

Avaliação da atividade apoptótica de novos compostos de rutênio sobre as linhagens tumorais S180 e K562.

CARVALHO, Bruno Pereira¹; VILANOVA-COSTA, Cesar Augusto Sam Tiago²; LIMA, Aliny Pereira³; PEREIRA, Flávia de Castro³; SILVEIRA-LACERDA, Elisângela de Paula^{4*}

Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Goiás - UFG, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil

e-mail: brunocarvalhoufg@gmail.com; silveiralacerda@gmail.com

PALAVRAS-CHAVES: Composto de rutênio, dano ao DNA, K-562; Sarcoma 180

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças mais comuns e graves vistas na medicina clínica (JEMAL *et al.*, 2004). Dados epidemiológicos demonstram que o câncer, de alguma forma, ataca mais que um terço da população mundial, sendo responsável por mais de 20% de todas as mortes, e, em países desenvolvidos, chegando a ser responsável por mais de 10% do custo total em cuidados médicos (THOMPSON *et al.*, 2002).

No Brasil, estimativas para o ano de 2010 apontavam que ocorreriam cerca de meio milhão de novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes seriam os de próstata e pulmão para o sexo masculino e mama e colo útero para o sexo feminino. Em Goiás, acredita-se que neste mesmo ano, a incidência para novos casos seria de 16.130 para cada 100.000 habitantes (INCA/MS, 2010).

Assim, o câncer torna-se o terceiro grupo de causas de mortalidade, superado apenas por doenças cardiovasculares e por morte acidental - tanto acidentes de trânsito quanto violência urbana – e consolidando-se como um problema de saúde pública (INCA/MS 2010).

Existem três abordagens principais para o tratamento do câncer: excisão cirúrgica, irradiação e quimioterapia, dependendo do tipo de tumor e do seu estágio de desenvolvimento. É de grande conhecimento a importância da compreensão da cinética do ciclo celular para o uso apropriado da atual geração de drogas antineoplásicas na quimioterapia. Muitos dos mais potentes agentes citotóxicos atuam em fases específicas do

¹ Aluno de Graduação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, bolsista PIVIC do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética;

² Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás;

³ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás;

⁴ Professora Dra do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

ciclo celular e, portanto, têm atividade apenas em células que estão em processo de divisão. Nos estudos *in vitro* da ação citotóxica das drogas antineoplásicas, verifica-se que há distúrbios do ciclo celular e, posteriormente, morte celular, embora cada droga possa apresentar mecanismos de ação específicos. A morte celular pode ocorrer de duas formas: por necrose ou por apoptose (MORAES *et al.*, 2007).

A apoptose é definida como uma morte celular programada. Nesse mecanismo, células indesejáveis são eliminadas devido à ativação de uma série coordenada de eventos executados por um conjunto exclusivo de proteínas (BRABEC & NOVÁKOVÁ, 2006). Defeitos na regulação dos mecanismos apoptóticos podem causar a deficiência dessa morte celular programada. A ausência de apoptose pode levar a anormalidades corporais, doenças auto-imunes, neoplasias e ao câncer (DELHALLE *et al.*, 2003).

As características morfológicas e bioquímicas da apoptose têm sido descritas principalmente como contração celular, condensação da cromatina, formação de corpo apoptótico e degradação de DNA. Tais propriedades se distinguem significativamente das características expressas por morte celular acidental ou necrótica (BORTNER *et al.*, 1995).

A fragmentação do DNA tem sido o principal critério bioquímico usado para distinguir os motivos da morte celular (BORTNER *et al.*, 1995). São formados oligonucleossomos de aproximadamente 180 pares de bases, formando assim um padrão em forma de escada no gel de eletroforese (VOLTARELLI *et al.*, 2008).

Pesquisas realizadas desde a década de 1990 têm demonstrado que a morte celular provocada pelas drogas quimioterápicas ocorre principalmente por indução de apoptose. Esta classe de drogas tem o potencial de restabelecer a apoptose celular, processo que se encontra alterado em células cancerígenas (HUSCHTSCHA *et al.*, 1998; HUANG & OLIFF, 2001; FESIK *et al.*, 2005; MORAES *et al.*, 2007).

Compostos baseados em Rutênio têm sido estudados como agentes antitumorais e antimetastáticos potenciais (MENEZES *et al.*, 2007). Os testes mostram que esses compostos apresentam toxicidade bem inferior às principais metalodrogas atualmente usadas no tratamento do câncer como, por exemplo, a cisplatina [*cis*-diaminodicloroplatina(II)]. Os compostos a base de cisplatina apresentam um conjunto limitado de tumores afetados e o desenvolvimento de resistência à droga (PEREIRA *et al.*, 2009). O Rutênio apresenta mecanismos de ação independentes do material genético, pois sua similaridade química com o Ferro permite sua ligação com proteínas Transferrinas. Apesar disso, o DNA tem sido encarado como o principal alvo da droga (SILVEIRA-LACERDA, 2010b).

