac{1}{2}$  EC<sub>10</sub> e EC<sub>10</sub>), apresentando alterações apenas na concentração mais alta (2x EC<sub>10</sub>), e quando avaliada a espessura da retina, houve um aumento significativo da espessura da retina na concentração mais baixa.

Já na avaliação do potencial neurotóxico através do teste de inibição da acetilcolinesterase, todos as concentrações dos compostos testados induziram a inibição

da enzima, porém a concentração que causou maior redução da atividade da enzima fora a concentração  $3\text{mg L}^{-1}$ , podendo estar relacionada portanto com a indução de efeitos neurotóxicos, mesmo que não acentuados.

## **7. PERSPECTIVAS**

Espera-se repetir os experimentos de acetilcolinesterase, bem como o de toxicidade de retina, para os demais compostos de rutênio que não foram testados.

Espera-se publicar um artigo de síntese dos compostos RuLap e RuLau, juntamente com os testes de toxicidade em embriões de *zebrafish*.

Espera-se publicar um artigo sobre a síntese e potencial de toxicidade aguda de compostos baseados em níquel (parceria com a UFPR).

Espera-se publicar um artigo sobre efeito larvicida dos complexos RuLap e RuLau.

Espera-se publicar o novo protocolo do ensaio cometa desenvolvido neste estudo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABID M.; SHAMSI F.; AZAM A. Ruthenium Complexes: An Emerging Ground to the Development of Metallopharmaceuticals for Cancer Therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**.16, 772–786; 2016.

ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects. **Platinum Metals Review**, 45, 62-69. 2001.

ALESSIO, E. Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. **European Journal of Inorganic Chemistry**, 2017.

ALI, I. et al. Platinum Compounds: A Hope for Future Cancer Chemotherapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 296–306, 2013.

ALLENDE, M. L., CALCATERRA, N. B., VIANNA, M. R., & ZOLESSI, F. R. First Meeting of the Latin American Zebrafish Network. *Zebrafish*, 8(1), 31–33. 2011.

ANGUEYRA, J. M.; KINDT, K. S. Leveraging Zebrafish to Study Retinal Degenerations. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, 19 set. 2018.

ANTONARAKIS, E., & EMADI, A. Ruthenium-based chemotherapeutics: Are they ready for prime time? **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, 66(1), 1-9, 2010.

ARALDI RP; MELO TC, MENDES TB, SÁ-JÚNIOR P, NOZIMA BHN, ITO ET, CARVALHO RF, SOUZA EB, STOCCO RC. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**.2015; 1:1-9.

ASSIS, C. R; LINHARES, A. G; OLIVEIRA, V. M; FRANCA, R. C; CARVALHO; E. V; BEZERRARS; DE CARVALHO, L. B. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Science of the Total Environment** 441:141–150. 2012.

BACANLI M, ANLAR HG, BAŞARAN AA, BAŞARAN N. Assessment of Cytotoxicity Profiles of Different Phytochemicals: Comparison of Neutral Red and MTT Assays in Different Cells in Different Time Periods. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**.14(2):95-107. 2017.

BARBAZUK, W. B; KORF, I.; KADAVI, C.; et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Research**;10(9):1351–1358, 2000.

- BASKAR, R. et al. Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 193–199, 2012.
- BAYNES, J.W.; DOMINICZAK, M.H. **Medical Biochemistry**. 4<sup>a</sup> Ed. Columbia, South Carolina, USA: Elsevier, 2014.
- BECCENERI, A. B; POPOLIN, C. P; PLUTIN, A. M.; MAISTRO, E. L.; CASTELLANO, E. E.; BATISTA, A. A.; COMINETTI, M. R. The *trans*-[Ru(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(*N,N*-dimethyl-*N'*-thiophenylthioureato-*k*<sup>2</sup>O,S)(bipy)]PF<sub>6</sub> complex has pro-apoptotic effects on triple negative breast cancer cells and presents low toxicity *in vivo*. **Journal of inorganic Biochemistry**, v. 186, p. 70–84, sep. 2018.
- BEDNARCZUK, V. et al. Testes in Vitro E in Vivo Utilizados Na Triagem Toxicológica Tests in Vitro and in Vivo Used in the Toxicological Screening of Natural Products. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 1518–5192, 2010.
- BERGAMO, A. et al. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 90–99, 2012.
- BERGAMO A., SAVA G. Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases. **Chemical Society Reviews**. 44:8818–8835, 2015.
- BERGAMO, A.; MASI, A.; PEACOCK, A. F. A.; HABTEMARIAM, A.; SADLER, P.J.; SAVA; G. In vivo tumour and metastasis reduction and in vitro effects on invasion assays of the ruthenium RM175 and osmium AFAP51 organometallics in the mammary cancer model. **Journal of inorganic biochemistry**. vol 104, 1, 79-86, 2009.
- BERNARDOS, R.L., BARTHEL, L.K., MEYERS, J.R., RAYMOND, P.A. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells. **Journal of Neuroscience**. 27. 2007.
- BERTRAND, C. et al. Zebrafish Acetylcholinesterase Is Encoded by a Single Gene Localized on Linkage Group 7. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 1, p. 464–474, 5 jan. 2001.
- BLAZEVIC, A. et al. Electronic State of Sodium *trans*-[Tetrachloridobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (NKP-1339) in Tumor, Liver and Kidney Tissue of a SW480-bearing Mouse. **Scientific Reports**, v. 7, n. December 2016, p. 1–8, 2017.

BLUNDEN, B. M.; LU, H.; STENZEL, M.H. Enhanced delivery of the RAPTA-C macromolecular chemotherapeutic by conjugation to degradable polymeric micelles. **Biomacromolecules**, 14, pp. 4177-4188, 2013.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M.P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCICI, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.;

FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis Advance Access**, v. 28, p.625-631, 2007.

BONASSI, S. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625–631, 18 ago. 2006.

BORENFREUND, E., BABICH, H., & MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicology in Vitro**, 2(1), 1–6. 1988.

