

**Efeitos citotóxicos da exposição ao mercúrio e à  
cisplatina: Estudo hemodinâmico**

**Daniele Angeli da Silva**

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Fisiologia Cardiovascular

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

Vitória, outubro de 2014

# **Efeitos citotóxicos da exposição ao mercúrio e à cisplatina: Estudo hemodinâmico**

**Daniele Angeli da Silva**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Cardiovascular.

Aprovada em 10/2014 por:

---

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo - Orientador, UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Fagundes - Co-orientadora, UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flavia de Paula, UFES

---

Prof. Dr. Valério Baraúna, UFES

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon, Coordenadora PPGCF

**Angeli, Daniele da Silva, 1987**

**Efeitos citotóxicos da exposição ao mercúrio e à cisplatina: Estudo hemodinâmico**

[Vitória] 2014

92 pp, 29,7cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2014)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo

1. Aberrações cromossômicas; Medula óssea; Pressão arterial; Citogenética; Clastogenicidade.

2. Aberrações cromossômicas; Hemodinâmica, Quimioterapia; Medula óssea; Frequência cardíaca.

*“Alice: Do you think I've gone 'round the bend?”*

*Charles Kingsley: I'm afraid so... you're mad. Bonkers. Off your head... but I'll tell you a secret...all of the best people are.”*

(Linda Woolverton)

*“Para ser feliz, você precisa escolher bem duas coisas na sua vida: Uma delas é com quem você irá se casar, a outra é com o que você vai trabalhar.”*

(Dalton Valentim Vassallo)

## AGRADECIMENTOS

Peço desculpas aos que condenam agradecimentos longos, mas me permitirei certo grau de liberdade, e até mesmo de informalidade aqui, para reconhecer o papel que cada um teve ao longo do meu caminho como mestrandia.

Em primeiro lugar agradeço aos membros da banca. À Dr<sup>a</sup>. Flavia de Paula por estimular o desenvolvimento do meu senso crítico na leitura de artigos e nas discussões científicas, contribuir para a minha formação desde a graduação, e pela disponibilidade em avaliar meu trabalho. Ao Dr. Valério Baraúna pela disponibilidade em avaliar meu trabalho, pelas correções e sugestões.

À Dr<sup>a</sup>. Valéria Fagundes, a quem carinhosamente denomino 'Chefa', que é uma das grandes 'culpadas' por eu estar onde estou hoje. Confesso que imergir totalmente em um mundo de incertezas não foi uma tarefa fácil, mas quem resiste ao lhe ver falando de pesquisa e cromossomos de forma tão passional? Não deu para fugir... me apaixonei pelos cromossomos também! Obrigada por ser minha 'mãe biológica' e por me lembrar que a vida é feita de sonhos, mas principalmente da vontade de realiza-los!

Ao Dr. Dalton Vassallo, mais conhecido como 'Chefe', que acolheu uma 'magrela maluca', com uma proposta de projeto fora do 'convencional'. Mesmo sabendo que minhas experiências anteriores com ratos haviam rendido uma tarde inteira de lágrimas, e que eu não conhecia nenhuma das técnicas do laboratório, apostou no meu trabalho e confiou na minha capacidade para desenvolver este projeto. Meu muito obrigado pela imensa bagagem que adquiri neste período. Fique tranquilo, pois projeto 5 quilos não foi esquecido!

Aos mestres que tanto contribuíram para a expansão do conhecimento e amadurecimento das ideias. Prof. Dr. Elizardo Vasquez pelas orientações na confecção da *lecture* e pelos ensinamentos sobre fisiologia cardiovascular. Ao Prof. Dr. Geraldo Mill, por compartilhar a grandiosidade de seu pensamento estatístico e pelo amadurecimento no senso crítico durante a leitura e escrita de artigos. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvana Meyrelles, por trazer luz à terapia gênica, ao uso das células tronco e à existência de uma infinidade de animais *knockout*. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Bissolli por compartilhar a experiência única de imersão no mundo da regulação humoral da circulação, além de 'aparar as arestas' que tantos estímulos ao senso crítico deixaram, afinal, ponderar com bom senso é tão importante quanto criticar.

À Dr<sup>a</sup>. Maria Do Carmo Batitucci, pelas discussões que enriqueceram o artigo oriundo deste trabalho, pela disponibilidade e exemplos de profissionalismo. Pelas lições que levarei para a vida, e que você me ensina desde a graduação. Obrigada por participar de etapas tão importantes na minha vida Do Carmo, você é muito especial.

Aos mestres Profs. Drs. Ivanita Stefanon, Leonardo dos Santos, Alessandra Padilha que além dos ensinamentos em sala de aula, contribuíram com informações valiosas para as dinâmicas do dia-a-dia, exemplos de profissionalismo, e momentos ímpares de descontração que tornavam até o dia mais cansativo de experimentos mais leve e revigorante.

Aos colegas de turma, Fabrício, Wender, Nathalie, Ananda, Marito, Bernadete, Paula e Morgana que dividiram o peso das dificuldades e multiplicaram os risos, agradeço pela energia e força ao longo da caminhada. Em especial à Dieli, com quem compartilhei o sufoco dos estudos para estatística, e uma amizade que extrapola os limites acadêmicos.

Aos LEMquianos (Galera do Laboratório de Eletromecânica Cardíaca da UFES) que contribuíram com conhecimento técnico e prático, dúvidas, curiosidades sobre um dos projetos mais 'ovelha negra' do laboratório. Que me fizeram rir e guardar boas lembranças. Obrigada pelo convívio harmônico, pela contribuição que TODOS tiveram para meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada também pelo carinho e respeito com o meu IC. Peço desculpas por minhas falhas e por não nomear cada um...a família é enorme e eu precisaria de algumas páginas para completar a tarefa sem ser injusta!

Aos LGanos (Povo do Laboratório de Genética Animal da UFES), com quem dividi momentos únicos de puro metanol e ácido acético, um agradecimento especial pois 'invadi a praia' de vocês, usei equipamentos, reagentes e ao final até telefone do laboratório eu atendia...podem falar...como é espaçosa essa Dani não?! Sem o carinho, respeito e auxílio de vocês este trabalho não seria viável! Obrigada Ana Heloisa, Arturo Martinelli, Cristina Dornelas, Débora Dalvi, Eduardo Loyola, Fernanda Zaidan, Gabriel Dalbem, Marianna Xavier, Marina Monjardim, Rosana Abrantes e Thaís Volpi.

Particularmente, algumas pessoas tiveram participação única e fundamental para que este trabalho saísse do papel e se tornasse experimentos, resultados e finalmente uma dissertação. Em primeiro lugar devo não apenas agradecimento, mas créditos e autoria ao colega Gilson Brás que realizou os experimentos da hemodinâmica e a leitura dos dados. Obrigada por dividir momentos como "Dani o rato está morrendo" e cuidar da anestesia

enquanto eu corria para o LGA com um rato moribundo sob efeito de colchicina, na esperança de salvar a preparação citogenética! Agradeço o respeito e dedicação que você teve ao meu trabalho!

Ao Victor Colombi por acompanhar meus passos desde a redação do projeto, comemorar a aprovação pelo Comitê de Ética, compartilhar ideias, me ensinar tudo e mais um pouco sobre as técnicas de citogenética. Pelo “Pouca hipotônica”, ou “muita colchicina”, pela amizade leve e divertida, pelo companheirismo e apoio incondicionais. Você sabe que mora no meu coração, numa casinha do lado da do Turo. Obrigada por me ajudar a ser uma profissional melhor!

À Letícia de Moraes, pelas correções e sugestões no texto. Pela amizade sólida e duradoura. Minha admiração pela sua competência e profissionalismo. Moradia eterna no meu coração!

Pela torcida malacológica de Mercia Barcellos, Gabriela Zamprogno e Rafael Devens, cuja energia sempre me fortaleceu. Muito obrigada!

Aos meninos do biotério, Mario Armando, Rodolfo, Marildo e João Batista, com quem firmei um ‘acordo de cavalheiros’ para não monopolizar os ratos em um momento em que o biotério passava por reformulações. Meu muito obrigada pela paciência, profissionalismo e respeito!

Àqueles com residência fixa no meu coração, que reclamaram por minha ausência, torceram pelo meu sucesso, me fortaleceram nos momentos de fragilidade e comemoraram cada etapa concluída, é chegada a hora de agradecer por tanto carinho. Felipe, Cintia, Vinícius, Larissa e Fábio. Amo todos vocês incondicionalmente!

Aos meus familiares agradeço a compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio e energia vindos até mesmo de outros países. Vocês são uma das partes mais importantes da minha vida!

Ao meu pai, que é meu guia, e fortaleza ao longo de toda a minha vida. Neste trabalho, preciso dizer a todo leitor que ele foi mais que um pai, foi meu IC. Com uma sensibilidade extraordinária, me auxiliou na lida com os ratos e me acompanhou durante os quatro meses de tratamento. Abdicou do descanso nos fins de semana para estar ao meu lado, e nos momentos em que me faltou energia, se esforçou mais do que eu para que o trabalho desse

certo. Pai, é por você que hoje finalizo esta dissertação. Ela é a forma que tenho de dizer a todos o quanto sou grata por tudo que você fez e representa para mim. Te amo!

À minha mãe por ser o alicerce mais forte da casa. Por ser o esteio depois de um dia exaustivo de experimentos. Pelo abraço com propriedades curativas, pela comida quentinha e pelo esforço por uma refeição em família. Desculpe pela bagunça e por não estar presente em todos os momentos, mas eu herdei o seu gene da inquietação... almejo um dia me tornar uma vencedora assim como você! Tenho por você profunda admiração e um amor imensurável.

À minha irmã Aline, que aguenta meu mau-humor, e que já pode escrever uma tese intitulada 'Paciência da Dani: limite humor-dependente'. Peço desculpas pelos meus momentos mais explosivos e agradeço por me treinar na arte da comunicação interpessoal. Obrigada por ignorar nossa diferença de idade e por transformar minha rotina em algo completo e feliz. Amo muito!!

À CAPES pelo apoio financeiro por meio de bolsa de pós-graduação em nível de mestrado.



# **CAPÍTULO I**

**Avaliação da genotoxicidade induzida pelo modelo crônico de exposição à baixa concentração plasmática de mercúrio em células da medula óssea de ratos**

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
1.1 METAL TÓXICO.....	22
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO.....	22
1.3 GENOTOXICIDADE E CLASTOGENICIDADE.....	23
1.4 ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS.....	25
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>27</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
4.1 DILUIÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS SOLUÇÕES DE CLORETO DE MERCÚRIO.....	29
4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	30
4.3 TRATAMENTO DOS ANIMAIS.....	31
4.4 HEMODINÂMICA.....	34
4.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA CITOGENÉTICA.....	35

4.6 ANÁLISE CITOGENÉTICA PARA AVALIAÇÃO DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS.....	36
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
5.1 PESO E IDADE.....	40
5.2 HEMODINÂMICA.....	41
5.3 GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE.....	42
5.4 ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS.....	43
5.4.1 Tratamento por 15 Dias.....	43
5.4.1.1 Frequência absoluta de aberrações cromossômicas.....	43
5.4.1.2 Quebras.....	44
5.4.1.3 <i>Gaps</i> .....	45
5.4.2 Tratamento por 30 Dias.....	46
5.4.2.1 Frequência absoluta de aberrações cromossômicas.....	46
5.4.2.2 Quebras.....	47
5.4.2.3 <i>Gap</i> .....	48
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
6.1 PESO E IDADE.....	49
6.2 HEMODINÂMICA.....	49
6.3 GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE.....	50
6.3.1 Frequência Absoluta de Aberrações Cromossômicas.....	50
6.3.2 Quebras.....	50

6.3.3 <i>Gaps</i> .....	51
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....</b>	<b>56</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequência da aplicação das injeções de HgCl <sub>2</sub> nas patas traseiras dos animais do grupo Hg.....	33
<b>Tabela 2:</b> Descrição dos tipos de testes estatísticos e suas respectivas aplicações nos dados do estudo.....	38
<b>Tabela 3:</b> Pesos médios dos seis animais de cada um dos grupos ao final dos tratamentos de 15 e 30 dias.....	40

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Descrição do protocolo de diluição do mercúrio para a obtenção das doses de ataque e manutenção, utilizadas nos tratamentos com duração de 15 e 30 dias (Retirado de Wiggers, 2008).....30
- Figura 2:** Localização e dissecação das estruturas durante a canulação da artéria carótida. Em A o quadrado evidencia o local onde ocorre a tricotomia e a incisão para exposição da musculatura (Modificada de Khajuria et al., 2012); Em B a seta aponta para a artéria carótida, na qual é introduzida a cânula (Foto: Gilson Brás).....34
- Figura 3:** Registros de duas metáfases com apenas uma aberração cada uma. Em A é possível visualizar, indicada pela seta, uma quebra; Em B a seta aponta para uma aberração do tipo gap. Observação em fotomicroscópio óptico (objetiva de 100X).....37
- Figura 4:** Gráfico comparativo entre os dados hemodinâmicos dos grupos controle e tratamento com mercúrio (teste t de Student, n = 6 para cada grupo). Em A, B, C e D, respectivamente, comparação das médias da PAS, PAD, PAM e FC; C-/ 15D – Animais controle do tratamento de 15 dias; Hg/ 15D – Animais mercúrio do tratamento de 15 dias; C-/ 30D – Animais controle do tratamento de 30 dias; Hg/ 30D – Animais mercúrio do tratamento de 30 dias. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.....41
- Figura 5:** Imagens de todas as aberrações cromossômicas registradas durante observação sob microscopia óptica (objetiva de 100X). Em A o evento de pulverização, caracterizado pela ocorrência de eventos aberrantes em quase todos os cromossomos de uma única metáfase; Em B a seta indica uma quebra em um dos braços do cromossomo; Em C a seta maior indica um gap que associou três cromossomos, enquanto a seta menor indica outra aberração do tipo gap; Em D a seta aponta para um cromossomo em anel.....42

**Figura 6:** Teste de Mann- Whitney para comparação entre o número de Metáfases Aberrantes do grupo controle (n = 6) e do grupo tratado pelo período de 15 dias (n = 6). Cada barra representa a média do número de Metáfases Aberrantes do grupo Controle Negativo (C-) e do grupo Tratamento com Mercúrio (Hg); \*p <0,05.....43

**Figura 7:** Gráfico comparativo entre as médias dos grupos controle negativo (C-) e tratamento com mercúrio por 15 dias (Hg). A figura A mostra os resultados do teste de Mann- Whitney para a comparação entre as médias dos totais de metáfases que apresentam quebra (p > 0,05). Em B a representação das médias do número de cromossomos com quebras para cada um dos grupos (p>0,05). Cada barra representa a média ± desvio padrão da média.....44

**Figura 8:** Os gráficos mostram a comparação entre as médias dos dados da anomalia do tipo *Gap* para os grupos controle negativo (C-) e tratamento com mercúrio por 15 dias (Hg), obtidos por meio do teste de Mann- Whitney. Cada barra representa a média ± desvio padrão da média. Em A, foram comparadas as médias dos totais de metáfases que apresentam esse tipo de anomalia (\*p < 0,05). De forma similar, B representa as médias dos totais de cromossomos com *Gap* (p=0,05).....45

**Figura 9:** Comparação entre o número de Metáfases Aberrantes do grupo controle e do grupo tratado pelo período de 30 dias. Cada barra representa a média ± desvio padrão da média das Metáfases Aberrantes dos grupos Controle Negativo (C-) e Tratamento com Mercúrio (Hg); Teste de Mann- Whitney \*\*p < 0,05, com n=6.....46

**Figura 10:** O gráfico apresenta a comparação entre as médias dos grupos controle negativo (C-) e tratamento com mercúrio por 30 dias (Hg). Em A cada barra representa a média ± desvio padrão da média dos totais de metáfases que apresentam quebra (\*p < 0,05), enquanto em B representam os números de cromossomos com quebras para cada um dos grupos (\*p< 0,05).....47

**Figura 11:** Representação gráfica da comparação entre as médias dos dados da anomalia do tipo *Gap* para os grupos controle negativo (C-) e tratamento com

mercúrio por 30 dias (Hg). Em A cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão da média dos totais de metáfases que apresentam esse tipo de anomalia (\*\* $p < 0,05$ ). Da mesma forma, B cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão da média dos totais de cromossomos com Gap (\*\* $p < 0,05$ ).....48

**Figura 12:** Figura esquemática da ação do mercúrio sobre via metabólica da formação de desoxitimina monofosfato. Em A observa-se o efeito sobre o DNA quando o Hg se liga ao sítio ativo da enzima dUTPase. A incorporação incorreta de uracila às fitas de DNA está representada pelas letras 'U' em vermelho; A partir da excisão das uracilas o DNA fragilizado segue por um, de dois caminhos diferentes, dependendo da magnitude do dano sofrido; Em B a via normal está representada de forma simplificada, e com destaque para a área pontilhada que sinaliza o local onde o metal se liga.....53



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

[CH<sub>3</sub>Hg]<sup>+</sup>: Metil Mercúrio  
AAL: Ácido Alfa Lipóico  
AC: Aberração Cromossômica  
ATP: Adenosina Trifosfato  
C-: Controle Negativo  
C+: Controle Positivo  
CDP: Citidina Difosfato  
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais  
CG: Cromossomo com Gap  
CQ: Cromossomo com Quebra  
dCDP: Desoxicitidina Difosfato  
dCTP: Desoxicitidina Trifosfato  
DNA: Ácido Desoxirribonucleico  
dTMP: Desoxitimidina Monofosfato  
dUMP: Desoxiuridina Monofosfato  
dUTP: Desoxiuridina Trifosfato  
EPM: Erro padrão da média  
EROs: Espécies reativas de oxigênio  
FC: Frequência cardíaca  
GSH: Glutathiona  
GSSG: Glutathiona Oxidada  
Hg: Mercúrio  
Hg<sup>2+</sup>: Mercúrio Mercúrico  
HgCl<sub>2</sub>: Cloreto de Mercúrio  
i.m.: Intramuscular  
i.p.: Intraperitoneal  
KCl: Cloreto de Potássio  
NaCl: Cloreto de Sódio  
P.A.: Para Análise  
p: Probabilidade

PAD: Pressão arterial diastólica

PAM: Pressão arterial média

PAS: Pressão arterial sistólica

rpm: Rotações por Minuto

-SH: Grupo sulfidríla

SSB: Single Stranded Binding

UDP: Uridina Difosfato

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

## RESUMO

Metal com características ímpares e de ampla utilização, o mercúrio tornou-se uma preocupação mundial a partir do momento em que seus riscos ao meio ambiente e à saúde humana foram compreendidos. Valores de referência para concentração plasmática foram estabelecidos, mas há estudos que demonstram a ocorrência de efeitos prejudiciais do metal, mesmo em concentrações próximas ou abaixo dos valores considerados seguros. Para melhor compreender os efeitos do mercúrio sob a fisiologia dos diversos sistemas biológicos, ensaios crônicos têm sido desenvolvidos em modelos para simular a intoxicação humana. Os resultados desses estudos têm esclarecido pontos das vias metabólicas que direta ou indiretamente participam da transformação, acumulação ou excreção do mercúrio. Mesmo com esses avanços, ainda há poucos estudos de genotoxicidade associados a modelos crônicos com baixas dosagens de intoxicação pelo metal. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência e identificar os tipos de aberrações cromossômicas (AC) em um modelo de exposição de ratos Wistar fêmeas ao cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) durante 15 e 30 dias. Outro objetivo foi registrar possíveis variações em parâmetros hemodinâmicos. Os animais foram divididos em três grandes grupos, sendo um controle negativo, um controle positivo e um tratamento com mercúrio. Após anestesia, registros hemodinâmicos indicaram a ausência de variação na pressão arterial e na frequência cardíaca dos animais tratados com  $\text{HgCl}_2$ . Com a utilização de citogenética clássica foi possível observar a presença de aberrações do tipo quebra e *gap* nas amostras de medula óssea dos animais tratados por 15 dias e 30 dias. Foram registrados a frequência absoluta de aberrações cromossômicas (FCAA), os totais de *gaps* e quebras (TG e TQ) e os totais de cromossomos com *gaps* e quebras (CG e CQ). De todos os resultados, somente as amostras de 30 dias apresentaram diferença estatisticamente perceptível para todos os parâmetros citogenéticos avaliados, quando comparadas com o controle negativo. Duas vias metabólicas que sofrem influência direta do mercúrio podem estar relacionadas aos resultados obtidos. A primeira é a via em que atua a enzima dUTPase, que quando desbalanceada provoca a fragilização da fita de DNA. A outra é a via da Glutathione, a qual está relacionada ao controle dos níveis de radicais livres, e cujo desequilíbrio aumenta a produção de espécies

reativas de oxigênio levando ao estresse oxidativo. Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que a baixa concentração de mercúrio utilizada no modelo de exposição crônico foi genotóxica, clastogênica e potencialmente mutagênica para as células de medula óssea de ratos *Wistar* fêmeas tratadas pelo período de 30 dias.