Estudos mostram que uma das propriedades antitumorais do Rutênio é a indução de apoptose nas células cancerígenas (SILVEIRA-LACERDA *et al.*, 2010a). Assim, estudos sobre o mecanismo de ação destes complexos de rutênio se tornam importantes, para que se possa definir seu real potencial clínico, contribuindo para o desenvolvimento de uma nova possível droga antitumoral, com propriedades complementares àquelas exibidas pelos fármacos utilizados na clínica atual.

2. OBJETIVOS

Com base no que foi apresentado, fez-se necessária a investigação da atividade apoptótica de compostos de Rutênio (III) sobre células tumorais K-562 e S-180, de forma a se favorecer seus possíveis efeitos farmacológicos e possíveis efeitos tóxicos, além disso, os tratamentos atuais para os diversos tipos de cânceres não são considerados satisfatórios, os estudos com novos compostos antitumorais baseados em metais representam um novo caminho para síntese de medicamentos menos agressivos ao organismo e mais efetivos nas células tumorais.

Avaliar a capacidade de diferentes compostos de rutênio em desencadear o processo de apoptose em células tumorais S180 e K-562.

3. METODOLOGIA

3.1. Delineamento experimental

A presente pesquisa foi desenvolvida com o apoio da equipe do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética do Instituto de Ciências Biológicas. Duas diferentes linhagens celulares tumorais, cultivadas *in vitro*, foram submetidas ao tratamento com agentes antitumorais baseados em Rutênio (III). Foram empregadas diferentes concentrações em cada um dos tratamentos. Após os tratamentos foi realizada uma avaliação do perfil apoptótico dos agentes antitumorais estudados sobre as linhagens celulares tumorais.

3.2. Cultura celular

Neste estudo foram utilizadas duas linhagens de células tumorais, uma de leucemia mielóide crônica humana (K-562) (ATCC número CCL-243TM) obtida do Banco de Células Norte-americano (*American Type Culture Collection* - ATCC, Rockville, MD, USA) e tumor Ascístico Murino Sarcoma 180, fornecida pelo Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia. As células foram cultivadas em garrafas de cultura segundo protocolo estabelecido pela ATCC (ATCC, Rockville, MD, EUA, 2009) e mantidas em estufa

(REVCO, Thermo Fisher Sci. Inc., Waltham, MA, EUA) a 37 °C contendo 95% de ar e 5% de CO₂ até o momento do ensaio experimental. Para a realização dos ensaios foram utilizadas células que apresentavam viabilidade superior a 90%.

3.3. Compostos de Rutênio

Os compostos de rutênio foram sintetizados pelo Laboratório de Química Supramolecular do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos e pelo Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. Para os ensaios biológicos, os compostos de rutênio liofilizados foram pesados e dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) 0,1%. A cisplatina foi utilizada como fármaco controle.

3.4. Ensaio *in vitro*

Para a realização dos ensaios de *in vitro* sobre as células tumorais, as linhagens K-562 e Sarcoma 180 foram centrifugadas por 10 minutos a 2.000 RPM e o sobrenadante descartado. O *pellet* celular foi ressuspensão em 1mL de meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (ambos da GIBCO, Grand Island, NY, EUA) e antibióticos 100 UI/mL (estreptomicina e penicilina) (CULTILAB, Campinas, SP, Brasil). Em seguida, realizou-se a contagem das células viáveis em azul de tripano (VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil) para o ajuste da concentração em 5×10^5 células/mL para a posterior realização dos ensaios de citotoxicidade.

3.5. Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripano

A avaliação da viabilidade da célula na presença dos compostos de rutênio (III) foi realizada segundo o método de exclusão de azul de tripano em células K-562 e S-180. Esse método permite detectar células inviáveis, cuja membrana, por apresentar danos, permite a incorporação do corante e coram-se em azul; enquanto que as células viáveis, por apresentarem membrana íntegra, bloqueiam a passagem do corante, ficando transparente (MCATEER & DAVIS, 1994 *apud* RIBEIRO *et al.*, 2003). O número total de células (células vivas e mortas) foi calculado segundo GORJÃO (2005).

