

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

RENATA ALBUQUERQUE DE ABRANTES

**TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DO TONANTZITLOLONE B, UM
DITERPENO DE *Stillingia loranthaceae* (EUPHORBIACEAE)**

João Pessoa-PB

2018

RENATA ALBUQUERQUE DE ABRANTES

**TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DO TONANTZITLOLONE B, UM
DITERPENO DE *Stillingia loranthaceae* (EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

**João Pessoa – PB
2018**

A161t Abrantes, Renata Albuquerque de.

TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DO TONANTZITLOLONE
B, UM DITERPENO DE *Stillingia loranthaceae*
(EUPHORBIACEAE) / Renata Albuquerque de Abrantes. -
João Pessoa, 2018.

90 f. : il.

Orientação: Marianna Vieira Sobral Sobral.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Diterpenos. 2. Carcinoma ascítico de Ehrlich. 3.
Atividade antioxidante. 4. Efeito antiangiogênico. I.
Sobral, Marianna Vieira Sobral. II. Título.


UFPB/BC

RENATA ALBUQUERQUE DE ABRANTES

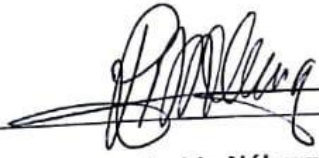
TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DO TONANTZITLOLONE B, UM
DITERPENÓ DE *Stillingia loranthaceae* (EUPHORBIACEAE)

APROVADA EM / /2018

COMISSÃO EXAMINADORA


Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral
(Orientadora - UFPB)

Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos
(Examinador Externo - UFPB)


Profa. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
(Examinador Interno - UFPB)

Aos meus pais **Leonor do Nascimento Albuquerque** e **Francisco Azul
Gonçalves de Abrantes**, pelos ensinamentos, dignidade, perseverança e amor.
Por não medirem esforços para a minha formação profissional e estímulo diário.

Por eles e para eles.

AGRADECIMENTOS

Deus, pelo olhar sobre mim, por nunca me abandonar, sempre me dar forças para perseverar em todos os momentos, principalmente os mais difíceis, por me colocar em seu colo e me aquecer com todo seu amor em todos os momentos. Obrigada por todo amor, pai!

Aos meus pais, **Francisco Azulil Gonçalves de Abrantes** e **Leonôr do Nascimento Albuquerque** por tudo que me ensinaram, por ter me dado tudo, por acreditarem em mim e sempre me apoiar. Não esquecerei de todos os esforços feitos por vocês para realizar meus sonhos e ver a minha vitória. Obrigada mainha, por todas as palavras de conforto, por transmitir a sua fé inabalável, fazendo com que eu sempre acredite nos planos de Deus, e por abrir mão de muita coisa por mim. Obrigada painho, pelo carinho de sempre, pelos conselhos, por nunca ter medido esforços para me dar algo e por ser um exemplo de pessoa pra mim, desconheço alguém com tamanho caráter. Amo muito vocês!

Ao meu irmão, **Lívio Albuquerque de Abrantes** por sempre me ajudar nos momentos em que eu precisei, pelo apoio, carinho e torcida sempre. Te amo maninho!

Aos meus tios, tias, primos e primas que sempre torceram por mim, por sempre estarem presentes nos meus melhores momentos e demonstrar um carinho imenso por mim, isso foi fundamental durante esta caminhada. Eu amo vocês!

À minha orientadora e mãe científica **Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral** a “nona topíssima”, pela oportunidade, por toda paciência, por estar disponível quando precisei e sempre ter acreditado em mim. Agradeço por cada conselho, cada palavra de conforto, por todos os ensinamentos (tanto para vida como para a carreira científica), você é um exemplo de profissional e ser humano, me espelho em você.

À minha querida amiga **Tatianne Mota Batista** por todo o apoio, ajuda e paciência nos momentos que mais precisei. És uma pessoa que admiro muito pela sua determinação, força e coragem de enfrentar todos os obstáculos da vida pra conseguir o que quer. Isso é motivador para qualquer pessoa que convive com a tua amizade!

Ao meu “pai científico”, **João Carlos Pita**, por ter me dado a oportunidade de aprender e de conviver, com ele, o que realmente é fazer pesquisa, por fazer com que eu goste cada vez mais da minha profissão. Agradeço ainda, por todas as vezes que precisei e sempre me ajudou, por toda paciência ao me ensi

minhas dúvidas. Você é um exemplo de pessoa e profissional, parte da minha formação eu devo a você.

Thaís Leite Rolim pelo apoio, por sempre me ajudar nas horas em que mais precisei, por ter me guiado durante a graduação, por ter me incentivado a entrar na pesquisa e ter compartilhado os seus conhecimentos. E ainda a minha afilhada **Lara Rolim**, pela sua alegria a cada encontro, pelo carinho e por me ensinar um dos amores mais lindos e puros dessa vida. Amo vocês!

À minha amiga de infância e de graduação, **Fiana Ferreira**, pelo seu companheirismo constante, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos desta caminhada, por sempre cuidar e se preocupar comigo. Deus me deu uma irmã para superar a ausência e a saudade da família durante esses anos, e Ele não poderia ter me dado uma irmã melhor. Amo você, amiga!

Aos amigos do laboratório de Oncofarmacologia **Ana Paula, Rafael, Ana Luiza, Jephesson, Sâmia, Thaís, Ana Luisa, Francisco, Daiana e Valgrácia** pela ajuda, torcida e apoio sempre que precisei. Em especial as “doutorinhas” **Tatianne Mota, Tatyanna Kelvia, Vivianne Manguiera e Ryldene Duarte** pela ajuda de sempre, companhia agradabilíssima, por cada risada, pelo apoio, torcida e sempre me fazerem bem. Vocês foram um presente de Deus!

Aos “topíssimos”, **José Lucas, Filipe Rodolfo, Fernando Neto, Jessyca Pinheiro, Lyvia Layanne, Hídna Cunha e Fiana Ferreira** pela amizade, companheirismo e torcida. Pelos momentos bons e difíceis que passamos juntos (que só fortaleceu nossa amizade). Vocês foram essenciais nesta caminhada.

À minha família **Oceanjos**, por todas as orações, pelo cuidado, apoio e mensagens de carinho a todo momento, me dando forças para continuar nessa caminhada. Vocês são muito importantes pra mim e foram fundamentais para que eu conseguisse enfrentar cada batalha. Amo vocês!

À **minha turma do mestrado**, que acompanhou minha trajetória para conclusão desse trabalho. Obrigada pela força, por estarem sempre dispostos a ajudar e nunca me deixar ser vencida pelo cansaço. Agradeço por cada palavra de conforto e pelos momentos de alegrias e muitas risadas. Juntos fomos/seremos mais vôlei top!

Ao professor **Dr. Sócrates Golzio**, por todo o incentivo de sempre, desde quando era IC, por ter me ajudado sempre que precisei e por aceitar participar da avaliação desse trabalho.

Ao professor **Dr. Reinaldo Nóbrega** pela contribuição nesse trabalho e por estar sempre disposto a nos ajudar quando precisamos.

Ao professor **Dr. Josean Fechine**, pela amizade, por ter estado sempre à disposição nos momentos em que precisei. Você é topissimo!

Ao doutorando **Lucas Abreu**, pela sua amizade, estar sempre disponível além da colaboração no fornecimento do material.

À todos os **professores do PPgPNSB**, pelos ensinamentos e por ter contribuído para a minha formação.

Ao funcionário e amigo, **Seu Josué e Seu Eliseu** pelo carinho e sempre estar dispostos a ajudar.

Ao meu “garotinho” **Crispim**, pela sua amizade e por todo carinho e atenção em sempre estar disposto a ajudar.

A **Universidade Federal da Paraíba**, pelo desenvolvimento na minha carreira profissional.

Ao **Cnpq**, pelo apoio financeiro.

E a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desse sonho.

Obrigada!!!

RENATA ALBUQUERQUE DE ABRANTES

“Acredite e não se explique
pois poucos vão entender:
só se compreende um sonho
se o sonhador for você.
Há quem possa lhe animar,
há quem possa duvidar,
há quem lhe faça seguir.
Mas não descuide um segundo
pois muita gente no mundo
quer lhe fazer desistir.

Acredite, pense e faça,
use sua intuição,
transforme sonho em suor,
pensamento em ação.
Enfrente cada batalha
sabendo que a gente falha
e que isso é natural
cair pra se levantar,
aprender pra ensinar
que o bem é maior que o mal.”