**Palavras-chave:** Aberrações cromossômicas; Medula óssea; Pressão arterial; Citogenética; Clastogenicidade.

## ABSTRACT

Metal with unique characteristics and wide use, mercury became a global concern from the moment that its environmental and human health risks were known. Reference values for plasma concentrations were established, but studies have shown the occurrence of adverse effects of the metal, even at near, or below, considered safe concentration levels. To better understand the effects of mercury on the physiology of various biological systems, chronic tests have been developed in models to simulate human poisoning. The results of these studies have clarified points of metabolic pathways that directly or indirectly participate in the transformation, accumulation or excretion of mercury. Even with these advances, there are few studies of genotoxicity associated with chronic models of metal intoxication. We began a study to verify the occurrence and to identify the types of chromosomal aberrations (CA) in a model of exposure of Wistar rats to mercuric chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) for 15 and 30 days. Another purpose was to record possible changes in hemodynamic parameters. The animals were divided into three groups, negative control, positive control and a treatment with mercury. After anesthesia, records from arterial pressure showed no change in arterial pressure and heart rate of the animals treated with  $\text{HgCl}_2$ . Classical cytogenetic allowed to observe the presence of aberrations such as breakage and gap, both in bone marrow samples from animals treated for 15 days and 30 days. The absolute frequency of chromosomal aberrations (AFCA) the total gaps and breaks (TG and TB) and total chromosomes with gaps and breaks (CG and CB) was recorded. From all results, only samples of 30 days showed statistically noticeable difference for all evaluated cytogenetic parameters when compared with the negative control. Two metabolic pathways that suffer direct influence of mercury may be related to the results obtained. The first is the way in which acts the dUTPase enzyme that, when unbalanced, makes DNA strand breakable. The other one is the Glutathione pathway, which is related to the control of the levels of free radicals, and whose imbalance increases the production of reactive oxygen species, leading to oxidative stress. Based on these results, it was concluded that the low concentration of mercury used in the chronic exposure model was genotoxic, clastogenic and

potentially mutagenic to cells of bone marrow from female Wistar rats treated for 30 days.

**Keywords:** Chromosomal aberrations; Bone marrow; Arterial pressure; Cytogenetics; Clastogenicity;

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 METAL TÓXICO

O mercúrio se apresenta em diversas formas químicas, dentre elas o mercúrio elementar ou metálico, os compostos inorgânicos, ou ainda formando compostos orgânicos. A contaminação por mercúrio é resultante da liberação/ descarte de mercúrio metálico e seus derivados no meio ambiente. No sedimento de ecossistemas aquáticos, os microrganismos promovem a oxidação das formas inorgânicas a metil e dimetilmercúrio (Betti et al., 1992; UNEP/WHO, 1995).

A forma com maior potencial tóxico aos seres vivos é o metilmercúrio ( $[\text{CH}_3\text{Hg}]^+$ ), o qual facilmente se difunde pela cadeia alimentar, atingindo os seres humanos por meio da ingestão de alimentos oriundos de áreas contaminadas (Krishnani & Ayyappan, 2006; Mergler et al., 2007; Selin et al., 2010 ). Diversos estudos em humanos e em outros animais têm relatado os efeitos adversos da exposição ao mercúrio, no que se refere a alterações na fisiologia cardiovascular (Wiggers, 2008; Peçanha, 2009; Furieri, 2011), renal (El-Shenawy & Hassan, 2008), no funcionamento do sistema nervoso (Kurland et al., 1960; Matsumoto et al., 1965) e sobre a divisão celular (Silva-Pereira et al., 2005).

## 1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres são produzidos por processos fisiológicos naturais e continuamente atuam como mediadores, transferindo elétrons em reações bioquímicas. Quando produzidos em quantidades adequadas, os radicais possibilitam, por exemplo, a geração das unidades de energia (ATP), a fertilização de óvulos e a ativação de genes (Barbosa et al., 2010), sendo, portanto, elementos importantes para a

manutenção da homeostasia. Contudo, a produção anormal dessas espécies químicas é alvo de preocupação, já que o aumento na produção de radicais livres caracteriza a manifestação de doenças humanas, tais com câncer e doenças cardiovasculares (Jacob & Burry, 1996).

A periculosidade do mercúrio também se relaciona ao fato de ele possuir grande afinidade pelos grupos sulfidríla (-SH), ácido alfa lipóico (AAL) e glutathiona (GSH), que são responsáveis por cerca de 10-50% da capacidade antioxidante das proteínas plasmáticas. O mercúrio substitui o zinco, cobre e outros metais-traço em ligações com metaloproteínas, o que reduz a efetividade das metaloenzimas. Além disso, provoca disfunções mitocondriais diminuindo, por um lado, a produção de ATP e glutathiona reduzida, e, em contrapartida, aumentando a peroxidação lipídica. Em suma, o mercúrio reduz a disponibilidade de antioxidantes, o que diminui a defesa celular ao ataque de radicais livres e, por consequência, aumenta o estresse oxidativo (Houston, 2007; 2011).

### 1.3 GENOTOXICIDADE E CLASTOGENICIDADE

A inespecificidade é uma das características da genética toxicológica, no que diz respeito ao estudo de um determinado efeito adverso à saúde. Isso, porque avalia efeitos genotóxicos em potencial, por serem considerados elementos precursores de alterações graves que culminem, por exemplo, em câncer (Ribeiro & Marques, 2003). A genotoxicidade, então, trata-se da capacidade que um agente físico, químico ou biológico tem de alterar a estrutura do DNA, ou de uma forma simplista, é a toxicidade manifestada no material genético celular (Sorsa, 2011). Aqueles com capacidade de promover quebra ou perda de cromossomo são denominados clastogênicos (Tucker & Preston, 1996), e há elevado grau de associação entre as respostas positivas encontradas nos testes de toxicidade genética e a carcinogenicidade, tanto em roedores quanto no homem (Ribeiro & Marques, 2003).



Segundo Houston (2007), diversos estudos têm demonstrado que o mercúrio gera radicais de oxigênio. O aumento na quantidade de estudos dessa natureza permite evidenciar que metais tóxicos e carcinogênicos são capazes de interagir com proteínas nucleares e DNA, causando dano oxidativo em macromoléculas biológicas.

A formação de nucleobases (produtos típicos, resultantes de ataque dos radicais de oxigênio ao DNA) nas células animais cultivadas em meio contendo metais carcinogênicos, é uma forte evidência que sustenta a hipótese da natureza oxidativa do dano genotóxico (Valko et al., 2005). Estudos mais específicos demonstraram que metais, dentre eles o mercúrio, produzem radicais reativos, que danificam o DNA, causam peroxidação lipídica e alterações nas proteínas, ligando-se a os grupos sulfidrilas nelas presentes (Chen et al., 2005).

Outros estudos indicam que o dano oxidativo ao DNA contribui ativamente para a formação da placa de ateroma (Andreassi, 2003; Weakley et al., 2010). Há ainda o fato de que a identificação de poliploidias, anomalias cromossômicas e mutações, auxilia na compreensão de como lesões no material genético celular podem contribuir para o desenvolvimento de doenças graves como a Colaginite Esclerosante Primária (DeHaan et al., 2007) e prejuízos bioquímicos severos (Reeve et al., 2008). Rotineiramente, testes de toxicidade genética têm sido utilizados para avaliar o espectro toxicológico de compostos químicos e medicamentos (Ribeiro & Marques, 2003).

No que diz respeito à influência do mercúrio na dinâmica celular, estudos têm alertado sobre o seu potencial genotóxico e mutagênico na forma de diferentes compostos, como amálgamas dentárias (Akiyama et al., 2001), o metil e o etilmercúrio (Popescu et al., 1979; Amorim et al., 2000), e o cloreto de mercúrio (Shurz et al., 2000), os quais conhecidamente promovem alterações citogenéticas, como aberrações cromossômicas, formação de micronúcleo e excisão de cromátides irmãs (Silva-Pereira et al., 2005).

Apesar dos grandes avanços e descobertas sobre os mecanismos de ação deste metal no organismo de mamíferos, nota-se ainda o uso de doses elevadas nos tratamentos (0,5 mg/kg nos estudos *in vivo* de El-Shenawy e Hassan, 2008; 50 mM nos estudos *in vivo* de Shurz et al., 2000 e de 0,1 a 1000µg/l nos estudos *in vitro* de Silva-Pereira et al., 2005), ainda que sejam consideradas, por alguns desses autores, doses baixas.

#### 1.4 ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Qualquer agente mutagênico é capaz de promover lesões no DNA celular, as quais são reparadas por diversas vias, como por exemplo, a excisão de nucleotídeos, o mecanismo de reparo por excisão de base, a junção de extremidades não homólogas, a reparação por recombinação homóloga e o reparo de pontes cruzadas (Natajara & Palitti, 2008). Quando uma gama de modificações sem reparo no DNA se acumula e torna-se visível ao microscópio, recebe a denominação Aberração Cromossômica (AC) (Obe et al., 2002).

Savage discorre sobre a 'Teoria Molecular' em seu trabalho de 1998. O autor afirma que a interpretação das aberrações cromossômicas tomou uma abordagem mais molecular, devido ao avanço dos estudos e a maior compreensão sobre a complexidade da arquitetura intranuclear. A integridade do DNA cromossômico e a grande quantidade de mecanismos associados à sua manutenção e/ou reparo, permitem inferir que a quebra em uma única fita (do inglês *Single Strand Break*) pode se tornar um gatilho para a propagação de uma lesão.

Pontos suscetíveis a quebras (do inglês *Breakpoints*) não são distribuídos de forma aleatória nos cromossomos, eles ocorrem com maior frequência em regiões de cromatina ativa. Regiões eucromáticas como o telômero e regiões repetitivas intersticiais, também desempenham papel fundamental na formação de AC. Trocas simétricas entre cromátides homólogas e aberrações crípticas em regiões subteloméricas são constantes e estão associadas a anormalidades humanas congênitas (Obe et al., 2002).

Grandes alterações cromossômicas e a maior parte das mutações espontâneas em células somáticas de mamíferos estão associadas ao câncer. Algumas aberrações específicas, manifestadas após a exposição a agentes cancerígenos, tendem a encurtar o caminho que leva ao início da doença (Bailey & Bedford, 2006). Em células cancerosas as taxas de instabilidade cromossômica, avaliadas por meio de ganho/perda de cromossomos inteiros ou segmentos cromossômicos, são elevadas e podem causar desequilíbrio na expressão gênica (Gollin, 2005).

As aberrações cromossômicas numéricas e estruturais são importantes biomarcadores de exposição a agentes nocivos ao DNA. Tais anormalidades têm sido associadas a neoplasias, anomalias congênitas (frequência de 0,6% de aberrações cromossômicas, no total de nascidos vivos) e abortos espontâneos (Natarajan, 2002; Obe et al., 2013).

Estudos de prospecção indicam que há correlação entre a manifestação do câncer e o aumento na frequência de aberrações espontâneas em linfócitos periféricos. Esses dados conferem ao ensaio de AC em linfócitos de sangue periférico sensibilidade suficiente para que seja aplicado nos casos em que há suspeita de exposição a agente genotóxico (Tawn & Whitehouse, 2001; Natarajan, 2002).

É necessário salientar que as aberrações cromossômicas ainda são reconhecidas como o único biomarcador válido para apontar o risco de câncer em humanos (Durante et al., 2013). Esse fato ressalta a importância da compreensão dos mecanismos de formação das AC, bem como de suas vias de reparo e proteção ao DNA (Natarajan, 2002; Natarajan & Boei, 2003; Natarajan & Palitti, 2008).

## 2 JUSTIFICATIVA

Estudos com modelos crônicos de baixa dosagem de mercúrio elucidaram aspectos importantes das correlações entre o sistema cardiovascular, a dose e o tempo de exposição ao metal. Esses resultados possuem alta relevância no que diz respeito aos cuidados com o risco cardiovascular, já que são reflexo de um tratamento que simula o modelo de exposição crônica em seres humanos.

Apesar de nas últimas décadas terem ocorrido muitos avanços nos estudos toxicológicos sobre a exposição ao mercúrio e seus derivados, ainda há lacunas a serem preenchidas, principalmente no que diz respeito à genotoxicidade e mutagenicidade em modelos crônicos de intoxicação.

A carência de informações que quantificassem ou qualificassem os efeitos citotóxicos, genotóxicos ou mutagênicos que a exposição crônica à intoxicação por baixas concentrações de cloreto de mercúrio pode apresentar em células de medula óssea de ratos *Wistar* fêmeas, levou ao desenvolvimento deste estudo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e dimensionar o potencial genotóxico do mercúrio em células da medula óssea do rato Wistar normotenso quando exposto a um modelo crônico de intoxicação por cloreto de mercúrio.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a ocorrência de alterações nos parâmetros hemodinâmicos tais como: pressão arterial média, sistólica e diastólica, e frequência cardíaca em fêmeas de ratos Wistar, ao final dos tratamentos com cloreto de mercúrio;

Investigar a presença de aberrações cromossômicas nas metáfases das células de medula óssea dos animais tratados durante 15 e 30 dias com cloreto de mercúrio;

Qualificar os diferentes tipos de aberrações cromossômicas presentes nas células medulares de fêmeas de ratos Wistar, ao final do período de exposição crônica ao metal;

Identificar possíveis diferenças entre os tratamentos de 15 e 30 dias, quanto às medidas hemodinâmicas e à ocorrência de aberrações cromossômicas nas células de medula óssea.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 DILUIÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS SOLUÇÕES DE CLORETO DE MERCÚRIO

As Soluções de Cloreto de Mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) aplicadas nos animais foram obtidas por meio de diluição seriada, conforme descrito no trabalho de Wiggers (2008) e disposto na figura 1. A massa de 0,01302g de  $\text{HgCl}_2$  (Sigma Aldrich) foi pesada e dissolvida em um total de 10 mL de solução salina de Cloreto de Sódio ( $\text{NaCl}$ ) 0,9%. Essa solução recebeu o nome de Estoque 1. A solução de Estoque 2 foi obtida por meio da diluição de 0,1mL da Solução Estoque 1 em 9,9mL de solução salina. A Estoque 2 foi alíquotada em quatro tubos de 2,5mL e renomeada como Dose de Ataque para posterior aplicação nos animais no primeiro dia de tratamento. O volume restante da solução foi utilizado nas diluições seguintes e armazenado em tubo plástico do tipo falcon de 14 mL. O volume de 1mL da Estoque 2 foi diluído em 9ml de solução salina para obtenção da Solução Estoque 3. A Dose de Manutenção, que foi a solução utilizada ao longo dos 14 ou 29 dias de tratamento dos animais, foi obtida com a diluição de 13,5  $\mu\text{L}$  da solução Estoque 3 em 86,5  $\mu\text{L}$  da solução salina. Um volume total de 50mL da Dose de Manutenção foi preparado, sendo que 25mL foram alíquotados em 10 tubos de 2,5mL para uso e o restante da solução foi disposto em tubo tipo falcon de 50mL. Todas as soluções foram conservadas em tubos protegidos da luz e armazenadas em *freezer* com temperatura de  $-20^\circ\text{C}$ .

$$d = Vd \times Cp$$

Peso aproximado do rato = 300 g (80% de água)

Vd = 240 ml considerando que o mercúrio distribui-se igualmente pelo organismo a concentração plasmática desejada em ng/ml foi calculada conhecendo-se o PM do HgCl<sub>2</sub>:

PM= 271,5g - 1L - 1M	0,000000271mg - 1 ml - 1nM
	x - - - - - 20nM
271,5mg - 1ml - 1M	x = 5,43ng/ml

Logo:

5,43ng - 1ml

dose a administrar = 240ml x 5,43ng/ml

dose = 1303,2 ng (massa para injetar para obter 20nM em 240 ml de volume)- 1ª DOSE

dose/kg= 4,6 µg/Kg

Supondo que na primeira injeção temos 20nM no rato e a meia-vida do HgCl<sub>2</sub> é de 37 dias. Em 37 dias se elimina a metade da dose (1303,2 ng), ou seja, 651,6ng

37 dias - 651,6 ng

1 dia - x

x = 17,61 ng massa das doses subsequentes

Todos os dias subsequentes foi injetado somente o que se eliminaria. As doses foram ajustadas ao peso do animal.