3.4. Ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do MTT

Para avaliar a viabilidade celular após tratamento com os compostos de rutênio foi utilizado o método colorimétrico do MTT. O princípio deste método descrito por Mosman

(1983) consiste em medir a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Para o teste do MTT, 1×10^5 de células tumorais K-562 ou S-180 foram semeadas em microplacas de 96 poços na ausência ou presença dos compostos Ru (0,2 a 200 $\mu\text{M.L}^{-1}$) ou cisplatina (0,2 a 200 $\mu\text{M.L}^{-1}$) e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Ao final do período de incubação, foi adicionado aos poços de cultivo celular 10 μL de MTT na concentração de 5 mg.mL^{-1} , e após 4 h 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 fórmula sugerida por Silveira-Lacerda *et al*, 2010a.

O valor de IC₅₀ (concentração em $\mu\text{M.L}^{-1}$ que inibe 50 % da viabilidade celular) foi determinada por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.4. Teste de determinação de apoptose através da avaliação da integridade das moléculas de DNA

Para a análise qualitativa de fragmentos de DNA resultante de clivagem internucleossomal, 5×10^5 de células/mL de cada uma das linhagens K562 e S180, tratadas com diferentes concentrações dos compostos de rutênio, foram submetidas à extração de ácidos nucléicos segundo Sambrook & Russel, 2001.

Após a extração as amostras os padrões de bandas de DNA foram analisadas por eletroforese em gel de agarose em concentração entre 0,8 e 1,5 %, corados com brometo de etídio. Os géis foram visualizados e fotografados sobre luz ultravioleta usando um fotodocumentador com sistema de captura digital de imagem.

3.5. Análise estatística

Para a análise dos dados foram utilizados a Análise de Variância (ANOVA) e *posteriori* o teste de comparação múltipla de Tukey, com significância de $p < 0.05$, para a comparação entre os grupos. Foi utilizado o Software GraphPad-Prism V3.02. Para todos os grupos consideraram-se estatisticamente significativos valores de p menores que 0.05 ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ataque indiscriminado promovido pelas drogas antineoplásicas às células de rápida proliferação, cancerosas ou normais, produz os indesejáveis efeitos colaterais ou tóxicos. Atualmente, a cisplatina é utilizada no tratamento de uma variedade de neoplasias, especialmente, o câncer testicular, com probabilidade de cura de 90% dos casos. Porém, o sucesso clínico da cisplatina é limitado pelos efeitos colaterais significantes causados nos pacientes e pela resistência adquirida ou intrínseca de vários tumores. Devido a sua relativa inespecificidade, estes antineoplásicos tornam-se tóxicos também para os tecidos saudáveis, principalmente os de maior grau de proliferação. Conseqüentemente, os esforços agora estão direcionados no sentido de se produzir agentes mais seletivos. Estudos de síntese e avaliação farmacológica de compostos contendo íons metálicos diferentes de platina têm despertado grandes interesses na terapêutica do câncer. Complexos baseados em rutênio, um metal do grupo da platina, têm demonstrado potencial antitumoral, com menor toxicidade sistêmica comparados aos de platina (SILVEIRA-LACERDA, 2010b).

No presente estudo avaliamos o potencial apoptótico, *in vitro*, de compostos de Rutênio (III) em células de leucemia mielóide crônica humana K-562 e sarcoma murino S180. Os resultados aqui apresentados demonstraram que o composto de Rutênio (III) induziu citotoxicidade e danos ao DNA de células tumorais, reduzindo sua viabilidade e causando citotoxicidade.

Três experimentos independentes, em triplicatas, foram realizados com as células K-562 e S-180 utilizando o teste de exclusão do Azul de Tripano e MTT de forma a se determinar o perfil citotóxico dos compostos estudados, assim como sua IC₅₀ (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração ($\mu\text{M.L}^{-1}$) dos compostos de rutênio que inibe 50 % da viabilidade das células tumorais (IC₅₀) pelo Ensaio de redução do MTT, tratadas *in vitro* por 48 h.

Compostos	Linhagem celular	
	K562	S180
Au16	0.68	0.6
Au21	-	-
RuMet	19,47	28,17
Cisplatina	50	63

Está bem estabelecido na literatura que a exposição terapêutica a xenobióticos pode resultar em ligação covalente com o DNA e danos genéticos, o que poderia ser um evento inicial no processo de carcinogênese química (RIBEIRO et al., 2006). Agentes

antineoplásicos geralmente apresentam propriedades alquilantes, complexando-se com o DNA, de forma indiscriminada, entre células normais e cancerosas.

Após o tratamento das células tumorais K562 com os complexos de rutênio, foi observada uma forte redução da concentração de DNA das amostras de células expostas às concentrações de 20 e 50 μM do composto RuMet (Figura 1). Estes mesmos resultados foram observados quando a linhagem tumoral S180 foi tratada com o composto Au16 por 24 horas (Figura 2).

