

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Câmpus Araraquara**

**Rone Aparecido De Grandis**

**Avaliação da atividade mutagênica de complexos heterolépticos de  
Rutênio(II) com atividade anti - *Mycobacterium tuberculosis***

**Araraquara/SP**

**2016**

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Câmpus Araraquara**

**Rone Aparecido De Grandis**

**Avaliação da atividade mutagênica de complexos heterolépticos de  
Rutênio(II) com atividade anti - *Mycobacterium tuberculosis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

**Orientadora:** Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira

**Araraquara/SP**

**2016**

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais Aparecido e Izilda,*

*Agradeço por terem me ensinado com grandiosidade e simplicidade que na vida não existe verdadeira vitória sem esforço e sacrifício. Vocês sempre me mostraram que ser humilde é a melhor escolha, assim sempre saberemos que ainda precisamos aprender muito, lutar muito, estudar muito, suar muito para conseguir alcançar o que desejamos. Obrigado por me aceitarem como sou, por respeitarem minha liberdade e minhas escolhas, por terem me dado as asas com as quais posso voar e por serem o colo quentinho, o melhor aconchego!*

*À minha orientadora Profª. Eliana,*

*Pela imensa alegria no convívio ao longo desses anos, pelo carinho e dedicação que teve ao me orientar nesse trabalho e em tantas outras realizações. Agradeço pelos ensinamentos que ultrapassam os muros da faculdade, pelos bons conselhos que levarei para sempre e o exemplo de conduta que desejo seguir. Tenho absoluta certeza de que sentirei muitas saudades das nossas conversas.*

## AGRADECIMENTOS

Ao escolher viver longe de casa e iniciar o curso de Farmácia-Bioquímica na UNESP, tomei uma decisão que mudaria por completo minha vida. Embora a vida universitária tenha me permitido muitas regalias, ao mesmo tempo exigiu de mim muita disciplina e persistência. Foram 6 anos de puro crescimento pessoal, onde aprendi a discernir pelo meu próprio bem. Mas, em muitas situações, precisei de pessoas ao meu lado ajudando a enfrentar os desafios da nova rotina. À essas pessoas, que estiveram presentes nos momentos de dificuldade e alegria da minha vida em Araraquara, que eu agradeço...

Agradeço primeiro a **Deus** por manter ao meu lado as pessoas que eu amo e que são importantes para minha vida e pra minha caminhada.

À **minha família** por seus gestos solidários, pela sua espiritualidade, pelo amor e carinho que me ensinaram os limites da vida, por ter investido e acreditado sempre na educação e me incentivado a trilhar os caminhos do conhecimento.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda**, pelas muitas oportunidades oferecidas e por toda a confiança em mim depositada.

À minha co-orientadora, **Profa. Dra. Flávia Resende Nogueira** pela nossa amizade que surgiu dentro do Laboratório de Mutagênese e por todas as competências que pude adquirir trabalhando ao seu lado.

À todos os amigos do Laboratório de Mutagênese, **Mariana Santoro, Débora Leite, Márcio Weiss, Lívia Espanha e Caterine Nogueira**. Obrigado a todos pela recepção amigável e pela ajuda nas atividades do laboratório.

Às amigas da faculdade, **Flávia Santana, Larissa Polli, Mariane Adami e Roberta Mingote** por toda a alegria de convívio diário, pelas festas, brincadeiras e companheirismo. Obrigado por manterem a estabilidade da nossa amizade tão forte.

Aos amigos do coração, **Érica Lopes e Flávia Marcussi**, amigas de tantos anos e **Wellington Marques**, agradeço muito a ajuda no laboratório e fora dele, o amor e carinho incondicionais e o apoio nos momentos bons e nem tão bons desse tempo que passou, agradeço por terem sido minha família em Araraquara e por manterem tão forte esse sentimento que nos une. Amo vocês!

Aos meus queridos professores da graduação, **Profa. Dra. Márcia da Silva (in memoriam)**, **Profa. Dra. Mara Pinto**, **Prof. Dr. Sandro Valentini**, **Profa. Dra. Clarice Queico**, **Profa. Dra. Patrícia Mastroiani**, **Profa. Dra. Hérica Salgado**, **Prof. Dr. Jean dos Santos**, **Prof. Dr. Saulo Garrido**, **Profa. Dra. Cleopatra Planeta** e **Profa. Dra. Rosângela Peccinini**, pelas brilhantes aulas que se tornaram os momentos de maior aprendizado acadêmico durante a faculdade.

À **Jornada Farmacêutica da UNESP**, que foi o local onde eu pude treinar diversas competências pessoais. Agradeço especialmente a 61ª Gestão que me deu o prazer de realizar um evento excepcional. Destaco também meu agradecimento à **Profa. Dra. Ana Dóris de Castro** pelas saborosas conversas, sempre construtivas e divertidas.

Aos meus alunos e à coordenação do **CUCA-UNESP**, pelos 3 anos de troca de experiências e pela oportunidade de aprender ensinando.

À equipe da **Farmácia-Escola “Prof. Dr. Antônio Alonso Martinez”**, **Farmacêuticas Silmara e Cristiane** e os **Técnicos Adriano e Val** por todo o ensinamento prático e clima agradável construído durante meu estágio.

Aos funcionários da FCF, **Silva Helena** e **Margareti Rossi** do Departamento de Ciências Biológicas, **Alexandre Pazoti** e **Helenisa Hudari** da Seção Técnica de Graduação, **Eduardo Massari** e **Renato Herlani** da Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, **Sebastiana Cândida** e **Olívia Inez** da portaria, **Irani Coito**, **Max Brandão** e **Lívia Laila** da Biblioteca, meu muito obrigado pela ajuda mais do que profissional nas suas respectivas competências.

Aos **Membros da Banca Examinadora**, por sua disposição e paciência em analisar este trabalho e trazer contribuições preciosas para sua finalização.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP)**, por ter sido local de grande aprendizado nesses anos, tornando-se minha verdadeira morada em Araraquara, um lugar que aprendi a amar e que fará muita falta. Um até logo...

A todos que foram importantes direta ou indiretamente na história construída em Araraquara que, por falta de memória, mas não de gratidão, eu possa ter esquecido de mencionar nessas linhas.

**MEU MAIS SINCERO OBRIGADO A TODOS!**

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão  
uma gota de água no mar, mas o mar seria menor se lhe  
faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)*

## Lista de Abreviaturas e Siglas

---

<b>Abreviaturas</b>	
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>CBMN-cit</b>	Ensaio do micronúcleo citoma com bloqueio da citocinese
<b>CETESB</b>	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
<b>CHO-K1</b>	Células de Ovário de Hamster Chinês
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>D-MEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfônico
<b>HepG2</b>	Células de carcinoma hepatocelular humano
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>IDN</b>	Índice de divisão nuclear
<b>MN</b>	Micronúcleo
<b>NBUD</b>	Brotamentos nucleares
<b>NPB</b>	Pontes nucleoplasmáticas
<b>OECD</b>	Organisation for Economic Co-operation and Development
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SCAR</b>	Complexos de Rutênio(II) fosfina/diimina/picolinato
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>TB</b>	Tuberculose
<b>TB-MDR</b>	Tuberculose multi-droga resistente
<b>TB-XDR</b>	Tuberculose Extensivamente droga resistente

---

## Lista de Ilustrações

<b>Figura 1.</b> <i>Pipeline</i> de desenvolvimento de fármacos anti-TB.....	14
<b>Figura 2.</b> Estrutura dos complexos SCAR .....	22
<b>Figura 3.</b> Contagem de colônias de <i>S. typhimurium</i> .....	27
<b>Figura 4.</b> Ensaio de Sobrevivência Clonogênica em cultura de células HepG2. ....	30
<b>Figura 6.</b> Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem CHO-K1.. ....	43
<b>Figura 7.</b> Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem HepG2.....	43

## Lista de Tabelas

- Tabela 1** - Características genóticas e fenotípicas das cepas padrões sugeridas para o Teste de Ames utilizadas no estudo..... 24
- Tabela 2** - Atividade mutagênica expressa pela média ( $\pm$ DP) do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) (em parênteses) da cepa TA1535 de *Salmonella typhimurium* expostas à diferentes concentrações do complexo metálico SCAR 4, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica ..... 37
- Tabela 3** - Atividade mutagênica expressa pela média ( $\pm$ DP) do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) (em parênteses) das cepas TA1535, TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella typhimurium* expostas à diferentes concentrações do complexo metálico SCAR 5, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica ..... 38
- Tabela 4** - Atividade mutagênica expressa pela média ( $\pm$ DP) do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) (em parênteses) das cepas TA1535, TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella typhimurium* expostas à diferentes concentrações do complexo metálico SCAR 6, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica ..... 39
- Tabela 5** - Média ( $\pm$ DP) do número de MN, NPBs, NBUDs e IDN em 1000 células CHO-K1 tratadas com diferentes concentrações ( $\mu$ M mL<sup>-1</sup>) dos complexos SCARs<sup>a</sup> ..... 47
- Tabela 6** - Média ( $\pm$ DP) do número de MNs, NPBs, NBUDs e IDN em 1000 células HepG2 tratadas com diferentes concentrações ( $\mu$ M mL<sup>-1</sup>) dos complexos SCARs<sup>a</sup> ..... 48

## RESUMO

A tuberculose (TB) é classificada como a segunda causa de morte por um único agente infeccioso, o *Mycobacterium tuberculosis*. Crescentes incidências de cepas resistentes a múltiplas drogas (MDR) estão emergindo como uma ameaça global à saúde. Além disso, os medicamentos padrões da terapia são incapazes de controlar o surto de TB-MDR e os casos de co-infecção com HIV. Nos últimos anos, um grande número de grupos de pesquisa têm dedicado a sua atenção para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos específicos e de baixo custo, direcionados às cepas MDR. Novos estudos apontam os complexos de rutênio(II) como uma promissora alternativa na terapia anti-TB. Esses complexos vêm sendo testados contra diversas bactérias e estudos atuais indicaram excelentes resultados contra cepas de TB-MDR. Todavia, mesmo com resultados promissores, é imprescindível avaliar seus efeitos toxicológicos, a fim de garantir um uso seguro à saúde humana. Nesse contexto, a avaliação do potencial mutagênico é fundamental para assegurar seu uso sem demonstrar riscos no desenvolvimento de cânceres, bem como outras doenças desencadeadas por alterações no DNA. Baseados nisso, este trabalho teve como objetivo, avaliar os efeitos mutagênicos de três complexos de rutênio(II), com promissora atividade anti-TB-MDR, denominados de SCAR 4, SCAR 5 e SCAR 6 por meio dos ensaios de mutação gênica reversa nas cepas TA1535 TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) e pelo ensaio do micronúcleo citoma com bloqueio da citocinese (CBMN-cit) em cultura de células CHO-K1 e HepG2. Em ambos os ensaios, foram utilizados modelos onde foi possível avaliar o efeito da metabolização dos complexos. O ensaio de sobrevivência clonogênica foi utilizado para avaliar o efeito antiproliferativo nas linhagens CHO-K1 e HepG2, além de selecionar concentrações não citotóxicas para o ensaio do CBMN-cit. Por meio destes experimentos observou-se que os complexos SCARs induziram uma redução dose-dependente na viabilidade das células CHO-K1 e HepG2, tendo o complexo SCAR 5 apresentado a maior resposta citotóxica, enquanto que o complexo SCAR 6 mostrou maior seletividade de ação na linhagem tumoral. Embora os complexos SCAR 4 e 5, não revelaram nenhuma atividade mutagênica, o complexo SCAR 6 foi capaz de provocar mutações do tipo *frameshift* na cepas TA97a de *S. typhimurium* na presença de metabolização. Da mesma forma, observou-se dano cromossômico nas células HepG2 com aumentos significativos de micronúcleos e pontes nucleoplásmicas. Estes dados indicam que os complexos SCAR 4 e 5 não apresentaram mutagenicidade por meio dos modelos utilizados, enquanto que o complexo SCAR 6 apresenta atividade mutagênica em sistemas metabolizadores. Este estudo apresentou uma avaliação genotóxica *in vitro* abrangente dos complexos de Rutênio(II) SCAR que contribui com a elucidação do perfil de segurança no uso terapêutico desses complexos.