Ex: 0,1 ml para 300 g

X ----- 400 g

X= 0,13 ml (quantidade a ser injetada em um rato de 400 g)

Figura 1: Descrição do protocolo de diluição do mercúrio para a obtenção das doses de ataque e manutenção, utilizadas nos tratamentos com duração de 15 e 30 dias (Retirado de Wiggers, 2008).

## 4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) normotensos foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). O protocolo metodológico utilizado neste estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de

Animais (CEUA), da UFES, e teve certificado de aprovação emitido sob o número 052/2012.

Esse protocolo incluiu o tratamento crônico com injeção intramuscular (i.m.) de cloreto de mercúrio para obtenção da concentração plasmática final aproximada de 30 nM, leitura da frequência cardíaca (FC) e aferição da pressão arterial (PA) por meio do transdutor de força e, coleta de medula óssea após o sacrifício dos animais.

#### 4.3 TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Durante os experimentos foram utilizados 36 animais, que permaneceram acondicionados em gaiolas devidamente identificadas. A aclimatação ocorreu no biotério do Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular da Universidade Federal do Espírito Santo, respeitando o período mínimo de 72 horas, conforme diretrizes estabelecidas pela Boston University (2009). No local, a temperatura foi controlada e períodos claro/escuro intercalados a cada 12 horas. Água e ração padrão (Presence da Purina®) foram oferecidas para livre consumo. Durante todo o tratamento, as injeções e troca da palha foram realizadas pelas mesmas pessoas, sempre no período da manhã, de forma a minimizar o estresse decorrente da manipulação.

Grupos de seis animais foram formados e a cada um deles foi atribuído um número de 1 a 6, que foi marcado em sua cauda com caneta de tinta permanente. Após a marcação, houve randomização por sorteio, e cada grupo foi subdividido de forma a conter dois indivíduos Controle Positivo (CT+), dois Controle Negativo (CT-) e dois Tratamento com Mercúrio (Hg).

Os animais foram distribuídos em 6 grupos e receberam tratamento crônico com durações de 15 ou 30 dias. Os indivíduos dos grupos foram tratados com injeções i.m. de cloreto de mercúrio (No Grupo Hg), Solução Salina de Cloreto de Sódio 0,9% (No Grupo CT -) ou Salina + Cisplatina (No Grupo CT +).



Na primeira dose, para os animais dos grupos Hg foi utilizada uma solução com concentração maior de mercúrio para elevar imediatamente à concentração desejada do metal no plasma. A partir do segundo dia de tratamento foi utilizada a dose de manutenção, que repõe as perdas do mercúrio e mantém a concentração plasmática próxima a 30 nM.

Para evitar a precipitação do metal e neutralizar possíveis efeitos inflamatórios, houve alternância das injeções nas patas traseiras, a cada cinco dias consecutivos de aplicação, como mostra o esquema descrito na tabela 1. Para a correção das doses, os animais foram pesados a cada cinco dias e a dose recalculada com o valor médio dos pesos dos seis animais do grupo.

Para os animais CT+ o tratamento foi idêntico ao dos CT- até as 24 horas que antecederam o sacrifício, ou seja, nos dias 14 ou 29 dos tratamentos de 15 ou 30 dias, respectivamente. Nesses dias, foi aplicada a cisplatina na concentração de 10 mg/kg.

Tabela 1 – Sequência da aplicação das injeções de HgCl<sub>2</sub> nas patas traseiras dos animais do grupo Hg.

<b>PREFERÊNCIAS PARA INJEÇÃO - TRATAMENTO DE 15 DIAS</b>						
<b>Revezamento de Injeção</b>	<b>Dias 1- 5</b>	<b>Dias 6-10</b>	<b>Dias 11-15</b>	<b>Dias 16-20</b>	<b>Dias 21-25</b>	<b>Dias 25-30</b>
<b>Pata Traseira Direita</b>	SIM	NÃO	SIM	<b>TRATAMENTO DE 15 DIAS</b>		
<b>Pata Traseira Esquerda</b>	NÃO	SIM	NÃO			
<b>PREFERÊNCIAS PARA INJEÇÃO - TRATAMENTO DE 30 DIAS</b>						
<b>Revezamento de Injeção</b>	<b>Dias 1- 5</b>	<b>Dias 6-10</b>	<b>Dias 11-15</b>	<b>Dias 16-20</b>	<b>Dias 21-25</b>	<b>Dias 25-30</b>
<b>Pata Traseira Direita</b>	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO
<b>Pata Traseira Esquerda</b>	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM

#### 4.4 HEMODINÂMICA

Os animais foram pesados para o cálculo da dose individual do anestésico. Cada animal recebeu injeção de Uretana (1,2 mg/kg/i.p.) e os reflexos foram testados a fim de evitar qualquer sofrimento durante o procedimento cirúrgico. Somente após a certificação da ausência de reflexos teve início a cirurgia.

Na altura da traqueia foi realizada a tricotomia no local indicado pela figura 2A. Em seguida foi feita uma incisão com auxílio de tesoura e pinça para expor a musculatura e os vasos adjacentes. A artéria carótida foi localizada e dissecada (Figura 2B). Nela foi realizada uma pequena incisão para a introdução e passagem da cânula (PE-50/ Clay Adams) preenchida com solução de heparina 50 U/mL. À cânula foi conectado o transdutor de força (TSD 104A- Biopac) que registrou os valores da pressão arterial sistólica, diastólica, média e da frequência cardíaca.

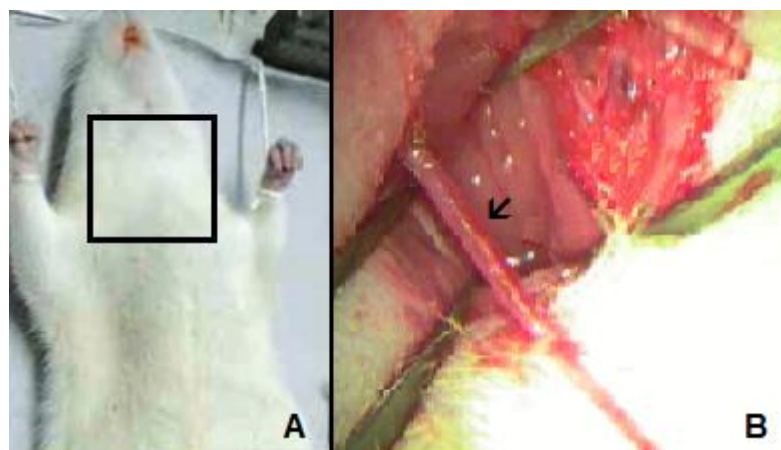


Figura 2: Localização e dissecção das estruturas durante a canulação da artéria carótida. Em A o quadrado evidencia o local onde ocorre a tricotomia e a incisão para exposição da musculatura (Modificada de Khajuria et al., 2012); Em B a seta aponta para a artéria carótida, na qual é introduzida a cânula (Foto: Gilson Brás).

O tempo mínimo de vinte minutos foi aguardado para a estabilização das leituras no sistema (MP 30 Biopac Systems, Inc; CA). Após a coleta dos registros, a cânula era desconectada do sistema e retirada do vaso.

#### 4.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA CITOGENÉTICA

Imediatamente após o término das leituras hemodinâmicas, os animais foram conduzidos ao Laboratório de Genética Animal da UFES, onde teve início o protocolo para obtenção da suspensão celular de medula óssea.

Adaptado do protocolo de Guerra & Souza (2002), para cada 200 g de peso corporal, 1 mL de solução de colchicina 0,1% foi injetado por via subcutânea na coxa direita de cada animal. O período de incubação foi de 25 minutos. Em seguida, o animal foi sacrificado por exsanguinação e o fêmur direito retirado para obtenção da suspensão celular.

Para retirada do fêmur, foi feita uma incisão na altura do joelho do animal, com desligamento dos tendões e desarticulação do osso. No primeiro momento, foi preservada a cartilagem que cobria a epífise. A extremidade superior do fêmur, que estava articulada à bacia, foi deslocada e, com o auxílio de tesoura, desarticulada. A epífise foi cortada, deixando livre a medula do osso para a passagem da solução hipotônica de KCl 0,075M, utilizada durante a lavagem. A cartilagem anteriormente preservada foi removida e uma agulha 23 G inserida para conduzir 7 mL de solução hipotônica. A lavagem e homogeneização da suspensão celular da medula ocorreram em placa de Petri. O material resultante foi aspirado, transferido para um tubo tipo falcon de 14 mL e disposto em banho-maria à temperatura de 37°C, onde permaneceu por 40 minutos.

Para a fixação do material foi preparada, 30 minutos antes do uso, a solução fixadora contendo Metanol P.A. e Ácido Acético P.A. na proporção de 3:1. A solução foi armazenada a -20°C, em recipiente com tampa para evitar a evaporação.

Após banho-maria, a suspensão celular foi pré-fixada por cinco minutos com seis gotas de solução fixadora gelada. Em seguida foi fixada com 3 mL de solução fixadora gelada. Nas duas etapas acima descritas, o conteúdo do tubo foi lentamente homogeneizado.

Após centrifugação por 7 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante de todas as amostras foi descartado. A ressuspensão do material foi realizada com 7 mL de solução fixadora gelada, seguida de centrifugação a 1000 rpm por 7 min e descarte do sobrenadante. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes. O material resultante foi diluído e homogeneizado em aproximadamente 2 mL de solução fixadora gelada - o volume varia de acordo com a quantidade de material obtido após as centrifugações - e duas gotas foram pingadas em cada lâmina. Para cada animal foram pingadas cinco lâminas que secaram ao ar por, no mínimo, 24 horas.

Após a secagem, todas as lâminas passaram pelo processo de hidrólise, sendo imersas em solução de Ácido Clorídrico (HCl) 1 N, a 60 °C por 7 minutos e, em seguida, lavadas com água destilada e secadas ao ar. As lâminas foram coradas com Giemsa (MERK) e solução A+B (NaCl e KCl) na proporção de 1:30, durante 5 minutos e novamente lavadas com água destilada e deixadas para secar ao ar.

#### 4.6 ANÁLISE CITOGENÉTICA PARA AVALIAÇÃO DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Para cada animal foram analisadas, às cegas, 100 metáfases em fotomicroscópio óptico Nikon Eclipse 40i. Para as análises das aberrações cromossômicas foram consideradas metáfases bem espalhadas com grau de condensação suficiente para possibilitar a observação da morfologia dos cromossomos.

Todas as metáfases que possuíam o mínimo de um cromossomo com anomalia foram consideradas metáfases aberrantes, conforme demonstrado na figura 3.

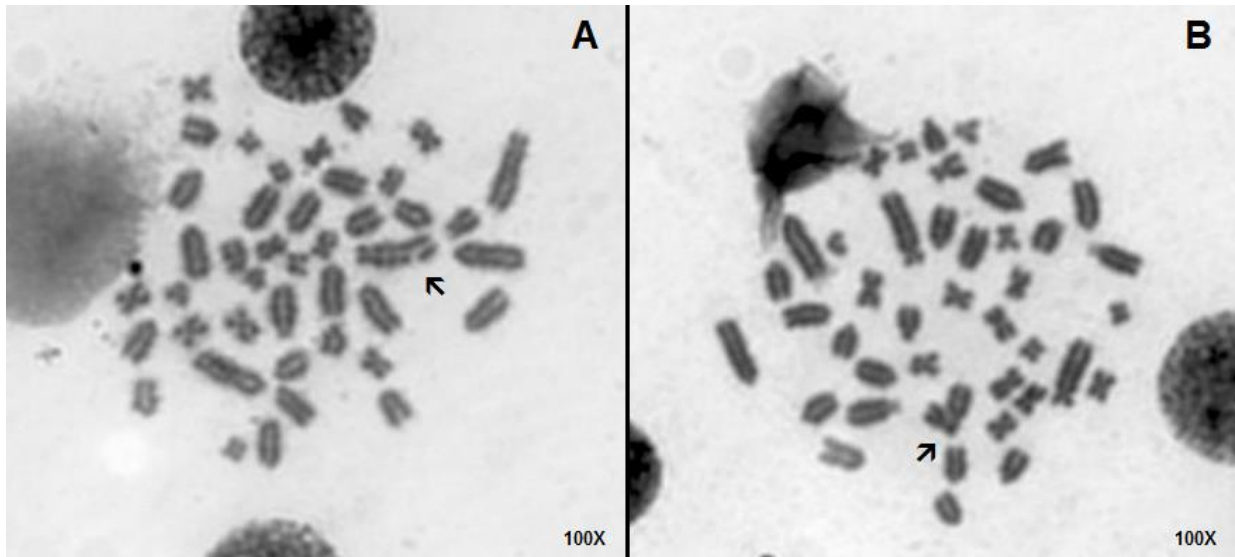


Figura 3: Registros de duas metáfases com apenas uma aberração cada uma. Em A é possível visualizar, indicada pela seta, uma quebra; Em B a seta aponta para uma aberração do tipo gap. Observação em fotomicroscópio óptico (objetiva de 100X).

O registro das imagens foi obtido por meio do software GraphPad 2.0 (Applied Spectral Imaging, Software, USA).

Uma única pessoa realizou as análises de todas as lâminas, e foram registradas apenas as aberrações evidentes, como quebras, cromossomos em anel, *gaps* (erros) e desestruturação da metáfase (pulverizações).

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foram aplicados o teste não paramétrico de Mann-Whitney, e o teste paramétrico t de Student, conforme descrito na tabela a seguir (Tabela 2). O software utilizado foi Prisma 5.01 (GraphPad, Software, USA), sendo os resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média, e considerados significantes ao nível de 5%.

Tabela 2: Descrição dos tipos de testes estatísticos e suas respectivas aplicações nos dados do estudo.

<b>Teste</b>	<b>Variável</b>	<b>Dado</b>	<b>Comparação</b>
t de Student	Pressão Arterial; Pressão Sistólica; Pressão Diastólica; Frequência Cardíaca.	Média	Grupo Controle Negativo X Grupo Mercúrio
Mann-Whitney	Aberrações Cromossômicas	Frequência Absoluta	Grupo Controle Positivo X Grupo Controle Positivo e Grupo Controle Negativo X Grupo Mercúrio
	Tipos de Aberrações Cromossômicas	Quantidade de Cromossomos afetados por Tipo de Aberração	

Foram calculados a média e o desvio padrão dos valores de cada um dos grupos. Quando presentes, os valores aberrantes (*outliers*) foram excluídos e substituídos pelos valores médios de seus respectivos grupos.

As comparações ocorreram entre os dados dos grupos CT- e CT+. Após a validação, os dados de CT- foram comparados aos dados do grupo Hg a fim de obter as informações sobre a significância estatística.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 PESO E IDADE

A diferença de idade observada entre os indivíduos de um mesmo grupo não foi superior a três dias, sendo a idade média observada ao final dos tratamentos foi de 114 dias. Para os animais de todos os grupos, o peso médio observado ao final do tratamento foi de 257 g. Um resumo dos valores de pesos médios é demonstrado na tabela 3. Foi aplicado o teste t para simples conferência e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os pesos dos grupos tratados por 15 dias e 30 dias.

Tabela 3 – Pesos médios dos seis animais de cada um dos grupos ao final dos tratamentos de 15 e 30 dias.

15 dias						
Grupo	Peso Inicial	Média	±EPM	Peso Final	Média	±EPM
G1	246	243	1,2	254	255	4,8
G3	247			266		
G4	236			245		
30 dias						
Grupo	Peso Inicial	Média	±EPM	Peso Final	Média	±EPM
G2	235	245	3,4	273	258	3,5
G5	245			250		
G6	233			251		

## 5.2 HEMODINÂMICA

Abaixo seguem dispostos na figura 5 os dados obtidos após processamento dos registros hemodinâmicos, representados por suas médias. Na Pressão Arterial Sistólica (PAS) não houve diferença significativa quando comparado o grupo controle com o grupo mercúrio (Figura 4A). Da mesma forma, os dados da Pressão Arterial Diastólica (PAD) também não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados os dois grupos (Figura 4B). Na Figura 4C está disposto o resultado da Pressão Arterial Média (PAM), o qual não foi significativo do ponto de vista estatístico. A comparação entre os dados de Frequência Cardíaca (FC) também retornaram valor de  $p > 0,05$ , como pode ser observado na figura 5D.