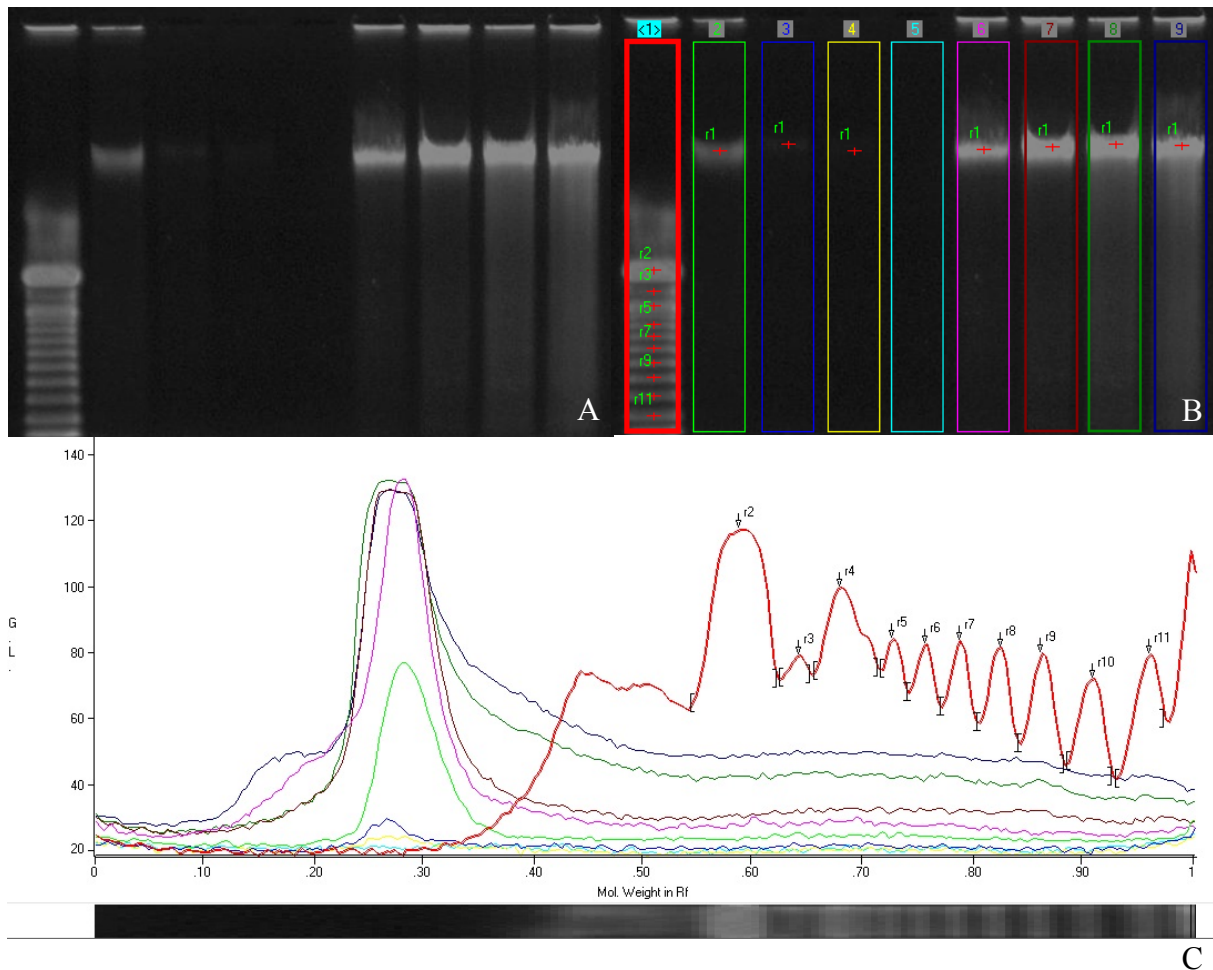


Figura 1. Análise de fragmentação de DNA de células tumorais K562 expostas a diferentes concentrações dos complexos RuMet e Au21 por 24 horas(A e B). **Raia 1**, ladder de 100 pb; **Raia 2**, células K562 controle não tratadas; **Raia 3**, células K562 expostas ao composto RuMet na concentração de 20 μM por 24h; **Raia 4**, células K562 expostas ao composto RuMet na concentração de 50 μM por 24h; **Raia 5**, não foi aplicada amostra; **Raia 6**, células K562 expostas ao composto Au21 nas concentração de 40 μM por 24h; **Raia 7**, células K562 expostas ao composto Au21 nas concentração de 60 μM por 24h; **Raia 8**, células K562 expostas ao composto Au21 na concentração de 80 μM por 24h; **Raia 9**, células K562 expostas a cisplatina na concentração de 50 μM por 24h.(C) Gráfico representativo das bandas observáveis no gel, através da avaliação da intensidade de fluorescência das bandas (densidade óptica).