BROWN J. D, DUTTA S, BHARTI K, BONNER R. F, MUNSON P. J, DAWID I. BAKHTAR A. L, ONOJAFE I. F, ALUR, R. P, GROSS, J. M. Expression profiling during ocular development identifies 2 Nlz genes with a critical role in optic fissure closure. **Proceeding of the National Academy of Sciences**. 106(5):1462–1467, 2009.

BRAY, F.; JACQUES F.; SOERJOMATARAM I.; SIEGEL R. L.; TORRE L. A; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018.

BUCK LM, WINTER MJ, REDFERN WS, WHITFIELD TT. Ototoxin-induced cellular damage in neuromasts disrupts lateral line function in larval zebrafish. **Hearing Research** 284:67–81. 2012.

BULLOCK, J. L.; CELESTINE, M. J.; HOLDER, A. A. In ruthenium: Synthesis, Physicochemical Properties And Applications; Keeler, G.P., Ed.; **Nova Science Publishers**: New York, pp 3–11, 2014.

- CABALLERO, M. V.; CANDIRACCI, M. Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy. **Journal of Unexplored Medical Data**; 3-8; 2018.
- CALDERÓN-MONTAÑO, J.M., BURGOS-MORÓN, E., ORTA, M.L., & LÓPEZ-LÁZARO, M. Effect of DNA Repair Deficiencies on the Cytotoxicity of Drugs Used in Cancer Therapy - A Review. **Current Medicinal Chemistry**, 21(30), pp.3419–3454. 2014.
- CANTOR, D. Cancer. In: LECOURT, Dominique (Ed.). Dictionnaire de la pensée médicale. Paris: PUF. p. 195-201. 2004.
- CARNIZELLO, A. P.; ALVES, J. M.; DAIANE, E. P.; CAMPOS, J. C. L.; BARBOSA, M. I. F.; BATISTA, A. A.; TAVARES, D. C. Study of the cytotoxic and genotoxic potential of the carbonyl ruthenium(II) compound,  $ct-[RuCl(CO)(dppb)(bipy)]PF_6$  [dppb = 1,4-bis(diphenylphosphino)butane and bipy = 2,2'-bipyridine], by in vitro and in vivo assays. **Journal of applied toxicology**, p. 1-9, nov, 2018.
- CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; DUQUE ZAMBRONE, F. A. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: Uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, p. 289–299, 2004.
- CHABNER, B.A. and ROBERTS Jr., T.G. Timeline: Chemotherapy and the War on Cancer. **Nature Reviews Cancer**, 5, 65-72, 2005.
- CHABNER, B.A. Drug shortages - A critical challenge for the generic drug market. **New England Journal of Medicine**, 365, 2147–2149, 2011.
- CHANDRASEKAR, G; ARNER, A; KITAMBI, S. S; DAHLMAN-WRIGHT, K; LENDAHL, M. A. Developmental toxicity of the environmental pollutant 4-nonylphenol in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology** 33:752–764. 2011.
- CHANG, W. P. et al. Cytogenetic effect of chronic low-dose, low-dose-rate  $\gamma$ -radiation in residents of irradiated buildings. **The Lancet**, v. 350, n. 9074, p. 330–333, ago. 1997.
- CHAUDHARY A, SINGH A. K, SINGH R. V. Investigations of the possible pharmacological effects of organotin(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**. Oct;100(10):1632-1645. 2006.

CHEN, J., WU, Q., HUA, Y. *et al.* Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. **Applied Microbiology and Biotechnology** **101**, 8309–8319 (2017)

CHEQUER, F. M. D. Utilizacao do teste de Micronucleo na avaliacao da toxicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13. **Tese de doutorado**, Universidade de Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2008.

CHHETRI, J.; JACOBSON, G.; GUEVEN, N. Zebrafish—on the move towards ophthalmological research. **Eye**, v. 28, n. 4, p. 367–380, 7 abr. 2014.

CHU, E.;M. D.; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do câncer. In:KATZUNG, B. G. **Farmacologia: básica e clínica**. 9ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, cap.55, p.751-829.

CLARKE, M. J., ZHU, F., & FRASCA, D. R. Non-Platinum Chemotherapeutic Metallopharmaceuticals. **Chemical Reviews**, *99(9)*, 2511–2534. 1999.

COFFIN AB, OU H, OWENS KN, SANTOS F, SIMON JA, RUBEL EW, RAIBLE, DW. Chemical screening for hair cell loss and protection in the zebrafish lateral line. **Zebrafish** 7:3–11. 2010.

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

COLLINS AR. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica et Biophysica Acta** 2014; 1840: 794–800.

DA SILVA, R. S. *et al.* Maternal caffeine intake affects acetylcholinesterase in hippocampus of neonate rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 26, n. 3–4, p. 339–343, maio 2008.

DENIZOT F. & LANG R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**. 89, 271-277. 1986.

DE LIMA, A. P. *et al.* Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptosis by Ruthenium Complex cis-(Dichloro)tetramineruthenium(III) Chloride in Human Lung Carcinoma Cells A549.

**Biological Trace Element Research**, v. 147, n. 1–3, p. 8–15, 6 jun. 2012.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 5–32, 2009.

DILRUBA, S. & KALAYDA, G. Platinum-based drugs: past, present and future. **Cancer chemotherapy and pharmacology**. Vol. 77, n.6, pp. 1103-1124, 2016.

DISHAW, L. V; HUNTER, D. L; PADNOS, B; PADILLA. S; STAPLETON, H. M. Developmental exposure to organophosphate flame retardants elicitsovert toxicity and alters behavior in early life stage zebrafish (Daniorerio). **Toxicological Science**. 142:445–454. 2014.

DOS SANTOS, E. R. et al. Cytotoxic activity and structural features of Ru(II)/phosphine/amino acid complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 182, p. 48–60, maio 2018.

DOS SANTOS, N. A. G. et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 8, p. 1233–1250, 1 ago. 2012.

DUFFY, K. T., MCALEER, M. F., DAVIDSON, W. R., KARI, L., KARI, C., LIU, C. G., ... RODECK, U. Coordinate control of cell cycle regulatory genes in zebrafish development tested by cyclin D1 knockdown with morpholino phosphorodiamidates and hydroxypropylphosphono peptide nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, 33(15), 4914–4921, 2005.