Bráulio Bessa

ABRANTES, R.A. **TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DO TONANTZITLOLONE B, UM DITERPENOS DE *STILLINGIA LORANTHACEAE* (EUPHORBIACEAE).** 2018. 95f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB / CCS, João Pessoa

RESUMO

Produtos naturais representam uma rica fonte de compostos bioativos para o tratamento de diversas doenças. Entre os produtos naturais com potencial antitumoral destacam-se os diterpenos, metabólitos secundários da classe dos terpenoides que apresentam 20 átomos de carbono em sua estrutura. Tonantzitlolone B (TNZ-B) é um diterpeno raro da classe dos flexibilenos que apresenta relatos de atividade antitumoral *in vitro* em diferentes linhagens celulares. Todavia, não há dados na literatura relacionados à sua toxicidade e atividade antitumoral *in vivo*. Sendo assim, o presente trabalho objetivou avaliar a toxicidade e o potencial antitumoral *in vivo* de TNZ-B em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE), bem como investigar possíveis mecanismos de ação envolvidos nesse efeito. Inicialmente foi avaliada a toxicidade pré-clínica aguda de TNZ-B em camundongos por via intraperitoneal (i.p.). A DL50 (dose letal 50%) foi estimada em 25 mg/kg, considerando o Guia n. 423 da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), o que indica alta toxicidade. Ainda, na triagem farmacológica comportamental, foram observados poucos efeitos induzidos pelo TNZ-B, como contorções abdominais e perda do reflexo corneal e auricular, que desapareceram logo após o tratamento. O teste do micronúcleo foi usado para a avaliação da genotoxicidade de TNZ-B. Foi observado que este diterpeno (3,0 ou 6,0 mg/kg, i.p.) não induziu aumento no número de eritrócitos micronucleados, sugerindo baixa genotoxicidade. Em modelo de CAE observou-se que TNZ-B (1,5 ou 3,0 mg/kg, i.p., sete dias consecutivos de tratamento) reduziu os parâmetros volume do tumor, massa tumoral e a quantidade total de células tumorais ($p < 0,05$). Para estudar o mecanismo de ação antitumoral de TNZ-B, foram avaliados os efeitos antiangiogênicos e antioxidantes. TNZ-B (3 mg/kg) reduziu a microdensidade dos vasos no peritônio dos animais ($p < 0,05$), o que sugere ação antiangiogênica. Em seguida, considerando o vasto papel do estresse oxidativo na propagação de tumores, foi avaliado o efeito de TNZ-B por meio do ensaio fluorimétrico com o 2'-7-dichlorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Observou-se redução do nível de estresse oxidativo ($p < 0,05$) após tratamento com TNZ-B (3,0 mg/kg), o que sugere efeitos antioxidantes. Ainda, foi detectado que TNZ-B (3,0 mg/kg) promoveu redução da produção de óxido nítrico (NO) ($p < 0,05$), um mediador chave envolvido em processos de crescimento, angiogênese e metástase tumoral. Para avaliação da toxicidade em animais transplantados com CAE submetidos a sete dias de tratamento com TNZ-B (3,0 mg/kg, i.p.) foram avaliados parâmetros bioquímicos e hematológicos. Observou-se apenas redução da contagem de eritrócitos, indicando que TNZ-B possui baixa toxicidade bioquímica e hematológica. Por outro lado, TNZ-B induziu aumento nos índices dos órgãos fígado, baço, rins e coração, o que deve ser melhor avaliado por meio de análise histopatológica. Os dados apresentados, em conjunto, sugerem que TNZ-B possui atividade antitumoral por exercer ação antiangiogênica via modulação do estresse oxidativo e redução dos níveis de óxido nítrico.

Palavras-chave: Diterpenos, Carcinoma ascítico de Ehrlich, Efeito antiangiogênico, Atividade antioxidante.

ABRANTES, R.A. **TOXICITY AND ANTITUMORAL POTENTIAL OF TONANTZITLOLONE B, A DITERPENE OF *STILLINGIA LORANTHACEAE* (EUPHORBIACEAE)**. 2018. 96f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB / CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Natural products represent a rich source of bioactive compounds for the treatment of various diseases. Among the natural products with antitumor potential are diterpenes, secondary metabolites of the terpenoid class which have 20 carbon atoms in their structure. Tonantzitlolone B (TNZ-B) is a rare diterpene of the class of flexibilenes that presents reports of antitumor activity in vitro in different cell lines. However, there is no evidence in the literature regarding its toxicity and antitumor activity in vivo. Thus, the present work aimed to evaluate the toxicity and antitumor potential in vivo of TNZ-B in the Ehrlich ascitic carcinoma (CAE) model, as well as to investigate possible mechanisms of action involved in this effect. Initially, the acute pre-clinical toxicity of TNZ-B in mice was evaluated intraperitoneally (i.p.). LD50 (50% lethal dose) was estimated at 25 mg / kg, considering Guide n. 423 from the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), which indicates high toxicity. Also, in behavioral pharmacological screening, few TNZ-B-induced effects were observed, such as abdominal writhing and loss of corneal and atrial reflex, which disappeared shortly after treatment. The micronucleus test was used to evaluate the genotoxicity of TNZ-B. It was observed that this diterpene (3.0 or 6.0 mg / kg, i.p.) did not induce an increase in the number of micronucleated erythrocytes, suggesting low genotoxicity. In the CAE model, TNZ-B (1.5 or 3.0 mg / kg, ip, seven consecutive days of treatment) was found to reduce tumor volume, tumor mass and total tumor cell parameters ($p < 0.05$). To study the mechanism of antitumor action of TNZ-B, the antiangiogenic and antioxidant effects were evaluated. TNZ-B (3 mg / kg) reduced the microdensity of the vessels in the peritoneum of the animals ($p < 0.05$), which suggests antiangiogenic action. Then, considering the vast role of oxidative stress in tumor propagation, the effect of TNZ-B was assessed by means of the fluorometric test with the 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). A reduction in oxidative stress level ($p < 0.05$) was observed after treatment with TNZ-B (3.0 mg / kg), suggesting antioxidant effects. In addition, TNZ-B (3.0 mg / kg) was shown to reduce nitric oxide (NO) production ($p < 0.05$), a key mediator involved in growth, angiogenesis and tumor metastasis. In the evaluation of toxicity in CAE transplanted animals submitted to seven days of treatment with TNZ-B (3.0 mg / kg, i.p.), only a reduction of red blood cell count was observed, indicating that TNZ-B has low biochemical and hematological toxicity. On the other hand, TNZ-B induced an increase in the indexes of the liver, spleen, kidneys and heart, which should be better evaluated through histopathological analysis. The data presented, together, suggest that TNZ-B has antitumor activity by exerting antiangiogenic action through modulation of oxidative stress and reduction of nitric oxide levels.

Keywords: Diterpenes, Ehrlich ascitic carcinoma, Antiangiogenic effect, Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira estimados para 2018-2019, exceto câncer de pele não melanoma.....	24
Figura 2. Características biológicas do câncer.....	26
Figura 3. Terapia alvo direcionada à família do receptor do fator de crescimento epidérmico.....	28
Figura 4. Equilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante.....	34
Figura 5. Estrutura química do Tonatiztlolone B.....	41
Figura 6. Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral de TNZ-B.....	46
Figura 7. Efeitos da administração aguda de TNZ-B em camundongos.....	54
Figura 8. Número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com TNZ-B (3,0 mg/kg e 6,0 mg/kg) e ciclofosfamida (50 mg/kg), por via intraperitoneal.....	55
Figura 9. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com TNZ-B* (1,5 ou 3 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	57
Figura 10. Efeito do tratamento com TNZ-B* (3,0 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	58

Figura 11. Efeito do tratamento de sete dias com TNZ-B (3 mg/kg, i.p) na produção de espécies reativas de oxigenio (ROS) em modelo de tumor de Ehrlich.....	59
Figura 12. Efeito do tratamento de sete dias com TNZ-B (3,0 mg/kg, i.p) e e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) na produção de nitrito no fluido peritoneal de camundongos transplantedos com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	59
Figura 13. Efeito do tratamento de sete dias com TNZ-B* (3,0 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) no consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos transplantedos com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	61
Figura 14. Efeito do tratamento de sete dias com TNZ-B* (3,0 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantedos com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	61
Figura 15. Efeito do tratamento de sete dias com TNZ-B * (3,0 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantedos com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	62
Figura 16. Índices dos órgãos de camundongos transplantedos com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias com TNZ-B* (3,0 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.).....	63

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU - 5-fluorouracil

ALT - Alanina aminotransferase

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST - Aspartato aminotransferase

CAE- Carcinoma Ascítico de Ehrlich

CDK- Cinases Dependentes de Ciclina

CEUA – Comissão de Ética em Uso de Animais

CHCM - Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EGFR- Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

ERK- Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares

FDA- *Food and Drug Administration*

FITC - Isotiocianato de Fluoresceína

FHIT- Tríade de Histidina Frágil

HCM - Hemoglobina Corpuscular Média

HE - Hematoxilina-eosina

IARC- Agência Internacional para Pesquisa em Câncer

INCA - Instituto Nacional do Câncer

MoAbs- Anticorpos Monoclonais

NCI- Instituto Nacional do Câncer

OECD- Guidelines for Testing of Chemicals

OMS - Organização Mundial de Saúde

Oncofar- Laboratório de Oncofarmacologia

PBS - Solução Tampão Fosfato

PDGF- Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PPgPNSB - Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