Estes resultados, quando confrontados com o valor de IC_{50} destes compostos para as linhagens tumorais estudadas, revelam um forte efeito citotóxico. A ausência de padrão de

fragmentação por bandas, leva-se a crer numa possível ação oncótica do composto, frente a linhagem tumoral, causando-lhe morte, sem o deflagramento da cascata apoptótica.

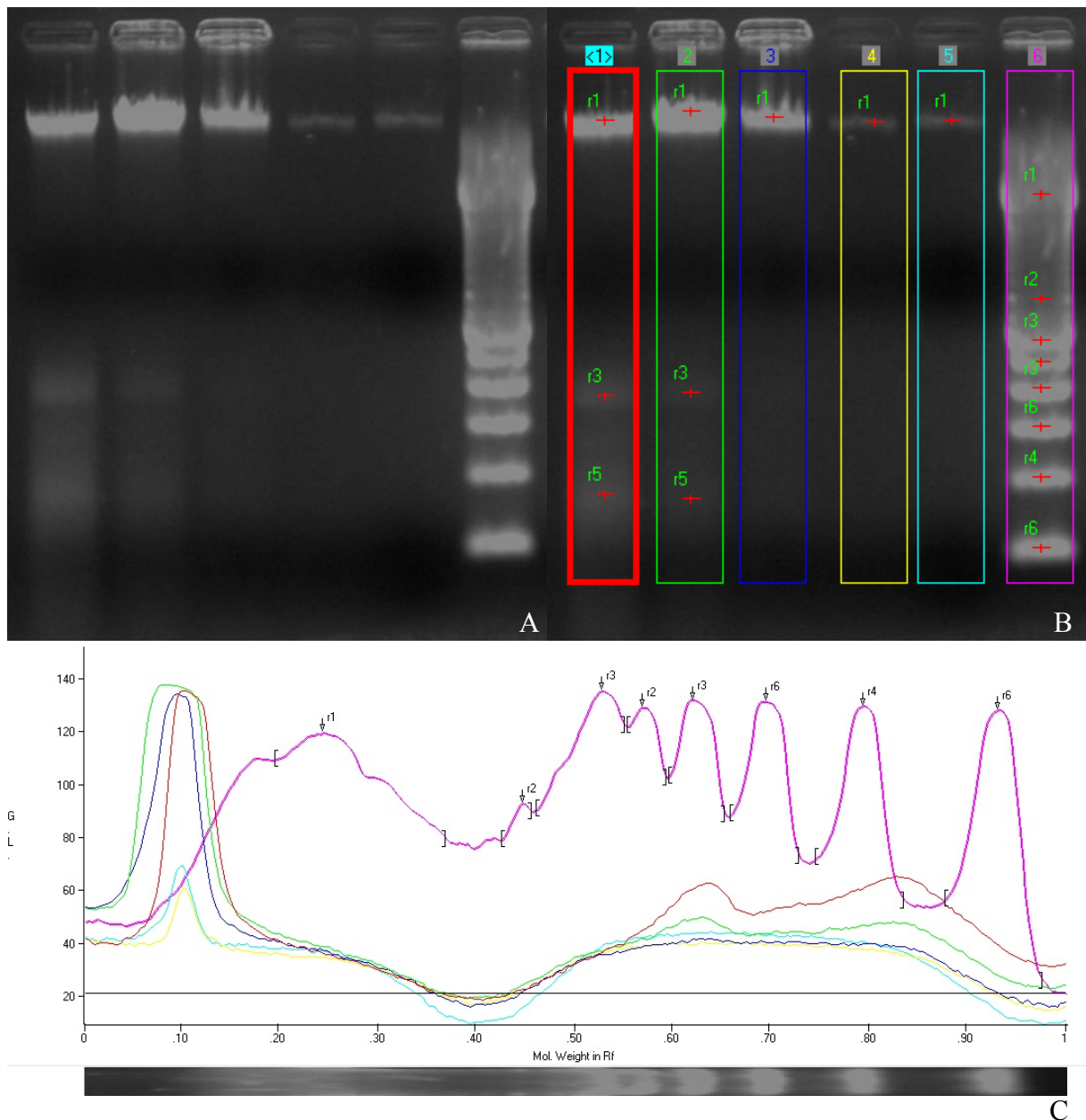
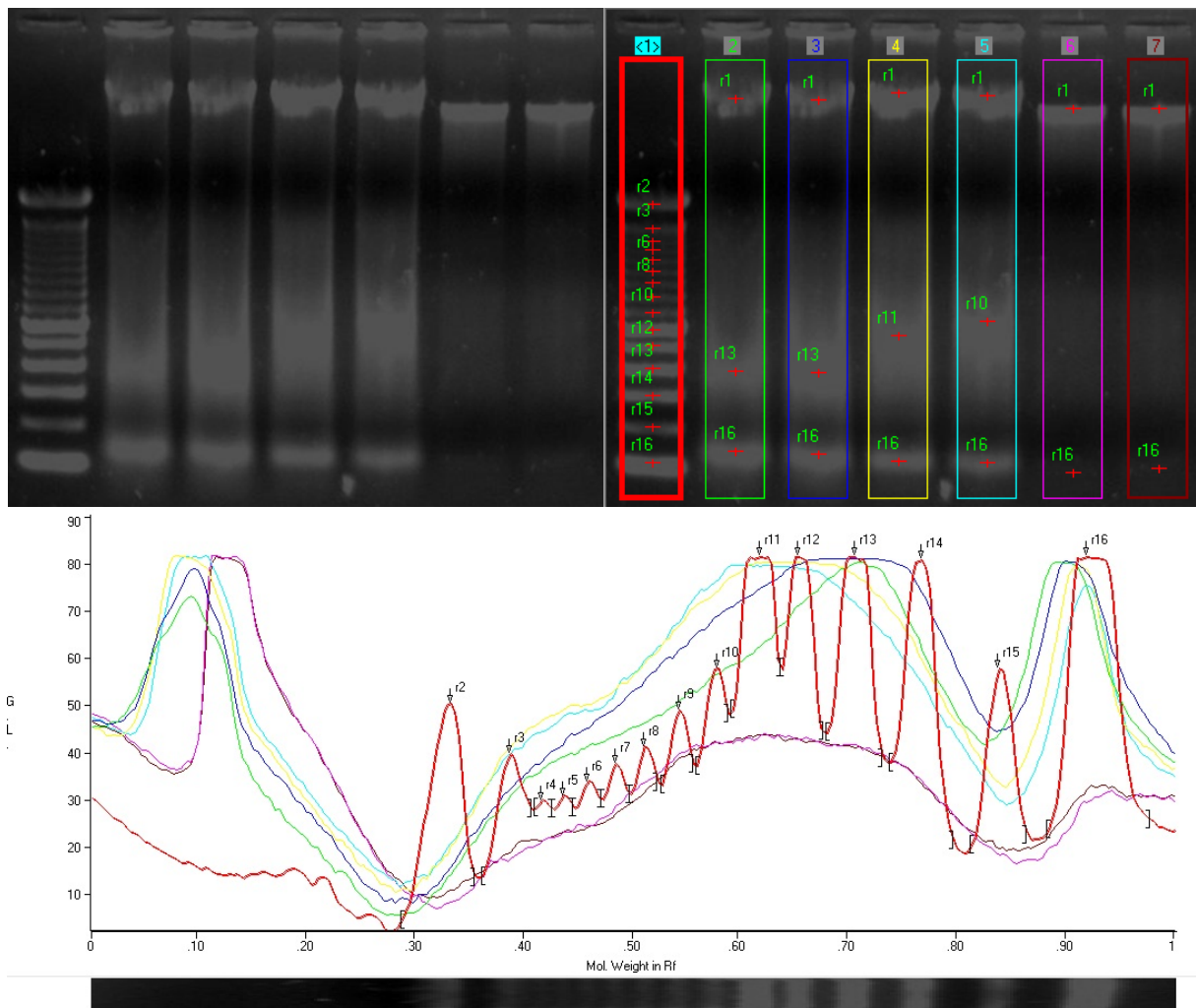


Figura 2. Análise de fragmentação de DNA de células tumorais S180 expostas a diferentes concentrações do complexo AU16 por 24 horas (A e B). **Raia 1**, ladder de 100 pb; **Raias 2 e 3**, células S180 controle não tratadas; **Raias 4 e 5**, células S180 expostas ao composto RuMet na concentração de 20 μM por 24h; **Raias 6 e 7**, células S180 expostas ao composto RuMet na concentração de 50 μM por 24h.(C) Gráfico representativo das bandas observáveis no gel, através da avaliação da intensidade de fluorescência das bandas (densidade óptica).