**Palavras-chave:** tuberculose, complexos de rutênio, genotoxicidade.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1. Bactéria de interesse em saúde pública: <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b> .....	<b>12</b>
<b>1.2. Química inorgânica no desenvolvimento de fármacos</b> .....	<b>14</b>
<b>1.3. A importância da avaliação da mutagenicidade</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4. Ensaio de mutação gênica reversa com <i>Salmonella typhimurium</i></b> .....	<b>16</b>
<b>1.5 Ensaio do micronúcleo citoma com bloqueio da citocinese (CBMN-cit)</b> .....	<b>17</b>
<b>1.6 Culturas celulares</b> .....	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1. Objetivos Específicos</b> .....	<b>21</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1 Síntese dos complexos</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2 Ensaio de mutação gênica reversa com <i>Salmonella typhimurium</i></b> .....	<b>22</b>
3.2.1 Verificação das características genéticas das cepas de <i>S. typhimurium</i> .....	24
3.2.2 Manutenção e estoque das cepas de <i>S. typhimurium</i> .....	24
3.2.3 Preparo dos inóculos de <i>S. typhimurium</i> .....	25
3.2.4 Preparo da mistura S9.....	25
3.2.5 Controles .....	26
3.2.6 Teste de Ames.....	26
3.2.7 Análise dos resultados.....	27
<b>3.3 Ensaios de Sobrevivência Celular</b> .....	<b>28</b>
3.3.1 Cultivo e manutenção das culturas celulares .....	28
3.3.2 Repique e manutenção das células.....	29
3.3.3 Sobrevivência Celular .....	29
3.3.4 Análise Estatística .....	30
<b>3.4 Ensaio do micronúcleo citoma com bloqueio da citocinese (CBMN-cit)</b> .....	<b>31</b>
3.4.1 Análise das lâminas.....	32
3.4.2 Análise estatística.....	33
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1. Ensaio de Sobrevivência Clonogênica</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2. Ensaio do micronúcleo citoma com bloqueio da citocinese (CBMN-cit)</b> ..	<b>45</b>

4.3. Ensaio de mutação gênica reversa com <i>Salmonella typhimurium</i> .....	35
5. CONCLUSÃO.....	51
6. REFERÊNCIAS.....	51

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Bactéria de interesse em saúde pública: *Mycobacterium tuberculosis*

O *Mycobacterium tuberculosis* ou bacilo de Koch, principal agente etiológico da tuberculose, é responsável pela morte de dois a três milhões de pessoas no mundo e por prejuízos econômicos globais de aproximadamente 12 bilhões de dólares ao ano. As últimas estimativas divulgadas no relatório publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) apontaram 9,6 milhões de novos casos em 2014, sendo detectadas 1,5 milhão de mortes. Desse número, 26% dos casos tem co-infecção com HIV (GLOBAL ALLIANCE, 2009; WHO, 2015)

Ainda que a terapia padrão para a TB seja ativa, tratamentos mais eficazes se tornam necessários para reduzir a carga de processos infecciosos (ZUMLA et al., 2015).

Além disso, é crescente o número de novos casos de TB multi-droga resistente (MDR), onde as cepas de *M. tuberculosis* apresentam resistência a pelo menos rifampicina e isoniazida e outro fármaco que não seja uma fluoroquinolona, e TB extensivamente droga resistente (XDR), definida pela resistência à rifampicina, isoniazida, qualquer fluoroquinolona e pelo menos um dos fármacos de segunda linha, ou seja, praticamente sem qualquer alternativa farmacológica (SOMAN et al., 2014; WHO, 2014).

Os protocolos para a TB-MDR envolvem meses de tratamento e combinação de diversos medicamentos. Esses regimes estão associados a efeitos adversos significativos e comorbidade psicológica, em razão do isolamento social (BROWN et al., 2015).

O investimento em pesquisa e desenvolvimento (P&D) de fármacos tem aumentado substancialmente nas últimas décadas, entretanto o número anual de

novos fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* USA (FDA) não aumentou em conformidade (MUNOS, 2009). Fatos como a falta de novos fármacos anti-tuberculose desde 1960, fracasso do tratamento com TB-XDR e TB-MDR e maior investimento em P&D, vem despertando o interesse de muitos grupos de pesquisa no desenvolvimento de estratégias para identificar novos fármacos contra tuberculose (KOUL et al., 2011).

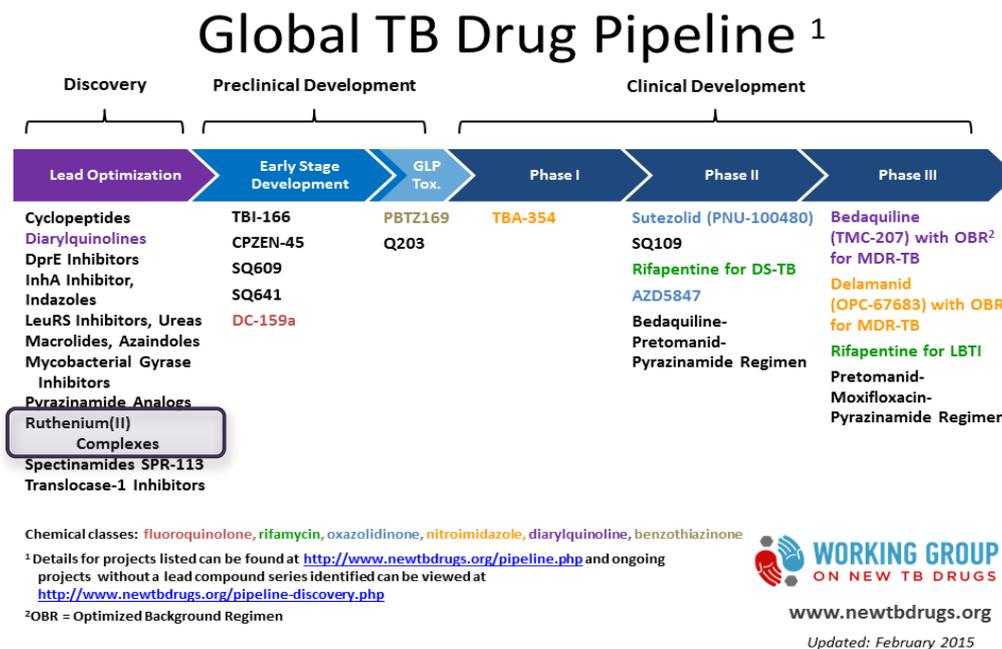
Depois de 50 anos, dois novos medicamentos contra TB foram aprovados pelo FDA e pela EMA (*European Medicines Agency*) (ZUMLA et al., 2015). A bedaquilina e delamanida foram autorizadas a entrar no mercado, com uso racional, ainda em estudos clínicos, vista a carência de novos fármacos mais eficazes contra a TB-MDR (SKRIPCONOKA et al., 2013; GOULOOZE et al., 2015)

Embora novas moléculas estejam em fase clínica de desenvolvimento, não existem medicamentos totalmente eficazes contra cepas resistentes.

Dentro da busca por novas moléculas mais seguras e eficazes, os complexos de rutênio têm apresentado resultados promissores, com concentrações inibitórias mínimas (MIC) menores ou equivalentes aos fármacos de primeira linha (PAVAN et al., 2013).

Em particular importância, os complexos de rutênio(II) contendo ligantes como picolinatos, diiminas e fosfinas (SCAR), sintetizados pelo grupo de Química Inorgânica da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar, apresentaram atividade promissora frente à cepas dormentes e MDR de *M. tuberculosis* (PAVAN et al., 2010, 2011).

Esses resultados levaram os complexos SCAR a ocuparem uma importante posição no *pipeline* global de fármacos anti-TB em pesquisa e fases de aprovação (Figura 1).



**Figura 1.** Pipeline de desenvolvimento de fármacos anti-TB. Working Group on new TB drugs ([www.newtbdrugs.org](http://www.newtbdrugs.org), 2015)

Vista a importante atividade dos complexos de Rutênio(II) SCAR frente às cepas MDR de TB, nosso grupo têm buscado elucidar o perfil de segurança desses complexos, como parte dos estudos pré-clínicos recomendados, a fim de dar subsídios e garantir o desenvolvimento seguro, como possíveis candidatos na terapia anti-TB (PAVAN et al., 2013).

## 1.2. Química inorgânica no desenvolvimento de fármacos

A química medicinal inorgânica mostra ser uma ferramenta em potencial para minimizar os problemas de tratamento da tuberculose. Sabe-se que muitos elementos metálicos desempenham papel crucial em sistemas vivos (OLIVEIRA et al., 2006).

Considerando que os íons metálicos são deficientes em elétrons, e que a maioria das moléculas biológicas, tais como proteínas e DNA são ricos em elétrons, a atração destas cargas opostas leva a uma tendência geral dos íons metálicos em se ligar e interagir com moléculas biológicas. A relação estrutura atividade entre os complexos e

os ligantes livres evidencia que a complexação com o metal pode aumentar a atividade antimicobacteriana do ligante, principalmente se este já for um fármaco, e também indica que o material desempenha por si só um papel relevante (BERNHARDT et al., 2008; ZHANG et al., 2011).

Os complexos de Rutênio (Ru) têm sido avaliados como potenciais agentes contra uma série de bactérias (GORLE et al., 2014; LI et al., 2015). Em alguns casos foi demonstrado que tais complexos contendo fármacos (antibióticos) como ligantes orgânicos podem superar a resistência desenvolvida pelas bactérias para os ligantes livres (NAVARRO et al., 1998; SHAIENDRA et al., 2001).

Observa-se uma satisfatória atividade antimicobacteriana dos complexos de Ru(II) e seus ligantes em ensaios preliminares *in vitro* contra *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, indicando que fármacos inorgânicos são promissores contra o bacilo da tuberculose (NASCIMENTO et al., 2008).

### **1.3. A importância da avaliação da mutagenicidade**

Atualmente, observa-se a tentativa de síntese de novos compostos com atividade biológica. No entanto, muitos deles ainda não podem ser utilizados na terapêutica, devido as suas propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (MAISTRO et al., 2010; NUNES et al., 2012). Apesar de demonstrarem boas atividades antimicobacterianas, complexos de Ru(II) precisam passar por ensaios preliminares, a fim de assegurar seu uso e esclarecer sua inocuidade quanto ao material genético humano.

As indústrias farmacêuticas utilizam-se de ensaios de mutagenicidade *in vitro* e *in vivo* para deliberação de novos agentes terapêuticos. Segundo a ICH (*International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of*

*pharmaceuticals for human use*), uma bateria de testes genotóxicos deve ser realizada para o registro seguro de novos fármacos. Dentre eles, destacam-se os testes de mutação gênica em procariotos, testes *in vitro* para avaliação citogenética de dano cromossômico em células de mamíferos, além de testes *in vivo* para avaliação de dano cromossômico em células hematopoiéticas de roedores (ICH, 2011).

#### **1.4. Ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium***

As mutações gênicas, por exemplo, podem ser investigadas pela utilização de linhagens de *S. typhimurium* sensíveis a substâncias capazes de induzir diferentes tipos de mutação, conhecido como teste de Ames. O método emprega linhagens de *S. typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (His-), apresentando diferentes mutações no operon deste aminoácido, sendo desenvolvidas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) ou substituições de bases no DNA (MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Essas linhagens são incapazes de sintetizar o aminoácido histidina (histidina dependentes) e, portanto, são incapazes de crescer e formar colônias na sua ausência. Novas mutações no local dessas mutações pré-existentes, ou nas proximidades dos genes, podem restaurar a função do gene e permitir que as células sintetizem histidina. Estas células recém-mutadas podem crescer na ausência de histidina e formar colônias. Por esta razão, o teste é muitas vezes referido como um “ensaio de reversão”. O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de uma população de bactérias expostas à amostra a ser testada (MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

As linhagens bacterianas não apresentam enzimas de metabolização, o que impossibilita sua capacidade para identificação de agentes mutagênicos de ação

indireta. Para superar essa dificuldade, adiciona-se às culturas durante os ensaios a chamada fração S9, que contém enzimas de metabolização de xenobióticos e é obtida a partir do fígado de ratos (MARON & AMES, 1983). Todas essas características conferem ao Teste de Ames uma grande capacidade de identificação e caracterização de diferentes agentes mutagênicos, com grande eficiência e sensibilidade.

### **1.5 Ensaio do micronúcleo citoma com bloqueio da citocinese (CBMN-cit)**

A avaliação de danos cromossômicos, por exemplo, pode ser investigada por meio do teste do micronúcleo. Estas anormalidades na estrutura do cromossomo são uma consequência direta do dano em nível de DNA. Por exemplo, as quebras cromossômicas podem resultar de quebras duplas de DNA não reparadas e os rearranjos cromossômicos, do reparo incorreto de quebras na fita de DNA. A perda de cromossomos e os erros de segregação são eventos importantes na carcinogênese, causados principalmente por defeitos na formação do fuso, centrômero, e como consequência de alterações na condensação da cromatina antes da metáfase (FENECH, 2000; FENECH et al., 2006; 2007). Nas técnicas citogenéticas clássicas, os cromossomos são estudados diretamente pela observação de aberrações nas metáfases. Entretanto, essa abordagem, embora mais detalhista, é bastante complexa e trabalhosa. Desse modo, o desenvolvimento de um sistema simples para avaliação do dano cromossômico foi necessário. O ensaio de micronúcleo é hoje um dos testes citogenéticos mais bem estabelecidos no campo da genética toxicológica, com validação internacional e aplicável a qualquer população celular nucleada (FENECH, 2000; FENECH et al., 2006; 2007).