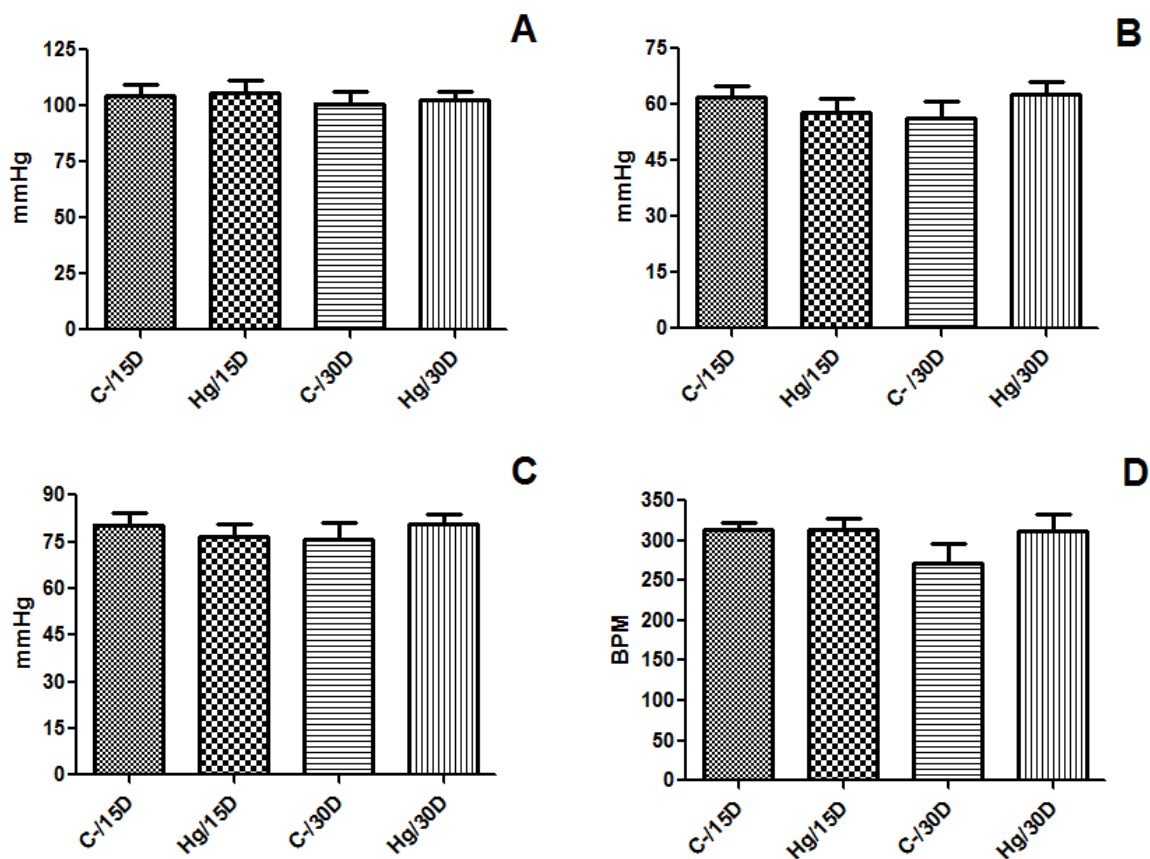


Figura 4: Gráfico comparativo entre os dados hemodinâmicos dos grupos controle e tratamento com mercúrio (teste t de Student,  $n = 6$  para cada grupo). Em A, B, C e D, respectivamente, comparação das médias da PAS, PAD, PAM e FC; C-/ 15D – Animais controle do tratamento de 15 dias; Hg/ 15D – Animais mercúrio do tratamento de 15 dias; C-/ 30D – Animais controle do tratamento de 30 dias; Hg/ 30D – Animais mercúrio do tratamento de 30 dias. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.

### 5.3 GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE

Durante as análises das lâminas, foram encontrados quatro tipos de aberrações cromossômicas, as quebras, os gaps, os cromossomos em anel e as pulverizações, as quais estão exemplificadas na figura 5. Para cada tratamento, abaixo serão descritos os resultados obtidos referentes ao tipo de aberração contabilizada.

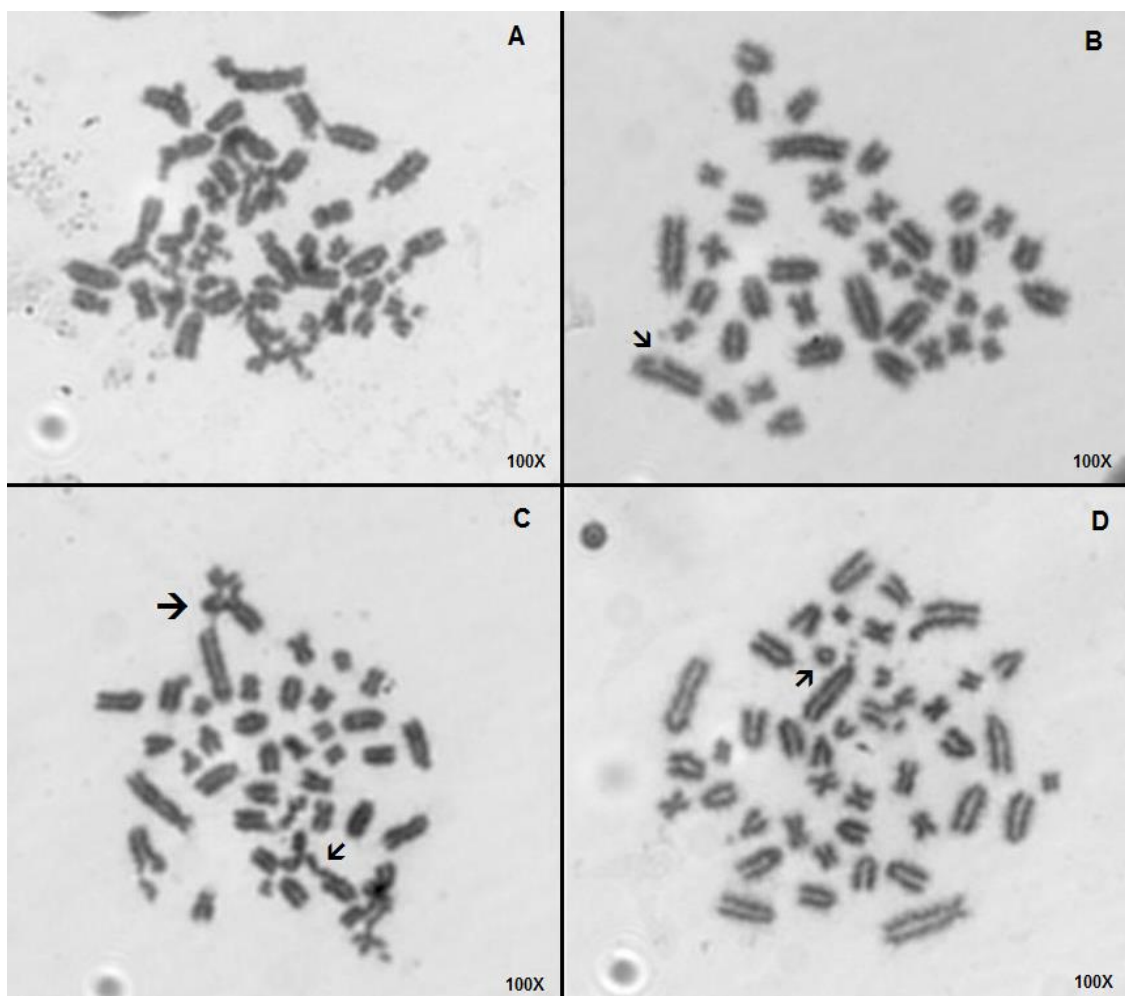


Figura 5: Imagens de todas as aberrações cromossômicas registradas durante observação sob microscopia óptica (objetiva de 100X). Em A o evento de pulverização, caracterizado pela ocorrência de eventos aberrantes em quase todos os cromossomos de uma única metáfase; Em B a seta indica uma quebra em um dos braços do cromossomo; Em C a seta maior indica um gap que associou três cromossomos, enquanto a seta menor indica outra aberração do tipo gap; Em D a seta aponta para um cromossomo em anel.

## 5.4 ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

### 5.4.1 Tratamento por 15 Dias

#### 5.4.1.1 Frequência absoluta de aberrações cromossômicas

Os dados foram validados através da comparação entre o controle positivo, tratado com cisplatina, e o controle negativo, tratado com solução salina de NaCl 0,9% ( $p < 0,05$ ).

Quando comparados os números de metáfases com aberrações dos grupos controle negativo e mercúrio, as diferenças foram significativas, como pode ser observado na figura 6.

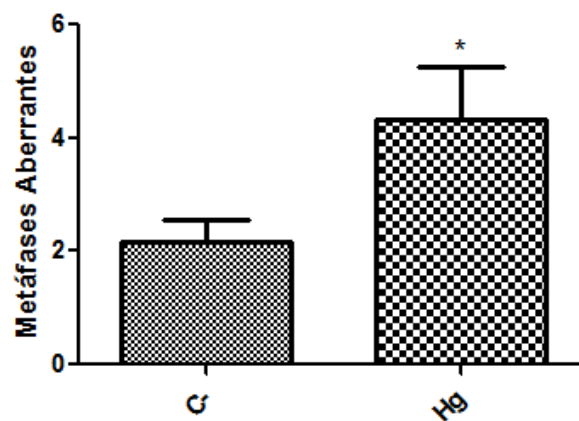


Figura 6: Teste de Mann-Whitney para comparação entre o número de Metáfases Aberrantes do grupo controle ( $n = 6$ ) e do grupo tratado pelo período de 15 dias ( $n = 6$ ). Cada barra representa a média do número de Metáfases Aberrantes do grupo Controle Negativo (C-) e do grupo Tratamento com Mercúrio (Hg); \* $p < 0,05$ .

### 5.4.1.2 Quebras

Um dos tipos de aberrações cromossômicas encontrados nas amostras foi a quebra. Foram contabilizadas as metáfases além da quantidade de cromossomos que continham esse tipo de aberração e o resultado foi plotado na figura 7.

Quando comparados os dados dos grupos controle negativo e tratamento por 15 dias com mercúrio, a diferença encontrada não foi significativa tanto para o número total de quebras encontradas nas metáfases com aberrações cromossômicas ( $p > 0,05$ ), quanto para o número de cromossomos com quebra, contabilizados no total de metáfases anômalas ( $p > 0,05$ ).

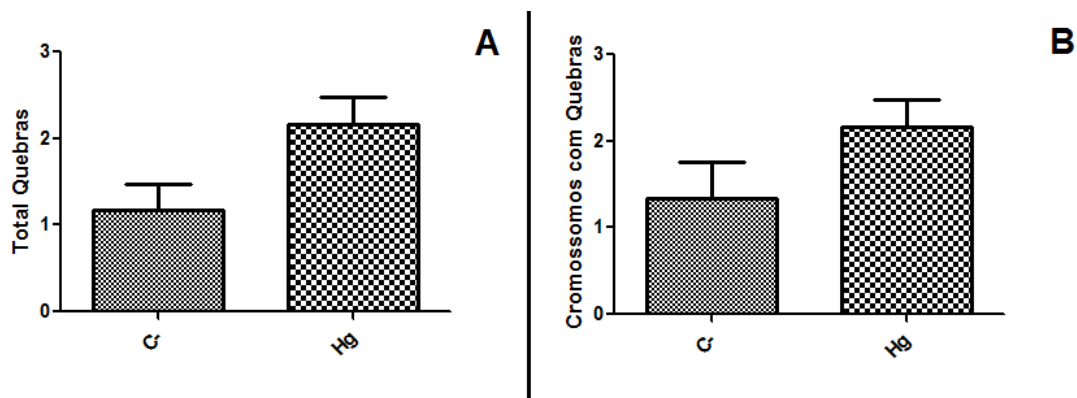


Figura 7: Gráfico comparativo entre as médias dos grupos controle negativo (C-) e tratamento com mercúrio por 15 dias (Hg). A figura A mostra os resultados do teste de Mann-Whitney para a comparação entre as médias dos totais de metáfases que apresentam quebra ( $p > 0,05$ ). Em B a representação das médias do número de cromossomos com quebras para cada um dos grupos ( $p > 0,05$ ). Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão da média.

### 5.4.1.3 Gaps

Na figura 8 estão dispostos os resultados da comparação entre os grupos controle negativo e tratamento com mercúrio. O número Total de *Gaps*, representado pela figura 8A apresenta diferença significativa. Por outro lado, quando comparados os números de cromossomos afetados pela anomalia do tipo *Gap*, o p-valor foi não significativo (figura 8B), embora com valor limítrofe.

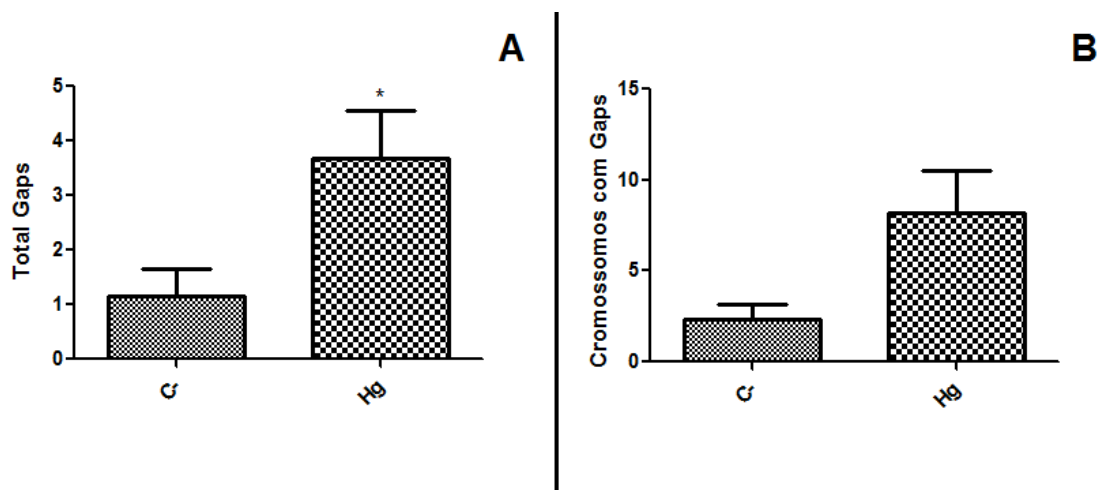


Figura 8: Os gráficos mostram a comparação entre as médias dos dados da anomalia do tipo *Gap* para os grupos controle negativo (C-) e tratamento com mercúrio por 15 dias (Hg), obtidos por meio do teste de Mann-Whitney. Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão da média. Em A, foram comparadas as médias dos totais de metáfases que apresentam esse tipo de anomalia (\*  $p < 0,05$ ). De forma similar, B representa as médias dos totais de cromossomos com *Gap* ( $p = 0,05$ ).

## 5.4.2 Tratamento por 30 Dias

### 5.4.2.1 Frequência absoluta de aberrações cromossômicas

O experimento foi validado por meio da comparação entre os dados dos grupos controle positivo e negativo, e os resultados foram significantes.

Como pode ser observado na figura 9 a comparação entre os grupos controle negativo e tratamento por 30 dias com mercúrio retornou com valor de  $p < 0,05$ , sendo considerada uma diferença perceptível do ponto de vista estatístico.

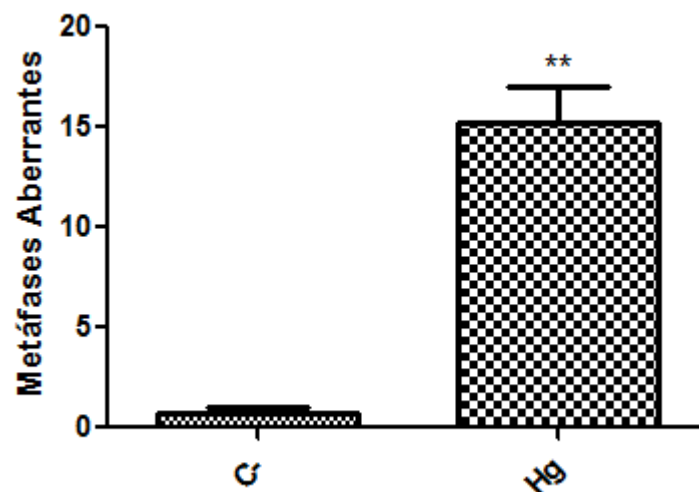


Figura 9: Comparação entre o número de Metáfases Aberrantes do grupo controle e do grupo tratado pelo período de 30 dias. Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão da média das Metáfases Aberrantes dos grupos Controle Negativo (C-) e Tratamento com Mercúrio (Hg); Teste de Mann-Whitney  $**p < 0,05$ , com  $n = 6$ .

### 5.4.2.2 Quebras

Para o tratamento de 30 dias, também foram encontradas aberrações do tipo quebra. Na figura 10 estão dispostos os resultados provenientes da contabilização do número de metáfases e do número de cromossomos que continham este tipo de aberração.

Para o número total de metáfases que apresentaram aberração do tipo quebra, quando comparados os dados dos grupos controle negativo e tratamento por 30 dias com mercúrio, a diferença encontrada foi significativa (Figura 10A). Da mesma forma a comparação com o número de cromossomos que apresentaram quebras retornou valor de  $p < 0,05$  (Figura 10B).

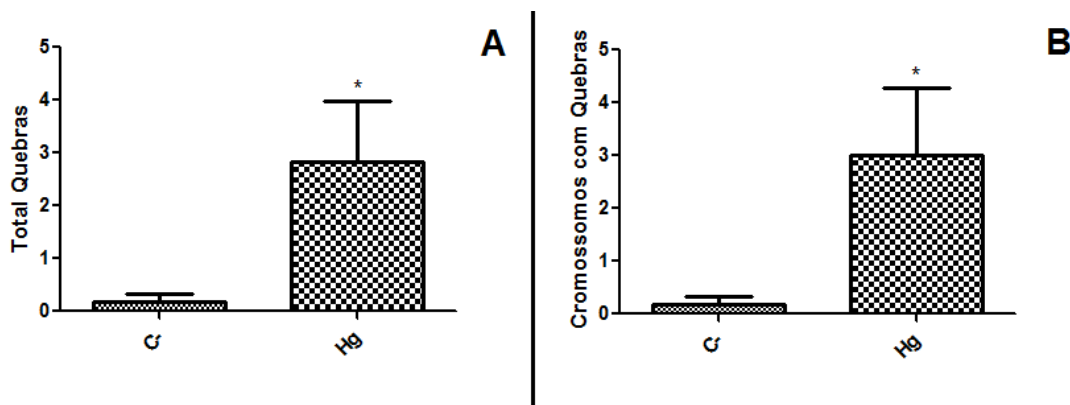


Figura 10: O gráfico apresenta a comparação entre as médias dos grupos controle negativo (C-) e tratamento com mercúrio por 30 dias (Hg). Em A cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão da média dos totais de metáfases que apresentam quebra ( $*p < 0,05$ ), enquanto em B representam os números de cromossomos com quebras para cada um dos grupos ( $*p < 0,05$ ).



### 5.4.2.3 Gaps

Os resultados da comparação entre os grupos controle negativo e tratamento com mercúrio estão dispostos na figura 11. O número total de metáfases com *Gaps* está representado pelos valores médios na figura 11A, e apresenta diferença significativa. Da mesma forma, quando comparados os números de cromossomos afetados pela anomalia do tipo *Gap*, foi observada que a diferença foi significativa (Figura 11B).