Rb- Retinoblastoma

SBF - Soro Bovino Fetal

SNA - Sistema Nervoso Autônomo

SNC - Sistema Nervoso Central

SDS - Docecil Sulfato de Sódio

TGF- β - Fator de Crescimento Tumoral- β

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

VCM - Volume Corpuscular Médio

VEGF- Fator de Crescimento de Endotélio Vascular

v/v - volume/volume

M/T – morte/tratado

TNZ-A - Tonantzitlolone A

TNZ-B – Tonantzitlolone B

i.p – intraperitoneal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1 Aspectos gerais do câncer.....	22
2.2 Angiogênese e estresse oxidativo no câncer.....	30
2.3 Tonantzitlolone B (TNZ-B).....	35
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 MATERIAL	40
4.1 Local da pesquisa	40
4.2 Tonantzitlolone B.....	40
4.3 Animais e condições experimentais.....	41
4.4 Linhagem tumoral	42
4.5 Reagentes.....	42
4.6 Equipamentos.....	42
5 MÉTODOS	45
5.1 Estudos toxicológicos.....	46
5.1.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda	46
5.1.2 Avaliação da Genotoxicidade.....	46
5.2 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich.....	47
5.2.1 Investigação do mecanismo de ação antitumoral.....	48
5.2.1.1 Avaliação do efeito antiangiogênico.....	48
5.2.1.2 Avaliação do estresse oxidativo.....	48
5.2.1.2.1 Ensaio do DCFH.....	48
5.2.1.2.2 Quantificação dos níveis de nitrito.....	49
5.2.2 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de Carcinoma Ascítico de Ehrlich.....	50
5.2.2.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração	50
5.2.2.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos	50
5.2.2.3 Avaliação dos índices dos órgãos	51
5.3 Análise estatística	51

6 RESULTADOS	52
6.1 Estudos de toxicidade.....	53
6.1.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda	53
6.1.2 Avaliação da Genotoxicidade.....	54
6.2 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.....	54
6.2.1 Investigação do mecanismo de ação.....	56
6.2.1.1 Avaliação do efeito antiangiogênico.....	57
6.2.1.2 Avaliação do estresse oxidativo.....	58
6.2.1.2.1 Ensaio do DCFH.....	58
6.2.1.2.2 Quantificação dos níveis de nitrito.....	59
6.2.2 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE)	59
6.2.2.1 Avaliação ponderal e consumo de água e de ração	59
6.2.2.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos	60
6.2.2.3 Avaliação dos índices dos órgãos	63
7 DISCUSSÃO	65
8 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	77
ANEXOS	90

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um importante problema de saúde pública em nível mundial, caracterizado pelo crescimento descontrolado e multiplicação de células transformadas que podem invadir diversos tecidos (KASALA et al., 2015). A carcinogênese é um processo de várias etapas que se inicia com a transformação das células saudáveis em cancerosas, progride com hiperproliferação e culmina na aquisição de propriedades angiogênicas, potencial invasivo, e estabelecimento de lesões metastáticas (SINGH, 2013).

Do ponto de vista epidemiológico, o risco de câncer foi estimado em um a cada 20 indivíduos (5%), o que estaria relacionado à própria taxa da doença considerada hereditária/genética ou inata, em 1900. Atualmente, estima-se que 33% das mulheres e 50% dos homens desenvolva câncer durante a sua vida. Ou seja, apesar de diversos avanços tecnológicos para a detecção e a descoberta de novas terapias, as novas gerações estão cada vez mais doentes do que as gerações anteriores na mesma idade (KHATAMI, 2018). Frente às estimativas sobre a incidência e aos crescentes índices de mortalidade causada por neoplasias em nível global, torna-se necessária a aplicação de medidas preventivas à população em relação aos fatores de risco cancerígeno (uso de tabaco e álcool, hábitos alimentares inadequados, obesidade, agentes infecciosos, radiação ultravioleta e exposições ocupacionais) (INCA, 2018).

Em relação ao tratamento, os métodos mais utilizados são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, este último ainda representando o eixo principal da terapia. Além dos problemas de baixa efetividade, os fármacos antineoplásicos normalmente produzem efeitos secundários graves, que ocorrem devido à sua baixa especificidade (SAFARZADEH et al., 2014).

Então, para minimizar os índices de morbidade e mortalidade associadas ao câncer, torna-se imprescindível a busca por novas opções de tratamento antineoplásico, dirigido essencialmente às células malignas, com o objetivo de promover efeitos menos agressivos ao indivíduo acometido com a doença (MARTINS, 2014).

Os produtos naturais são elementos funcionais com diversas atividades biológicas, dentre eles pode-se citar, as plantas. Existem mais de 250.000 espécies de plantas e, a cada ano, 4.000 novos produtos naturais são descobertos. De fato, muitos dos

quimioterápicos utilizados hoje em dia são derivados de produtos naturais isolados de origem vegetal, como alcalóides, flavonóides e terpenos (HASANPOURGHADI et al., 2016).

Os compostos naturais derivados de plantas, como os clássicos exemplos vincristina, vimblastina, etoposídeo, paclitaxel, topotecano e irinotecano são utilizados para o tratamento de diversos tipos de câncer (HUA et al., 2017). Assim, cada vez mais, medicamentos obtidos a partir de produtos naturais, de origem vegetal, têm sido analisados em relação ao seu potencial anticâncer.

Dentre as subclasses de produtos naturais com relatos de atividade antitumoral destacam-se os diterpenos, metabólitos secundários da classe dos terpenóides que apresentam 20 átomos de carbono em sua estrutura, correspondendo a quatro unidades de isopreno (CEBORSKA, 2017; ROZIMAMAT; HU; AISA, 2018). Vários tipos de diterpenos são descritos na literatura, tais como, labdano, atisano, traquilobano, tigliano, entre outros (JIAN; ZHANG; LIU, 2018). Diterpenos do tipo flexibilano são raros na natureza e, portanto, pouco descritos na literatura. Dentre estes, pode-se citar os diterpenos tonantzitlolone A (TNZ-A) e seu enantiômero tonantzitlolone B (TNZ-B), isolados da espécie *Stillingia loranthaceae* (Euphorbiaceae). Esses compostos apresentam atividade citostática e citotóxica em linhagens de células tumorais (PFEFFER, et al., 2016; SOURBIER, et al., 2015), todavia, não há descrição na literatura em relação ao seu perfil de toxicidade e atividade antitumoral *in vivo*.

Então, reconhecendo a importância do estudo dos produtos naturais na descoberta de novas drogas, bem como a relevância dos diterpenos nesse contexto, o presente trabalho objetiva contribuir para a pesquisa científica no que se refere à investigação do potencial farmacológico do Tonantzitlolone B, avaliando, por meio de ensaios *in vivo*, sua toxicidade e atividade antitumoral, bem como mecanismos de ação associados a esse efeito.

FUNDAMENTAÇÃO
TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer

Câncer é a denominação utilizada para caracterizar doenças malignas resultantes de modificações genéticas (HASANPOURGHADI et al., 2017) e/ou alterações epigenéticas, que culminam com o crescimento celular descontrolado e com um transtorno proliferativo levando a formação de tumores (ROSENQUIST; ESTELLER; PLASS, 2017). De acordo com suas características histológicas e comportamento biológico, os tumores podem ser classificados em benignos ou malignos.

Os tumores benignos são formados por uma massa celular localizada, envoltos por uma cápsula, apresentam crescimento lento, se assemelham ao seu tecido original e dificilmente causam risco de vida. Já nos tumores malignos, o crescimento é rápido e descontrolado, não ocorre formação da cápsula fibrosa, tornando-o invasivo, o que leva à formação de metástases, estreitamente relacionada com o aumento do risco de vida ao indivíduo (POLO et al., 2017). Essas células apresentam características marcadas pela sua capacidade de se diferenciar das células saudáveis do tecido de origem, por sofrer mutações somáticas, alterar sua rede transcricional de diversas formas e sofrer influências do microambiente local do tecido (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2016).

A transformação de células saudáveis em células cancerígenas leva a mudanças na arquitetura dos tecidos, o que promove a ativação de resposta imune para a eliminação do tumor (HILBIG et al., 2017). No entanto, as células transformadas escapam destas respostas por apresentarem alterações em sinais moleculares que ativam os processos de morte celular. Assim, a proliferação celular descontrolada e a resistência à morte celular causada pela alteração desses sinais geralmente resultam na formação do tumor maligno, chamado de câncer (SILVA et al., 2017).