ERDTMANN BA genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVAJ,ERDTMANN B, HENRIQUESJAP. **Genética Toxicológica**. 1 ed. Porto Alegre: Ed. Alconce, 2003. p. 26-27.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. ICH guideline: on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. Disponível em « [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/12/WC\\_500119604.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/12/WC_500119604.pdf). 2012.

FAUSETT, B.V., GOLDMAN, D. A role for alpha1 tubulin-expressing Muller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. **Journal of Neuroscience**. 26, 2006.

FENECH, M. et al. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol,  $\beta$ -carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability—results from a dietary intake and micronucleus index su. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 5, p. 991–999, 1 maio 2005.

FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 504, n. 1–2, p. 131–136, jul. 2002.

FIMBEL, S.M., MONTGOMERY, J.E., BURKET, C.T., HYDE, D.R. Regeneration of innerretinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. **Journal of Neuroscience**. 27. 2007.

Fridman J. S., Lowe S. W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22 9030–9040.

FURRERA, J; SÜSS-FINK, G. Thiolato-bridged dinuclear arene ruthenium complexes and their potential as anticancer drugs, *Coord. Chemical Reviews*. 309. 2016.

GADE, C. In a search of a positive control for the fish embryo retina assay as a tool for alternatives in developmental neurotoxicity testing. **Bachelor thesis**, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2019.

GALLO, M.A. History and scope of toxicology. In Casarett & Doulls. **Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 6ª Edição Nova Iorque. Editora McGraw-Hill. pp. 1-3. 2001.

GERLAI, R.; LEE, V.; BLASER, R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 4, p. 752–761, dez. 2006.

GILMAN, A. The initial clinical trial of nitrogen mustard. **The American Journal of Surgery**, New York, v.105, n. 5, p. 574-578, Maio, 1963.

GLASS, A. S.; DAHM, R. The Zebrafish as a Model Organism for Eye Development. **Ophthalmic Research**, v. 36, n. 1, p. 4–24, 2004.

GOMEZ PEREZ, M., FOURCADE, L., MATEESCU, M. A., & PAQUIN, J. Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. **Analytical Biochemistry**, 535, 43–46. 2017.

GONTIJO AMMC, TICE R. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas In: **Mutagênese Ambiental**. 2003. Canoas: ULBRA.

GRAMAGE, E.; LI, J.; HITCHCOCK, P. The expression and function of midkine in the vertebrate retina. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 4, p. 913–923, fev. 2014.

GRAY, M. P; SMITH, R. S; SOULES, K. A; JOHN, S. W. M; LINK, B. A. The Aqueous Humor Outflow Pathway of zebrafish. **Investigative Ophthalmology & visual science**, v. 50, n. 4, p. 1515 – 1521, 2009.

HAGHDOOST, M. et al. Lipophilicity-antiproliferative activity relationship study leads to the preparation of a ruthenium(II) arene complex with considerable in vitro cytotoxicity against cancer cells and a lower in vivo toxicity in zebrafish embryos than clinically approved c. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 132, p. 282–293, maio 2017.

HARTINGER, C. G. et al. Application of mass spectrometric techniques to delineate the modes-of-action of anticancer metallodrugs. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 14, p. 6186–6199, 2013.

HEFFETER, P.; ATIL, B.; KUSHTRIM, K.; GROZA, D.; KOELLENSPERGER, G.; KÖRNER, W.; JUNGWIRTH, U.; MOHR, T.; KEPPLER, B.; BERGER, W. The ruthenium compound KP1339 potentiates the anticancer activity of sorafenib in vitro and in vivo. **European journal of cancer**. 49 (15): 3366-3375, 2013.

HERLENIUS, E.; LAGERCRANTZ, H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. **Experimental Neurology**, v. 190, p. 8–21, nov. 2004.

HOWLAND, R. D.; MYCEK, M. J. Farmacologia ilustrada. 3.ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2018. Rio de Janeiro, 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Tratamento do Cancer**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tratamento>. Acesso em: 01 jan. 2020.

JAREMA, K. A; HUNTER, D. L; SHAFFER, R. M; BEHL, M; PADILLA, S. Acute and developmental behavioral effects of flame retardants and related chemicals in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology** 52:194–209. 2015.

JEMAL, A. et al. Cancer Statistics, 2008. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 58, n. 2, p. 71–96, 28 jan. 2008.

KAUFFMAN, G. B. et al. Michele Peyrone (1813-1883), discoverer of cisplatin. **Platinum Metals Review**, v. 54, n. 4: 250-256, 2010.

KAIS, B. et al. Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 21, p. 16329–16339, 9 nov. 2015.

KATANIĆ, J; MATIĆ, S.; PFERSCHY-WENZIG, E.M.; KRETSCHMER, N.; BOROJA, T.; MIHAILOVIĆ, V.; STANKOVIĆ, V.; STANKOVIĆ, N.; MLADENOVIĆ, M.; STANIĆ, S.; MIHAILOVIĆ, M.; BAUER, R. Filipendula ulmaria extracts attenuate cisplatin-induced liver and kidney oxidative stress in rats: in vivo investigation and LC-MS analysis. **Food and Chemical Toxicology**, 99, pp. 86-102, 2017.

KATSAROS N, ANAGNOSTOPOULOU A. Rhodium and its compounds as potential agents in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology Hematology**. 42(3):297-308. 2002.

KAGUE, E., GALLAGHER, M., BURKE, S., PARSONS, M., FRANZ-ODENDAAL, T., & FISHER, S. Skeletogenic fate of zebrafish cranial and trunk neural crest. **PloS One**, v. 7, n. 11, p. e47394, 2012.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 8, p. 573–584, 2007.

KIMMEL, C. B., BALLARD, W. W., KIMMEL, S. R., ULLMANN, B. AND SCHILLING, T. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Dev. Dyn.** 203,253-310, 1995.