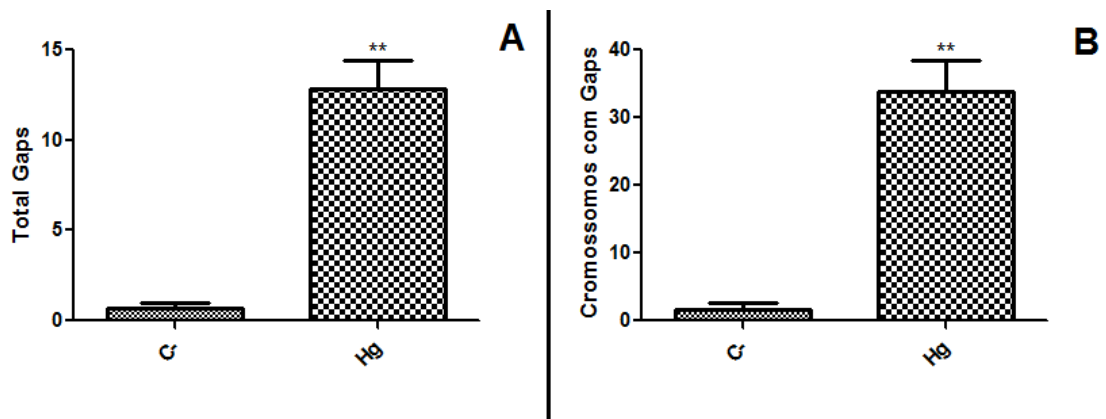


Figura 11: Representação gráfica da comparação entre as médias dos dados da anomalia do tipo *Gap* para os grupos controle negativo (C-) e tratamento com mercúrio por 30 dias (Hg). Em A cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão da média dos totais de metáfases que apresentam esse tipo de anomalia (\*\*p < 0,05). Da mesma forma, B representa as médias dos totais de cromossomos com *Gap* (\*\*p < 0,05).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 PESO E IDADE

Quanto ao peso e à idade não foi encontrada diferença significativa entre os valores das médias dos grupos testados ( $p > 0,05$ ). É importante destacar neste ponto, que todos os animais utilizados nos experimentos compõem um grupo homogêneo no que diz respeito ao peso. Como não foi encontrada diferença estatisticamente perceptível entre as médias dos pesos, é possível inferir que o método de seleção e randomização dos grupos foi eficiente para evitar vieses advindos de variações na massa corpórea dos animais.

A idade também é um fator cuja variação tem influência em experimentos que avaliem citotoxicidade e mutagenicidade. A literatura indica a idade como um fator que predispõe ao aumento da frequência de erros provocados pela fragilização do sistema de reparo (Bendtsen et al., 2012). Por esse motivo, o uso de animais jovens foi cuidadosamente determinado desde o desenho experimental. Os animais utilizados em cada grupo randomizado possuíam a mesma idade e os grupos dos tratamentos (CT+; CT- e Hg) apresentaram variação máxima de cinco dias entre si.

Uma vez que o modelo experimental em que cada grupo contendo dois animais CT+, dois animais CT- e dois animais Hg seguiu as diretrizes descritas por Ribeiro (2003), infere-se que a variável idade não influenciou nos demais resultados obtidos.

### 6.2 HEMODINÂMICA

A ausência de alteração dos parâmetros hemodinâmicos foi considerada um produto esperado, sendo já documentada pela literatura a influência do mercúrio na reatividade vascular sem alteração na pressão arterial. (Wiggers, 2008; Furieri et al., 2010; Lemos et al., 2012).

Devido à ausência de estudos com fêmeas, os dados aqui apresentados não se tratam de uma repetição, mas sim da certificação de que não há influência do gênero nas medidas hemodinâmicas.

### 6.3 GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE

#### 6.3.1 Frequência Absoluta de Aberrações Cromossômicas

Mesmo em baixas concentrações o mercúrio é capaz de promover alterações morfológicas nos cromossomos das células da medula óssea de ratos. As alterações presentes nas metáfases dos animais tratados durante 15 e 30 dias foram as quebras e os *gaps*, as quais foram mais profundamente analisadas e discutidas.

Devido ao baixo suporte estatístico observado para a Frequência Absoluta de Aberrações Cromossômicas, fica evidente apenas que há tendência das células metafásicas sofrerem com o efeito genotóxico do mercúrio nos primeiros 15 dias de tratamento.

Por outro lado, os dados de 30 dias apresentam permitem afirmar que o mercúrio apresenta efeito genotóxico no modelo de exposição crônica utilizado.

#### 6.3.2 Quebras

De forma mais evidente é possível verificar que o baixo suporte estatístico observado nos resultados de 15 dias para a frequência absoluta de aberrações cromossômicas é suportado pelos dados das aberrações do tipo quebra, encontradas nos animais expostos ao mercúrio.

A ausência de suporte estatístico, tanto para os dados do Total de Quebras quanto para os do Número de Cromossomos com Quebras, também evidencia a tendência à genotoxicidade que as amostras do grupo tratado por 15 dias apresentam.

De modo a corroborar com os resultados da frequência absoluta de aberrações cromossômicas, o fato de os dados do total de quebras obtidos das amostras dos animais tratados por 30 dias apresentarem suporte estatístico reforça a constatação da genotoxicidade provocada pelo mercúrio, nas células de medula óssea dos grupos expostos por 30 dias.

Da mesma forma, ressaltando a argumentação anteriormente descrita, quando considerados os números de Cromossomos com Quebras dos grupos 15 e 30 dias, os valores de  $p$  encontrados permitem inferir que a genotoxicidade do mercúrio manifesta-se apenas nas amostras dos grupos tratados por 30 dias, ou seja, é tempo dependente.

### 6.3.3 Gaps

Para as aberrações do tipo *gap*, os dados apresentam a mesma tendência que os da frequência absoluta de aberrações cromossômicas, do total de quebras e dos cromossomos com quebras. De modo geral, dados do tratamento com duração de 15 dias retornam valores de  $p$  com pouco ou nenhum suporte estatístico o que não permite afirmar sobre a existência de genotoxicidade. Enquanto no tratamento de 30 dias, a estatística permite afirmar com clareza que o mercúrio promove efeito genotóxico.

No caso do Total de *Gaps* encontrados em animais tratados por 15 dias, houve diferença perceptível do ponto de vista estatístico, mas é importante destacar que esta diferença possui baixo suporte estatístico, colocando em dúvida a precisão de qualquer afirmação feita a respeito deste dado. Em contrapartida, a significância estatística apresentada pelos dados dos animais tratados por 30 dias reforça a ocorrência de genotoxicidade.

Quanto aos resultados do número de Cromossomos com Gap, para os animais tratados por 15 dias, não há significância estatística. Entretanto, da mesma forma como nos dados anteriores é possível notar a tendência para a ocorrência de citotoxicidade. Já nos resultados de 30 dias, é possível notar não somente a tendência, mas afirmar com segurança que ocorre genotoxicidade.

Este estudo é a primeira documentação sobre a avaliação da genotoxicidade do modelo crônico de intoxicação por mercúrio proposto por Wiggers et al (2008). Após a análise dos dados como conjunto, o que fica evidente é a existência de uma janela entre o 15º e o 30º dia de tratamento em que alterações provocadas pela constante exposição ao metal levam ao aumento das lesões provocadas no DNA.

A via de produção da desoxitimidina monofosfato (dTMP), por exemplo, sofre influência direta do  $Hg^{2+}$ , como mostra o esquema a seguir (Figura 12). O metal se liga irreversivelmente ao sítio ativo da dUTPase (enzima conversora da desoxiuridina trifosfato - dUTP em desoxiuridina monofosfato - dUMP ), provocando retenção na via e desbalanço da razão dUTP/dTMP (Williams et al., 1987). Com o aumento da concentração de dUTP, a incorporação uracila ao DNA é favorecida, em detrimento à de timina. Esse erro ativa o sistema de reparo por excisão de base promovido pela Uracil-DNA glicosilase, a qual retira cada uracila para que seja substituída (Nelson & Cox, 2004). Com a presença constante do mercúrio, a via permanece congestionada e a concentração de dTMP é insuficiente para preencher todas as lacunas geradas pelo sistema de reparo. Mesmo com ação de proteínas estabilizadoras como as SSBs, o DNA fica suscetível à ocorrência de quebras em fita simples, ou dupla a qual é uma possível explicação para o aumento na frequência de aberrações cromossômicas observada nos indivíduos tratados com mercúrio.

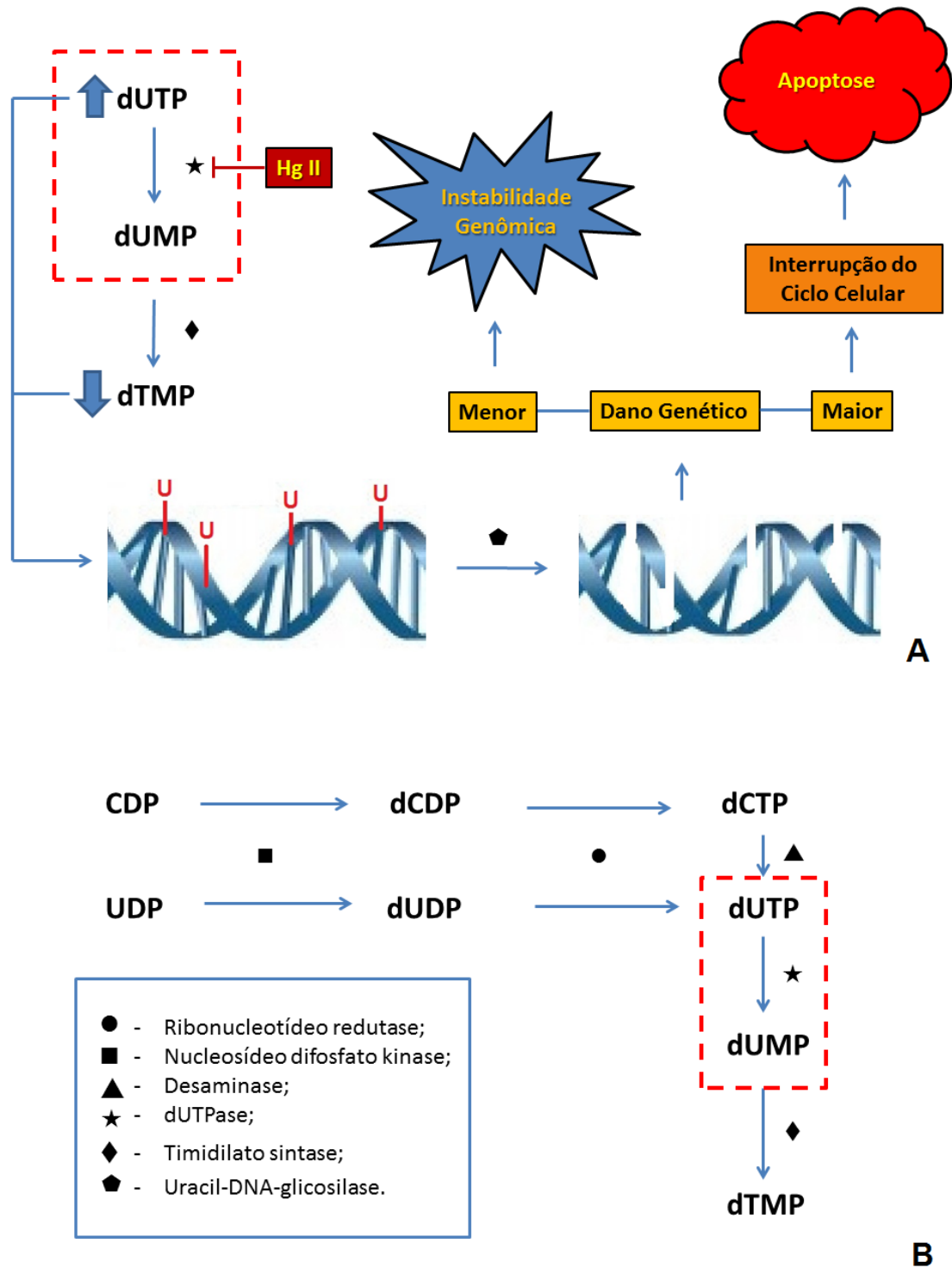


Figura 12 – Figura esquemática da ação do mercúrio sobre via metabólica da formação de desoxitimina monofosfato. Em A observa-se o efeito sobre o DNA quando o Hg se liga ao sítio ativo da enzima dUTPase. A incorporação incorreta de uracila às fitas de DNA está representada pela letra 'U' em vermelho. A partir da excisão das uracilas o DNA fragilizado segue por um, de dois caminhos diferentes, dependendo da magnitude do dano sofrido. Em B a via normal está representada de forma simplificada, e com destaque para a área pontilhada que sinaliza o local onde o metal se liga.

A forma mercúrica também se liga a dois resíduos de timina formando pontes cruzadas (Rossman, 1981), as quais prejudicam os processos de replicação e transcrição do DNA. Além disso, causam alterações cromossômicas consistentes com quebra na fita, e se acumuladas, podem levar a célula à morte (Noll et al., 2006).

Outra via que merece destaque é a da Glutathione. Uma vez que o mercúrio apresenta grande afinidade por grupos sulfidríla, a glutathione atua como carreador do metal, diminuindo a toxicidade intracelular (Miura & Clarkson, 1993). É também a maior fonte de proteção antioxidativa em eritrócitos humanos, e, embora não tenha sido medida a sua concentração plasmática, a literatura descreve que em presença de mercúrio a glutathione tem a concentração de sua forma reduzida (GSH) diminuída, enquanto a forma oxidada (GSSG) tem sua concentração aumentada (Lee et al., 2002).

Apesar de, em concentrações moderadas, a presença de um agente estressor/xenobiótico estimular o aumento na capacidade dos sistemas antioxidantes celulares (Kromidas et al., 1990; Chen et al., 2005), há um momento em que a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) supera o limite e o sistema biológico não mais consegue proteger a célula da ocorrência de danos.

É possível que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, associado à diminuição e até mesmo inativação da defesa desempenhada por antioxidantes como a glutathione, (Houston, 2011; Vassallo et al., 2011) também seja uma das justificativas para a elevação da frequência de aberrações cromossômicas.

## 7 CONCLUSÃO

Inúmeras vias metabólicas são afetadas em organismos expostos de forma crônica à intoxicação por mercúrio, dentre elas estão as vias relacionadas à manutenção da integridade do DNA. Como observado nos resultados, esse metal provoca o aumento na ocorrência de aberrações cromossômicas de dois tipos, quebra e gap, em células de medula óssea dos animais. Portanto, é possível sugerir que o Hg tem sua atividade clastogênica elevada a níveis estatisticamente perceptíveis após 30 dias de exposição.

Da mesma forma, conclui-se que a elevação na atividade genotóxica e potencialmente mutagênica do mercúrio reflete-se no aumento da ocorrência de gaps e quebras nos cromossomos das células de animais tratados por 30 dias.

O estudo demonstra ainda que aparentemente o 15<sup>o</sup> dia de tratamento é um limiar a partir do qual as vias de reparo e proteção antioxidante ao DNA têm sua eficiência reduzida. Essa redução pode ser visualizada, do ponto de vista estatístico, por meio da elevação nos números de aberrações cromossômicas.

Por fim, vale ressaltar que embora na literatura seja difundido o conhecimento sobre o potencial clastogênico, genotóxico e mutagênico de mercúrio, o presente estudo traz dados sobre esses efeitos em um tratamento crônico com elevação progressiva na concentração plasmática do metal. Como esse tratamento se assemelha ao modelo de exposição humana, a intenção é agregar os dados aqui descritos aos já existentes, no sentido de melhor compreender os mecanismos da toxicidade desse metal.



## 8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Para a execução do estudo houve limitação no fornecimento de animais pelo biotério, devido à execução de obras no prédio do Biotério Central da UFES, o que demandou alterações no projeto originalmente proposto.

Outra limitação foi a possibilidade de concluir de forma clara sobre o potencial mutagênico do mercúrio, uma vez que os dados apresentados foram gerados com base em análises realizadas apenas em células somáticas. A avaliação do efeito desse modelo crônico de exposição ao metal sobre as células germinativas seria ideal, já que o conceito de mutagenicidade inclui a probabilidade de transmissão das mutações para as gerações seguintes. Contudo, seria necessária a aplicação de outra metodologia, a qual, lamentavelmente, não se encaixava no cronograma de execução.

Apesar do volume de dados gerado ao longo da execução desse estudo, a demanda de informações sobre os efeitos genotóxicos do tratamento crônico com mercúrio em células germinativas abre possibilidades, tornando-se uma das perspectivas para projetos futuros.

## 9 REFERÊNCIAS

AMORIM, M. I. M.; MERGLER, D.; BAHIA, M. O.; DUBEAU H.; MIRANDA, D.; LEBEL, JEAN; BURBANO, R. R.; LUCOTTE, M. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Dez. v.72, n. 4, p. 497-507, 2000.

ANDREASSI, M. G. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. **Mutation Research**. v. 543, 67–86, 2003.

BAILEY, S.M.; BEDFORD, J.S. Studies on chromosome aberration induction: What can they tell us about DNA repair? **DNA Repair**. v. 5, p.1171–1181, 2006.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. En: Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**. Campinas. v. 23, n.4, p. 629-643, 2010.

BENDTSEN, K. M.; JUUL, J.; TRUSINA, A. Fragile DNA Repair Mechanism Reduces Ageing in Multicellular Model. **PLoS ONE**. May., v. 7, n. 5, e36018.

BETTI, C.; DAVINI, T.; BARALE, R. Genotoxic activity of methyl mercury chloride and dimethyl mercury in human lymphocytes. **Mutation Research**. v. 281, p. 255-260, 1992.

BOSTON UNIVERSITY: **Acclimation of Rodents**. BU IACUC. Jun., 2009. Disponível em: <<http://www.bu.edu/orcccommittees/iacuc/policies-and-guidelines/acclimation-of-rodents/>>. Acesso em: 01 Ago. 2014.

CHEN, C.; QU, L.; LI, B.; LI, X.; JIA, G.; WANG, T.; GAO, Y.; ZHANG, P.; LI, M.; CHEN, W.; CHAI, Z. Increased Oxidative DNA Damage, as Assessed by Urinary 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Concentrations, and Serum Redox Status in Persons Exposed to Mercury. **Clinical Chemistry**. v. 5, n.14, p. 759 –767, 2005.

DE HAAN, R. D.; KIPP, B. R.; SMYRK T. C.; ABRAHAM S. C.; ROBERTS L. R.; HALLING K. C. An assessment of chromosomal alterations detected by fluorescence in situ hybridization and p16 expression in sporadic and primary sclerosing cholangitis-associated cholangiocarcinomas. **Human Pathology**. v. 38, p. 491 – 499, 2007.