Sendo assim, o câncer é considerado um grupo de doenças caracterizadas por um transtorno proliferativo e crescimento celular descontrolado (HANAHAN E WEINBERG, 2011; HILBIG et al, 2017). Trata-se de um conjunto de doenças que se distinguem em mais de 200 tipos devido a sua grande diversidade celular (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2016). Em consequência, o câncer possui diferentes denominações de acordo com o tecido de origem. Dentre estes podem ser citados os sarcomas, tumores originados por células de tecido conjuntivo (POLO et al., 2017), os


carcinomas que são tumores formados por células de tecido epitelial, quando o tecido é epitelial glandular o carcinoma recebe o termo adenocarcinoma (FARAJI; EISELE; FAKHRY, 2016) além de linfomas, um tipo de tumor formado a partir dos linfonodos que apresenta alto risco de disseminação linfática (GONZÁLEZ et al., 2017), e leucemias, causadas por uma transformação das células hematopoiéticas saudáveis em uma neoplasia maligna na medula óssea prejudicando a produção dos glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas (STUBBS; KRIVTSOV, 2017).

O câncer permanece como a principal causa de morte em países economicamente desenvolvidos e em desenvolvimento. Em 2012, os casos de câncer atingiram cerca de 14 milhões de pessoas no mundo e havia 8,2 milhões de mortes estimadas (JIA et al., 2017). Tendências demográficas, incluindo o crescimento populacional, aumento da expectativa de vida e estilos de vida exagerados, devido ao desenvolvimento econômico, serão os principais impulsionadores de um aumento contínuo do número de casos dessa doença. De acordo com estatísticas globais, mais de 20 milhões de pessoas serão diagnosticadas com câncer em 2025 (SLEIRE, 2017).

Estima-se para o Brasil, biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil casos novos de câncer (Figura 1). O cálculo global corrigido para o sub-registro aponta a ocorrência de 640 mil casos novos (MATHERS et al., 2017).

Em média os homens têm 77% mais chances de desenvolver câncer do que as mulheres e a probabilidade de um homem morrer de câncer é 85% maior do que entre as mulheres. Não existe razão biológica, isso acontece porque os homens se expõem mais aos fatores de risco da doença, como tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, obesidade, dieta desequilibrada e sedentarismo. Outro fator que contribui é a falta de prevenção dos homens (Figura 1) (JEIHOONI; DINDARLOO; HARSINI, 2018).

Figura 1. Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira estimados para 2018-2019, exceto câncer de pele não melanoma.

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	 <p>Homens Mulheres</p>	Mama Feminina	59.700	29,5%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%		Cólon e Reto	18.980	9,4%	
Cólon e Reto	17.380	8,1%		Colo do Útero	16.370	8,1%	
Estômago	13.540	6,3%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%	
Cavidade Oral	11.200	5,2%		Glândula Tireoide	8.040	4,0%	
Esôfago	8.240	3,8%		Estômago	7.750	3,8%	
Bexiga	6.690	3,1%		Corpo do Útero	6.600	3,3%	
Laringe	6.390	3,0%		Ovário	6.150	3,0%	
Leucemias	5.940	2,8%		Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%	
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%		Leucemias	4.860	2,4%	

Fonte: INCA, 2018

Em relação aos mecanismos de carcinogênese, ou seja, de formação do câncer, estes podem se dividir em três etapas: iniciação, promoção e progressão. A iniciação é o processo em que as células sofrem alterações, modificando a expressão de genes de células saudáveis para se transformarem em células mutadas (malignas). Na fase de promoção, as células com características malignas, recebem estímulos de diversos fatores que estimulam o crescimento e a divisão desregulada dessas células levando a formação do tumor primário. Em seguida ocorre a progressão, resultado de alterações em uma rede de proteínas intra e extracelulares que regulam a progressão da célula através das diferentes fases do ciclo celular, favorecem a proliferação podendo levar a disseminação do tumor para tecidos distantes através de mecanismos de invasão e metástase (FISHER et al., 2017; SAIT et al., 2015).

No contexto da carcinogênese, pode-se dizer que o desenvolvimento do câncer envolve a desregulação de processos de sinalização celular em consequência de mutações genéticas, alterações epigenéticas e fatores ambientais, dentre estes, tabagismo, hábitos alimentares e alcoolismo. Comumente, essas alterações surgem e se acumulam como resultado da exposição a agentes cancerígenos ambientais, enquanto que raros cânceres surgem como resultado de uma mutação hereditária. (GOWSHALL; TAYLOR-ROBINSON, 2018). Nesse sentido, é amplamente aceito que a maioria dos cânceres surge por meio de uma série complexa de interações entre genes ("natureza") e o meio ambiente ("educação"). Estima-se que 95% dos cânceres são explicados pelo meio ambiente que interage com genes e os 5% restantes dos cânceres são explicados pela hereditariedade (HYNDMAN, 2016).

Do ponto de vista molecular, as alterações genéticas e epigenéticas envolvidas no processo de carcinogênese levam à ativação de diferentes tipos de oncogenes e à inativação de genes supressores de tumores, o que inicia e sustenta o desenvolvimento tumoral (SHANMUGAM et al., 2018).

Há um número crescente de evidências ligando oncogenes à indução de neoplasias malignas. Esses genes são códigos para proteínas que determinam a proliferação e diferenciação celular (HASANPOURGHADI et al., 2017). Modulações nesses oncogenes levam ao aumento da expressão de sinais contribuindo para o fenótipo tumorigênico, produzindo um grande número de proteínas que favorecem o crescimento celular e inibem a apoptose (CUI et al., 2017).

Exemplos de oncogenes incluem àqueles que codificam as proteínas RAS/RAF/MEK/ERK, STAT, NF- κ B, c-JUN e FOXM1, que participam de importantes vias de sinalização que regulam diversas funções celulares, incluindo proliferação celular, sobrevivência, diferenciação e migração. No câncer, essas oncoproteínas são alvos frequentes de mutações que induzem sua superexpressão e conseqüentemente o mau funcionamento dessas vias de sinalização, o que culmina em desregulação das funções celulares (ZOU et al., 2017; EI-MAGD et al., 2017).

Por outro lado, diversos genes atuam como genes supressores de tumor, como exemplo, os supressores de tumor p53 e p16. A redução da expressão de genes supressores de tumor pode também desregular fatores relacionados ao controle do ciclo celular, apoptose, migração e diferenciação celular o que está associado com as características clínico patológicas e a progressão do câncer (BEDIR et al., 2016; MENZIES et al., 2015; HAN et al., 2016).

As células cancerígenas são reconhecidas por apresentarem uma série de características específicas que as diferem das células normais, como: instabilidade do genoma, sinalização autossustentada para proliferação celular, não responsividade a sinais supressores de crescimento, resistência à morte celular programada, imortalidade na replicação celular, indução de angiogênese, invasão e metástases, reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição pelo sistema imune (WANG., et al 2017).

Figura 2. Características biológicas do câncer



Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG; 2011

O conhecimento dessas características biológicas é fundamental para a compreensão dos tratamentos e para a pesquisa de novas abordagens terapêuticas. Conhecer o estágio da progressão do câncer é um requisito para determinar qual abordagem é mais ideal para cada indivíduo: cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia (PRABHU; DEVARAJ, 2017), ou transplante de medula óssea, podendo em muitos casos ser necessária a combinação de mais de uma modalidade de tratamento (GUERREIRO et al., 2015). O processo de decisão entre as alternativas terapêuticas é difícil, e envolve tanto a sobrevivência quanto a qualidade de vida dos indivíduos acometidos com a doença (GARCÍA-LEÓN et al., 2017). A quimioterapia é o tratamento mais utilizado, sendo aplicado em cerca de 60-70% dos casos, entretanto, algumas vezes é indicado após cirurgias ou para auxiliar na remoção do tumor (KALIKS et al, 2017).

Os quimioterápicos atuam interferindo no ciclo celular e reduzindo a capacidade de reparação do DNA. Conforme a sua atuação sobre o ciclo celular são divididos em: quimioterápicos que atuam nas células que estão ou não no ciclo proliferativo (ciclo-inespecíficos); quimioterápicos que atuam somente nas células que se encontram em proliferação (ciclo-específicos) e quimioterápicos que atuam em determinadas fases do ciclo celular (fase-específicos) (OLIVEIRA-SOUZA, 2016).

Farmacologicamente, os quimioterápicos citotóxicos podem se dividir em três grandes classes, a saber, **i) agentes antimetabólitos**: atuam na fase S do ciclo celular bloqueando o metabolismo dos nucleotídeos, impedindo a formação dos ácidos nucléicos e, conseqüentemente, a síntese do DNA. Os principais compostos desse grupo são os análogos de pirimidina (5-fluorouracil, 5-FU), de purina (6-mercaptopurina) e análogos do ácido fólico (metotrexato); **ii) agentes alquilantes**: ligam-se de forma irreversível principalmente ao nitrogênio (N7) na guanina, causando uma desespiralização da dupla hélice do DNA, fenômeno esse indispensável para a reprodução celular. Dentre os agentes alquilantes estão a ciclofosfamida e os compostos de platina (cisplatina); **iii) produtos naturais**: induzem estresse oxidativo e extinção cromossômica por meio da inibição da topoisomerase II, como exemplo pode-se citar a doxorubicina. Há também os que agem sobre o citoesqueleto celular, estabilizando os microtúbulos e conseqüentemente interrompendo a polimerização/despolimerização normal, levando a parada do ciclo celular na fase G2-M, a exemplo dos taxanos (paclitaxel e docetaxel) (OLIVEIRA-SOUZA, 2016).