KIMURA A, MIYATA A, HONMA M. A combination of in vitro comet assay and micronucleus test using human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutagenesis*. 2013; 28: 583–590. LAMMER, E.; CARR, G.; WENDLER, K.; RAWLINGS, J.; BELANGER, S.; BRAUNBECK, T. Is the Fish embryo toxicity test (FET) with the Zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative biochemistry and physiology*. **Toxicology & Pharmacology: CBP**. 149. 169-200, 2009.

KLÜVER N, KÖNIG M, ORTMANN J, MASSEI R, PASCHKE A, KUEHNE R, SCHOLZ, S. The fish embryo toxicity test (FET)—identification of compounds with weak toxicity and analysis of behavioral effects to improve prediction of acute toxicity for neurotoxic compounds. **Environmental Science and Technology** 49:7002–7011. 2015.

KOCK, F. V. C., COSTA, A. R., DE OLIVEIRA, K. M., BATISTA, A. A., FERREIRA, A. G., & VENÂNCIO, T. A Supramolecular Interaction of a Ruthenium Complex With Calf-Thymus DNA: A Ligand Binding Approach by NMR Spectroscopy. **Frontiers in Chemistry**, 7. 2019.

LEGIERSE, K.C.H.M. Differences in sensitivity of aquatic organisms to organophosphorus pesticides. **Ph.D. thesis**, University of Utrecht, 1998.

Li M., You L., Xue J., Lu Y. Ionizing radiation-induced cellular senescence in normal, non-transformed cells and the involved DNA damage response: a mini review. *Front. Pharmacol.* 9:522. 2018.

LIMA, A. P. et al. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium(II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

MAGALHÃES, L. F. et al. cis-[RuCl(BzCN)(bipy)(dppe)]PF<sub>6</sub> induces anti-angiogenesis and apoptosis by a mechanism of caspase-dependent involving DNA damage, PARP activation, and Tp53 induction in Ehrlich tumor cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 278, p. 101–113, 2017.

MANOLOV I, KOSTOVA I, NETZEVA T, KONSTANTINOV S, KARAIVANOVA M. Cytotoxic activity of cerium complexes with coumarin derivatives. Molecular modeling of the ligands. **Archiv der Pharmazie**. 2000 Apr;333(4):93-98. 2000.

MARKOWSKA, A. et al. Noble metals in oncology. **Wspolczesna Onkologia**, v. 19, n. 4, p. 271–275, 2015.

MATHERS, C. D. et al. Global burden of disease in 2002: data sources, methods and results. [Geneve]: World Health Organization, 2003. (Global programme on evidence for health policy discussion paper, v. 54).

MATTHEWS, R. P., EAUCLAIRE, S. F., MUGNIER, M., LORENT, K., CUI, S., ROSS, M. M, ZHANG, Z., RUSSO, P., PACK, M. "DNA hypomethylation causes bile duct defects in zebrafish and is a distinguishing feature of infantile biliary atresia". **Hepatology**, Vol.53, no.3. 2011.

MEDICI, S. et al. Noble metals in medicine: Latest advances. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 284, p. 329–350, 2015.

MENG, L., & DING, J. (2001). Induction of bulk and c-mycP2 promoter-specific DNA damage by an anti-topoisomerase II agent salvicine is an early event leading to apoptosis

in HL-60 cells. **FEBS Letters**, 501(1), 59–64. doi:10.1016/s0014-5793(01)02633-3

MELLO-ANDRADE, F. et al. Antitumor effectiveness and mechanism of action of Ru(II)/amino acid/diphosphine complexes in the peritoneal carcinomatosis progression. **Tumor Biology**, v. 39, n. 10, p. 101042831769593, 11 out. 2017.

MELLO-ANDRADE, F. et al. Acute toxic effects of ruthenium (II)/amino acid/diphosphine complexes on Swiss mice and zebrafish embryos. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 1082–1092, nov. 2018.

MENEZES, C. S. R.; COSTA, L. C. G. P.; AVILA, V. M. R.; FERREIRA, M. J.; VIEIRA, C. U.; PAVANIN, L. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. Analysis in vivo of antitumor activity, cytotoxicity and interaction between plasmid DNA and the *cis*-dichlorotetraammineruthenium(III) chloride. **Chemical Biological Interactions**. 167:116–124, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Cancer de mama no Brasil: mortalidade está abaixo da media mundial**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <<http://saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45879-cancer-de-mama-no-brasil-mortalidade-esta-abaixo-da-media-mundial>>.

Acesso em: 01 janeiro de 2020.

MORRIS, R. E.; AIRD, R. E.; MURDOCH, P. D. S.; CHEN, H.; CUMMINGS, J.; HUGHES, N. D.; PARSON, S.; PARKIN, A.; BOYD, G.; JODRELL, D. I.; SADLER, P. J. Inhibition of cancer cell growth by ruthenium arene complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**. 44:3616–3621, 2001.

MOURA, D. S. et al. Evaluation of the embryotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) of the flocculant and coagulant compounds used for water remediation. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 31, 2019.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, 55-63, 1983.

NAUGHTON, C. **Drug-induced nephrotoxicity**. *American family physician*. 78. 743-50, 2008.

NEPOMUCENO, J. C.; SILVA, A. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, v. 7, n. 1, p. 167–179, 2010.

NISHIMURA, Y. et al. Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing. **Congenital Anomalies**, v. 55, n. 1, p. 1–16, fev. 2015.

NOYES PD, HAGGARD DE, GONNERMAN GD, TANGUAY RL. Advanced morphological-behavioral test platform reveals neurodevelopmental defects in embryonic zebrafish exposed to comprehensive suite of halogenated and organophosphate flame re-tardants. **Toxicological Sciences** 145:177–195. 2015.

NUSSBAUM, R.L.; MCINEES, R.R.; WILLARD, H.F. **Genética Médica**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 525 p, 2008.

OLIVEIRA, K. M. et al. Selective Ru(II)/lawsone complexes inhibiting tumor cell growth by apoptosis. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 176, p. 66–76, nov. 2017.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Test **No.236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, France, 2013.

ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAÚDE. **Cancer**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1)>. Acesso em: 01 janeiro de 2020.