DURANTE, M.; BEDFORD, J.S.; CHEN, D.J.; CONRAD, S.; CORNFORTH, M.N.; NATARAJANF, A.T.; VAN GENTG, D.C.; OBE, G. From DNA damage to chromosome aberrations: Joining the break. **Mutation Research**. v. 756, p. 5 – 13, 2013.

EL-SHENAWY, S.M., HASSAN, N.S. Comparative evaluation of the protective effect of selenium and garlic against liver and kidney damage induced by mercury chloride in the rats. **Pharmacological Reports**. Mar-Apr., v.60, n.2, p.199-208, 2008.

FURIERI, L.B. **Exposição a baixa concentração de HgCl<sub>2</sub> durante 30 dias deprime a contratilidade miocárdica e promove disfunção coronariana em ratos**. 2011. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

FURIERI, L.B.; GALÁN, M.; AVENDAÑO, M.S.; GARCÍA-REDONDO; A.B.; AGUADO, A.; MARTÍNEZ, S.; CACHOFEIRO,V.; BARTOLOMÉ, M. V.; ALONSO, M. J.; VASSALLO, D.V.; SALAICES, M. Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. **British Journal of Pharmacology**. v.162, p. 1819–1831, 2011.

GOLLIN, S.M. Mechanisms leading to chromosomal instability. **Seminars in Cancer Biology**. v.15, p. 33–42, 2005.

GUERRA, M. (Ed.); SOUZA, M.J. de (Ed.) Como observar cromossomos mitóticos humanos e de pequenos mamíferos. In: **Como observar cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana**. 1<sup>a</sup>. Ed. São Paulo: FUNPEC, 2002. Capítulo 9, p. 89 - 99.

HOUSTON, M.C. Role of mercury toxicity in hypertension, cardiovascular disease, and Stroke. **Journal of Clinical Hypertension** (Greenwich). v.13, p. 621–627, 2011.

HOUSTON, M.C. Role of Mercury Toxicity in Hypertension, Cardiovascular Disease, Humans: A Worldwide Concern. **Ambio**. Mar - Apr., v. 13 n. 2, S128-33, 2007.

JACOB, R. A.; BURN, B.J. Oxidative damage and defense. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 63, n. 98, 5S-90S, 1996.

KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Descrição de um novo método de ooforectomia em ratas. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 52, n. 3, p. 462-470, 2012.

KRISHNANI, K. K.; AYYAPPAN, S. Heavy Metals Remediation of Water Using Plants and Lignocellulosic Agrowastes. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 188, p. 59–84, 2006.

KROMIDAS, L.; TROMBETTA, L. D.; JAMALL, I.S. The protective effects of glutathione against methylmercury cytotoxicity. **Toxicology Letters**. v. 51, p. 67-80, 1990.

KURLAND, T.; FARO, S. N.; SIEDLER, H. Minamata Disease. The Outbreak of a Neurologic Disorder in Minamata, Japan, and its Relationship to the Ingestion of Seafood contaminated by Mercuric Compounds. **World Neurology**. v. 1, n. 5, p. 370-395, 1960

LEE, Y. W.; HA, M. S.; KIM, Y. K. Role of Reactive Oxygen Species and Glutathione in Inorganic Mercury-Induced Injury in Human Glioma Cells. **Neurochemical Research**. v. 26, n. 11, p. 1187–1193, 2001.

LEMONS, N.B.; ANGELI, J.K.; FARIA, T. DE O.; RIBEIRO JUNIOR, R.F.; VASSALLO, D.V.; PADILHA, A.S.; STEFANON, I. Low Mercury Concentration Produces Vasoconstriction, Decreases Nitric Oxide Bioavailability and Increases Oxidative Stress in Rat Conductance Artery. **PLoS ONE**. May., v. 7, n. 11, e49005, 2012.

MATSUMOTO, H.M.D.; KOYA, G.M.D.; TAKEUCHI, T.M.D. Fetal Minamata Disease: A Neuropathological Study of Two Cases of Intrauterine Intoxication by a Methyl Mercury Compound. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**. Oct., v. 24, n. 4, p. 563-574, 1965.

MERGLER, D; ANDERSON, H.A.; CHAN, L.H.M.; MAHAFFEY, K.R.; MURRAY,M.; SAKAMOTO, M.; STERN, A.H.. Methylmercury Exposure and Health Effects in Humans: a Worldwide Concern. **Ambio**. v. 36, n. 1, p. 3-11, 2007.

MIURA, K., CLARKSON, T.W. Reduced methylmercury accumulation in a methylmercury-resistant rat pheochromocytoma PC12 cell line. **Toxicology and Applied Pharmacology**. Jan., v.118, n.1, p. 39-45, 1993.

MIURA, K.; CLARKSON, T.W. Reduced methylmercury accumulation in a methylmercury-resistant rat pheochromocytoma PC12 cell line. **Toxicology and Applied Pharmacology**. Jan., v. 118, n. 1, p. 39-45, 1993.

NATARAJAN, A. T.; PALITTI, F. DNA repair and chromosomal alterations. **Mutation Research**. v. 657, p. 3–7, 2008.

NATARAJAN, A.T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research**. v. 504, p. 3–16, 2002.

NATARAJAN, A.T.; BOEI, J.J.W.A. Formation of chromosome aberrations: insights from FISH. **Mutation Research**. v. 544, p. 299–304, 2003.

NELSON, D. L. (Ed.); COX, M. M. (Ed.) Biosynthesis of Amino Acids, Nucleotides, and Related Molecule. In: **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4<sup>a</sup>. Ed. Nova Iorque: W. H. Freeman, 2004. Capítulo 22, p. 833 – 880.

NOLL, D. M.; MASON, T. McG.; MILLER, P.S. Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA. **Chemical Reviews**. Feb., v. 106, n.2, p. 277–301, 2006.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE,W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**. v. 504, p.17–36, 2002.

OBE, G.; RITTER, S.; DURANTE, M. Chromosome aberrations, DNA damage, and risk: Matrix reloaded. **Mutation Research**. v. 756, p. 3 – 4, 2013.

PEÇANHA, F. M. **A exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio altera a reatividade vascular da artéria aorta de ratos. Papel das espécies reativas do oxigênio e dos prostanóides derivados da via da ciclooxygenase**. 2009. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

POPESCU, H.I.; NEGRU, L.; LACRANJAN, I. Chromosome Aberrations Induced by Occupational Exposure to Mercury. **Archives of Environmental Health**. Nov – Dec., v. 34, n. 6, p. 461 – 463, 1979.

REEVE, A. K.; KRISHNAN, K. J.; TURNBULL, D. Mitochondrial DNA Mutations in Disease, Aging, and Neurodegeneration. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1147, p. 21–29, 2008.

RIBEIRO, L.R. (Ed.) Teste do Micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: **Mutagênese Ambiental**. 1ª. Ed. Canoas: ULBRA, 2003. Capítulo 7, p. 173 - 200.

RIBEIRO, L.R. (Ed.); MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: **Mutagênese Ambiental**. 1ª. Ed. Canoas: ULBRA, 2003. Capítulo 1, p. 21-27.

ROSSMAN, T. G. Effect of Metals on Mutagenesis and DNA Repair. **Environmental Health Perspectives**. v. 40, p. 189-195, 1981.

SAVAGE, J.R.K. A brief survey of aberration origin theories. **Mutation Research** . v. 404, p.139-147, 1998.

SCHURZ, F.; SABATER-VILAR, M.; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence: the role of metal-binding proteins. **Mutagenesis**. v.15, n. 6, p. 525 - 530, 2000.

SELIN, N.; SUNDERLAND, E. M.; KNIGHTES, C. D.; MASON, R.P. Sources of Mercury Exposure for U.S. Seafood Consumers: Implications for Policy. **Environmental Health Perspectives**. v.118, p.137–143, 2010.

SILVA-PEREIRA, L.C.; CARDOSO, P.C.S.; LEITE, D.S.; BAHIA, M.O.; BASTOS, W.R.; SMITH, M.A.C.; BURBANO, R.R. Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes in vitro. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.38, p.06, p. 901-907, 2005.

SORSA, M. **Genotoxic chemicals**. in 27. Biological Monitoring, La Ferla, Francis, Lauwerys, Robert R. (Ed.) Encyclopedia of Occupational Health and Safety, Jeanne Mager Stellman, Editor-in-Chief. International Labor Organization, Geneva. 2011.

TAWN, E.J.; WHITEHOUSE, C.A. Frequencies of chromosome aberrations in a control population determined by G banding. **Mutation Research**. v. 490, p. 171–177, 2001.

TUCKER, J.D., PRESTON, R.J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutation Research**. Sep., v.365, n.1-3, p.147-59, 1996.

UNEP/WHO: **Epidemiological studies related to the environmental quality criteria for bathing waters, shellfish-growing waters and edible marine organisms**. MAP Technical Reports Series. n. 93 UNEP, Athens, 1995.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T.D. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. **Current Medicinal Chemistry**. v.12, p.1161-1208, 2005.

VASSALLO, D.V.; SIMÕES, M.R.; FURIERI, L.B.; FIORESI, M.; FIORIM, J.; SILVEIRA, E. A.; ANGELI, J. K.; WIGGERS, G. A.; PEÇANHA, F. M.; SALAICES, M. Toxic effects of mercury, lead and gadolinium on vascular reactivity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 44, n. p. 939-946, 2011.

WEAKLEY, S. M.; JIANG J.; KOUGIAS, P.; LIN, P. H.; YAO, Q.; BRUNICARDI, F.C.; GIBBS, R.A.; CHEN, C. Role of Somatic Mutations in Vascular Disease Formation. **Expert Rev. Mol. Diagn.** n.10, v. 2, p. 173–185, 2010.

WIGGERS, G. A. **Efeitos da exposição crônica ao cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) sobre a reatividade vascular e propriedades mecânicas e estruturais de artérias de resistência de ratos.** 2008. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

WIGGERS, G.A.; PEÇANHA, F.M.; BRIONES, A. M.; PÉREZ-GIRÓN, J. V.; MIGUEL, M.; VASSALLO, D. V.; CACHOFEIRO, V.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. **American Journal of Physiology.** v. 295, p. H1033–H1043, 2008.

WILLIAMS, M. V.; WINTERS, T.; WADDELL K. S. *In Vivo* Effects of Mercury (II) on Deoxyuridine Triphosphate Nucleotidohydrolase, DNA Polymerase ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), and Uracil-DNA Glycosylase Activities in Cultured Human Cells: Relationship to DNA Damage, DNA Repair, and Cytotoxicity. **Molecular Pharmacology.** Feb., v. 31, n. 2, p. 200–207, 1987.



# **CAPÍTULO II**

**Dose única de Cisplatina afeta a pressão arterial e tem correlação com dano cromossômico**

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>70</b>
1.1 CISPLATINA.....	70
1.2 NEFROTOXICIDADE.....	71
1.3 INFLUÊNCIA SOBRE O DNA.....	72
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>74</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>75</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	75
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	75
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>76</b>
4.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	76
4.2 TRATAMENTO DOS ANIMAIS.....	76
4.3 HEMODINÂMICA.....	78
4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA CITOGENÉTICA.....	79

4.5 ANÁLISE CITOGENÉTICA PARA AVALIAÇÃO DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS.....	80
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	81
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>89</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1:** Fórmula estrutural da cisplatina.....70

**Figura 2:** Localização e dissecação das estruturas durante a canulação da artéria carótida. Em A o quadrado evidencia o local onde ocorre a tricotomia e a incisão para exposição da musculatura (Modificada de Khajuria et al., 2012); Em B a seta aponta para a artéria carótida, na qual é introduzida a cânula (Foto: Gilson Brás).....78

**Figura 3:** Registros de duas metáfases com apenas uma aberração cada uma. Em A é possível visualizar, indicada pela seta, uma quebra; Em B a seta aponta para uma aberração do tipo gap. Observação em fotomicroscópio óptico (objetiva de 100X).....81

**Figura 4:** As barras representam as médias  $\pm$  desvio padrão da média das medidas hemodinâmicas obtidas dos animais controle (CT) e tratados com cisplatina (CP). Em A, B, C e D respectivamente, Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC); \* $p < 0,05$ , comparação com o grupo controle em animais anestesiados.....83

**Figura 5:** Valores médios do número de aberrações cromossômicas encontradas nas metáfases de animais estão representados nas barras  $\pm$  desvio padrão da média, sendo controle (CT) e tratados com Cisplatina (CP);  $p < 0,05$ .....84

**Figura 6:** Correlação entre os dados dos animais tratados com cisplatina. De A até D, respectivamente: Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC), em animais anestesiados. Alfa foi significativo para todos os resultados e os valores de r estão dispostos em seus gráficos de dispersão correspondentes.....85

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

AC: Aberração Cromossômica  
CEUA: Comissão de tica no Uso de Animais  
CP: Grupo Cisplatina  
CT: Grupo Controle  
DNA: cido Desoxirribonucleico  
EPM: Erro padrão da média  
FC: Frequência cardica  
i.p.: Intraperitoneal  
KCl: Cloreto de Potássio  
NaCl: Cloreto de Sódio  
PA: Pressão Arterial  
P.A.: Para Análise  
p: Probabilidade  
PAD: Pressão arterial diastólica  
PAM: Pressão arterial média  
PAS: Pressão arterial sistólica  
rpm: Rotações por Minuto  
UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

## RESUMO

Um dos compostos derivados de platina mais utilizados em tratamentos de câncer é a cisplatina. Apesar da eficiência, seu uso fica limitado devido à alta toxicidade que apresenta, principalmente no que se refere ao sistema renal. Diversas vias metabólicas e processos fisiológicos tem sido utilizados para explicar as complicações advindas do tratamento com cisplatina, contudo nem todos processos estão plenamente descritos. O presente trabalho buscou avaliar se havia correlação entre a progressão no dano ao DNA e alterações em parâmetros hemodinâmicos em ratos tratados com uma única dose de cisplatina. Vinte e quatro horas após a injeção, foram obtidas medidas de pressão arterial sistólica, diastólica e média, além de frequência cardíaca. Da medula óssea foram obtidas amostras para avaliação das aberrações cromossômicas. Os dados mostraram correlação negativa entre cada um dos parâmetros hemodinâmicos e as aberrações cromossômicas, o que permite observar que o aumento no número de aberrações reflete diretamente na queda da pressão arterial e na frequência cardíaca.

**Palavras-chave:** Aberrações cromossômicas; Hemodinâmica, Quimioterapia; Medula óssea; Frequência cardíaca.

## ABSTRACT

One of the platin compounds currently used in cancer treatment is cisplatin . Despite of its efficiency, the use is limited because of its high toxicity which occurs, primarily, on renal system. Several metabolic pathways and physiological processes have been used to explain the complications of treatment with cisplatin, however not all processes are fully understood. The present study attempted to assess if there was a correlation between the progression in DNA damage and changes in hemodynamic parameters in rats treated with a single dose of cisplatin. Twenty four hours after injection, systolic, diastolic and mean arterial pressure, in addition of heart rate were obtained. Bone marrow samples were obtained for assessment of chromosomal aberrations. The data showed a negative correlation between hemodynamic parameters and chromosomal aberrations, which allowed to infer that the increase in the number of aberrations is linked to the reduction of blood pressure and heart rate.

**Keywords:** Chromosomal aberrations; Hemodynamics; Chemotherapy; Bone marrow; Heart rate.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CISPLATINA

A cis-diamminedichloroplatinum (II), ou cisplatina, é um complexo químico coordenado planar, solúvel em água, cuja estrutura é descrita como um átomo de platina ligados a dois átomos de cloro e dois grupamentos amônio como mostra a figura 1 (Prestayko et al., 1979).

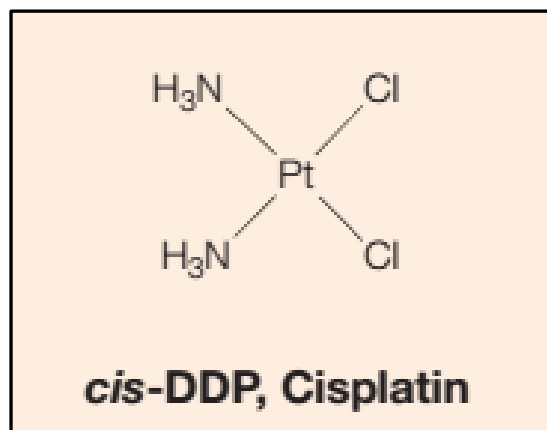


Figura 1: Fórmula estrutural da cisplatina.

Devido a suas características químicas, é o principal componente dos antitumorais derivados de platina. O primeiro registro de sua administração em um paciente com câncer ocorreu no ano de 1971. Em 1978, tornou-se disponível no Canadá para a prática geral da oncologia e pouco tempo depois, teve utilização difundida em todo mundo (Lebwohl & Canetta, 1998).

Antineoplásico de amplo espectro, a cisplatina é empregada no tratamento de inúmeros tipos de câncer (Lau, 1999). Atualmente, regimes combinados de quimioterapia com cisplatina são utilizados na primeira linha no tratamento contra o câncer de células germinativas em testículos e ovários, câncer do epitélio ovariano, de endométrio, do colo do útero (avançado), câncer de cabeça e pescoço, de



bexiga, mesotelioma, câncer do epitélio pulmonar, melanoma maligno, carcinóides, câncer do pênis, carcinomas adrenocorticais e carcinomas de origem desconhecida (Desoize & Madoulet, 2002; Hanigan & Devarajan, 2003)

A eficiência da cisplatina é notável, principalmente em terapias contra tumores sólidos onde os tratamentos convencionais normalmente falham, entretanto sua toxicidade inspira precauções (Lebwohl & Canetta, 1998; Hanada et al., 2000). Com quase três décadas de utilização, há relatos de que o tratamento com cisplatina provoca efeitos indesejáveis tais como ototoxicidade, gastrotoxicidade, mielosupressão, distúrbios eletrolíticos como hipomagnesemia, hipocalcemia, hipofosfatemia, hipopotassemia e reações alérgicas. Além disso, desencadeia nefrotoxicidade e neurotoxicidade, que são os principais fatores limitantes de sua dosagem (Miller et al., 2010; Arunkumar et al., 2011).

## 1.2 NEFROTOXICIDADE

Apesar da melhora na resposta terapêutica com o aumento da dose, a terapia de alta dosagem é limitada devido à acumulação da cisplatina, que ocorre principalmente nos rins e no tecido nervoso (Hanigan & Devarajan, 2003). Da mesma forma como alcança os objetivos terapêuticos, a cisplatina estimula mecanismos inflamatórios e afeta as vias de proteção antioxidante das células, deixando-as susceptíveis a ação de radicais livres (Nasri, 2013a).