O micronúcleo indica um índice de quebras cromossômicas permanentes e perda cromossomal, que pode ser detectado em células que tenham completado ao menos um ciclo de divisão celular (FENECH, 2000; FENECH et al., 2006; 2007).

Micronúcleos também podem ser formados através de brotamento nuclear na interfase. No entanto, quando este processo é incompleto pode dar origem a brotos nucleares (NBUDs – “Nuclear Buds”), os quais permanecem presos ao núcleo por uma fina ponte nucleoplasmática (FENECH, 2006). Os brotos nucleares podem ser formados durante a fase S da mitose por DNA amplificado localizado em sítios específicos na periferia do núcleo em células tumorais humanas (El-Zein et al., 2008; FENECH, 2006). Além dos brotos nucleares, ocasionalmente, pontes nucleoplásmicas (NPBs – “Nucleoplasmic Bridges”) entre os núcleos também podem ser observadas e frequentemente correspondem a cromossomos dicêntricos em que os centrômeros foram puxados para pólos opostos da célula, constituindo assim, em um indicativo de rearranjo cromossômico. Pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares são indicadores promissores no monitoramento de dano genético (DUAN et al., 2009).

O teste de micronúcleos, portanto, detecta em eucariotos, mutagênese cromossômica do tipo clastogênica, aneugênica e danos no fuso mitótico. O micronúcleo normalmente aparece pela primeira vez no final da primeira divisão mitótica, após clastogênese ou aneugênese, porém micronúcleos adicionais podem se formar nas divisões seguintes. Por isso, para visualizar micronúcleos, as células precisam ter passado por um ciclo mitótico (FENECH, 2000; FENECH et al., 2006; 2007).

Para a execução da técnica de micronúcleo, a população celular deve se dividir e a cinética dessa divisão celular deve ser bem estabelecida. Considerando que as células de uma população não se dividem ao mesmo tempo, várias abordagens foram desenvolvidas para facilitar a execução do teste. Uma das mais conhecidas é o teste

de micronúcleo com bloqueio na citocinese. Nessa variação do teste, as células que completaram uma divisão nuclear são tratadas com citocalasina B, um inibidor da polimerização da actina, necessária para formação dos microfilamentos que constriem o citoplasma entre os núcleos filhos durante a citocinese, permitindo que as células em divisão sejam rapidamente identificadas pelo aspecto binucleado. O uso da citocalasina B possibilita o acúmulo das células em divisão no estágio binucleado na população, independente da sincronização e proporção de células em divisão (FENECH, 2000; FENECH et al., 2006; 2007).

Em razão dessas características, o conceito desse teste como um ensaio citoma de determinação de instabilidade cromossomal tem sido sugerido. O conceito “citoma” deve-se ao fato de cada célula do sistema estudado ser avaliada citologicamente em relação ao seu estado de viabilidade, estado mitótico (mono-, bi-, tri- ou tetranucleada) e instabilidade cromossomal ou danos (presença de micronúcleo, pontes nucleoplásmicas entre as células binucleadas e broto nuclear) (FENECH et al., 2006; 2007).

## **1.6 Culturas celulares**

De acordo com TAKAHASHI (2003), dentre os tipos celulares mais empregados em ensaios *in vitro* de mutagênese e carcinogênese, destacam-se os linfócitos de sangue periférico humano e linhagens provenientes de Hamster Chinês, como por exemplo, as linhagens CHO (células de ovário) e V79 (fibroblastos de pulmão).

As linhagens obtidas a partir de Hamster Chinês apresentam algumas vantagens, que propiciam sua utilização em estudos de genotoxicidade, como a facilidade de crescimento durante o cultivo, o pequeno número de cromossomos e um ciclo celular curto (10 a 14 horas, aproximadamente) (PRESTON et al., 1987). No

entanto, grande parte das linhagens empregadas em ensaios *in vitro* não apresentam a capacidade de metabolizar compostos xenobióticos, havendo, muitas vezes, a necessidade de adição de sistemas exógenos para executar essa função como, por exemplo, a fração S9 (fração microsomal obtida a partir de fígado de ratos tratados com Aroclor 1254) (GALLOWAY et al., 1994).

Contudo, a utilização de linhagens celulares com capacidade de ativação metabólica é uma escolha mais usual. Um bom exemplo são as culturas provenientes de hepatocarcinoma humano, HepG2.

As células HepG2 foram isoladas em 1979 a partir de um hepatoblastoma primário de um garoto argentino de 11 anos. Essa linhagem apresenta morfologia semelhante ao epitélio e ao parênquima hepático, além de manter a capacidade de sintetizar e secretar a maioria das proteínas plasmáticas características das células normais do fígado humano (KNASMULLER et al., 1998). Essas células conservam as atividades das enzimas de fase I, tais como as do citocromo P450 CYP1A1, CYP1A2, CYP2B e CYP2E1, como também as enzimas de fase II, incluindo glutationa-S-transferases, sulfotransferases, N-acetiltransferases e glucuronosiltransferases, sendo que tais enzimas estão envolvidas no metabolismo de carcinógenos, as quais apresentam importante função na ativação e detoxificação de carcinógenos reativos de DNA (MAJER et al., 2004). Portanto, é aceitável que os ensaios com células HepG2 refletem mais adequadamente os danos causados por mutágenos que os testes *in vitro* feitos com bactérias ou células de mamíferos, os quais requerem a adição de misturas de ativação exógenas para mimetizar o metabolismo de compostos de ação indireta (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

A comparação dos resultados dos ensaios de mutagênese em diferentes tipos celulares, metabolizadoras e não metabolizadoras, podem fornecer dados importantes sobre o mecanismo de ação desses compostos.

## 2. OBJETIVO

Elucidar o perfil genotóxico *in vitro* dos complexos heteroléticos de Rutênio(II) fosfinas/diiminas/picolinato:  $\text{Ru}[(\text{pic})(\text{dppe})(\text{phen})]\text{PF}_6$  (SCAR 4), *cis*- $[\text{Ru}(\text{pic})(\text{dppe})_2]\text{PF}_6$  (SCAR 5) e *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{dppb})(\text{bipy})]$  (SCAR 6).

### 2.1. Objetivos Específicos

a) Avaliar a atividade mutagênica, em nível gênico, dos complexos SCAR 4, 5 e 6, por meio de ensaios de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium*, utilizando as cepas TA1535, TA98, TA97a, TA100 e TA102, em ausência e presença de metabolização.

b) Avaliar o efeito antiproliferativo por meio de ensaios de sobrevivência clonogênica nas linhagens CHO-K1 e HepG2 mediante o tratamento de 48 horas com os complexos SCAR 4, 5 e 6.

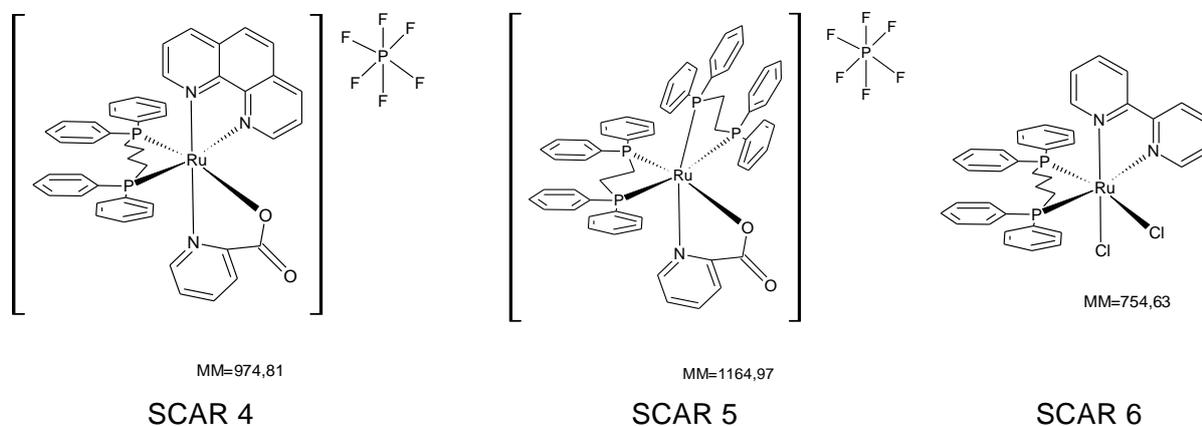
c) Avaliar a atividade mutagênica, em nível cromossômico, dos complexos SCAR 4, 5 e 6, por meio do Ensaio do micronúcleo citoma com bloqueio da citocinese (CBMN-cit), utilizando as linhagens celulares CHO-K1 e HepG2.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Síntese dos complexos

Os complexos SCAR 4, SCAR 5 e SCAR 6 (Figura 2), foram sintetizados e caracterizados pelo grupo de Química Inorgânica sob responsabilidade do Prof. Dr. Alzir Azevedo Batista, do Departamento de Química Inorgânica da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar.

Os procedimentos de síntese e os ensaios de caracterização estão descritos nas publicações de PAVAN et al. (2010, 2011).



**Figura 2.** Estrutura dos complexos SCAR

Os complexos foram solubilizados em DMSO (Sigma) atingindo a concentração desejada para a realização dos testes.

### 3.2 Ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium* (MARON & AMES, 1983)

No presente estudo foram utilizadas as cepas TA98, TA100, TA1535, TA97a e TA102 de *S. typhimurium*, gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, EUA, em experimentos com e sem ativação metabólica.

A cepa TA98 apresenta mutação no gene *hisD* (*hisD3052*) que codifica para a histidinol desidrogenase, apresentando como ponto preferencial para a reversão de oito resíduos repetitivos de G:C, favorecendo a detecção de compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA (*frameshift*).

A mutação *hisG46* presente na cepa TA100 ocorre no gene que codifica a primeira enzima do processo de biossíntese da histidina, através da substituição do códon selvagem GGG (CCC) – prolina – por GAG (CAT) – leucina. Assim, essa cepa

detecta agentes mutagênicos que ocasionam substituições, principalmente neste par G:C.

Da mesma forma que a TA100, a cepa TA1535, identifica mutações por substituição de G:C para A:T, mas não possui o plasmídeo pKM101. Devido a tal propriedade, utiliza-se a TA1535 para detecção de agentes que possam induzir metilação e causar substituição de pares de bases (G:C). Sua construção é baseada em uma mutação de ponto, a partir de alteração de base A:T por G:C, que codifica numa trinca específica prolina e leucina, respectivamente, obtendo-se a produção da primeira enzima da biossíntese de histina, restaurando o fenótipo selvagem.

A cepa TA97a apresenta uma mutação que, ao ser alterada (*hisGD6610*), causa deleção de um par de bases (*frameshift mutation*), levando a proliferação bacteriana pelo restabelecimento normal do quadro de leitura. Esta mutação induzida dá origem à formação de uma pseudo histidinol desidrogenase, o que permite o crescimento muito próximo ao normal em meio mínimo.

A cepa TA102 contém a mutação *ochre* TAA no gene *hisGe*, que detecta eficientemente mutágenos que causam danos oxidativos e agentes *cross-link*. Ela apresenta aproximadamente 30 cópias do plasmídeo que confere resistência à tetraciclina e contém o gene mutante *hisG*, determinando seu caráter auxotrófico. Além disto, contém o par de bases A:T no sítio crítico da reversão, detectando uma grande variedade de mutagênicos oxidativos e de agentes *cross-links* que atacam preferencialmente estes pares de base, diferenciando-a das demais cepas que são revertidas nos alvos G:C.

Resumidamente, as características genóticas e fenotípicas das cepas padrão avaliadas no presente estudo estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Características genóticas e fenóticas das cepas padrões sugeridas para o Teste de Ames utilizadas no estudo

Cepa	Mutação <i>His</i>	Plasmídeos	Outras mutações	Tipo de mutação detectável	
TA98	<i>hisD3052</i>	pKM101	<i>rfaΔ(uvrBchlbio)</i>	Frameshift	Deleção G:C
TA100	<i>hisG46</i>	pKM101	<i>rfaΔ(uvrBchlbio)</i>	Substituição	G:C para A:T
TA1535	<i>hisG46</i>	-	<i>rfaΔ(uvrBchlbio)</i>	Substituição	G:C para A:T
TA97a	<i>hisD6610</i> <i>hisO1242</i>	pKM101	<i>rfaΔ(uvrBchlbio)</i>	Frameshift	Adição G:C
TA102	<i>pAQ1 (hisG428)</i>	pKM101	<i>rfa</i>	Substituição	A:T para G:C

***rfaΔ***: Esta mutação leva à perda parcial da camada de lipopolissacarídeos da parede bacteriana (LPS), tornando a célula mais permeável a diferentes moléculas.