Devido à gravidade da doença e as limitações do tratamento quimioterápico citotóxico, avanços recentes no entendimento das mutações das células neoplásicas, vias de sinalização que levam à progressão do tumor e o melhor entendimento da interação entre as células tumorais e o sistema imunológico, estão revolucionando o tratamento do câncer (KALIKS, 2015).

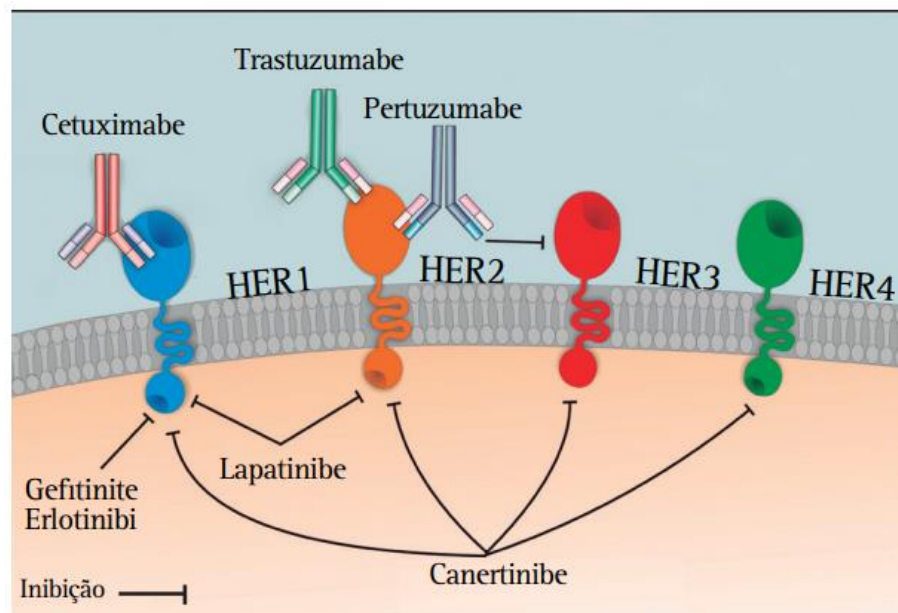
Nesse contexto, podem ser citadas outras terapias para o câncer que incluem a hormonioterapia, a terapia alvo e a imunoterapia. A **hormonioterapia** é uma terapêutica mais efetiva no tratamento de indivíduos que apresentam tumores que tenham a expressão de receptores hormonais, tais como os receptores de estrogênio (ER) e de progesterona (PR) (KALIKS, 2015). Drogas inibidoras desses receptores, como o tamoxifeno (ERI) e megestrol (PRI), atuam regulando genes promotores do tumor levando a supressão da transcrição gênica (OLIVEIRA-SOUZA, 2016).

Abordagens terapêuticas direcionadas com anticorpos monoclonais ou inibidores de tirosina quinase são opções mais seletivas para as células tumorais, denominadas **terapia alvo**, pois apresentam mecanismo de combate com alta especificidade pelas células malignas e poucos efeitos colaterais, tendo como alvos, por exemplo, receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR, HER-1/ErbB1) (PRABHU; DEVARAJ, 2017). Apesar de atuarem com o mesmo objetivo final, essas duas classes de fármacos possuem mecanismos moleculares e perfil clínico diferentes. Os anticorpos monoclonais

(AM) são geralmente direcionados ao domínio externo dos receptores ou ao ligante, bloqueando a ligação ligante-receptor. Enquanto que os inibidores tirosina quinase (ITQ) impedem a fosforilação do domínio intracelular tirosina-quinase, uma vez que competem pelo sítio de ligação do ATP. Os principais fatores de crescimento envolvidos com o câncer, os quais representam alvos terapêuticos importantes na terapia alvo são: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de células tronco (SCF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), entre outros (LEITE et al., 2012).

O EGFR é o alvo mais comum desse tipo de terapia, e é codificado por proto-oncogenes. Sofre ação de diversos ITQ e AM, como o erlotinibi (ITQ), gefitinite (ITQ), canertinibe (ITQ), cetuximabe (AM), pertuzumabe (AM), trastuzumabe (AM) e lapatinibe (ITQ), como mostra a figura 3, que vêm sendo utilizados no tratamento de vários tipos de câncer (GOMES et al, 2018).

Figura 3. Terapia alvo direcionada à família do receptor do fator de crescimento epidérmico. Anticorpos monoclonais atuam bloqueando o receptor na sua porção extracelular, enquanto que os inibidores tirosina quinase atuam na porção intracelular, impedindo a fosforilação, dimerização e consequente ativação desse receptor.



Fonte: Leite et al., 2012.

A imunoterapia é uma das mais novas alternativas terapêuticas que está revolucionando o desenvolvimento de novos fármacos, estimulando a resposta imune do

indivíduo para destruir células tumorais (MORGADO-CARRASCO; FERRANDIZ, 2017). Se o sistema imunitário detecta uma célula que não reconheça e que considere como “estranho”, essa célula é marcada para o ataque através de uma resposta imune. Porém, muitas vezes, o sistema imunitário não reconhece células tumorais como “estranho” e estas, proliferam de uma maneira descontrolada formando o tumor. Em outros casos, o sistema imunitário reconhece essas células como “estranho”, mas a resposta que se lança não é forte o bastante para elimina-las (DIAS, 2016).

A imunoterapia pode ser classificada de acordo com as substâncias utilizadas e os seus mecanismos de ação. A imunoterapia ativa se subdivide em dois tipos: específica e inespecífica. Na **imunoterapia ativa inespecífica**, são utilizadas substâncias estimulantes e restauradoras da função imunológica (BCG e derivados Levamisole, Isoprinosina, *Corynebacterium parvum*), enquanto que na **imunoterapia específica** as vacinas de células tumorais são administradas com a finalidade de intensificar a resistência ao crescimento tumoral (vacinas e soros produzidos a partir de culturas de células tumorais coletadas do próprio paciente (imunoterapia autóloga) ou de outro paciente com neoplasia semelhante (imunoterapia heteróloga). Na **imunoterapia passiva** são administrados anticorpos antitumorais ou células mononucleares exógenas, objetivando proporcionar capacidade imunológica de combate à doença (DAY et al., 2017; ESCUÍN, 2017; OCHOA et al., 2017).

De forma geral, apesar de recentes avanços e extensivas pesquisas, os tratamentos disponíveis contra o câncer ainda são limitados sendo relatadas falhas frequentes como resistência a drogas e questões farmacológicas e de toxicidade aliadas a inúmeros efeitos colaterais que, muitas vezes, diminuem a qualidade de vida do indivíduo (COSTA; SILVA, 2017).

Embora tenha se mostrado eficaz e aumentado a taxa de sobrevivência de pacientes com câncer nos últimos anos, a quimioterapia citotóxica apresenta limitações em seu tratamento, a principal, é a falta de especificidade. As drogas antineoplásicas não destroem apenas células tumorais, mas também células saudáveis, principalmente aquelas que apresentam, normalmente, alto índice de proliferação, como as células do folículo piloso, mucosas da cavidade oral e do trato gastrointestinal, eritrócitos e leucócitos (SINGH et al, 2018; REJHOVÁ et al, 2018), provocando queda de cabelos, fadiga intensa, perda de peso, vômitos e mielossupressão, sendo esses sintomas relatados com maior frequência por pacientes que passam por esse tipo de tratamento e

que, conseqüentemente, têm a sua qualidade de vida também afetada (OLIVEIRA-SOUZA, 2016).

Apesar de apresentarem diversos benefícios em relação à terapia citotóxica, as abordagens mais específicas como terapia alvo, hormonioterapia e imunoterapia, também possuem limitações, incluindo seu uso limitado para alguns tipos específicos de câncer, bem como, efeitos indesejáveis associados ao tratamento (BOIN et al., 2015).

Diante de todos esses fatores, é perceptível a necessidade de investir cada vez mais em pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos destinados ao tratamento do câncer, na perspectiva de aumentar a efetividade, possibilitando cura ou aumento da sobrevida, além de reduzir os níveis de toxicidade e resistência ao tratamento (AIRES; GUEDES, 2018).

2.2 Angiogênese e estresse oxidativo no câncer

A indução de angiogênese é definida como uma característica essencial para o desenvolvimento do câncer. Os tumores originam-se de massas celulares com crescimento descontrolado. À medida que as células se multiplicam, tanto o oxigênio quanto os nutrientes são fundamentais para a sobrevivência e proliferação celular. O tumor precisa de um fornecimento de sangue independente e apresenta capacidade de induzir a produção de novos vasos sanguíneos para suas necessidades nutricionais e de oxigênio, bem como para a eliminação de resíduos metabólicos e facilitação do processo metastático (LUDZKI et al., 2018).