Ainda neste experimento, notou-se também, um efeito citotóxico, dose-dependente, por parte do composto AU21, pois, à medida que se aumentava a dose de tratamento, foi observado também um aumento de arraste de DNA (Figura 1). O arraste se dá, devido à

presença de DNA de diferentes pesos moleculares na raia, o que leva a crer numa possível interação entre o composto AU21 e o material nucléico da célula tumoral.

Para a linhagem tumoral de murino Sarcoma 180, foi observada uma redução da quantidade de DNA de alto peso molecular, nos tratamentos de maior concentração da droga RuMet (50 μM) (Figura 3). Esta redução pode estar relacionada com a possível interação entre o composto de Rutênio estudado e o desencadeamento de processos apoptóticos.



C

Figura 3. Análise de fragmentação de DNA de células tumorais S180 expostas a diferentes concentrações do complexo RuMet por 24 horas (A e B). **Raia 1**, ladder de 100 pb; **Raias 2 e 3**, células S180 controle não tratadas; **Raias 4 e 5**, células S180 expostas ao composto RuMet na concentração de 20 μM por 24h; **Raias 6 e 7**, células S180 expostas ao composto RuMet na concentração de 50 μM por 24h. (C) Gráfico representativo das bandas observáveis no gel, através da avaliação da intensidade de fluorescência das bandas (densidade óptica).

Estudos sobre o mecanismo pelo qual os complexos de rutênio se ligam ao DNA têm sido investigados, e ao contrário da formação de *crosslink* intrafita causado pela cisplatina, complexos de rutênio tem demonstrado se ligar ao DNA através de *crosslink* interfita, possivelmente favorecido pelas restrições impostas pela geometria octaédrica destes

compostos (ALLARDYCE & DYSON, 2001; PIZARRO et al., 2009). Apesar de cisplatina e complexos de rutênio formarem diferentes tipos de *crosslink* na molécula de DNA, a interação de ambos os compostos com o DNA ocorre preferencialmente através do N7 da guanina (CLARKE, 2003; PIZARRO, 2009).

Considerando o DNA como alvo, vários compostos de rutênio foram desenvolvidos e suas propriedades de ligação estão sendo testadas (CLARKE et al., 2003; BERGAMO & SAVA, 2007). As duas propriedades atribuídas ao complexo de rutênio: ativação pela redução e seu transporte seletivo via sistema transferrina pode explicar estas características antitumorais (CLAIRE & DYSON, 2001; FRASCA et al., 2001; TIMERBAEV et al., 2005).

6. CONCLUSÕES

No presente foi observado que os compostos RuMet, Au16 e Au21 apresentam potencial antitumoral, pois foram observadas alterações no padrão eletroforético de bandas de DNA de células tumorais K562 e S180, tratadas com estes compostos baseados em rutênio.

A diversidade no mecanismo de ação e aplicação que estes compostos podem alcançar é de grande interesse clínico. Porém, o uso de novos medicamentos antineoplásicos requer o seu conhecimento profundo e adequado, a fim de se evitar tratamentos insuficientes ou tóxicos. Assim, novos estudos mais aprofundados de forma a se caracterizar melhor o mecanismo de ação dos compostos estudados.

O conhecimento do mecanismo de como esses complexos de metal alcançam suas atividades é crucial para seu sucesso clínico e também para o desenho racional de novos compostos potencialmente melhorados. Desta forma, poderíamos dispor de drogas mais eficazes, pois agiriam especificamente nos mecanismos moleculares da neoplasia, com um grau bem menor de toxicidade.

7. REFERÊNCIAS

A.T.C.C. 2009. American Type Culture Collection. Disponível em <<http://www.atcc.org>>. Acesso em: 21 de maio 2009.

ALLARDICE, C.S.; DYSON, P.J. (2001). Ruthenium in Medicine: current clinical uses and future prospects. **Platinum Metals Review** 45 (2), 62-69.

BERGAMO, A.; GAGLIARDI R.S.; GARCIA, V.; FURLANI, A.; ALESSIO, E.; MESTRONI, G.; SAVA, G. (1999). In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors, and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 289 (1), 559-64.

BORTNER, C.D., OLDENBURG, N.B., CIDLOWSKI, J.A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. **Trends in Cell Biology** 5, 21-26.

BRABEC, V.; NOVÁKOVÁ, O. (2006). DNA binding mode of Ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. **Drug Resistance Update** 9, 111-122.

CLARKE, M.J. (2003) Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews** 236, 209-233.

DELHALLE, S.; DUVOIX, A.; SCHNEKENBURGER, M.; MORCEAU, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. (2003) An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. **Annals of the New York Academy of Science** 1010, 1-8.

