

**RIBEIRO**, Alessandra de Santana Braga Barbosa<sup>1</sup>; **ROCHA**, Hatori Rosângela<sup>2</sup>; **SILVEIRA-LACERDA**, Elisângela de Paula<sup>3</sup>. Avaliação Genotóxica dos Novos Compostos de Rutênio Utilizando Cultura de Linfócitos Humanos - Resultados Preliminares. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG – CONPEEX, 3., 2006, Goiânia. **Anais eletrônicos do III Seminário de Pós-graduação** [CD ROM], Goiânia: UFG, 2006. n.p.

## AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DOS NOVOS COMPOSTOS DE RUTÊNIO UTILIZANDO CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS - RESULTADOS PRELIMINARES

**RIBEIRO**, Alessandra de Santana Braga Barbosa<sup>1</sup>; **ROCHA**, Hatori Rosângela<sup>2</sup>; **SILVEIRA-LACERDA**, Elisângela de Paula<sup>3</sup>.

Palavras-chave - Câncer, Aberrações cromossômicas, compostos de rutênio.

### 1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

O câncer é uma doença genética das células somáticas. Tanto as mutações de ganho de função dos oncogenes quanto as mutações de perda de função dos genes supressores tumorais podem contribuir para a progressão de um tumor através do desequilíbrio dos controles normais que reprimem o ciclo celular ou que promovem a apoptose (GRIFFITHS *et al.*, 2001). No Brasil, a estimativa para o ano de 2006 aponta que ocorrerão 472.050 novos casos de câncer (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2006).

A cisplatina é uma das drogas de maior efeito citostático desenvolvida para o tratamento de carcinomas sólidos (NICOLINI, 1988), e desde o seu desenvolvimento vários complexos metálicos de platina e não-platina foram sintetizados e testados com atividade antitumoral, sendo que os compostos de rutênio tem sido objeto de grande atenção por ser um agente com propriedades antimetastática e de baixa toxicidade e os seus componentes parecem penetrar na célula tumoral e ligar efetivamente ao seu DNA e (KOSTOVA., 2006).

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

A cultura de linfócitos do sangue periférico constitui um ótimo sistema para se testar a capacidade de um agente (físico ou químico), quanto à sua capacidade de causar danos no DNA e também ser utilizada no monitoramento de indivíduos expostos (RABELLO-GAY *et al.*, 1991). Nos sistemas de liberação de novos fármacos, testes genotóxicos são requisitados para o lançamento

dos mesmos no mercado. Como o laboratório trabalha com a verificação do potencial de novas drogas que são sintetizadas, vê-se a necessidade de implantação de mais uma metodologia para o sistema de liberação de drogas, fazendo com que haja necessidade de um estudo genotóxico e otimização de metodologias. O estudo visa a avaliação e análise citogenética de cromossomos humanos em metáfase e possíveis quebra de DNA, detecção de aberrações espontâneas e/ou induzidas pelo uso dos novos compostos de rutênio cis-[RuCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]Cl e cis-[Ru(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]2(S<sub>2</sub>O<sub>6</sub>).

## **2.METODOLOGIA**

### **2.1 Drogas teste**

Os compostos Cloreto de cis-tetraamindiclororutênio(III) e cis-tetraaminoxalatorutênio foram sintetizados pelo laboratório de Química supramolecular da UFU e encaminhados ao LMG e CH para estudos citogenéticos.

### **2.2 Droga controle**

Como controle positivo foi utilizado a droga Rubidox (Cloridrato de doxorubicina 50mg da Bergamo®), solução em pó líofilo injetável 50mg, obtida comercialmente do laboratório.

### **2.3 Preparação do composto de Rutênio para ensaios biológicos *in vitro* e droga controle**

Os compostos cis-[RuCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]Cl e cis-[Ru(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]2(S<sub>2</sub>O<sub>6</sub>) liofilizados foram pesados e dissolvidos em meio RPMI incompleto nas concentrações de 0,001 a 10mg.mL<sup>-1</sup>. O tratamento foi feito após 24 horas de cultura. A droga controle será dissolvida em meio incompleto a uma concentração final de 2µg.mL<sup>-1</sup>.

### **2.4 Grupo amostral e coleta das amostras**

Foram selecionados doadores entre 20 e 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumantes, que não possuem vícios, não sejam consumidores de álcool, que não estejam tomando medicamentos ou que trabalhem em laboratórios (BURIN et al., 2001). As amostras de sangue periférico foram coletadas, no laboratório, por punção venosa com seringas e tubos vacutainer heparinizadas.