OSTI, R. Z., SERRANO, F. A., PASCHOALIN, T., MASSAOKA, M. H. S., TRAVASSOS, L. R., TRUZZI, D. R., ... FRANCO, D. W. The In Vitro and In Vivo Antitumour Activities of Nitrosyl Ruthenium Amine Complexes. **Australian Journal of Chemistry**, 65(9), 1333. 2012.

OTT, I., & GUST, R. Non Platinum Metal Complexes as Anti-cancer Drugs. **Archiv Der Pharmazie**, 340(3), 117–126. 2007.

OU, H. C; RAIBLE, D. W; RUBEL, E. W. Cisplatin-induced haircell loss in zebrafish (Danio rerio) lateral line. **Hearing Research** 233(1):46–53, 2007.

OTTESON, D.C., HITCHCOCK, P.F. Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. **Vision Research**. 43, 927e936. 2003.

PARMIGIANI, R. B.; CAMARGO, A. A. O genoma Humano e o Câncer. IN: Ferreira, C.G.; Rocha, J.C.C. (Org.). **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004.

PEREIRA, F. DE et al. Cytotoxic effects of the compound cis-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate on K-562 human chronic myelogenous leukemia cells. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 301, 2014.

PEREIRA, M I G. Desenvolvimento de metalofármacos; novos complexos de rutênio contendo ligandos macromoleculares como agentes antitumorais. Manuscrito. 2016.

PERES, L. A. B.; CUNHA JÚNIOR, A. D. DA. Acute nephrotoxicity of cisplatin: Molecular mechanisms. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 35, n. 4, p. 332–340, 2013.

PIRES, W. C. Estudo do potencial citotóxico, genotóxico e do mecanismo de morte celular de complexos de rutênio (II) em células de Sarcoma 180. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

PICKSTONE, J. V. Contested cumulations: configurations of cancer treatments through the twentieth century. **Bulletin of the History of Medicine**, Baltimore, v. 81, n. 1, p. 164-196, 2007.

PINTO, L. F. R.; FELZENSZWALB, I. Genética do câncer humano. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K (Org). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. da Ulbra, p. 29-44, 2003.

PIRES, W. C. et al. Ru(II)/diphenylphosphine/pyridine-6-thiolate complexes induce S-180 cell apoptosis through intrinsic mitochondrial pathway involving inhibition of Bcl-2 and p53/Bax activation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 438, n. 1–2, p. 199–217, 2018.

PIZARRO, A. M.; SADLER, P. J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1198–1211, 2009.

PORTO, H. K. P. et al. Synthesis of a ruthenium(II) tryptophan-associated complex and biological evaluation against Ehrlich murine breast carcinoma. **Transition Metal Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 1–10, 19 fev. 2015.

PUTNAM KP, BOMBICK DW, DOOLITTLE DJ. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. **Toxicology In Vitro**.16:599-607. 2002.

REEDIJK, J. Metal-ligand exchange kinetics in platinum and ruthenium complexes: Significance for effectiveness as anticancer drugs. **Platinum Metals Review**, v. 52, n. 1, p. 2–11, 2008.

REISNER, E.; ARION, V. B.; GUEDES DA SILVA, M. F. C.; et al., “Tuning of redox potentials for the design of ruthenium anticancer drugs—an electrochemical study of [trans-

RuCl<sub>4</sub>L(DMSO)]<sup>-</sup> and [trans-RuCl<sub>4</sub>L<sub>2</sub>]<sup>-</sup> complexes, where L = imidazole, 1,2,4-triazole, indazole,”. **Inorganic Chemistry**, vol. 43, no. 22, pp. 7083–7093, 2004.

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

Rezzola, S., Belleri, M., Gariano, G., Ribatti, D., Costagliola, C., Semeraro, F., & Presta, M. In vitro and ex vivo retina angiogenesis assays. **Angiogenesis**, 17(3), 429–442. 2013.

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

RICO, E.P, ROSEMBERG, D.B, SENGER, M.R, ARIZI M.B, BERNARDI, G.F, BOGO, M.R; BONAN, C.D. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. **Neurotoxicology and teratology**. 28, 489-496, 2006.

RICO, E.P, ROSENBERG, D.B, DIAS, R.D, BOGO, M.R, BONAN, C.D. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. **Toxicology**. let. 174, 25-30, 2007.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; TROSKO, J. E, et al. Platinum compounds: A new class of potent antitumor agents. **Nature** 222:385-386, 1969.

SADLER K.C.; AMSTERDAM, A; SOROKA, C; BOYER, J; HOPKINS, N. "A genetic screen in zebrafish identifies the mutants vps18, nf2 and foie gras as models of liver disease". **Development**. Vol. 132, no. 15. 2005.

SAMANTA P, PAL S, MUKHERJEE AK, GHOSH AR. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71, on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 107:120–125. 2014.

SANT'ANNA, M. C. B. Zebrafish danio rerio como modelo para estudo da toxicidade induzida pelo ferro. Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2009.

SAVA G., BERGAMO A. Ruthenium-based compounds and tumor growth control. **International Journal of Oncology**. 17:353–365, 2000.

SCHEIN C F; MARQUES AR; VARGAS CL; KIRSTEN VR. Efeitos Colaterais da quimioterapia em pacientes oncológicos hospitalizados. **Revista Ciência e Saúde**. 7(1): 101-7. 2006.

SENGER, M. R. et al. In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 6, p. 954–958, set. 2006.

DOS SANTOS, EDJANE R. ; GRAMINHA, ANGELICA, E. ; SCHULTZ, MARIO S. ; CORREIA, ISABEL ; SELISTRE-DE-ARAÚJO, HELOISA S. ; CORRÊA, RODRIGO S. ; ELLENA, JAVIER ; LACERDA, ELISÂNGELA DE PAULA S. ; PESSOA, JOÃO COSTA ; BATISTA, ALZIR A. Cytotoxic activity and structural features of Ru(II)/phosphine/amino acid complexes. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 182, p. 48-60, 2018.

dos SANTOS, N.A.G., CARVALHO RODRIGUES, M.A., MARTINS, N.M. *et al.* Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. **Archives of Toxicology** **86**, 1233–1250, 2012.