***uvrB***: A deleção do gene *uvrB* elimina o mecanismo de reparo por excisão livre de erro (*error free*). A deleção se estende até o gene responsável pela síntese da biotina, tornando as linhagens dependentes de biotina.

**pKM101**: Este plasmídeo R contém um gene que causa aumento no sistema de reparo passível de erro (*error prone*). O plasmídeo tem a resistência a ampicilina como marcador.

### 3.2.1 Verificação das características genéticas das cepas de *S. typhimurium*

As características genéticas das cepas de *S. typhimurium* foram checadas rotineiramente, antes do preparo dos estoques para congelamento. A dependência da histidina, presença de mutação *rfa*, presença de deleção *uvrB*, presença de plasmídios de resistência e taxa de reversão espontânea foram verificadas de acordo com MARON & AMES (1983).

### 3.2.2 Manutenção e estoque das cepas de *S. typhimurium*

As cepas de *S. typhimurium* ficaram estocadas em tubos criogênicos (2,0 mL), e mantidas à -80 C para que se mantivessem inalteradas todas as suas características

genéticas. Para cada 0,9 mL de cultura foi adicionado 0,1 mL de DMSO (Sigma) que exerce o efeito crioprotetor.

### **3.2.3 Preparo dos inóculos de *S. typhimurium***

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada a 37°C, por 14-16 horas, em agitador orbital (37° C – 100 rpm), de modo a obter uma densidade de  $1-2 \times 10^9$  bactérias/mL.

### **3.2.4 Preparo da mistura S9**

Para realização dos experimentos com ativação metabólica, foi utilizada a fração microsomal S9 homogeneizada de fígado de rato Sprague Dawley (fração pós-mitocondrial, suplementada com um co-fator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, Aroclor 1254-500 mg/kg), comercialmente obtida pela Molecular Toxicology, Inc., USA. A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica.

O sistema de ativação metabólica consistiu de 4% de fração S9, 1% de 0,4 M de cloreto de magnésio, 1% de 1,65 M de cloreto de potássio, 0,5% de 1 M de glicose-6-fosfato e 4% de 0,1 M de  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, além de 50% de 0,2 M de tampão fosfato pH 7,4 e 39,5% de água MilliQ estéril (MARON & AMES, 1983). Essa mistura foi mantida em banho de gelo durante todo o ensaio. Todas as soluções foram preparadas sempre a fresco e utilizadas num período máximo de 3 horas.

### 3.2.5 Controles

O controle negativo foi realizado com DMSO (100 µL/placa), o solvente dos complexos. Para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa foram utilizados como controles positivos, em ensaios sem ativação metabólica, o 4-nitrofenilenodiamina (NPD) (10 µg/placa) para as cepas TA98 e TA97a, azida sódica (1,25 µg/placa) para a cepa TA100 e TA1535 e mitomicina C (0,5 µg/placa) para a cepa TA102. Em ensaios com ativação metabólica, foram usados 2-aminoantraceno (1,25 µg/placa) para todas as cepas. Também foi realizado um controle onde apenas o inóculo bacteriano, sem qualquer tratamento, foi plaqueado, a fim de se determinar a taxa de reversão espontânea de cada cepa e compará-la com os padrões recomendados.

### 3.2.6 Teste de Ames

Foi usada a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por MARON & AMES (1983). Em tubos de ensaios foram colocados 0,1 mL de cultura de bactérias ( $1-2 \times 10^9$  bactérias/mL), a concentração adequada dos complexos e 0,5 mL de tampão fosfato pH 7,4 ou 0,5 mL de S9 mix (4%) nos ensaios com ativação metabólica. Os tubos assim compostos foram incubados a 37° C durante 20 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 2 mL de ágar de superfície (top-agar) acrescido de uma solução de histidina e de biotina 0,05 mM na proporção de 10:100 mL. Em seguida, os tubos foram agitados e vertidos em placas de Petri que já continham o meio mínimo glicosado. Essas placas foram incubadas por 48 horas a 37° C. Transcorrido esse tempo, as colônias revertentes foram contadas no contador de colônias Synbiosis ProtoCOL<sup>®</sup> (Figura 3). Todas as concentrações testadas e controles foram realizados em triplicata.

As concentrações adequadas das substâncias teste foram obtidas em ensaios “piloto”, nos quais adicionou-se a maior concentração dos complexos (obtida no seu máximo de solubidade) em contato com a bactéria. Com isso, foi possível avaliar a toxicidade da amostra, pois o número de colônias é contado e este é comparado com o valor médio de revertência espontânea específica para cada linhagem. Se este número for menor que a média de revertência espontânea, considera-se a amostra tóxica e esta deve ser diluída até que o valor de contagem das colônias seja igual ou maior que o valor da média de revertência espontânea.



**Figura 3.** Contagem de colônias de *S. typhimurium* no Synbiosis ProtoCol®. Laboratório de Mutagênese, FCF UNESP Araraquara. Fonte: Arquivo pessoal

### 3.2.7 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (*U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0*), elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myers (*Research Triangle Institute, Carolina do Norte, USA*) por intermédio da Dra. Maria Inês Sato (CETESB). Esse programa permite avaliar o efeito dose-resposta com o cálculo da análise de variância (ANOVA) entre as médias do número de revertentes nas diferentes concentrações testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear.

O modelo escolhido para a análise dos dados foi o de BERNSTEIN et al., (1982). O índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{número de revertentes por placa (composto-teste)}}{\text{número de revertentes por placa (controle negativo)}}$$

A amostra foi considerada mutagênica quando o índice de mutagenicidade (IM) foi maior ou igual a 2 em pelo menos uma das concentrações testadas e quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

### **3.3 Ensaio de Sobrevivência Celular**

#### **3.3.1 Cultivo e manutenção das culturas celulares**

Foram utilizadas as células CHO-K1 (ATCC<sup>®</sup> CCL-61<sup>™</sup>), provenientes do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, cedidas pela Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi e células HepG2 (ATCC<sup>®</sup> HB-8065<sup>™</sup>), provenientes do Laboratório de Mutagênese da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

As células foram removidas do nitrogênio líquido e descongeladas rapidamente. Logo após, foram transferidas para um tubo cônico estéril (tubo falcon) contendo 9,0 mL de meio de cultivo completo, ou seja, meio de cultura D-MEM (Sigma) suplementado com 10% de SFB (Gibco), solução de antibióticos e antimicóticos (Gibco) e HEPES (Sigma) e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, o *pellet* ressuspenso, e

então foi adicionado 1 mL de meio completo. Por fim, as células foram transferidas para uma garrafa de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo 15 mL de meio de cultura completo e submetidas às condições padronizadas de cultivo em incubadora (Thermo Scientific®) a 37° C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de saturação de umidade.

### **3.3.2 Repique e manutenção das células**

Após remoção do meio de cultura, as células foram lavadas com PBS e desprendidas da superfície interna da garrafa de cultura com 0,5 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco). Após o desprendimento das células, foi adicionado meio de cultura completo à garrafa para a inativação da enzima. Uma pequena quantidade de células foi, então, colocada em cultivo em novas garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup> (Corning) contendo meio de cultura completo, e submetidas às condições padronizadas de cultivo celular até a preparação da próxima subcultura. Os ensaios foram realizados entre o terceiro e o décimo subcultivo devido a maior estabilidade celular.

### **3.3.3 Sobrevivência Celular**

Este experimento foi realizado segundo BALLAL et al., (2009) com algumas modificações. Foram semeadas 1x10<sup>6</sup> células CHO-K1 e HepG2 em garrafas de cultivo celular de 25cm<sup>2</sup> em 5 mL de meio de cultura completo e incubadas a 37° C em estufa de CO<sub>2</sub>. Depois de 24h de cultivo, procedeu-se o tratamento com 1,5; 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50 e 100 µM dos complexos SCARs. Como controle positivo (CP) foi utilizada uma solução a 10% de DMSO (Sigma) e como controle negativo (CN), uma solução a 0,5% de DMSO em meio de cultura. Todos os tratamentos foram realizados por 48h.

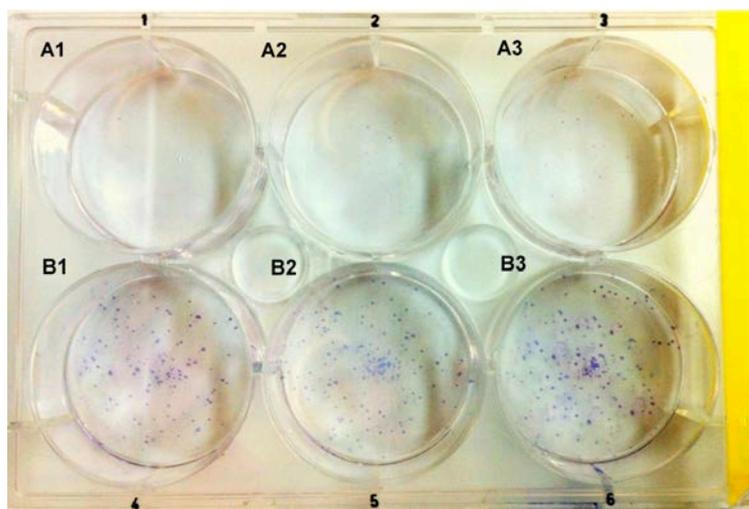
Ao final do tratamento, as células foram lavadas e tripsinizadas, sendo novamente semeadas em placas de 6 poços (TPP) na concentração de 150 células por

poço, para cada tratamento em triplicata.

Após 7 dias de cultivo, as células foram lavadas e fixadas com metanol:ácido acético:água destilada (1:1:8) por 30 minutos. As colônias foram coradas com 2,5 mL de corante Giemsa, por 20 minutos. Depois de coradas, as células foram lavadas com água destilada, e as colônias foram contadas (Figura 4).

A média do número de colônias contadas no controle negativo foi considerado como 100%. A partir disso, foram realizados os cálculos das frações de sobrevivência (FS) para cada tratamento:

$$FS = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colônias contadas em cada tratamento}}{\text{n}^\circ \text{ de colônias observadas no controle negativo}} \times 100$$



**Figura 4.** Ensaio de Sobrevivência Clonogênica em cultura de células HepG2. Na figura observa-se a triplicata do CP (DMSO 10%) [A1-A3] e do CN (DMSO 0,5%) [B1-B3], células coradas com giemsa. Laboratório de Mutagênese, FCF - UNESP Araraquara. Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.3.4 Análise Estatística

Neste ensaio, a porcentagem da FS dos tratamentos de cada um dos três experimentos independentes, foi submetida à análise de variância (ANOVA), seguido de comparação de pares por Tukey e comparações múltiplas por Dunnett. Utilizou-se o

programa Graph Pad Prism 5 (*Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA*) e todos os testes foram considerados ao nível de significância de 5%.

### **3.4 Ensaio do micronúcleo citoma com bloqueio da citocinese (CBMN-cit)**

O CBMN-cit em células CHO-K1 e HepG2 foi realizado de acordo com o protocolo de FENECH (2007) com algumas modificações.

Para realização do teste,  $5,0 \times 10^5$  células foram inicialmente semeadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Corning) em 5 mL de meio de cultura completo. Para tanto, realizou-se a contagem das células em câmara de Newbauer, com o objetivo de se estimar o volume apropriado de suspensão a ser distribuído para cada garrafa.

Após 24 horas de incubação, as células foram lavadas com solução PBS e, então, submetidas ao tratamento com 3 diferentes concentrações dos complexos SCARs, as quais foram baseadas na citotoxicidade previamente selecionadas dos ensaios de sobrevivência clonogênica. Além disso, foi utilizado como agente indutor de danos (CP), cloridrato de doxorubicina (Fauldoxo 50 mg Libbs<sup>®</sup>) na concentração de 0,03 µg/ mL, por ser um agente antitumoral que age como um intercalante no DNA e em cultura de células de mamíferos, é capaz de inibir a síntese de DNA e RNA, provocando quebras de fita simples de DNA e danos na membrana (RESENDE et al., 2010). Outro CP foi composto pela Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) de *Aspergillus flavus* (SIGMA), que foi utilizada como modelo de mutágeno indireto. Como controle negativo, foi utilizado o veículo no qual os complexos foram solubilizados, DMSO (1%) e o controle do meio foi constituído por meio de cultura D-MEM completo, sem a ação de qualquer tratamento.