Fisiologicamente, a atividade angiogênica contribui para a manutenção da homeostase e metabolismo tecidual, além de controlar processos regenerativos, bem como a cicatrização. Está presente também durante o desenvolvimento embrionário, quando o endotélio vascular instrui ativamente a organogênese (AUGUSTIN, 2016).

Todavia, no câncer, a neoangiogênese tumoral é um fenômeno crítico que acompanha o crescimento e a disseminação tumoral. Para isso, diversos fatores envolvidos na regulação desse processo podem estar em desequilíbrio no sentido de facilitar a angiogênese (GRESTA, 2014).

Neste sentido, destacam-se: o fator de crescimento fibroblástico (bFGF), um dos mais potentes peptídeos angiogênicos conhecidos, que apresenta importante atividade mitogênica para células endoteliais; os fatores de crescimento ligados à heparina; o fator

de crescimento derivado das plaquetas (PDGF); o fator de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β); moléculas de adesão como integrinas e caderinas; o fator de transformação de crescimento (TGF- α), interleucinas 1, 6 e 8 (IL-1, IL-6 e IL-8); o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); metaloproteinases (MMPs); fator indutor de hipóxia (HIF); ciclooxigenase 2 (COX-2) e as angiopoietinas 1 e 2 (Ang-1 e Ang-2). Estes fatores são liberados pelas células tumorais, células endoteliais ou pela matriz extracelular promovendo a formação de novos vasos que contribuem para o crescimento e nutrição do tumor (RAMJAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017).

Em contrapartida, o estímulo angiogênico é acompanhado da supressão dos inibidores da angiogênese, denominados fatores antiangiogênicos, que protegem o endotélio vascular do estímulo proliferativo. Dentre estes podem ser citados: o fator plaquetário 4 (PF4), inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3), interferon alfa (IFN- α), prolactina, angiostatina, trombospondina-1 (TSP-1), interleucina 10 (IL-10) e endostatina (VORON et al., 2014).

Em contraste com a angiogênese fisiológica que é transientemente ativada, no câncer a angiogênese está quase sempre ativada e permanece ligada num estado chamado “switch” angiogênico, que é um mecanismo que leva ao desenvolvimento de uma rede vascular ativa e invasiva, resultante de um desequilíbrio permanente entre fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos (PALMA; BIZIATO; PETROVA, 2017).

O principal fator envolvido é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que representa uma proteína determinante da angiogênese fisiológica e neoplásica. A família VEGF agrupa: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PlGF (fator de crescimento da placenta). A ativação dos receptores de VEGF nas células endoteliais induz cascatas de reações intracelulares, especialmente a via das MAP cinases (RAF/ERK/MEK) e a via PI3K/AKT/mTOR. Existem diversas abordagens farmacológicas para inibição dessas vias, incluindo, anticorpos monoclonais contra o fator VEGF, tal como o bevacizumabe, e inibidores de tirosina quinase que inibem o receptor de VEGF, tal como o sunitinibe (PRABHATH et al 2018).

O VEGF está no topo da hierarquia de eventos que leva ao crescimento de novos vasos sanguíneos, mas o VEGF não é o único fator específico indutor de angiogênese. Combinações com fatores que controlam etapas posteriores da cascata angiogênica estão em desenvolvimento clínico avançado. Para oncologia, combinações de anti-VEGF/VEGFR com anti-angiopoietina-2 são as mais avançadas no desenvolvimento clínico (AUGUSTIN, 2016). Futuros desenvolvimentos nesse campo

também prometem que drogas antiangiogênicas contribuam para a remodelação do microambiente tumoral, de forma que elas não apenas facilitem a quimioterapia, mas também possam ser fundamentais para melhorar a eficácia das imunoterapias e conseqüentemente da redução de tumores. Sendo assim, a inibição da angiogênese é uma importante estratégia antitumoral utilizada isoladamente, mas principalmente, em combinação com drogas citotóxicas (BRETAGNE et al., 2015).

Ainda no contexto da angiogênese, acredita-se que o óxido nítrico (NO) apresenta importante papel no desenvolvimento de vasos sanguíneos intra-tumorais, provavelmente através da indução do crescimento de células endoteliais e também via regulação do fluxo sanguíneo.

O NO é uma molécula de efeitos pleiotrópicos, altamente reativa e com um tempo de meia-vida reduzido que tem revelado papel crucial em vários processos biológicos. O NO é gerado por três isoformas de sintase de NO (NOS): neuronal (nNOS/NOS1), induzível (iNOS/NOS2) e endotelial (eNOS/NOS3), que catalisam a síntese de NO a partir da L-arginina usando a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato e o oxigênio molecular como substratos (RIDNOUR et al., 2015).

A proteína óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é a mais importante proteína da família das óxido nítrico sintases, a qual é capaz de produzir grandes quantidades de NO. A indução permanente de iNOS foi levantada como potencialmente mutagênica, apresentando um papel central na biologia tumoral e tem sido reportado em vários tumores (SERVATO, 2016). Ainda, a expressão de VEGF e a angiogênese mediada por esse fator de crescimento, depende da produção de NO via enzima iNOS, requerendo para isso, ativação da via de sinalização NO/cGMP no interior das células endoteliais (DE OLIVEIRA, 2017; SOMASUNDARAM, 2018).

Contudo, apesar do destaque acima para os efeitos pró-angiogênicos do NO, a literatura destaca há décadas o efeito NO em induzir citotoxicidade celular. Sendo assim, o papel do NO em induzir efeitos pró ou antitumorigênicos parece estar na dependência de sua concentração, duração de exposição, estado redox celular, fonte de NO e por fim, sensibilidade intrínseca das células tumorais ao NO (WU et al., 2014).

De forma semelhante aos efeitos do NO, o estresse oxidativo gerado nas células tumorais, bem como no microambiente tumoral, pode exercer diferentes efeitos biológicos.

O oxigênio é essencial para produzir energia para as células, através de um processo conhecido como metabolismo oxidativo, que ocorre na mitocôndria. Durante as

reações na mitocôndria, o oxigênio pode ser reduzido parcialmente, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como, ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot) (CERTAINHO-PIRES, 2017).

Para combater essas espécies produzidas normalmente as células contam com um arsenal de antioxidantes para a manutenção da homeostasia oxidativa (Figura 4). Eles fazem parte do sistema de defesa e podem ser produzidos pela própria célula (glutathione - GSH, ácido alfa-lipoico, coenzima Q, ferritina, ácido úrico, bilirrubina) ou obtidos pela dieta (ácido ascórbico ou vitamina C, tocofenol ou vitamina E, betacaroteno ou vitamina A). Existem ainda os antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase ou SOD, catalase ou CAT, glutathione peroxidase), que atuam na produção ou eliminação das ROS (SILVA; JASIULIONIS, 2014).

Figura 4. Equilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante. O sistema de defesa conta com antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) e não enzimáticos (vitaminas, glutathione, flavonoides). Entre as fontes endógenas de espécies reativas estão a mitocôndria, os peroxissomos e as células inflamatórias. Fatores ambientais como radiações, ozônio e xenobióticos também são fonte de espécies reativas.



Fonte: SILVA; JASIULIONIS, 2014.

Quando ocorre a perda do equilíbrio entre produção e eliminação de ROS, o que é chamado de estresse oxidativo, podem ocorrer danos ao DNA, RNA, lipídios e proteínas. Além de fragmentação do DNA, as ROS podem causar o mau funcionamento

do sistema de reparo do DNA, contribuindo para o desenvolvimento de doenças, como o câncer (SIES; BERDNT; JONES, 2018).

Além disso, uma das características do câncer é a desregulação da energia celular. Isso permite que as células cancerosas proliferem e sobrevivam em microambientes que levariam à morte de uma célula normal. Como consequência da energia celular desregulada, as células produzem níveis mais elevados de ROS, concomitantemente com alterações nas vias antioxidantes. Nesse contexto, ROS contribuem para a sobrevivência, proliferação e metástase das células em vários tipos de câncer, mas deixam condutas descontroladas para a morte celular. As células cancerígenas adaptam-se a este estresse oxidativo através de vários mecanismos, permitindo-lhes sobreviver em hipóxia e tornar-se resistente aos medicamentos (POSTOVITI et al., 2018).

Diversos tumores humanos, incluindo melanoma, leucemias, carcinomas gástrico, prostático, mamário e de cólon apresentam níveis elevados de ROS. Estas espécies atuam como reguladores de diversas vias de transdução de sinais, podendo participar de diversas etapas da transformação e progressão tumoral, como a autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais antiproliferativos, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão e metástase, metabolismo e inflamação (SILVA; JASIULIONIS, 2014).