SHERPA, T., FIMBEL, S.M., MALLORY, D.E., MAASWINKEL, H., SPRITZER, S.D., SAND, J.A., LI, L., HYDE, D.R., STENKAMP, D.L. Ganglion cell regeneration following whole-retina destruction in zebrafish. **Developmental Neurobiology**. 2007.

SILVA, R., RICHETTI, S., SILVEIRA, V., BATTASTINI, A., BOGO, M., LARA, D., BONAN, C. Maternal caffeine intake affects acetylcholinesterase in hippocampus of neonate rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**. 26, 339–343, 2008.

SOUZA, A. P. C. Complexos de rutenio (II) de interesse biológico: Avaliação In vitro e in vivo do potencial antitumoral e genotóxico. **Tese de doutorado**, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

SOUZA REIS, S. Avaliação do desenvolvimento de embriões e larvas de zebrafish (*Danio rerio*) expostos ao LASER de baixa potência. 2018.

SPITSBERGEN, J. M.; KENT, M. L. The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research—Advantages and Current Limitations. **Toxicologic Pathology**, v. 31, n. 1\_suppl, p. 62–87, 17 jan. 2003.

SREEKANTH, T.; RODRIGUES, D.A.; CRANS, D. C.; BARREIRO, E. J. Ru(II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics?. **Journal of Medicinal Chemistry**. 61 (14), 5805-5821, 2018.

STANTON MF. Diethylnitrosamine-induced hepatic degeneration and neoplasia in the aquarium fish, brachydanio rerio. **Journal of the National Cancer Institute**. 34:117–30. 1965.

STENGEL, D., WAHBY, S., & BRAUNBECK, T. In search of a comprehensible set of endpoints for the routine monitoring of neurotoxicity in vertebrates: sensory perception and nerve transmission in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, 25(5), 4066–4084. 2017.

STREISINGER, G.; WALKER, C; DOWER, N; KNAUBER, D; SINGER, F. "Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*)". **Nature**, Vol.291, no.5813. 1981.

STRÄHLE, U.; SCHOLZ, S.; GEISLER, R.; GREINER, P.; HOLLERT, H.; RASTEGAR, S.; SCHUMACHER, A.; SELDERSLAGHS, I.; WEISS, C.; WITTERS, H.; BRAUNBECK, T. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments--a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. **Reproductive toxicology**. 33 (2): 128–32, 2012.

SUDHAKAR, A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. **Journal of Cancer Science and Clinical Therapeutics**. 1 (2). 1-4, 2009.

TEIXEIRA, L. A; FONSECA, C. De doença desconhecida a problema de saúde pública: o INCA e o controle do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2007

TRONDL, R. et al. NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. **Chemical Science**, v. 5, n. 8, p. 2925–2932, 2014.

TRUDU, F. et al. Coordination compounds in cancer: Past, present and perspectives. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 13, n. 2, p. 79–103, 2015.

VACARU, A. M. et al. In vivo cell biology in zebrafish - providing insights into vertebrate development and disease. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 3, p. 485–495, 1 fev. 2014.

VALENTE, A.; GARCIA, M. H. Syntheses of macromolecular ruthenium compounds: A new approach for the search of anticancer drugs. **Inorganics**, v. 2, n. 1, p. 96–114, 2014.

VAN DER WEL, H.; WELLING, W. Inhibition of acetylcholinesterase in guppies (*Poecilia reticulata*) by chlorpyrifos at sublethal concentrations: Methodological aspects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 17, n. 2, p. 205–215, abr. 1989.

VAN SCHOOTEN, F. J. et al. Effects of oral administration of N-Acetyl-L-cysteine: A multi-biomarker study in smokers. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 11, n. 2, p. 167–175, 2002.

VELOZO-SÁ, V. S. et al. In vitro cytotoxicity and in vivo zebrafish toxicity evaluation of Ru(II)/2-mercaptopyrimidine complexes. **Dalton Transactions**, v. 48, n. 18, p. 6026–6039, 2019.

VILANOVA-COSTA, C. A. S. T. et al. MDR1 and Cytochrome P450 Gene-Expression Profiles as Markers of Chemosensitivity in Human Chronic Myelogenous Leukemia Cells Treated with Cisplatin and Ru(III) Metallocomplexes. **Biological Trace Element Research**, v. 163, n. 1–2, p. 39–47, 2015.

WANG, J. et al. The antitumor effect and toxicity of a ruthenium(II) complex in vivo. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 87, p. 49–52, jan. 2018.

WATANABE, K. et al. In vivo imaging of zebrafish retinal cells using fluorescent coumarin derivatives. **BMC Neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 116, 2010.

WELLS DJ. Animal welfare and the 3Rs in European bio-medical research. *Ann NY Acad Sci* 1245:14–16. 2011.

WEN H. SONG , FENG DING , JING GUO , LI Y. LI , JIN H. ZHANG , JIE LIAN , WEI X. HU & MIN L. GAO (2010) Study on acute toxicity and structure-activity relationship of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to naphthoquinones, *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 45:7, 601-605

WESTERFIELD, M. *The zebrafish book*, 5th Edition; **A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)**. University of Oregon Press; Eugene, Oregon: 2007.

WHEATE, N. J. et al. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 35, p. 8113–8127, 2010.

WITTE, I. et al. Genetic Toxicity Assessment: Employing the Best Science for Human Safety Evaluation Part III: The Comet Assay as an Alternative to In Vitro Clastogenicity Tests for

Early Drug Candidate Selection. **Toxicological Sciences**, v. 97, n. 1, p. 21–26, 1 maio 2007.

WONG, E., AND GIANDOMENICO, C. M. Current status of platinum-based antitumor drugs. **Chemical Reviews**. 99, 2451–2466, 1999.

WONG, E., GIANDOMENICO, C. M. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem. Rev.* v. 99, p. 2451–2466. 1999. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health Statistics and Informatics Department. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em: 17 de janeiro de 2014.

WYLD, L.; AUDISIO, R. A.; POSTON, G. J. The evolution of cancer surgery and future perspectives. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 2, p. 115–124, 2015.