Inflamação, indução da morte celular por apoptose, e necrose tecidual estão associados à toxicidade renal da cisplatina, a qual afeta principalmente o seguimento S3 do túbulo proximal. Em consequência do efeito tóxico às células tubulares, ocorre redução do volume de sangue drenado promovendo hipóxia na medula externa, o que agrava o dano renal (Weidemann et al., 2008). Há relatos de que até 30% dos pacientes tratados apresentaram injúrias agudas nos rins e um terço dos pacientes submetidos à terapia com cisplatina terminam o tratamento com algum tipo de lesão renal irreversível (Nasri, 2013a).

Estudos tem sido desenvolvidos para melhor compreender a farmacocinética e a farmacodinâmica da cisplatina, buscando reduzir sua toxicidade. Urien e colaboradores (2005), discutiram a administração por via oral como alternativa à alta toxicidade do tratamento endovenoso com cisplatina. Esforços também tem sido empregados para o desenvolver e testar drogas alternativas, além questionar sobre a influência de outros fatores, como a idade (Erdlenbruch et al., 2001; Minami et al., 2004) e o gênero (Nasri, 2013b) no grau de toxicidade da cisplatina.

### 1.3 INFLUÊNCIA SOBRE O DNA

A configuração isomérica cis do complexo tem importância chave, já que uma das formas de atuação da cisplatina contra o crescimento tumoral ocorre por meio da inibição da síntese de DNA. Essa configuração favorece a formação de pontes cruzadas (do inglês *Crosslinks*) entre as fitas de DNA (Reed et al., 1987). A eficiência da cisplatina também está relacionada à saturação de mecanismos de reparo do DNA (Szymkowski et al., 1992). Além disso, os adutos formados entre a configuração trans do complexo platinado e o DNA são reparados com mais facilidade do que os que se formam com a configuração cis (Mello et al., 1995).

Em estudos *in vitro* sobre a influência da cisplatina nos componentes do DNA, observou-se, que a interação com as bases nitrogenadas adenina (A) e guanina (G) é mais rápida, tornando mais frequente a formação de pontes cruzadas A-G (25% dos adutos) e G-G (65% dos adutos formados na mesma fita) (Szymkowski et al., 1992). Essas informações corroboram com dados de estudo anterior que sugere a susceptibilidade de configuração química da guanina para reação, apresentando-a, potencialmente, como ponto inicial para interação da cisplatina com DNA (Prestayko et al., 1979).

A inibição dos processos de síntese, replicação e reparo resulta, portanto, da alteração na estrutura tridimensional do DNA induzida pelos adutos formados com a cisplatina (Suo et al., 1999). Contudo, células com intensa atividade de reparo apresentam resistência no tratamento com cisplatina, e esse fato tem sido o alvo de

diversos estudos. Um deles descreve a influência do fator de crescimento epidermal sobre o sistema de reparo do DNA e a resistência à cisplatina (Hsu et al., 2009). Já extensa revisão realizada por Crul e colaboradores (1997), detalha os mecanismos de reparo e a atuação da cisplatina sobre eles.

Outra linha de pesquisa defende que membrana celular é mais um local de ação da cisplatina, e que a ligação metal-membrana desencadeia processos inflamatórios que podem estar relacionada aos efeitos colaterais observados em pacientes submetidos ao tratamento com os compostos derivados da platina (Rebillard et al., 2008; Ciarimboli, 2012).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Este estudo desenvolveu-se a partir de resultados preliminares do projeto piloto cujo objetivo inicial era testar a dosagem de cisplatina para uso como controle positivo em ensaio de genotoxicidade. Desde as primeiras leituras hemodinâmicas, os animais tratados com cisplatina apresentaram dados que demandaram uma análise mais profunda. A fim de compreender a dinâmica da droga no organismo, quais os seus mecanismos de ação e que tipo de influência teria nos parâmetros hemodinâmicos essa investigação foi realizada.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Determinar a frequência absoluta de aberrações cromossômicas nas células de medula óssea de ratos Wistar fêmeas, 24 horas após a exposição a uma única dose de cisplatina.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar a resposta hemodinâmica dos animais submetidos ao tratamento com uma única dose de cisplatina;

Correlacionar a frequência absoluta de aberrações cromossômicas e as leituras dos parâmetros hemodinâmicos dos ratos;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) normotensos foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). O protocolo metodológico utilizado neste estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da UFES, e teve certificado de aprovação emitido sob o número 052/2012.

Esse protocolo incluiu a exposição aguda à cisplatina por injeção intraperitoneal (i.p.) na concentração de 10 mg/kg de peso vivo, leitura da frequência cardíaca (FC) e aferição da pressão arterial (PA) por meio do transdutor de força, além da coleta de medula óssea após o sacrifício dos animais.

### 4.2 TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Durante os experimentos foram utilizados 24 animais do sexo feminino, que permaneceram acondicionados em gaiolas devidamente identificadas. A aclimatação ocorreu no biotério do Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular da Universidade Federal do Espírito Santo, respeitando o período mínimo de 72 horas, conforme diretrizes estabelecidas pela Boston University (2009). No local, a temperatura foi controlada e períodos claro/escuro intercalados a cada 12h. Água e ração padrão (Presence da Purina®) foram oferecidas para livre consumo. Durante o tratamento, a manipulação dos animais foi realizada pelas mesmas pessoas, sempre no período da manhã, de forma a minimizar o estresse ocasional.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos de seis indivíduos, e a cada um deles foi atribuído um número de 1 a 6. Seguido da numeração, ocorreu o sorteio para randomização e após a definição de cada grupo, o número foi marcado na cauda de cada rato com caneta de tinta permanente. Foi convencionalizada a tinta azul para os animais do grupo cisplatina (CP) e preta para os animais controle (CT).

Os indivíduos do grupo CP foram tratados com injeção única de cisplatina (10mg/kg), por via intraperitoneal, já os indivíduos do grupo CT receberam injeção da Solução de Cloreto de Sódio 0,9 %, cujo volume foi proporcionalmente calculado com base no peso do animal e na dose de cisplatina, conforme descrito abaixo.

Dosagem de Cisplatina para Aplicação	Solução Comercial de Cisplatina
10mg ----- 1000g	50mg ----- 50mL
1mg ----- 100g	1mg ----- 1mL

**CISPLATINA** - Volume de solução a ser aplicado (exemplo):

Animal com 300g de peso corporal, considerando a concentração de 10mg/kg.  
 300g peso corporal ----- 3mg de cisplatina ----- 3mL de solução para injeção

**SALINA (NaCl 0,9%)** - Volume de solução a ser aplicado (exemplo):

Animal com 300g de peso corporal, considerando o volume proporcional de cisplatina.

300g peso corporal ----- 3mL de salina para injeção

Cada animal do grupo CP recebeu a injeção da solução de cisplatina proporcional ao seu peso, enquanto os animais CT receberam a injeção da solução salina. Após a aplicação, foi aguardado um período de 24h para dar prosseguimento às demais etapas do protocolo experimental.

### 4.3 HEMODINÂMICA

Transcorridas 24 horas após a injeção de cisplatina (CP) e salina (CT), os animais foram pesados para o cálculo da dose individual do anestésico. Cada animal recebeu injeção de Uretana (1,2 mg/kg/i.p.) e os reflexos foram testados a fim de evitar qualquer sofrimento durante o procedimento cirúrgico. Somente após a certificação da ausência de reflexos teve início a cirurgia.

Na altura da traqueia foi realizada a tricotomia no local indicado pela figura 2A. Em seguida foi feita uma incisão com auxílio de tesoura e pinça para expor a musculatura e os vasos adjacentes. A artéria carótida foi localizada e dissecada (Figura 2B). Nela foi realizada uma pequena incisão para a introdução e passagem da cânula (PE-50/ Clay Adams) preenchida com solução de heparina 50 U/mL. À cânula foi conectado o transdutor de força (TSD 104A- Biopac) que registrou os valores da pressão arterial sistólica, diastólica, média e da frequência cardíaca.

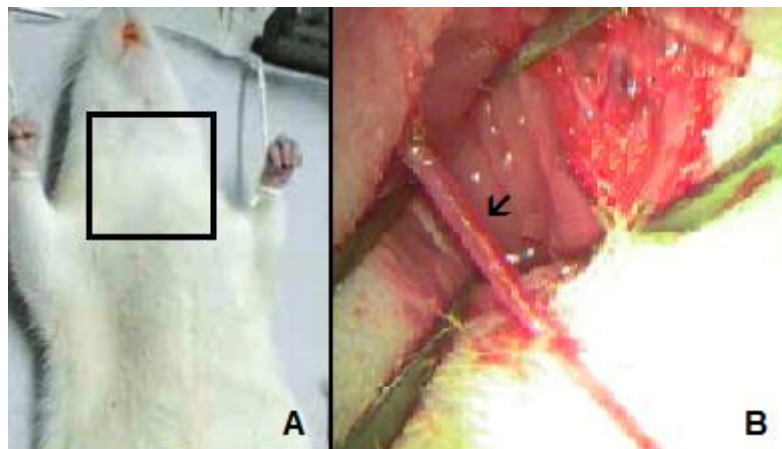


Figura 2: Localização e dissecção das estruturas durante a canulação da artéria carótida. Em A o quadrado evidencia o local onde ocorre a tricotomia e a incisão para exposição da musculatura (Modificada de Khajuria et al., 2012); Em B a seta aponta para a artéria carótida, na qual é introduzida a cânula (Foto: Gilson Brás).



O tempo mínimo de vinte minutos foi aguardado para a estabilização das leituras no sistema (MP 30 Biopac Systems, Inc; CA). Após a coleta dos registros, a cânula era desconectada do sistema e retirada do vaso.

#### 4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA CITOGENÉTICA

Imediatamente após o término das leituras hemodinâmicas, os animais foram conduzidos ao Laboratório de Genética Animal da UFES, onde teve início o protocolo para obtenção da suspensão celular de medula óssea.

Adaptado do protocolo de Guerra & Souza (2002), para cada 200 g de peso corporal, 1 mL de solução de colchicina 0,1% foi injetado por via subcutânea na coxa direita de cada animal. O período de incubação foi de 25 minutos. Em seguida, o animal foi sacrificado por exsanguinação e o fêmur direito retirado para obtenção da suspensão celular.

Para retirada do fêmur, foi feita uma incisão na altura do joelho do animal, com desligamento dos tendões e desarticulação do osso. No primeiro momento, foi preservada a cartilagem que cobria a epífise. A extremidade superior do fêmur, que estava articulada à bacia, foi deslocada e, com o auxílio da tesoura, desarticulada. A epífise foi cortada, deixando livre a medula do osso para a passagem da solução hipotônica de KCl 0,075 M, utilizada durante a lavagem. A cartilagem anteriormente preservada foi removida e uma agulha 23 G inserida para conduzir 7 mL de solução hipotônica. A lavagem e homogeneização da suspensão celular da medula ocorreram em placa de Petri. O material resultante foi aspirado, transferido para um tubo tipo falcon de 14 mL e disposto em banho-maria à temperatura de 37°C, onde permaneceu por 40 minutos.

Para a fixação do material foi preparada, 30 minutos antes do uso, a solução fixadora que continha Metanol P.A. e Ácido Acético P.A. na proporção de 3:1. A solução foi armazenada a -20°C, em recipiente com tampa para evitar a evaporação.

Após banho-maria, a suspensão celular foi pré-fixada por cinco minutos com seis gotas de solução fixadora gelada. Em seguida foi fixada com 3 mL de solução fixadora gelada. Nas duas etapas acima descritas, o conteúdo do tubo foi lentamente homogeneizado.

Após centrifugação por 7 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante de todas as amostras foi descartado. A ressuspensão do material foi realizada com 7 mL de solução fixadora gelada, seguida de centrifugação a 1000 rpm por 7 min e descarte do sobrenadante. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes. O material resultante foi diluído e homogeneizado em aproximadamente 2 mL de solução fixadora gelada – o volume varia de acordo com a quantidade de material obtido após as centrifugações - e duas gotas foram pingadas em cada lâmina. Para cada animal foram pingadas cinco lâminas que secaram ao ar por, no mínimo, 24 horas.

Após a secagem, todas as lâminas passaram pelo processo de hidrólise, sendo imersas em solução de Ácido Clorídrico (HCl) 1 N, a 60 °C por 7 minutos e, em seguida, lavadas com água destilada e secadas ao ar. As lâminas foram coradas com Giemsa (MERK) e solução A+B (NaCl e KCl) na proporção de 1:30, durante 5 minutos e novamente lavadas com água destilada e deixadas para secar ao ar.

#### 4.5 ANÁLISE CITOGENÉTICA PARA AVALIAÇÃO DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Para cada animal foram analisadas, às cegas, 100 metáfases em fotomicroscópio óptico Nikon Eclipse 40i. Para as análises das aberrações cromossômicas foram consideradas metáfases bem espalhadas com grau de condensação suficiente para possibilitar a observação da morfologia dos cromossomos.

Todas as metáfases que possuíam o mínimo de um cromossomo com anomalia foram consideradas metáfases aberrantes, conforme demonstrado na figura 3.

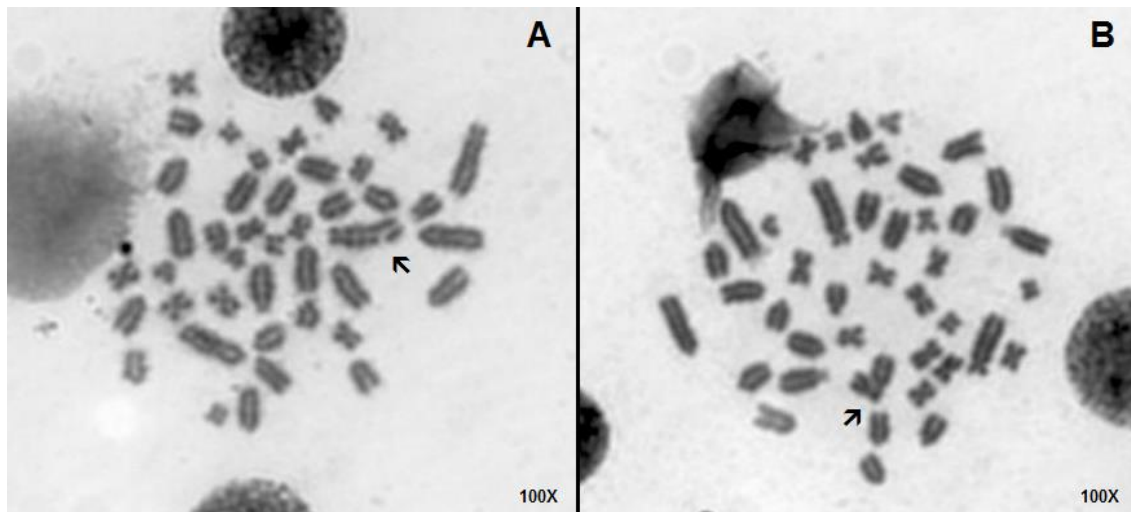


Figura 3: Registros de duas metáfases com apenas uma aberração cada uma. Em A é possível visualizar, indicada pela seta, uma quebra; Em B a seta aponta para uma aberração do tipo gap. Observação em fotomicroscópio óptico (objetiva de 100X).

O registro das imagens foi obtido por meio do software GraphPad 2.0 (Applied Spectral Imaging, Software, USA). Uma única pessoa realizou as análises de todas as lâminas, e foram registradas apenas as aberrações evidentes, como quebras, cromossomos em anel, *gaps* (erros) e desestruturação da metáfase (pulverizações).

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foram aplicados o teste não paramétrico de Mann-Whitney, e o teste paramétrico t de Student, conforme descrito na tabela a seguir (Tabela 1). Os dados foram comparados e correlacionados utilizando o Coeficiente de Correlação de Pearson (Tabela 1). O software utilizado foi Prisma 5.01 (GraphPad, Software, USA), sendo os resultados considerados significantes ao nível de 5%. Foram calculados a média e o desvio padrão dos valores de cada um dos grupos. Quando presentes, os valores aberrantes (*outliers*) foram excluídos e substituídos pelos valores médios de seus respectivos grupos.

Tabela 1: Descrição dos tipos de testes estatísticos e suas respectivas aplicações nos dados do estudo.

<b>Teste</b>	<b>Variável</b>	<b>Dado</b>	<b>Comparação</b>
t de Student	Pressão Arterial; Pressão Sistólica; Pressão Diastólica; Frequência Cardíaca.	Média	Grupo Controle Negativo X Grupo Mercúrio
Mann-Whitney	Aberrações Cromossômicas	Frequência Absoluta	Grupo Cisplatina X Grupo Controle
Correlação de Pearson	Parâmetros Hemodinâmicos X Aberrações Cromossômicas	Média X Frequência Absoluta	Grupo Cisplatina

## 5 RESULTADOS

A queda estatisticamente significativa de valores dos parâmetros hemodinâmicos, quando comparados CP e CT, pode ser observada por meio das médias dos valores dispostos na Figura 4.