FESIK, S.W. (2005) Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery, *Nature* 5, 876-885.

FRASCA, R.D.; GEHRIG, L.E.; CLARKE, M.J. (2001) Cellular effects of transferrin coordinated to $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ and *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$. **Journal of Inorganic Biochemistry** 83, 139-149.

HUANG, P.; OLIFF, A. (2001). Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy. **Trends in Cell Biology** 11, 343-348.

HUSCHTSCHA, L.I.; NOBLE, J.R.; NEUMANN, A. A.; MOY, E. L.; BARRY, P.; MELKI, J. R.; CLARK, S.J.; REDDEL, R.R. (1998) Loss of p16^{INK4} expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells. **Cancer Research** 58, 3508-3512.

INCA 2010. INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer/Ministério da Saúde (2003). Falando sobre câncer do intestino. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer - INCA. Rio de Janeiro.

JEMAL, A; TIWARI, R.C; MURRAY, T. (2004) Cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians** 54, 8-29.

KUNG, A; PIEPER, T. E; KEPPLER, B. K. (2001) Investigations into the interaction between tumor-inhibiting ruthenium (III) complexes and nucleotides by capillary electrophoresis. *Journal of chromatography B*, v.759, p. 81-89.

MENEZES, C.S.R.; COSTA, L.C.G.P.; ÁVILA, V.M.R.; FERREIRA, M.C.; UEIRA, C.V.; PAVANIN, L. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; SILVEIRA-LACERDA, E.P. (2007) Interaction between plasmid DNA and the *cis*-dichloroTetraammineRuthenium(III) chloride . **Chemico-Biological Interactions** 167, 116-124.

MESTRONI, G. ALESSIO, E.; CALLIGARIS, M. (1989). Rhodium (III) analogues of antitumor-active ruthenium (III) compounds: the crystal structure of $\{\text{ImH}\}\{\text{trans-RhCl}_4(\text{Im}=\text{imidazole})\}$. **Inorganica Clinica Acta**, v. 273, p. 62-71, 1989.

MORAES, A.M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L.R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica** – São Paulo; Roca 2007.

PEREIRA, F.C.; VILANOVA-COSTA, C.A.S.T.; LIMA, A.P.; RIBEIRO, A.S.B.B.; DA SILVA, A.D.; PAVANIN, L.A.; SILVEIRA-LACERDA, E.P. (2009) Cytotoxic and genotoxic effects of cis-tetraammine(oxalato)ruthenium(III) dithionate on the root meristem cells of *Allium cepa*, **Biological Trace Element Research** 128(3), 258-268.

PIZARRO, A.M.; SADLER, P.J. (2009) Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. **Biochimie** 91(10), 1198-1211.

SAMBROOK, JOSEPH; RUSSELL, DAVID W. *Molecular cloning : a laboratory manual* . New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SILVEIRA-LACERDA EDE P, VILANOVA-COSTA CA, PEREIRA FDE C, HAMAGUCHI A, PAVANIN LA, GOULART LR, HOMSI-BRANDENBURGO MI, SOARES AM, DOS SANTOS WB, NOMIZO A. (2010a) The ruthenium complex cis-(Dichloro)Tetraammineruthenium(III) chloride presents immune stimulatory activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Biological Trace Element Research**, 133(3):270-83.

SILVEIRA-LACERDA, E. P, VILANOVA-COSTA C.A.S.T.; HAMAGUCHI, A.; PAVANIN, L.A.; GOULART, L.R.; HOMSI-BRANDENBURGO, M. I.; SANTOS, W.B.; SOARES, A. M.; NOMIZO, A.(2010b) The Ruthenium Complex cis-(Dichloro)tetraammineruthenium(III) Chloride Presents Selective Cytotoxicity Against Murine B Cell Lymphoma (A-20), Murine Ascitic Sarcoma 180 (S-180), Human Breast Adenocarcinoma (SK-BR-3), and Human T Cell Leukemia (Jurkat) Tumor Cell Lines. **Biological Trace Element Research**, 135(1-3):98-111.

THOMPSON & THOMPSON. **Genética médica**. Guanabara Koogan, 6 ed, 2002.

TIMERBAEV, A.R.; HARTINGER, C.G.; ALEKSENKO, S. S.; KEPPLER, B.K. (2006) Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. **Chemical Reviews** 106, 2224-2248.

VOLTARELLI, F.A.; MELLO, M.A.R; DUARTE, J.A.R. (2008). Apoptosis and physical exercise: effects on skeletal muscle. *Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano* 10(1):100-105.