WU Q., ALLOUCH A., MARTINS I., BRENNER C., MODJTAHEDI N., DEUTSCH E., et al. (2017). Modulating both tumor cell death and innate immunity is essential for improving radiation therapy effectiveness. *Front. Immunol.* 8:613. 2017.

YURCO, P., CAMERON, D. A. Responses of Muller glia to retinal injury in adult zebrafish. **Vision Research**. 45, 991e1002. 2005.

ZEIGER, E. Genetic toxicity tests for predicting carcinogenicity. In: CHOY, W. N. (Ed.). **Genetic toxicology and cancer risk assessment**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 2001. p. 33–34.

ZENG, L.; GUPTA, P.; CHEN, Y.; WANG, E.; JI, L.; CHAO, H.; CHEN, Z. S. The development of anticancer ruthenium(II) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials. **Chemical society reviews**, 46 (19), p. 5771–5804, 2017.

ZENG, C. C. et al. The induction of apoptosis in HepG-2 cells by ruthenium(II) complexes through an intrinsic ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 122, p. 118–126, 2016.

## APÊNDICE 1

Complexos de rutênio (II), coordenados mercapto (RuAc, RuDia, RuTiu e RuMTiu) (Figura 1) e complexos coordenados a Fenantrolina e trifenilfosfina RuCwphen e RuCwbipy (Figura 2). Todos foram sintetizados no *Laboratório* de Estrutura e Reatividade de Compostos Inorgânicos do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos sob a coordenação do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista e encaminhados ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética (LGMC) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Goiás (UFG) para realização dos ensaios necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

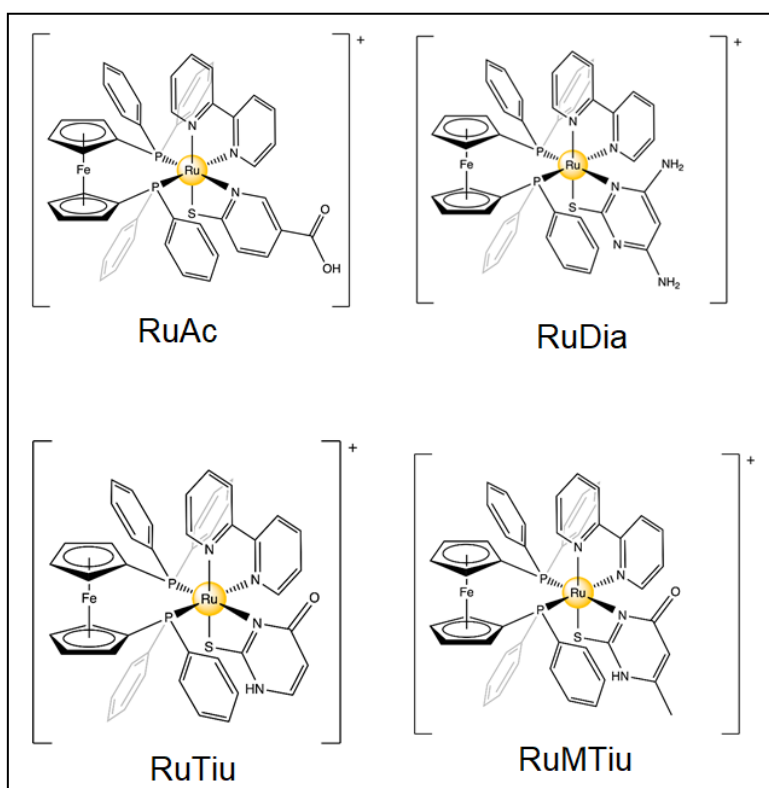
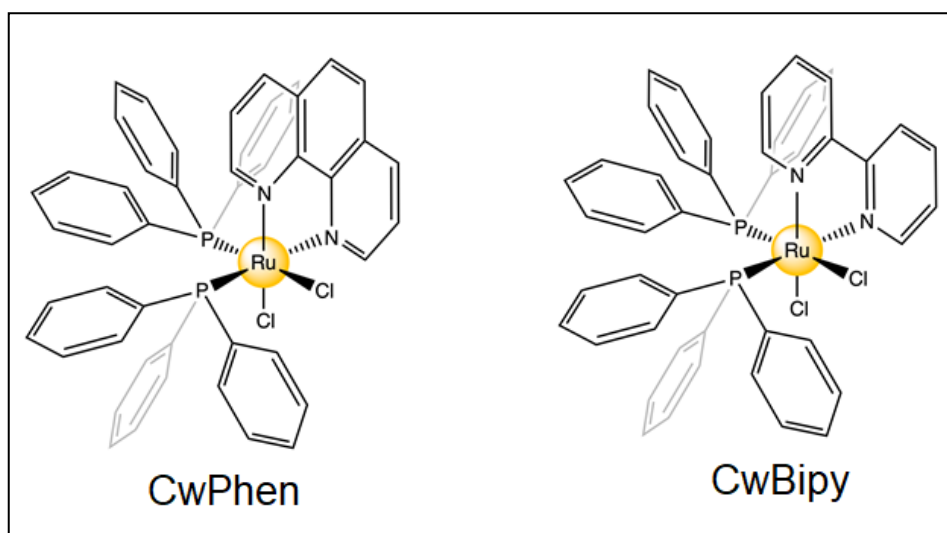


Figura 1 – Estruturas dos complexos de rutênio coordenados a mercaptos RuAc, RuDia, RuTiu e RuMTiu. Fonte: Elaborado por Tom Bettens, 2019



**Figura 2** - Estruturas dos complexos de rutênio coordenados à fosfina CwPhen e CwBipy. Fonte: Elaborado por Tom Bettens, 2019.

As fórmulas e massas moleculares dos complexos de rutênio testados estão apresentadas na tabela abaixo (Tabela 1).