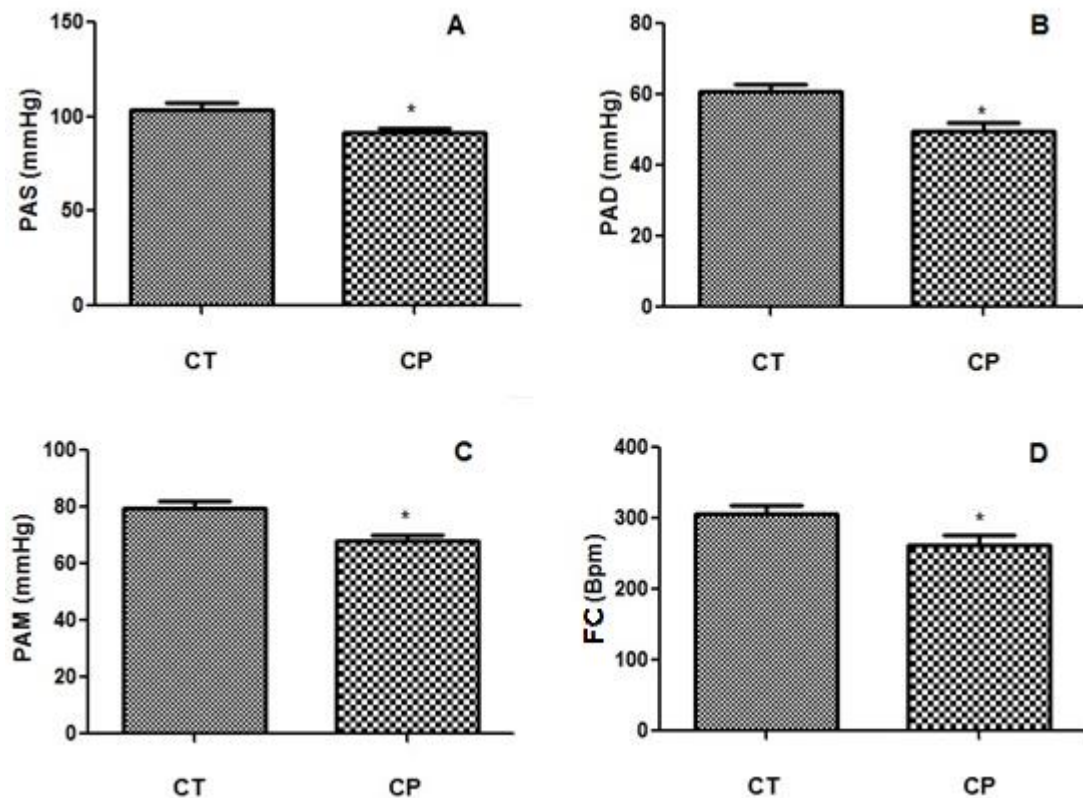


Figura 4: As barras representam as médias com desvio padrão da média das medidas hemodinâmicas obtidas dos animais controle (CT) e tratados com cisplatina (CP). Em A, B, C e D respectivamente, Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC); \*  $p < 0,05$ , comparação com o grupo controle em animais anestesiados.

Na figura 5 estão dispostas as médias dos valores das aberrações cromossômicas tanto para animais CP quanto CT. As análises estatísticas também retornaram valores significantes os quais refletem claramente o aumento do número de aberrações nos animais tratados com cisplatina.

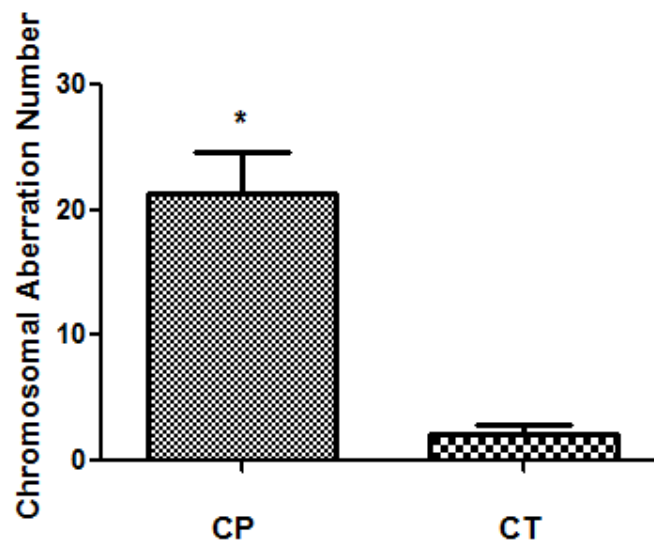


Figura 5: Valores médios do número de aberrações cromossômicas encontradas nas metáfases de animais estão representados nas barras  $\pm$  desvio padrão da média, sendo controle (CT) e tratados com Cisplatina (CP);  $p < 0,05$ .

Foi analisada também a correlação entre o aumento do número de aberrações cromossômicas e a diminuição encontrada em cada um dos parâmetros hemodinâmicos (Figura 6). É importante destacar que a correlação foi estabelecida entre os valores crescentes de aberrações cromossômicas e os valores decrescentes de PAS, PAD, PAM e FC. Os resultados apresentados, portanto, consideram o conjunto de dados como um todo, e relacionam aumento do número de aberrações cromossômicas, com queda nos valores dos parâmetros hemodinâmicos.

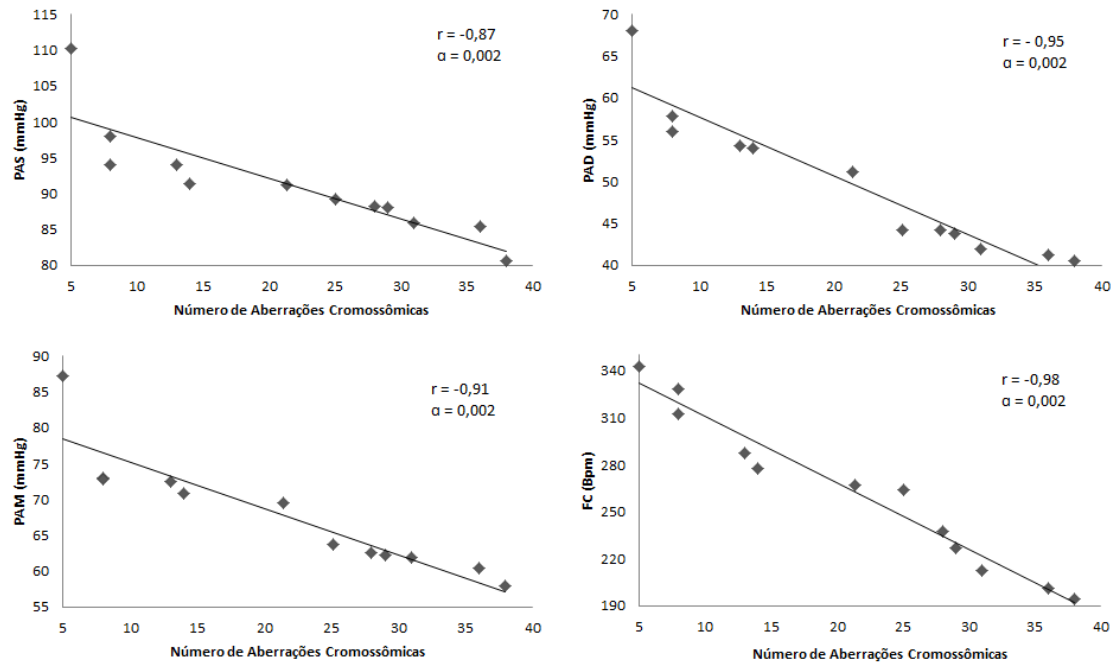


Figura 6: Correlação entre os dados dos animais tratados com cisplatina. De A até D, respectivamente: Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC), em animais anestesiados. Alfa foi significativo para todos os resultados e os valores de  $r$  estão dispostos em seus gráficos de dispersão correspondentes.

As correlações fortemente negativas apresentadas na figura 6 demonstram que a queda, tanto nas pressões sistólica, diastólica e média, como na frequência cardíaca são inversamente proporcionais ao aumento na frequência absoluta de aberrações cromossômicas encontradas nas metáfases.

## 6 DISCUSSÃO

As alterações significativas nos parâmetros hemodinâmicos e as correlações negativas obtidas neste estudo, após a comparação dos dados hemodinâmicos com o número de aberrações cromossômicas, são compatíveis com dados sobre a nefrotoxicidade dos compostos platinados, apresentados pela literatura.

O efeito nefrotóxico da cisplatina foi descrito mesmo com uma única dose, a qual pode incorrer em insuficiência renal aguda (Lau,1999). Parte desse efeito se deve à capacidade que a cisplatina tem de agir nas células epiteliais dos túbulos proximais, prejudicando sua funcionalidade (Miller et al., 2010).

Devido ao fato de as células epiteliais dos túbulos proximais serem as primeiras a sofrerem os efeitos tóxicos da cisplatina (Kaushal et al., 2001), a alteração da pressão arterial média, bem como de suas componentes (PAS e PAD) é um resultado coerente. Desde 1985, Winston e Safirstein haviam descrito que a cisplatina é responsável pela queda no fluxo sanguíneo em ratos, o que também suporta as alterações hemodinâmicas apresentadas neste estudo.

O efeito citotóxico da cisplatina se deve ao fato de ocorrer a formação de adutos de DNA intra e inter fitas da dupla hélice. Ela funciona como uma barreira física, perturbando a dinâmica de processos como duplicação e transcrição, o que promove a ativação dos mecanismos de reparo na célula. As quebras podem acontecer quando os adutos promovem paradas nas forquilhas de replicação, gerando instabilidades nas regiões onde a cisplatina se liga. Esse fato justifica a ocorrência de quebras nos cromossomos das amostras dos grupos tratados com cisplatina. Se o DNA da célula sofre sucessivas lesões, uma série de reações bioquímicas são iniciadas culminando em morte celular (Wang & Lippard, 2005; Oliver et al., 2010).

Alguns estudos descrevem processos metabólicos para explicar as vias de apoptose e necrose ativadas nos tecidos renais em decorrência da exposição à cisplatina.



Alguns deles são a via das caspases (Kaushal et al., 2001; Cummings & Shnellmann, 2002) e o fator de indução de hipóxia (HIF) (Weidemann et al., 2008).

Uma vez que o rim é um dos órgãos mais afetados no tratamento por cisplatina, se torna evidente a relação entre o número de aberrações cromossômicas e as alterações hemodinâmicas. Nos rins, os níveis de platina podem atingir valores até cinco vezes maiores do que os plasmáticos. Além disso, são a principal rota de excreção, o que potencializa o acúmulo desproporcional de cisplatina e contribui para o aumento da nefrotoxicidade (Lau, 1999; Yao et al., 2007).

As aberrações cromossômicas identificadas em células da medula óssea, permitem a visualização do efeito in vivo da cisplatina nas células do organismo. Apesar de o tecido amostrado acumular menor quantidade do quimioterápico, o número de anomalias encontradas foi suficientemente para ser correlacionado com as perturbações hemodinâmicas. A medula óssea é fonte de células sanguíneas e qualquer processo que influencie sua dinâmica celular (necrose ou apoptose, por exemplo) altera o hematócrito, que também é um fator importante para a biofísica da circulação.

Para estabelecer os mecanismos pelas quais esses efeitos ocorrem, é preciso estudar profundamente a influência da cisplatina na circulação arterial, incluindo a regulação humoral. É necessário também uma avaliação a fim de correlacionar tempos de tratamento e diferentes dosagens para determinar quais são as etapas iniciais, e como se manifestam em escala temporal.

## 7 CONCLUSÃO

Por meio desses resultados é possível observar que o dano ao DNA registrado através de Aberrações Cromossômicas expõe seus reflexos sobre os parâmetros hemodinâmicos. A cisplatina induz a queda na pressão arterial após 24 h de exposição, e esse dado corrobora com outros encontrados na literatura. O fato de haver uma correlação inversa entre o aumento da quantidade de aberrações cromossômicas e a queda nos valores médios da pressão arterial, agrega interesse aos resultados obtidos e mostra uma face pouco explorada dos efeitos que este quimioterápico produz na fisiologia vascular.

## 8 REFERÊNCIAS

ARUNKUMAR, P. A.; MUKUND, H.; RADHESHYAM, N.; BELLİYAPPA, M. S. Clinical Evaluation of Cisplatin Induced Nephrotoxicity Characterized By Electrolyte Disturbances. **Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**. v. 1, n. 4, p. 100 - 104, 2011.

BOSTON UNIVERSITY: **Acclimation of Rodents**. BU IACUC. Jun., 2009. Disponível em: <<http://www.bu.edu/orccommittees/iacuc/policies-and-guidelines/acclimation-of-rodents/>>. Acesso em: 01 Ago. 2014.

CIARIMBOLI, G. Membrane Transporters as Mediators of Cisplatin Effects and Side Effects. **Scientifica**. v. 2012, p. 1-18, 2012.

CRUL, M. J.; SCHELLENS, H. M.; BEIJNENT, J. H.; MALIEPAARD, M. Cisplatin resistance and DNA repair. **Cancer Treatment Reviews**. v. 23, p. 341-366, 1997.

CUMMINGS, B. S.; SCHNELLMANN, R. G. Cisplatin-Induced Renal Cell Apoptosis: Caspase 3-Dependent and -Independent Pathways. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 302, n. 1, p. 8–17, 2002.

DESOIZE, B.; MADOULET, C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 42, p. 317– 325, 2002.

ERDLENBRUCH, B.; NIER, M.; KERN, W.; HIDDEMANN, W.; PEKRUN, A.; LAKOMEK, M. Pharmacokinetics of cisplatin and relation to nephrotoxicity in paediatric patients. **European Journal of Clinical Pharmacology**. v. 57, n. 5, p. 393-402, 2001.

GUERRA, M. (Ed.); SOUZA, M.J. de (Ed.) Como observar cromossomos mitóticos humanos e de pequenos mamíferos. In: **Como observar cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana**. 1ª. Ed. São Paulo: FUNPEC, 2002. Capítulo 9, p. 89 - 99.

HANADA, K.; NINOMIYA, K.; OGATA, H. Pharmacokinetics and Toxicodynamics of Cisplatin and Its Metabolites in Rats: Relationship between Renal Handling and Nephrotoxicity of Cisplatin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 52, p. 1345 - 1353, 2000.

HANIGAN, M. H., DEVARAJAN, P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. **Cancer Therapy**. v. 1, p. 47-61, 2003.

HSU, S-C.; MILLER, S. A.; WANG, Y.; HUNG, M-C. Nuclear EGFR is required for cisplatin resistance and DNA repair. **American Journal of Translational Research**. v.1, n. 3, p. 249-258, 2009.

KAUSHAL, G. P.; KAUSHAL, V.; HONG, X.; SHAH, S.V. Role and regulation of activation of caspases in cisplatininduced injury to renal tubular epithelial cells. **Kidney International**. v. 60, p. 1726–1736, 2001.

KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Descrição de um novo método de ooforectomia em ratas. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 52, n. 3, p. 462-470, 2012.

LAU, A.H. Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxic injury. **Kidney International**. v. 56, p. 1295–1298, 1999.

LEBWOHL, D.; CANETTA, R. Clinical Development of Platinum Complexes in Cancer Therapy: an Historical Perspective and an Update. **European Journal of Cancer**. v. 34, n. 10, p. 1522-1534, 1998.

MELLO, J. A.; LIPPARD, S. J.; ESSIGMANN, J. M. DNA Adducts of cis-Diamminedichloroplatinum (II) and Its Trans Isomer Inhibit RNA Polymerase Differentially *in vivo*. **Biochemistry**. v. 34, p. 14783 - 14791, 1995.

MILLER, R.P.; TADAGAVADI, R.K.; RAMESH, G.; REEVES, W.B. Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. **Toxins**. v. 2, p. 2490-2518, 2010.

MINAMI, H.; OHE, Y.; NIHO, S.; GOTO, K.; OHMATSU, H.; KUBOTA, K.; KAKINUMA, R.; NISHIWAKI, Y.; NOKIHARA, H.; SEKINE, I.; SAIJO, N.; HANADA, K.; OGATA, H. Comparison of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Docetaxel and Cisplatin in Elderly and Non-Elderly Patients: Why Is Toxicity Increased in Elderly Patients? **Journal of Clinical Oncology**. v. 22, p.2901-2908, 2004.

NASRI, H. Cisplatin and renal injury; current concepts. **Journal of Renal Injury Prevention**. v. 2, n. 3, p. 89 – 90, 2013a.

NASRI, H. Cisplatin therapy and the problem of gender-related nephrotoxicity. **Journal of Nephro pharmacology**. v. 2, n. 2, p. 7–8, 2013b.

OLIVER, T.G.; MERCER, K. L.; SAYLES, L.C.; BURKE, J.R.; MENDUS, D.; LOVEJOY, K.S.; CHENG, M-H.; SUBRAMANIAN, A.; MU, D.; POWERS, S.; CROWLEY, D.; BRONSON, R. T.; WHITTAKER, C. A.; BHUTKAR, A.; LIPPARD, S. J.; GOLUB, T.; THOMALE, J.; JACKS, T.; SWEET-CORDERO, E. A. Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. **Genes & Development**. 24: 837-852, 2010.

PRESTAYKO, A. W., D'AOUST, J. C.; ISSELI, B. F.; CROOKE, S. T. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). **Cancer Treatment Reviews**. v. 6, p. 17-39, 1979.

REBILLARD, A.; LAGADIC-GOSSMANN, D.; DIMANCHE-BOITREL, M.T. Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets. **Current Medical Chemistry**. v. 15, n. 26, p. 2656 - 2663, 2008.

REED, E.; OZOLS, R. F.; TARONE, R.; YUSPA, S. H.; POIRIER, M. C. Platinum-DNA adducts in leukocyte DNA correlate with disease response in ovarian cancer patients receiving platinum-based chemotherapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 84, p. 5024-5028, 1987.

SUO, Z.; LIPPARD, S. J.; JOHNSON, K. A. Single d(GpG) /cis-Diammineplatinum(II) Adduct-Induced Inhibition of DNA Polymerization. **Biochemistry**. v. 38, p. 715-726, 1999.

SZYMKOWSKI, D. E.; YAREMA, K.; ESSIGMANN, J. M.; LIPPARD, S. J.; WOOD, R. D. An intrastrand d(GpG) platinum crosslink in duplex M13 DNA is refractory to repair by human cell extracts (dsplatin/DNA repair/DNA polymerase). **Biochemistry**. v. 89, p. 10772-10776, 1992.

URIEN, S.; BRAIN, E.; BUGAT, R.; PIVOT, X.; LOCHON, I.; VO VAN, M-L.; VAUZELLE, F.; LOKIEC, F. Pharmacokinetics of platinum after oral or intravenous cisplatin:a phase 1 study in 32 adult patients. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**. v. 55, p. 55–60, 2005.

WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 4, p. 307 – 320, 2005.

WEIDEMANN, A.; BERNHARDT, W.M.; KLANKE, B.; DANIEL, C.; BUCHHOLZ, B.; CÂMPEAN, V.; AMANN, K.; WARNECKE, C.; WIESENER, M. S.; ECKARDT, K-U.; WILLAM, C. HIF Activation Protects From Acute Kidney Injury. **Journal of American Society of Nephrology**. v.19, p. 486 – 494, 2008.

YAO, X.; PANICHPIHAL, K.; KURTZMAN, N.; NUGENT, K. Cisplatin Nephrotoxicity: A Review. **The American Journal of the Medical Science**. v. 334, n.2, p.115-124, 2007.