A produção de ROS é significativamente aumentada nas células cancerígenas devido à disfunção mitocondrial, metabolismo alterado e mutações genéticas frequentes, resultando no acúmulo de grandes quantidades de proteína oxidada, DNA e lipídios. Portanto, como uma resposta adaptativa, as células cancerígenas abrigam níveis elevados de moléculas de ROS (BANSAL; SIMON, 2018). Dentre as vias reguladas por essas espécies, destacam-se a das proteínas quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). A primeira possui papel importante na tumorigênese, principalmente por ativar fatores de transcrição como c-Jun e c-Fos, que regulam a expressão de genes envolvidos em proliferação celular, diferenciação, transformação, inflamação, entre outros. Já a PI3K está relacionada à via da RAS, que possui papel fisiológico importante na sobrevivência celular (GUNDAMARAJU et al., 2018).

2.3 Tonantzitlolone B (TNZ-B)

Ao longo dos anos, os produtos naturais, como os organismos marinhos, micro-organismos e plantas, tem representado uma rica fonte de drogas para o desenvolvimento de novas terapias em diversas áreas, dentre estas, as áreas da terapia do câncer e de doenças infecciosas (KHAZIR et al., 2014; SU et al., 2015).

Por trás da beleza da natureza esconde-se uma guerra surda pela sobrevivência dos mais aptos. As plantas, por exemplo, para sobreviver e evoluir tem que competir por espaço e se defender do ataque de herbívoros e patógenos, em geral. Neste embate de milhões de anos, as plantas foram desenvolvendo suas próprias defesas químicas. Esta é uma das razões pelas quais a constituição química das plantas é tão complexa, e porque muitas plantas biossintetizam substâncias para atuar em alvos específicos moleculares de seus predadores. Metabólitos secundários de plantas e microrganismos são produzidos para modular seus próprios metabolismos e, conseqüentemente, também podem alcançar alvos terapêuticos de doenças humanas (FERREIRA; PINTO, 2010).

Sendo assim, os produtos químicos identificados como produtos naturais são derivados do fenômeno da biodiversidade em que as interações entre os organismos e seu ambiente geram diversas moléculas químicas complexas (MISHRA; TIWARI, 2011), que, por sua vez, contribuem significativamente para o desenvolvimento de medicamentos (MACHA et al., 2015).

Dentre os metabólitos secundários das plantas, os terpenóides formam uma família ampla e estruturalmente diversa de produtos naturais derivados de unidades do isopreno (C5) unidos de modo cabeça-calda, contendo mais de 30.000 compostos identificados. A maioria dos terpenos tem sido isolada de plantas, os quais possuem uma grande utilidade no metabolismo e interações ecológicas (DAVIS; CROTEAU, 2000). O isopreno tem sido caracterizado como um produto de decomposição de vários hidrocarbonetos cíclicos naturais e foi sugerido como a unidade fundamental de construção. São classificados como hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (DEWICK, 2002).

Sabe-se que as plantas do gênero *Stillingia*, que abrange cerca de 30 espécies principalmente nas Américas, serviram como base para diversas finalidades terapêuticas, utilizados por nativos. Por exemplo, as raízes de *S. sanguinolenta* são

usadas em cataplasmas (curativo) após o parto, e nativos mexicanos do norte recomendam infusões de folhas para o tratamento de doenças pulmonares. Tribos indígenas de Navajos e Creek fazem o uso de *S. sylvatica*, de maneira similar (SOURBIER et al., 2015).

O gênero *Stillingia* pertence a família Euphorbiaceae, uma das maiores famílias de plantas com flor, com aproximadamente 300 gêneros e 8000 espécies. As espécies desta família são conhecidas por produzir uma grande quantidade de diterpenos e triterpenos, alguns deles com importantes atividades antitumorais e anti-inflamatórias (Draeger et al., 2007). Ensaios realizados com extratos brutos orgânicos, fases e compostos da espécie *Stillingia oppositifolia* utilizando-se as linhagens tumorais UACC-62 (câncer de melanoma humano), MCF-7 (câncer de mama humano) e TK-10 (câncer renal humano), mostraram inibição do crescimento celular; foi observado ainda atividade antifúngica em algumas espécies de *Candida* (COTA et al., 2001). O látex obtido das hastes de *S. patagonica* apresentou atividade proteolítica mostrando sua potencial fonte de enzimas digestivas e agentes anti-inflamatórios (SEQUEIROS et al., 2003; COTA et al., 2011). Ainda, o extrato da casca da espécie *Stillingia lineata* ssp. apresentou atividade antiviral contra o zika vírus (TECHER et al., 2015).

Dentre os terpenos isolados do gênero *Stillingia*, destacam-se dois diterpenos do tipo flexibilano, conhecidos como tonantzitlolone A (TNZ-A) e seu enantiômero tonantzitlolone B (TNZ-B) isolados da espécie *Stillingia loranthaceae* (Euphorbiaceae). Diterpenos do tipo flexibilano são raros na natureza e, por isso, apresentam poucos relatos na literatura, tanto do ponto de vista fitoquímico, como farmacológico/toxicológico.

É relatado na literatura que tonantzitlolone A e seu enantiômero exercem atividade citostática em células tumorais atuando na proteína do sistema mitótico kinesina-5, um alvo importante na terapia do câncer, sendo a maior inibição observada para o TNZ-B (PFEFFER et al., 2016), e ainda TNZ-A inibiu o crescimento *in vitro* de células de carcinoma renal, das linhagens 786-O e A498 (SOURBIER et al., 2015). Todavia, não há relatos na literatura do potencial tóxico e da atividade antitumoral *in vivo* dessas moléculas.

Sendo assim, diante das premissas apresentadas, esse trabalho se propôs a avaliar os possíveis efeitos tóxicos e a atividade antitumoral *in vivo* de tonantzitlolone B (TNZ-B), bem como mecanismos de ação associados a esses efeitos.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ✓ Avaliar a toxicidade e o potencial antitumoral do tonantzitolone B (TNZ-B), por meio de ensaios *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar a toxicidade pré-clínica aguda do TNZ-B em camundongos;
- ✓ Avaliar a genotoxicidade do TNZ-B em sangue periférico de camundongos;
- ✓ Estudar a atividade antitumoral *in vivo* do TNZ-B em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE);
- ✓ Avaliar o efeito antiangiogênico do TNZ-B;
- ✓ Investigar o efeito antioxidante do TNZ-B: quantificação de espécies reativas de oxigênio e do óxido nítrico;
- ✓ Avaliar o perfil de toxicidade do TNZ-B após tratamento antitumoral em modelo de CAE.

MATERIAL

4 MATERIAL

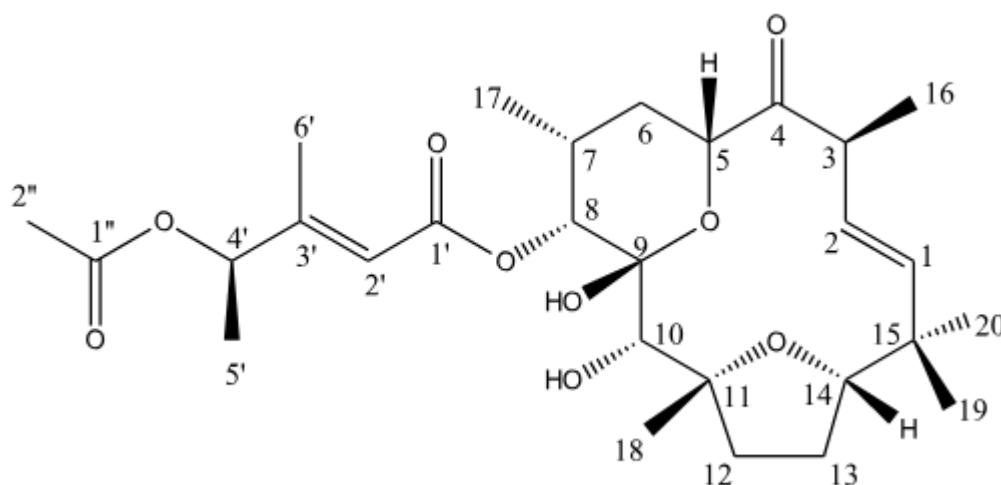
4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), onde funciona o Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da saúde, da Universidade Federal da Paraíba (CCS/UFPB).

4.2. Tonantzitlone B

A substância utilizada, tonantzitlone B, foi fornecida gentilmente pelos colaboradores professor Dr. Josean Fachine Tavares e pelo colaborador Me. Lucas Silva Abreu do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise da Universidade Federal da Paraíba (LMCA-UFPB) e pelo professor Dr. Eudes da Silva Velozo do Laboratório de Pesquisa Médica em Matéria Médica da Universidade Federal da Bahia (LAPEMM-UFBA).

Figura 5. Estrutura química do Tonantzitlone B



4.3 Animais e condições experimentais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, pesando entre 28 e 32 g obtidos da Unidade de Produção Animal/Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos - IPeFarM/UFPB. Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob temperatura de 21 ± 1 °C, sem uso de qualquer medicação, tendo livre acesso à comida (tipo *pellets* de ração da marca Purina®) e água potável. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os cuidados foram considerados no sentido de diminuir a dor e o sofrimento dos animais.