**Tabela 1** - Complexos de rutênio adicionalmente avaliados.

<b>FÓRMULA GERAL DOS COMPLEXOS</b>	<b>SIGLA</b>	<b>TIPO DE LIGANTE</b>	<b>MASSA MOLECULAR (g mol<sup>-1</sup>)</b>
[Ru(pyAC)(bipy)(dppf)]PF <sub>6</sub>	RuAc	Mercapto	1110,78
[Ru(dmp)(bipy)(dppf)]PF <sub>6</sub>	RuDia	Mercapto	1097,78
[Ru(2TU)(bipy)(dppf)]PF <sub>6</sub> *	RuTiu	Mercapto	1083,75
[Ru(6m2TU)(bipy)(dppf)]PF <sub>6</sub> *	RuMTiu	Mercapto	1097,78
<i>cis</i> -[RuLau <sub>2</sub> (PPH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (phen)] *	CwPhen	Fenantrolina e trifenilfosfina	1123,96
<i>cis</i> -[RuLau <sub>2</sub> (PPH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (bipy)] *	CwBipy	Bipiridina e trifenilfosfina	1099,93

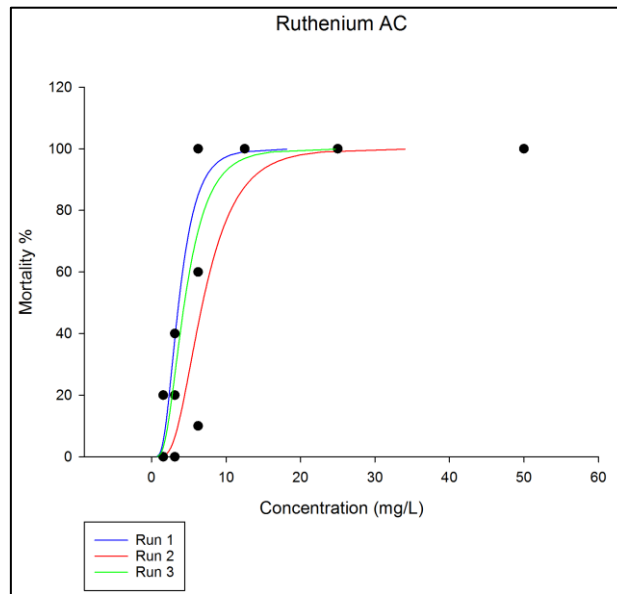
## APÊNDICE 2

**Tabela 2:** Concentrações inibitórias ( $IC_{50}$ ), em  $\mu M$ , e Índice de seletividade (IS) dos complexos de rutênio RuLap, RuLau, RuAc, RuDia, RuTiu, RuMTiu, RuCwphen e RuCwbipy frente às linhagens celulares V79 e HeLa.

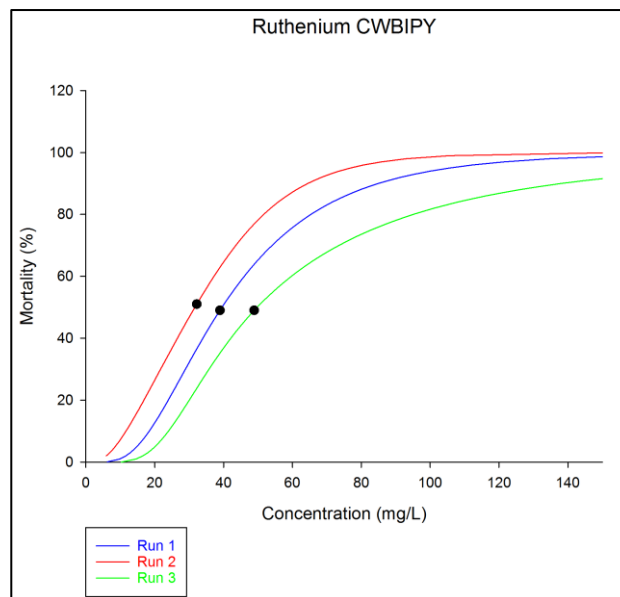
COMPOSTO	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )		IS
	LINHAGEM CELULAR		
	V79	HELA	
RuAc	49,26	20,29	2,42* (HeLa)
RuDia	9,76	6,47	1,5 (HeLa)
RuTiu	7,85	3,81	2,06* (HeLa)
RuMTiu	8,85	6,44	2,06* (HeLa)
RuCwphen	14,24	4,07	3,49* (HeLa)
RuCwbipy	75,78	8,81	8,7* (HeLa)

\*:  $IS \geq 2,0$ .

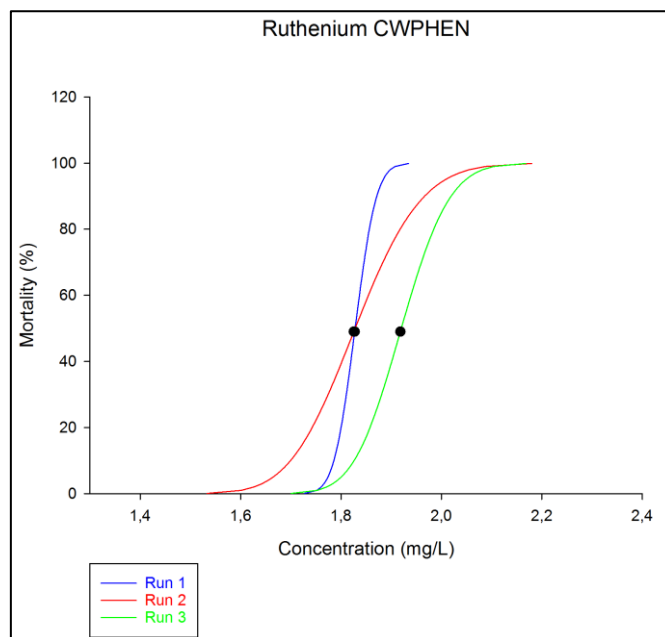
### APÊNDICE 3



**Figura 1** - Distribuição percentual dos efeitos subletais do composto RuAc após 96hpf de tratamento frente a embriões de Zebrafish.



**Figura 2** - Distribuição percentual dos efeitos subletais do composto RuCwBipy após 96hpf de tratamento frente a embriões de Zebrafish.



**Figura 3** - Distribuição percentual dos efeitos subletais do composto RuCwPhen após 96hpf de tratamento frente a embriões de Zebrafish.