Após 24 horas, foram adicionados a cada garrafa 50 µL de citocalasina B (3,0 µg/mL) para interromper a citocinese.

Para a colheita das células, essas foram desprendidas das garrafas por meio da tripsina, transferidas para um tubo de 15 mL e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular homogeneizado com 3 mL de uma solução hipotônica de cloreto de potássio (Sigma) (0,01%) gelada. Posteriormente, as células foram fixadas com 3 mL de fixador metanol:ácido acético (3:1) e 20 µL de formaldeído (37%). Esse material foi novamente centrifugado, o sobrenadante descartado e o sedimento celular lavado mais uma vez com 3 mL de fixador metanol:ácido acético (3:1). Após uma nova centrifugação, o material foi ressuspensionado em apenas 0,5 mL de fixador e essa suspensão celular foi gotejada sobre lâminas previamente lavadas em metanol e mantidas em água destilada gelada.

Após a secagem das lâminas em temperatura ambiente, procedeu-se a coloração do material, utilizando-se aproximadamente 1 mL de solução de laranja de acridina (Sigma) a 40 µg/mL, aplicada com pipeta Pasteur sobre uma lâmina de cada vez até cobri-la por inteiro. Depois de 2 minutos, a lâmina foi lavada em água corrente e coberta com uma lamínula; a leitura foi realizada em microscópio de fluorescência com excitação e emissão de 500 e 525 nm, respectivamente em objetiva de 100 x. Foram realizados três experimentos independentes.

### **3.4.1 Análise das lâminas**

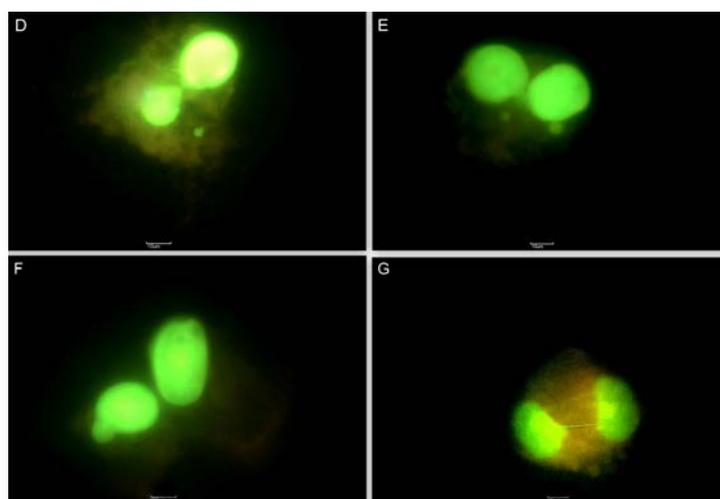
As lâminas coradas foram analisadas em microscópio de fluorescência e o número total de micronúcleos em 1000 células binucleadas viáveis foi avaliado para cada tratamento e controles. Os critérios utilizados para identificação de micronúcleos foram baseados em FENECH (2007). Nesta mesma análise, foram verificadas a

frequência de pontes nucleoplasmáticas e brotamentos nucleares. Além disso, foram contadas 500 células viáveis entre mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e multinucleadas (quatro ou mais núcleos) para o cálculo do IDN (FENECH, 2007) e da porcentagem de células binucleadas.

O IDN foi calculado de acordo com EASTMOND & TUCKER (1989), utilizando a fórmula:

$$\text{IDN} = [ M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4) ] / N$$

Onde M1 - M4 é o número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente; e N é o número total de células viáveis.



**Figura 5.** Fotomicrografia de células HepG2 para análise de MN, NPB e NBUD. (D) Células binucleada com MN; (E) Célula binucleada com 2 MNs; (F) Célula binucleada com NBUD; (G) Célula binucleada com NPB. Aumento de 100 x, coloração com laranja de acridina 40 µg/mL.

### 3.4.2 Análise estatística

Para cada tratamento foram calculadas as médias e os desvios padrões. A frequência de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotamentos nucleares, além dos IDNs foram calculados a partir de três experimentos independentes. Os resultados obtidos foram submetidos ao programa estatístico Graph Pad Prism 5

(Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) à análise de variância ANOVA (assumindo  $p < 0,05$ ) seguida comparação de pares por Tukey e pelo pós-teste de Dunnett para comparação com o controle negativo.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliar o efeito tóxico de substâncias químicas, tais como candidatos à novos fármacos, compostos ambientais e industriais, entre outros agentes, é um desafio cada vez mais recorrente no mundo moderno. O contato com moléculas recém descobertas, ainda sem conhecimento sobre suas atividades biológicas, pode trazer prejuízos a curto e longo prazo para a saúde humana (MASLOV et al., 2015).

A ausência de novos fármacos no tratamento da TB, apesar de diversos esforços, é preocupante, principalmente ao se tratar de TB-MDR (PAVAN et al., 2013). Muitos grupos de pesquisa têm se esforçado na busca por novas moléculas em substituição ou complementando a terapia padrão (GANIHIGAMA et al., 2015; GOBIS et al., 2015). No campo de descoberta de novos fármacos, pode-se destacar o papel da química inorgânica medicinal e o papel dos complexos metálicos na concepção de terapias que têm alvo diferentes vias bioquímicas (PAVAN et al., 2011).

Estudos têm destacado o papel dos complexos de ouro, paládio, cobalto, cobre e rutênio com atividades promissoras contra o *Mycobacterium tuberculosis*, com alvos extra e intracelulares, o que os torna potenciais candidatos a aplicações futuras na terapia (AGUIAR et al., 2015; GIOVAGNOLI et al., 2014; GLIŠIĆ; DJURAN, 2014; HOFFMANN et al., 2013).

Entusiasmados com os resultados promissores, nosso grupo tem buscado novos candidatos contra a TB-MDR. Em estudos anteriores, os complexos de rutênio(II) SCAR 4, 5 e 6 apresentaram concentrações inibitórias mínimas (CIM) melhores ou

equivalentes aos fármacos utilizados na primeira linha de tratamento, inclusive com atividade contra isolados clínicos resistentes de *M. tuberculosis* (PAVAN et al., 2013).

Esses resultados promissores levaram os complexos SCAR a representar uma nova alternativa na terapia contra a TB, ocupando uma importante posição no *pipeline* global de fármacos anti-TB em pesquisa e fases de aprovação (WGN TB Drugs, 2015).

Diante de sua importância no cenário da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos contra TB e fomentados pelo objetivo de desenvolver candidatos eficazes e seguros à terapia, o presente estudo propôs determinar o perfil toxicogenético de complexos de rutênio(II), que possuem promissora atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis*.

#### **4.1. Ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium***

O teste de Ames foi realizado de acordo com o guideline OECD nº 471 (1997) com 5 diferentes cepas de *Salmonella typhimurium* (TA 1535, TA 98, TA 100, TA 97a e TA 102).

As Tabelas 2, 3 e 4 apresentam a média do número de revertentes/placa (M), o desvio padrão (DP) e o índice de mutagenicidade (IM) após os tratamentos com as diferentes concentrações dos complexos SCAR 4, 5 e 6, frente as cepas padrão TA98, TA100, TA1535, TA97a e TA102 de *S. typhimurium*, na presença (+S9) e na ausência (-S9) de ativação metabólica.

O teste de Ames do complexo SCAR 4 foi realizado por este grupo de pesquisa e publicado em 2013. De acordo com PAVAN et al. (2013) o complexo SCAR 4 não apresentou atividade mutagênica evidenciada pelas cepas TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. typhimurium*. Contudo, para complementar esses resultados, foi avaliada a atividade mutagênica pela cepa TA1535 de *S. typhimurium*, evidenciando a ausência

de mutagenicidade por agentes que possam induzir metilação e causar substituição de pares de bases (G:C). Os ensaios complementares reafirmaram que o complexo SCAR 4 não é considerado mutagênico, pois não foi observado aumento do número de colônias revertentes, em nenhuma das concentrações de SCAR 4, na ausência e presença de ativação metabólica (Tabela 2).

O complexo SCAR 5 também não induziu o aumento do número de colônias revertentes, em nenhuma das concentrações testadas, na ausência e presença de ativação metabólica (Tabela 3). Esses resultados levam a conclusão de que este complexo metálico não é capaz de provocar mutações gênicas, evidenciado pelo Teste de Ames.

Na ausência de metabolização, o complexo SCAR 6 não foi considerado mutagênico em nenhuma concentração, em nenhuma das cepas de *S. typhimurium* analisadas.

Já nos experimentos com ativação metabólica (+S9), observou-se que o complexo SCAR 6 após ter passado pelo processo de metabolização, levou ao aumento do número de colônias revertentes, apresentando efeito mutagênico na cepa TA97a, enquanto que nas outras cepas testadas nenhum indício de mutagenicidade foi encontrado. O índice de mutagenicidade na cepa TA97a foi igual/superior a 2,0 a partir da concentração de 33,1  $\mu\text{M}$  até 199  $\mu\text{M}$ / placa (Tabela 4). Desta forma, pode se inferir que após metabolização, o complexo SCAR 6 induz mutações do tipo *frameshift* por adição de pares C:G, detectáveis pela cepa TA97a de *S. typhimurium*. Esses resultados mostram que produtos gerados pela metabolização foram mais reativos com o DNA.

**Tabela 2** - Atividade mutagênica expressa pela média ( $\pm$ DP) do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) (em parênteses) da cepa TA1535 de *Salmonella typhimurium* expostas à diferentes concentrações do complexo metálico SCAR 4, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica

Tratamento	Número de revertentes (M $\pm$ DP)/placa e IM	
	TA 1535	
$\mu$ M	- S9	+ S9
0,00 <sup>a</sup>	6 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1
3,2	7 $\pm$ 2 (1,2)	6 $\pm$ 2 (0,8)
6,4	6 $\pm$ 2 (1,0)	7 $\pm$ 1 (1,0)
12,8	6 $\pm$ 1 (1,0)	7 $\pm$ 2 (1,0)
25,6	6 $\pm$ 1 (0,9)	8 $\pm$ 1 (1,1)
51,3	5 $\pm$ 2 (0,8)	6 $\pm$ 2 (0,8)
102,6	Tóxico	Tóxico
C+	140 $\pm$ 22 <sup>b</sup>	234 $\pm$ 75 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Controle Negativo: dimetilsulfoxido (DMSO - 100  $\mu$ L/ placa); C+ = Controle Positivo: <sup>b</sup> Azida sódica (1,25  $\mu$ g/ placa) em ausência de S9 e <sup>c</sup> 2-anthramine (1,25  $\mu$ g/ placa), em presença de S9.

**Tabela 3** - Atividade mutagênica expressa pela média ( $\pm$ DP) do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) (em parênteses) das cepas TA1535, TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella typhimurium* expostas à diferentes concentrações do complexo metálico SCAR 5, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica

Tratamento	Número de revertentes (M $\pm$ DP)/ placa e IM									
	TA 1535		TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
$\mu$ M	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
<b>0,00<sup>a</sup></b>	6 $\pm$ 0	5 $\pm$ 1	20 $\pm$ 6	15 $\pm$ 4	184 $\pm$ 1	180 $\pm$ 60	297 $\pm$ 73	333 $\pm$ 26	125 $\pm$ 4	121 $\pm$ 8
<b>0,67</b>	8 $\pm$ 5 (1,3)	8 $\pm$ 1 (1,3)	24 $\pm$ 1 (1,2)	21 $\pm$ 2 (1,4)	201 $\pm$ 39 (1,1)	178 $\pm$ 26 (1,0)	316 $\pm$ 8 (1,1)	389 $\pm$ 3 (1,2)	186 $\pm$ 26 (1,5)	126 $\pm$ 1 (1,0)
<b>1,34</b>	8 $\pm$ 1 (1,2)	6 $\pm$ 1 (1,2)	19 $\pm$ 4 (0,9)	20 $\pm$ 3 (1,3)	170 $\pm$ 7 (1,0)	200 $\pm$ 69 (1,1)	293 $\pm$ 40 (1,0)	359 $\pm$ 50 (1,1)	171 $\pm$ 8 (1,4)	122 $\pm$ 7 (1,0)
<b>2,68</b>	7 $\pm$ 4 (1,2)	7 $\pm$ 1 (1,4)	22 $\pm$ 4 (1,1)	20 $\pm$ 2 (1,3)	209 $\pm$ 26 (1,1)	176 $\pm$ 21 (1,0)	319 $\pm$ 15 (1,1)	351 $\pm$ 84 (1,0)	151 $\pm$ 40 (1,2)	128 $\pm$ 21 (1,0)
<b>5,36</b>	7 $\pm$ 1 (1,2)	7 $\pm$ 1 (1,4)	18 $\pm$ 5 (0,9)	15 $\pm$ 3 (1,0)	176 $\pm$ 10 (1,0)	196 $\pm$ 28 (1,1)	312 $\pm$ 22 (1,0)	424 $\pm$ 17 (1,2)	162 $\pm$ 27 (1,3)	119 $\pm$ 16 (1,0)
<b>10,7</b>	5 $\pm$ 3 (0,8)	6 $\pm$ 2 (1,2)	17 $\pm$ 7 (0,8)	13 $\pm$ 1 (0,9)	162 $\pm$ 6 (0,9)	162 $\pm$ 10 (0,9)	300 $\pm$ 22 (1,0)	414 $\pm$ 35 (1,2)	155 $\pm$ 27 (1,2)	124 $\pm$ 9 (1,0)
<b>21,4</b>	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico
<b>42,9</b>	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico
<b>85,8</b>	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico
<b>C +</b>	462 $\pm$ 22 <sup>c</sup>	570 $\pm$ 33 <sup>e</sup>	883 $\pm$ 71 <sup>b</sup>	904 $\pm$ 80 <sup>e</sup>	801 $\pm$ 38 <sup>c</sup>	1020 $\pm$ 22 <sup>e</sup>	970 $\pm$ 114 <sup>d</sup>	1106 $\pm$ 51 <sup>f</sup>	749 $\pm$ 71 <sup>b</sup>	940 $\pm$ 115 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Controle Negativo: dimetilsulfoxido (DMSO - 100  $\mu$ L/placa); C+ = Controle Positivo: <sup>b</sup> 4-nitro-o-phenylenediamine (NPD - 10,0  $\mu$ g/ placa - TA98, TA97a); <sup>c</sup> Azida sódica (1,25  $\mu$ g/ placa - TA100, TA1535); <sup>d</sup> Mitomicina (0,5  $\mu$ g/placa - TA102), em ausência de S9 e <sup>e</sup> 2-anthramine (1,25  $\mu$ g/placa - TA97a, TA98, TA100, TA 1535); <sup>f</sup> 2-aminofluorene (10,0  $\mu$ g/ placa - TA102), em presença de S9.

**Tabela 4** - Atividade mutagênica expressa pela média ( $\pm$ DP) do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) (em parênteses) das cepas TA1535, TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella typhimurium* expostas à diferentes concentrações do complexo metálico SCAR 6, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica

Tratamento	Número de revertentes (M $\pm$ DP)/ placa e IM									
	TA 1535		TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
$\mu$ M	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
0 <sup>a</sup>	6 $\pm$ 1	7 $\pm$ 3	23 $\pm$ 6	24 $\pm$ 4	85 $\pm$ 8	95 $\pm$ 12	398 $\pm$ 12	474 $\pm$ 26	102 $\pm$ 4	86 $\pm$ 10
4,14	8 $\pm$ 1,5 (1,3)	9 $\pm$ 2 (1,2)	26 $\pm$ 8 (1,1)	27 $\pm$ 6 (1,1)	100 $\pm$ 15 (1,2)	122 $\pm$ 13 (1,3)	402 $\pm$ 7 (1,0)	542 $\pm$ 39 (1,1)	119 $\pm$ 19 (1,2)	106 $\pm$ 22 (1,2)
8,29	7 $\pm$ 0 (1,2)	10 $\pm$ 3 (1,4)	27 $\pm$ 5 (1,1)	27 $\pm$ 3 (1,1)	99 $\pm$ 17 (1,2)	115 $\pm$ 20 (1,2)	400 $\pm$ 36 (1,0)	554 $\pm$ 32 (1,2)	120 $\pm$ 20 (1,2)	110 $\pm$ 14 (1,3)
15,5	7 $\pm$ 1 (1,1)	7 $\pm$ 0 (1,0)	27 $\pm$ 3 (1,1)	24 $\pm$ 1 (1,0)	101 $\pm$ 33 (1,2)	107 $\pm$ 22 (1,1)	403 $\pm$ 40 (1,0)	466 $\pm$ 25 (1,0)	119 $\pm$ 20 (1,2)	132 $\pm$ 9 (1,5)
33,1	6 $\pm$ 1 (1,0)	8 $\pm$ 0 (1,1)	26 $\pm$ 4 (1,1)	28 $\pm$ 2 (1,1)	105 $\pm$ 45 (1,2)	110 $\pm$ 5 (1,1)	400 $\pm$ 33 (1,0)	474 $\pm$ 12 (1,0)	121 $\pm$ 10 (1,2)	172 $\pm$ 11* (2,0)
66,3	6 $\pm$ 2 (1,0)	7 $\pm$ 3 (1,0)	26 $\pm$ 2 (1,1)	34 $\pm$ 12 (1,4)	83 $\pm$ 22 (1,0)	109 $\pm$ 9 (1,1)	326 $\pm$ 18 (0,8)	415 $\pm$ 12 (0,9)	124 $\pm$ 16 (1,2)	210 $\pm$ 16* (2,4)
132,6	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	156 $\pm$ 15 (1,5)	253 $\pm$ 15* (2,9)
199,0	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	154 $\pm$ 26 (1,5)	204 $\pm$ 19* (2,3)
265,3	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	84 $\pm$ 13 (0,8)	88 $\pm$ 15 (1,0)
C +	463 $\pm$ 48 <sup>c</sup>	523 $\pm$ 107 <sup>e</sup>	912 $\pm$ 43 <sup>b</sup>	1010 $\pm$ 94 <sup>e</sup>	1021 $\pm$ 38 <sup>c</sup>	1200 $\pm$ 29 <sup>e</sup>	1067 $\pm$ 74 <sup>d</sup>	1126 $\pm$ 90 <sup>f</sup>	824 $\pm$ 54 <sup>b</sup>	904 $\pm$ 75 <sup>e</sup>

Modelo de Bernstein \*  $p < 0,05$  (ANOVA); <sup>a</sup>Controle Negativo: dimetilsulfoxido (DMSO - 100  $\mu$ L/placa); C+ = Controle Positivo: <sup>b</sup>4 -nitro-o-phenylenediamine (NPD - 10,0  $\mu$ g/ placa - TA98, TA97a); <sup>c</sup> Azida sódica (1,25  $\mu$ g/ placa - TA100, TA1535); <sup>d</sup> Mitomicina (0,5  $\mu$ g/placa - TA102), em ausência de S9 e <sup>e</sup>2-anthramine (1,25  $\mu$ g/placa - TA97a, TA98, TA100, TA1535); <sup>f</sup> 2-aminofluorene (10,0  $\mu$ g/ placa - TA102), em presença de S9.

Em nenhuma das concentrações dos complexos SCAR 4 e 5 observou-se duplicação da quantidade de colônias revertentes em comparação com o controle negativo e também não foi observada uma relação dose-resposta em nenhuma das cepas estudadas. Por isso, pode-se concluir que os complexos SCAR 4 e 5 não possuem efeito mutagênico.

Em estudos anteriores, PAVAN et al. (2013) avaliaram entre outros ensaios, a atividade mutagênica de alguns complexos rutênio (SCAR) pelo teste Ames. Seus resultados mostraram que os complexos estudados não apresentaram um aumento estatisticamente significativo no número de colônias revertentes em relação ao controle negativo, indicando ausência de efeito mutagênico (PAVAN et al., 2013).

O complexo SCAR 6 também não foi capaz de aumentar o número de revertentes em experimentos na ausência de metabolização. No entanto, quando se adicionou a fração S9 ao experimento, foi identificado efeito mutagênico na cepa TA97a.

De acordo com a cepa envolvida, podemos supor que o mecanismo de ação genotóxica principal deste composto seja mutação do tipo *frameshift* por adição de pares C:G (MARON & AMES, 1983) após metabolizado.

O mecanismo de mutagenicidade sugerido envolve a ativação metabólica, levando à formação de metabólitos que interagem com o DNA bacteriano e levaram a reverção de mutações instaladas das cepas de *S. typhimurium* (TA97a). Assim, os resultados deduzem, que o complexo SCAR 6 atua como um agente mutagênico de ação indireta, ou seja, quando metabolizado torna-se mutagênico.

Este resultado reafirma o efeito observado no ensaio CBMN-cit, sugerindo que complexo SCAR 6 pode dar origem a produtos mutagênicos após ser

biotransformado pelo sistema citocromo P-450.

Estudos *in vitro* tem confirmado a capacidade de complexos de Ru se ligarem ao DNA (CLARKE, 2002). A citotoxicidade em culturas celulares e genotoxicidade em sistema *in vitro* e *in vivo* indicam uma direta correlação desta capacidade (ALANYALI et al., 2011; BUSTO et al., 2013; DE LIMA et al., 2010).

É clara a importância do estudo do potencial mutagênico de novos compostos aos quais os organismos podem se expor. 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 (THOMAS & FENECH, 2011).

#### **4.2. Ensaio de Sobrevivência Clonogênica**

Neste estudo, o ensaio de sobrevivência clonogênica foi realizado para determinar a viabilidade celular de culturas de células CHO-K1 e HepG2 tratadas com sete diferentes concentrações dos complexos SCAR 4, 5 e 6 e para definir as concentrações para ser usado em posteriores ensaios *in vitro*.

É importante estabelecer a sobrevivência celular, uma vez que tratamentos curtos, de até 24 horas, podem apresentar resultados viáveis sobre a atividade mitocondrial, mas depois de um tempo, que neste estudo foi de 7 dias, o tratamento poderia causar algum dano na maquinaria de divisão celular.

Neste ensaio, as colônias foram contadas, sendo possível avaliar a capacidade reprodutiva das células tratadas. Na Figura 6, é apresentada a fração de sobrevivência (FS) das células CHO-K1, que foi calculada [FS = n° de colônias contadas nos tratamentos / (n° colônias contadas no controle negativo) x 100], sendo que os valores médios obtidos variaram de 99,0% a 7,7% no tratamento com

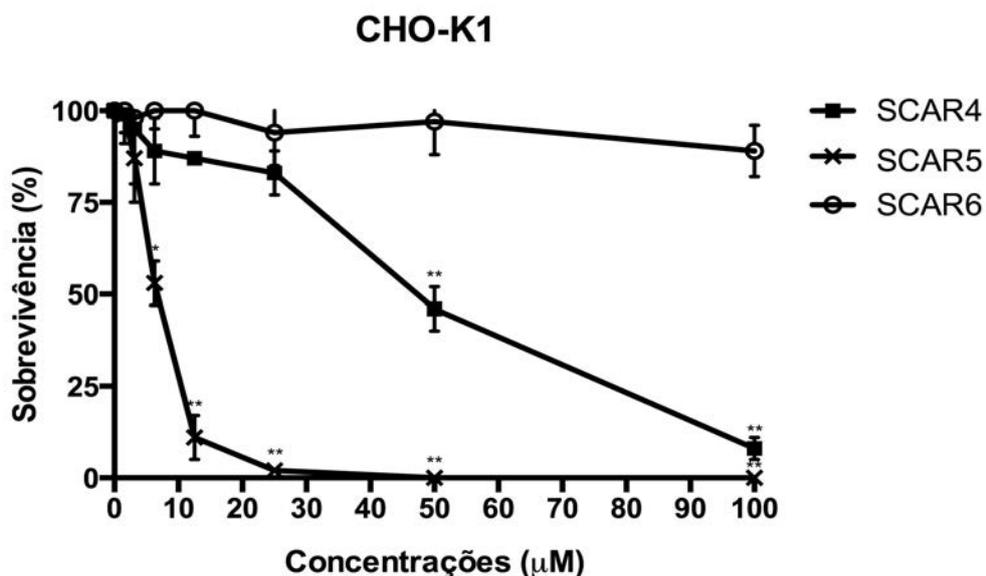
o SCAR 4, de 99,3% a 0% quando tratados com o SCAR 5 e os valores médios variaram de 99,8% a 89,5% no tratamento com o SCAR 6.

Da mesma forma, foram calculadas as FS para as células HepG2 nos diferentes tratamentos com os complexos (Figura 7). Os valores médios obtidos variaram de 99,1% a 20,4% no tratamento com o SCAR 4, de 88,4,3% a 0% quando tratados com o SCAR 5 e de 99,8% a 46,5% no tratamento com o SCAR 6.