### **2.5. Cultura de Linfócitos**

A cultura de linfócitos foi realizada com base na metodologia desenvolvida por Moorhead et al. (1960), com modificações.

### **2.6 Preparo das lâminas para análise citogenética**

Uma suspensão de células foi distribuída sobre a lâmina. Após, o material foi corado com Giensa diluído em tampão fosfato 0,06 M, pH 6,8.

### **2.7 Estudo de troca entre cromátides irmãs das células tratadas**

Para análise das trocas entre cromátides irmãs (TCI), a solução de 5-bromo-2'-desoxiuridina será adicionada no início da cultura, na concentração final de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de meio de cultura. A cultura será mantida a  $37^{\circ}\text{C}$  e colhida após 72 horas.

### 2.8 Estudo da ação das drogas sobre o ciclo celular

Para este trabalho será necessário outro grupo de amostras repetindo a cultura de acordo com Moorhead et al (1960), com modificações.

### 2.9 Análises das lâminas

As aberrações cromossômicas foram analisadas em, no mínimo, 100 metáfases por grupos analisados. As falhas (gaps) serão analisadas, e os resultados serão apresentados em uma coluna à parte segundo Savage (1976) para o critério de análise das aberrações cromossômicas. Para as trocas entre cromátides irmãs serão analisadas, no mínimo, 50 metáfases (RIBEIRO et al., 2003).

### 2.10 Análise do DNA em eletroforese em Gel de Agarose

As amostras serão analisadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8 e 1,5%, coradas com brometo de etídio, visualizado em UV e o gel fotografado.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O trabalho se encontra em fase de otimização da técnica. No início, foi testada apenas cultura sem tratamento, para análise qualitativa e quantitativa das metáfases. Após a padronização do protocolo, foram testadas quatro concentrações das novas drogas ( $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Foi encontrado metáfases nas amostras tratadas na concentração de  $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$  e estas metáfases se encontravam normais (Figura 01). Nas outras concentrações de tratamento, os resultados encontram-se indeterminados, pois não foram encontradas metáfases em boas condições de análise. Foram mudados alguns critérios da metodologia, como o tempo de exposição da cultura em solução hipotônica e a concentração do fixador.

A quantidade de metáfases por lâmina foi insatisfatória para uma análise detalhada, uma vez que se pede que sejam feitas análises de no mínimo 20 metáfases por tratamento.

## **4. CONCLUSÃO**

Existe a necessidade da continuação dos trabalhos para melhor obtenção de resultados.

## **5. BIBLIOGRAFIA**

BURIN, R.V., CANALLE, R., LOPES, J.L., VICHNEWSSKI, W., TAKAHASHI, C.S., Assessment of the cytotoxic and clastogenic

activities of the sesquiterpene lactone lynchnopholide in mammalian cells in vitro and in vivo. *Cancer Detec. Prev.*, 25(1):93-101, 2001.

**DEGRASSI, F.; DE SALVIA, R.; TANZARELLA, C.; PALITTI, F.** Induction of chromosomal aberrations and SCE by camptothecin, in inhibitor of mammalian topoisomerase I. *Mutat. Res.*, 211(1):125-130, 1989.

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

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

**INCA-**

**2006.**

<http://www.inca.gov.br/cancer/estimativa2006/versãofinal>.

Acessado em julho de 2006.

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

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

**MINDEN,M.D.** Oncogenes. In *The Basic Science of Oncology*, ed. I. F. Tannock and R.P. Hill. Pergamon Press, New York, pp.72-88, 1987.

**MOORHEAD, P. S., NOWELL, P. C., MELLMAN, J., BATIPPS, D. M., AND HUNGERFORD, D.A.** Chromosome preparation of leukocytes culture from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, 20: 613-616, 1960.

**NICOLINI, M.** Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy. Boston: Nijhoff, 1988.

**PHILLIPS, R.A.** The genetic basis os cancer. In *The Basic Science of Oncology*, ed, T.F. Tannock and R.P. Hill. Pergamon Press, New York, pp.24-51, 1987.

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

**RIBEIRO, L.G., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K.** Mutagênese Ambiental. Editora da ULBRA.v.1, 356p, 2003.

**SAVAGE, J.R.** Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J.Med. Genet.*, 13(2):103-122, 1976.

**FONTE DE FINANCIAMENTO:** CAPES/UFG

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

\* Correspondência: agarbio@hotmail.com