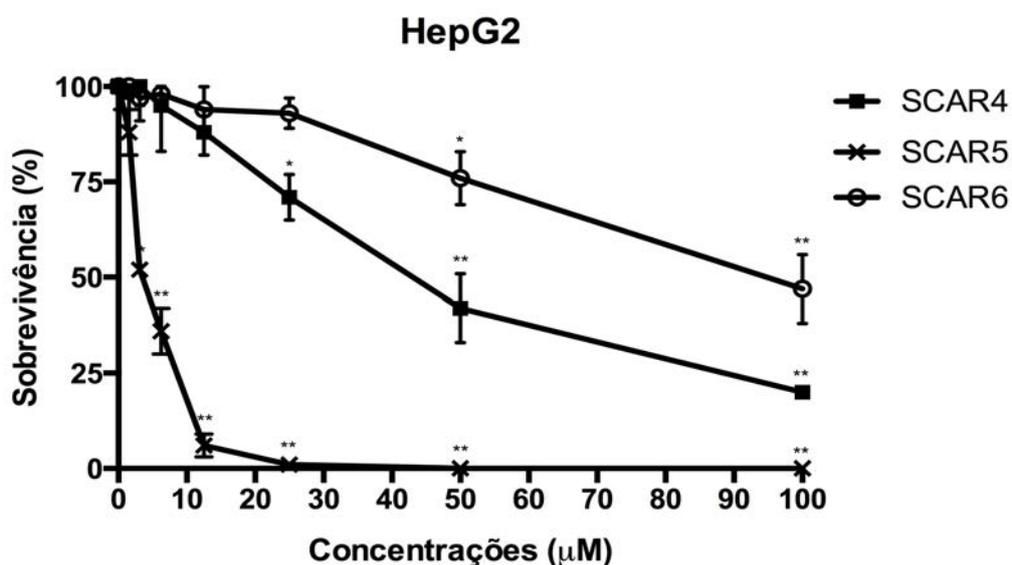
Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) no tratamento com SCAR 4 em relação ao controle para as concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$ , e de 6,2; 12,5; 25; 50 e 100 para o SCAR 5 na cultura com células CHO-K1.

Já para os tratamentos nas células HepG2, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$  de SCAR 4, de 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50 e 100  $\mu\text{M}$  no tratamento com SCAR 5 e nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  de SCAR 6.

Alguns resultados mostraram semelhança aos obtidos no ensaio redox da resazurina (24 h), mas como esperado, a resposta observada aqui, leva a conclusão de que mesmo mostrando-se viáveis após um tratamento de 24h, em um período maior, a população celular mostra-se incapaz de formar colônias, demonstrando dano na atividade mitótica.



**Figura 6.** Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem CHO-K1 após tratamento com os complexos SCARs (1,5; 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50 e 100 μM) por 48h. Foram calculadas as médias ( $\pm$ DP) dos resultados de três experimentos independentes. (\*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ); (\*\*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 7.** Sobrevivência clonogênica analisada para a linhagem HepG2 após tratamento com os complexos SCARs (1,5; 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50 e 100 M) por 48h. Foram calculadas as médias ( $\pm$ DP) dos resultados de três experimentos independentes. (\*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ); (\*\*) Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle e entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ).

Após 48 horas de tratamento e 7 dias de subcultivo foi observado que a fração de sobrevivências das células CHO-K1 variou de 99,8 a 0% de sobrevivência dependendo do complexo. O complexo SCAR 5 apresentou taxas de sobrevivência significativamente menores, apresentando cinco concentrações estatisticamente diferentes do controle (DMSO 0,5%) o SCAR 4 apresentou apenas duas concentrações citotóxicas, enquanto o SCAR 6 não foi capaz de inviabilizar a provileração celular em nenhuma concentração testada (Figura 6).

Observou-se o mesmo perfil anti-proliferativo para os complexos na linhagem tumoral HepG2, no entanto com efeitos mais pronunciados. O complexo SCAR 5 continuou apresentando efeito citotóxico, seguido de SCAR 4 e SCAR 6 que neste experimento também apresentou concentrações citotóxicas (50 e 100  $\mu\text{M}$ ) (Figura 7).

O ensaio de sobrevivência clonogênica é considerado um teste mais acurado, pois leva em consideração a morte reprodutiva, que é um importante parâmetro a ser analisado e serve para definir concentrações não citotóxicas em testes *in vitro* (FRANKEN et al., 2006).

O número de células formadoras de colônias foi reduzido de forma dependente da concentração dos complexos. Observa-se, ainda, que o número de colônias de células tumorais HepG2 tratadas com os complexos SCAR foi menor do que nas mesmas concentrações na linhagem normal CHO-K1. É importante considerar o efeito anti-proliferativo dos complexos de rutênio em linhagens tumorais em detrimento de culturas celulares normais, sugerindo um mecanismo de seletividade de ação. Dentro da mesma observação, estudos recentes apontam uma variedade de complexos de rutênio, com atividade antitumoral *in vitro* (DEMORO et al., 2013; WEISS et al., 2014).

Nossos resultados mostraram que o complexo SCAR 6 na máxima concentração analisada apresenta uma fração de sobrevivência de 46,5% nas células tumorais, enquanto que em linhagem normal a mesma concentração tem efeito anti-proliferativo bem menos evidente, com sobrevivência de 89,5% das células.

Esses valores refletem a natureza seletiva destes complexos, portanto parecem promissores agentes anticâncer. Estudos como o de CHELOPO et al., (2013) apresentam resultados comparativos entre a ação anti-proliferativa de complexos de rutênio em linhagens normais e tumorais, em geral, esses complexos apresentam valores de seletividade três vezes maior para células tumorais, indicando-os como promissores candidatos a uma terapia mais segura.

Retornando ao principal objetivo deste ensaio, foram selecionadas três concentrações para cada complexo que não interferiram na viabilidade das células CHO-K1 e HepG2. As mesmas foram utilizadas na avaliação do efeito mutagênico em nível cromossômico dos complexos.

#### **4.3. Ensaio do micronúcleo citoma com bloqueio da citocinese (CBMN-cit)**

Para a avaliação da mutagenicidade pelo teste do micronúcleo-citoma, os sistemas celulares utilizados foram constituídos pelas células CHO-K1 e HepG2, consideradas ferramentas adequadas tanto para a análise de mutágenos diretos quanto indiretos (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

O teste do micronúcleo citoma foi realizado em triplicata e foram analisados os seguintes parâmetros: número total de micronúcleos (MNs), pontes nucleoplasmáticas (NPBs) e brotos nucleares (NBUDs) em 1000 células binucleadas e a proporção de células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas ou

multinucleadas, que é utilizada para o cálculo do índice de divisão nuclear (IDN). As concentrações avaliadas no ensaio do micronúcleo-citoma foram previamente selecionadas pelos ensaios de sobrevivência clonogênica.

Segundo FENECH (2000) para a análise de micronúcleos, as culturas devem apresentar um percentual de células binucleadas acima de 35%. Neste estudo, em todos os tratamentos e controles, o percentual de células binucleadas foi maior que 65%, portanto, todos os tratamentos puderam ser analisados.

Com relação ao IDN, este fornece uma medida do estado proliferativo das células viáveis. Sendo assim, o menor valor possível de IDN é 1,0, o que ocorre quando todas as células não se dividiram ou não tiveram a citocinese bloqueada e, portanto, estão todas mononucleadas. Se todas as células completaram um ciclo de divisão e, portanto, estão todas binucleadas, o IDN será 2,0.

Neste estudo, não houve diferença estatisticamente significativa no estado proliferativo das culturas de células CHO-K1 e HepG2 tratadas com os complexos em relação ao controle negativo.

A Tabela 5 apresenta o número total de MNs, NPBs e NBUDs, induzidos pelo tratamento com os complexos SCAR 4, 5 e 6 em cultura de células CHO-K1. Os experimentos foram realizados em triplicata e a Tabela 5 apresenta as médias e os desvios padrão dos resultados.

**Tabela 5** - Média ( $\pm$ DP) do número de MN, NPBs, NBUDs e IDN em 1000 células CHO-K1 tratadas com diferentes concentrações ( $\mu\text{M mL}^{-1}$ ) dos complexos SCARs<sup>a</sup>

Tratamentos	Total em 1000 células Binucleadas			
	MNs	NPBs	NBUDs	IDN
<b>Controle</b>	2 $\pm$ 2	2 $\pm$ 2	7 $\pm$ 3	1,83 $\pm$ 0,19
<b>Solvente (DMSO 1%)</b>	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	7 $\pm$ 3	1,85 $\pm$ 0,18
<b>DXR 0,05 <math>\mu\text{M}</math></b>	55 $\pm$ 7*	14 $\pm$ 3*	17 $\pm$ 4*	1,81 $\pm$ 0,05
<b>AFB<sub>1</sub> 5 <math>\mu\text{M}</math></b>	5 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	10 $\pm$ 4	1,78 $\pm$ 0,83
<b>SCAR 4</b>				
<b>5,1 <math>\mu\text{M}</math></b>	4 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0	4 $\pm$ 1	1,82 $\pm$ 0,04
<b>10,2 <math>\mu\text{M}</math></b>	3 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	4 $\pm$ 3	1,81 $\pm$ 0,02
<b>20,5 <math>\mu\text{M}</math></b>	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2	1,85 $\pm$ 0,26
<b>SCAR 5</b>				
<b>0,64 <math>\mu\text{M}</math></b>	1 $\pm$ 0	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0	1,80 $\pm$ 0,09
<b>1,3 <math>\mu\text{M}</math></b>	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1,80 $\pm$ 0,57
<b>2,6 <math>\mu\text{M}</math></b>	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0	3 $\pm$ 1	1,78 $\pm$ 0,45
<b>SCAR 6</b>				
<b>25,0 <math>\mu\text{M}</math></b>	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2	1,78 $\pm$ 0,42
<b>50,0 <math>\mu\text{M}</math></b>	4 $\pm$ 0	5 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	1,81 $\pm$ 0,04
<b>100,0 <math>\mu\text{M}</math></b>	4 $\pm$ 1	7 $\pm$ 2	5 $\pm$ 3	1,82 $\pm$ 0,11

<sup>a</sup>Para cada experimento (n=3) foi analisada 1 lâmina (1000 células BN por lâmina) totalizando 3000 células BN por tratamento. \*  $p < 0,05$  considerado estatisticamente significativa a diferença em relação ao Controle Solvente (DMSO 1% v/v) por ANOVA – Dunnett.

Na linhagem CHO-K1, os complexos não induziram aumento, estatisticamente significativo, no número total de MNs, NPBs e NBUDs em relação ao controle negativo. Estes resultados indicam que os complexos metálicos não são capazes de induzir mutações cromossômicas em células animais não metabolizadoras nas condições utilizadas neste estudo.

O mesmo ensaio foi realizado também com a linhagem HepG2, uma célula derivada de carcinoma hepatocelular humano, que possui níveis indutíveis de enzimas detoxificadoras como a catalase, glutathione S transferase entre outras. Neste sistema, foi observado um aumento significativo em relação ao controle negativo, no número de MNs e NPBs no tratamento com o complexo SCAR 6 (Tabela 6).

Este resultado vai de encontro com o que foi observado no ensaio de Ames, onde o mesmo complexo, SCAR 6, apresentou atividade mutagênica, após ser metabolizado. Isso indica que o complexo SCAR 6 pode dar origem a produtos mutagênicos após ser biotransformado pelo sistema citocromo P-450.

Os complexos SCAR 4 e 5 não apresentaram atividade mutagênica nas condições utilizadas neste estudo.

**Tabela 6** - Média ( $\pm$ DP) do número de MNs, NPBs, NBUDs e IDN em 1000 células HepG2 tratadas com diferentes concentrações ( $\mu\text{M mL}^{-1}$ ) dos complexos SCARs<sup>a</sup>

Tratamentos	Total em 1000 células Binucleadas			
	MNs	NPBs	NBUDs	IDN
<b>Controle</b>	3 $\pm$ 1	5 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	1,88 $\pm$ 0,11
<b>Solvente (DMSO 1%)</b>	3 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	7 $\pm$ 2	1,84 $\pm$ 0,50
<b>DXR 0,05 <math>\mu\text{M}</math></b>	72 $\pm$ 11*	13 $\pm$ 2*	25 $\pm$ 15*	1,81 $\pm$ 0,17
<b>AFB<sub>1</sub> 5 <math>\mu\text{M}</math></b>	41 $\pm$ 17*	17 $\pm$ 2*	19 $\pm$ 6*	1,78 $\pm$ 0,15
<b>SCAR4</b>				
<b>3,8 <math>\mu\text{M}</math></b>	2 $\pm$ 0	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	1,83 $\pm$ 0,20
<b>7,6 <math>\mu\text{M}</math></b>	4 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1,75 $\pm$ 0,80
<b>15,5 <math>\mu\text{M}</math></b>	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0	2 $\pm$ 1	1,87 $\pm$ 0,20
<b>SCAR5</b>				
<b>0,32 <math>\mu\text{M}</math></b>	3 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0	3 $\pm$ 1	1,77 $\pm$ 0,50
<b>0,64 <math>\mu\text{M}</math></b>	6 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	1,89 $\pm$ 0,70
<b>1,3 <math>\mu\text{M}</math></b>	5 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	1,85 $\pm$ 0,30
<b>SCAR6</b>				
<b>7,5 <math>\mu\text{M}</math></b>	11 $\pm$ 3	3 $\pm$ 2	13 $\pm$ 2	1,85 $\pm$ 0,21
<b>15,0 <math>\mu\text{M}</math></b>	14 $\pm$ 3*	3 $\pm$ 1	11 $\pm$ 4	1,85 $\pm$ 0,18
<b>30,0 <math>\mu\text{M}</math></b>	23 $\pm$ 8*	9 $\pm$ 4*	13 $\pm$ 5	1,88 $\pm$ 0,53

<sup>a</sup> Para cada experimento (n=3) foi analisada 1 lâmina (1000 células BN por lâmina) totalizando 3000 células BN por tratamento. \*  $p < 0,05$  considerado estatisticamente significativa a diferença em relação ao Controle Solvente (DMSO 1% v/v) por ANOVA – Dunnett

Os resultados obtidos mostraram que as concentrações avaliadas dos complexos SCAR 4 e 5 não induziram um aumento, estatisticamente significativo, no número total de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotamentos nucleares

em relação ao controle negativo, indicando assim que estes complexos de rutênio não são capazes de induzir mutações cromossômicas nos sistemas celulares avaliados, nas condições utilizadas neste estudo (Tabela 5).

Observa-se, contudo, que o complexo SCAR 6 foi capaz de induzir um aumento significativo no número de MN e NPBs em células de hepatocarcinoma humano (Tabela 6). O fato de apenas ter sido observado efeito mutagênico em células HepG2 pode estar relacionado com o mecanismo de ação da molécula SCAR 6.

Sua estrutura quadrado planar, semelhante a cisplatina, possui dois ligantes cloreto complexados ao núcleo metálico.

O mecanismo de ação da cisplatina é bastante conhecido, seus ligantes cloretos são removidos, devido a hidrólise que ocorre no interior da célula, assim sua molécula hidrolizada gera uma espécie que se liga irreversivelmente ao DNA, geralmente a duas bases de guanina adjacentes (PAGE, 2012). Esta interação leva a distorção da molécula e conseqüentemente quebra do DNA (KELLAND, 2007). Estes mecanismos podem conduzir aberrações cromossômicas bem como a diminuição da viabilidade celular em mamíferos (KRISHNASWAMY & DEWEY, 1993).

Sugere-se assim, que o complexo SCAR 6, possa interagir com o DNA de forma semelhante, levando à quebra cromossômica e conseqüente formação de micronúcleos em células metabolizadoras.

O uso de linhagens celulares metabolizadoras, como as derivadas de fígado humano, reflete melhor a sensibilidade de detecção de várias classes de compostos químicos genotóxicos (MAJER et al., 2004).

A linhagem HepG2, derivada de hepatocarcinoma humano, manteve ativas as

enzimas de Fase I e II que desempenham papel crucial na ativação e mutágenos indiretos e refletem o metabolismo *in vivo* de forma mais preditiva do que modelos experimentais com células metabolicamente incompetentes com CHO-K1, por esta razão alguns agentes químicos podem apresentar resultados negativos de mutagenicidade em linhagens CHO-K1 e nas mesmas condições apresentarem resultados positivos em células HepG2 (KNASMÜLLER et al., 1998; WESTERINK et al., 2011).

No ensaio do CBMN-cit foi utilizado adicionalmente como controle a Aflotoxina B1 que, quando ativada pela CYP3A4, que não é altamente expressa em ratos em comparação com os seres humanos, pode formar diversos adutos no DNA (WESTERINK et al., 2011). Nossos resultados confirmam a capacidade de nossa linhagem HepG2 metabolizar xenobióticos potencialmente genotóxicos uma vez que o aumento de MNs, NPBs e NBUDs, foram estatisticamente significantes em células HepG2 (Tabela 6). Por outro lado, o efeito mutagênico não foi evidenciado nas células CHO-K1 (Tabela 5).

Em resumo, o nosso estudo mostrou que dois dos três complexos de Ru não possuem propriedades mutagênicas *in vitro*. Por feliz coincidência, estes complexos são os que apresentaram resultados mais promissores contra cepas de *M. tuberculosis* MDR em estudos anteriores (PAVAN et al., 2013). No entanto, o complexo SCAR 5 apresentou citotoxicidade em células CHO-K1 e HepG2 em concentrações acima de 3,0 µM.

A citotoxicidade foi investigada neste estudo a fim de determinar concentrações ideais para o ensaio de mutagenicidade CBMN-ct. Contudo, verificou-se uma possível atividade seletiva na citotoxicidade frente a linhagens tumorais. Uma investigação mais aprofundada desta questão é necessária usando diferentes

modelos de células tumorais e normais humanas.

## 5. CONCLUSÃO

A atividade anti-micobacteriana dessa classe de complexos de Ru apresentou resultados extremamente promissores, comparável ou até mesmo melhor dos que os medicamentos da terapia padrão. Suas promissoras atividades respondem positivamente aos critérios que um novo fármaco contra TB deve satisfazer.

Nosso estudo contribui esclarecendo suas diversas atividades em sistemas biológicos de forma que elucida o perfil de segurança no uso terapêutico dessas moléculas.

Apenas um dos complexos analisados (SCAR 6) foi considerado mutagênico em sistemas padrões de determinação da mutagenicidade *in vitro*. Este efeito, todavia, não é desanimador, pois conhecer os possíveis danos que substâncias químicas causam ao DNA é uma informação importante para a modelagem molecular ou direcionamento da terapia. Este efeito pode ainda ser explorado diante do conhecido potencial antitumoral que complexos de Rutênio possuem. Outros estudos sobre os mecanismos de ação destes complexos estão em andamento e os resultados preliminares sugeriram mecanismos de interação com o DNA.

## 6. REFERÊNCIAS

AGUIAR, I. DE et al. European Journal of Pharmaceutical Sciences Antitubercular activity of Ru (II) isoniazid complexes. **EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**, v. 70, p. 45–54, 2015.

ALANYALI, F. S. et al. **Investigation of Genotoxic Effects of Some Ruthenium Complexes According to Cis-platinum** *International Journal of Pharmacology*, 2011.

BALLAL, N. V. et al. A comparative *in vitro* evaluation of cytotoxic effects of EDTA and maleic acid: Root canal irrigants. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 108, n. 4, p. 633–638, 2009.

BERNSTEIN, L. et al. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutation research**, v. 97, p. 267–281, 1982.

BROWN, J. et al. International Journal of Infectious Diseases Health status and quality of life in tuberculosis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 32, p. 68–75, 2015.

BUSTO, N. et al. Anticancer activity and DNA binding of a bifunctional Ru(II) arene aqua-complex with the 2,4-diamino-6-(2-pyridyl)-1,3,5-triazine ligand. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n. 17, p. 9962–9974, 2013.

CLARKE, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, p. 69–93, 2002.

DE LIMA, A. P. et al. The ruthenium complex *cis*-(dichloro)tetrammineruthenium(III) chloride induces apoptosis and damages DNA in murine sarcoma 180 cells. **Journal of Biosciences**, v. 35, n. 3, p. 371–378, 2010.

DEMORO, B. et al. Screening organometallic binuclear thiosemicarbazone ruthenium complexes as potential anti-tumour agents: cytotoxic activity and human serum albumin binding mechanism. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 42, n. 19, p. 7131–46, 2013.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81–95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature**, v. 682, p. 217–234, 2007.

FRANKEN, N. A P. et al. Clonogenic assay of cells *in vitro*. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

GANIHIGAMA, D. U. et al. Antimycobacterial activity of natural products and synthetic agents: Pyrrolodiquinolines and vermelhotin as anti-tubercular leads against clinical multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 1–12, 2015.

GIOVAGNOLI, S. et al. Synthesis, characterization and *in vitro* extracellular and intracellular activity against *Mycobacterium tuberculosis* infection of new second-line

antitubercular drug-palladium complexes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 106–121, 2014.

GLIŠIĆ, B. Đ.; DJURAN, M. I. Gold complexes as antimicrobial agents: an overview of different biological activities in relation to the oxidation state of the gold ion and the ligand structure. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 43, n. 16, p. 5950–69, 2014.

GOBIS, K. et al. Synthesis and evaluation of *in vitro* antimycobacterial activity of novel 1H-benzo[d]imidazole derivatives and analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 13–20, 2015.

GORLE, A. K. et al. Tri- and tetra-nuclear polypyridyl ruthenium (II) complexes as antimicrobial agents. **Dalton Trans.**, v. 43, p. 16713–16725, 2014.

GOULOOZE, S. C.; COHEN, A. F.; RISSMANN, R. Bedaquiline. **British Journal of Clinical Pharmacology**, p. n/a–n/a, 2015.

GUIDELINE, O.; TESTING, F. O. R.; CHEMICALS, O. F. OECD guideline for testing of chemicals. n. July, p. 1–11, 1997.

HEALTH WORLD ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report 2015. **Available on line**, 2015.

HOFFMANN, C. J. et al. High Prevalence of Pulmonary Tuberculosis but Low Sensitivity of Symptom Screening among HIV-Infected Pregnant Women in South Africa. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 8–12, 2013.

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

KNASMÜLLER, S. et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 402, n. 1-2, p. 185–202, 1998.

KRISHNASWAMY, G.; DEWEY, W. C. Cell killing and chromosomal aberrations induced in Chinese hamster ovary cells by treating with cisplatin at 41.5 degrees C during the G1 or late S phase. **Cancer research**, v. 53, n. 6, p. 1239–1243, 1993.

LI, F.; COLLINS, J. G.; KEENE, F. R. Chem Soc Rev Ruthenium complexes as antimicrobial agents. **Chemical Society Reviews**, 2015.

MAJER, B. J. et al. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 551, n. 1-2, p. 153–166, 2004.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation research**, v. 113, n. 3-4, p. 173–215, 1983.

MASLOV, A. Y. et al. High-throughput sequencing in mutation detection: A new generation of genotoxicity tests? **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, p. 1–8, 2015.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 29–60, 2000.

PAGE, S. Ruthenium compounds as anticancer agents. **Education in chemistry**, n. January, p. 26–29, 2012.

PAVAN, F. R. et al. Ruthenium (II) phosphine/picolinate complexes as antimycobacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 598–601, 2010.

PAVAN, F. R. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Ruthenium (II) phosphine / diimine / picolinate complexes : Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 5099–5107, 2011.

PAVAN, F. R. et al. *In Vitro* and *In Vivo* Activities of Ruthenium(II) Phosphine/Diimine/Picolinate Complexes (SCAR) against *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–10, 2013.

RESENDE, F. A. et al. Effect of the dibenzylbutyrolactone lignan (-) -hinokinin on doxorubicin and methyl methanesulfonate clastogenicity in V79 Chinese hamster lung fibroblasts. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 700, p. 62–66, 2010.

SKRIPCONOKA, V. et al. Delamanid improves outcomes and reduces mortality in multidrug-resistant tuberculosis. **European Respiratory Journal**, v. 41, n. 6, p. 1393–1400, 2013.

SOMAN, R. et al. Successful Management of Highly Drug Resistant Tuberculosis with Individualised Drug Susceptibility Testing. **Journal of the association of physicians of india**, v. 62, n. July, p. 567–570, 2014.

THOMAS, P.; FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. **Methods in Molecular Biology**, v. 682, p. 217–234, 2011.

VALENTIN-SEVERIN, I. et al. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: Comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 536, p. 79–90, 2003.

WEISS, A. et al. In vivo anti-tumor activity of the organometallic ruthenium(II)-arene complex [Ru( $\eta^6$ -p-cymene)-Cl<sub>2</sub>(pta)] (RAPTA-C) in human ovarian and colorectal carcinomas. **Chem. Sci.**, v. 5, n. 12, p. 4742–4748, 2014.

WESTERINK, W. M. A et al. Development and validation of a high-content screening *in vitro* micronucleus assay in CHO-k1 and HepG2 cells. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1-2, p. 7–21, 2011.

WORKING GROUP ON NEW TB DRUGS. **The global TB drug pipeline.**

ZUMLA, A. et al. Tuberculosis treatment and management: an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 3, n. 3, p. 220–234, 2015.

Araraquara, 07 de janeiro de 2016.

---

Rone Aparecido De Grandis

Aluno

De acordo,

---

Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda

Orientadora