Após todos os ensaios *in vivo*, os animais foram anestesiados com uma solução de xilasina (16 mg/kg – i.m.) e cetamina (100 mg/kg – i.m.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. Todos os experimentos seguiram a lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal da UFPB sob certidão N° 112/2017 (ANEXO A).

4.4 Linhagem de células tumorais

Para os ensaios de atividade antitumoral *in vivo* foi usada uma linhagem de adenocarcinoma murino (Carcinoma Ascítico de Ehrlich), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA/Unicamp). As células foram mantidas na forma ascítica na cavidade peritoneal de camundongos Swiss (*Mus musculus*) na Unidade de Produção Animal (IPeFarM/UFPB), sendo realizados repiques semanais, nos quais uma alíquota de células (200 µL de 1×10^6 células/mL) é transferida de um animal para outro, a cada 5 dias.

4.5 Reagentes

Foram utilizadas as seguintes substâncias: Cetamina – (Ketamin®); cloridrato de xilazina –(Anasedan®); heparina – (HEPAMAX-S®); Solução fosfato tamponada (PBS); Tween 80 (Sigma-Aldrich®); Dimetilsulfóxido (Mallinckrodt CHEMICALS); Triton X-100 (Sigma- Aldrich®); Soro bovino fetal (SBF) (Nutricell®); Iodeto de Propídeo (Sigma – Aldrich); Tween 20 (Sigma-Aldrich®), 5-Fluorouracil (Sigma-Aldrich®), 2’7–dicloro

dihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich®) e Reagente de Griess (Sigma-Aldrich®).

4.6 Equipamentos

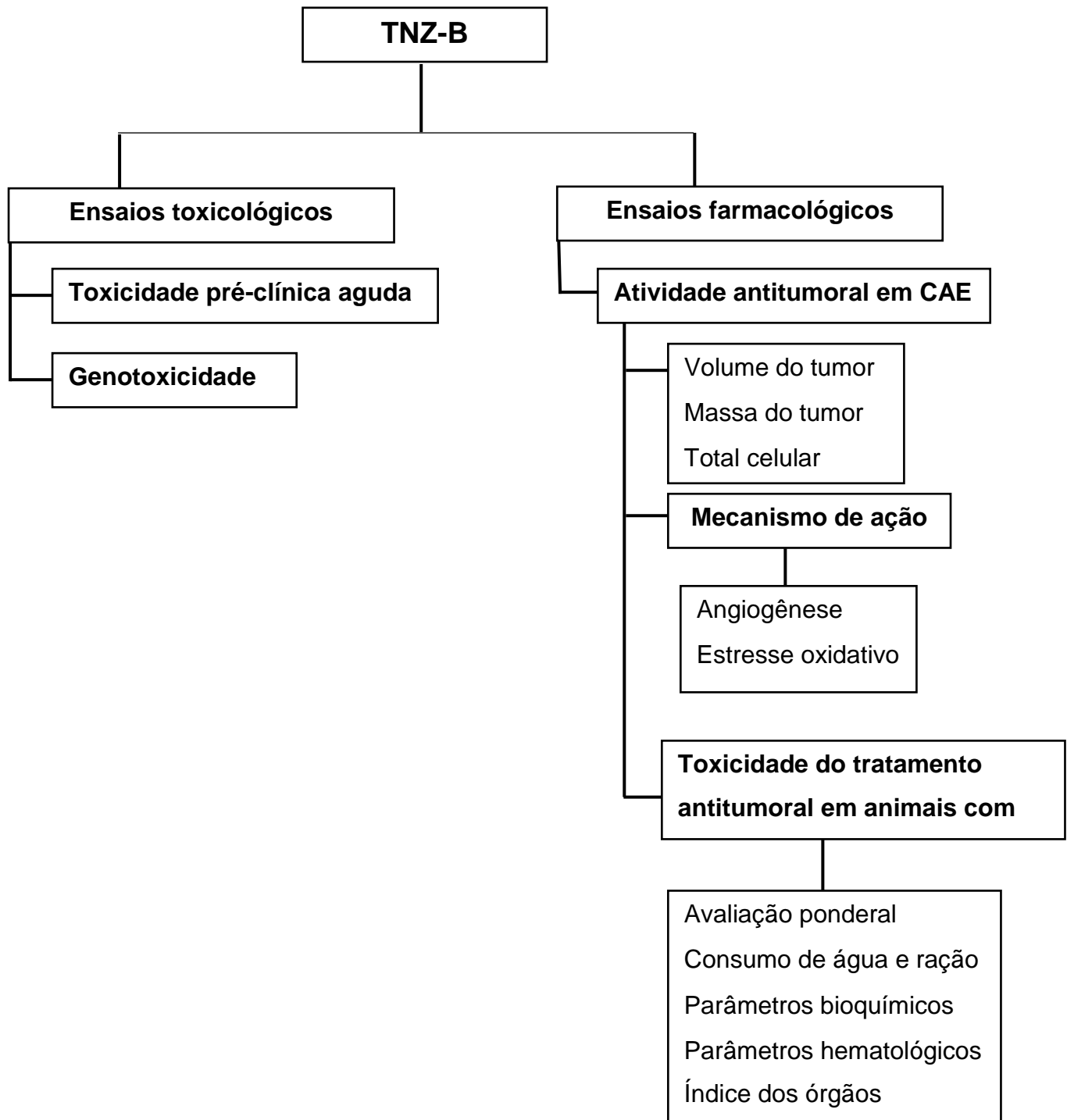
Foram utilizados os seguintes equipamentos: Centrífuga (HETTICH- Zentrifugen-Rotina 380 R); Microscópio invertido (Olympus); Microscópio NIKON-Eclipse E200; Balança analítica (GEHAKA® AG 200); Citômetro de fluxo (FacsCanto II, BD, EUA); Câmera fotográfica (Canon OverShot A2500); Leitor de placa (Synergy HT, BioTek). Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se kits específicos para o analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System) e o analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter Vet* (Horiba ABX Diagnostics), respectivamente.

MÉTODOS

5 MÉTODOS

Para o estudo do potencial antitumoral de TNZ-B foram realizados ensaios toxicológicos e farmacológicos, conforme fluxograma apresentado a seguir.

Fluxograma 2. Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral de TNZ-B.



5.1 Estudos toxicológicos

5.1.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

Os ensaios de toxicidade aguda em camundongos foram realizados de acordo com “Guidelines for testing of chemicals” n. 423/2001 da OECD (ANEXO B).

Camundongos Swiss, três fêmeas por grupo, foram submetidos a doses únicas de 50 ou 5 mg/kg de TNZ-B por via intraperitoneal e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (solução a 5% de Tween 80 em salina). O número de mortes foi contabilizado no período de 14 dias de observação após o tratamento agudo. Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL50 (apesar de fornecer uma estimativa do seu valor), entretanto permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” – GHS (OECD, 2001).

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após administração da substância foi realizada observação cuidadosa para detecção de possíveis sinais tóxicos como hiperatividade, irritabilidade, agressividade, tremores, convulsões, catatonias, analgesia, anestesia, ptose, resposta ao toque diminuído, ambulação, capacidade de limpeza e ato de levantar, nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos e após 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental (ANEXO C) descrito por Almeida et al. (1999) do Laboratório de Psicofarmacologia do PPgPNSB/CCS/UFPB.

5.1.2 Avaliação da genotoxicidade

A genotoxicidade de TNZ-B foi avaliada por meio do ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos. Para tal, camundongos fêmeas (n=6/grupo) foram tratados com dose única de 3 mg/kg e 6 mg/kg (i.p.) de TNZ-B. Um grupo controle positivo (ciclofosfamida - 50 mg/kg – i.p.) e um grupo controle negativo (solução salina e tween 80 à 5%) foram incluídos. Após 48 horas, os animais foram anestesiados e o sangue coletado pelo plexo orbital para confecção das extensões sanguíneas. Após secagem, as lâminas foram coradas com coloração panótica (Newprov®) para posterior análise em

microscópio óptico. Para cada animal, três extensões sanguíneas foram preparadas e um mínimo de 2000 eritrócitos contados para determinação do número de eritrócitos micronucleados (OECD, 1997).

5.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich

Células de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE) com cinco dias de crescimento foram aspiradas da cavidade peritoneal de camundongos e implantadas por via intraperitoneal (0,5 mL - 4×10^6 células/mL) nos camundongos experimentais (n=8 fêmeas/grupo) (DOLAI et al., 2012). Vinte e quatro horas após o implante, TNZ-B foi solubilizado em Tween 80 (12%) e administrado diariamente por via intraperitoneal (i.p.), nas doses de 1,5 e 3,0 mg/kg, por sete dias (MELO, 2014 adaptado). O grupo controle foi tratado com uma solução de 12% de Tween 80 e um quinto grupo de animais foi tratado com 5-Fluorouracil (5-FU), 25 mg/kg, como droga padrão.

Para a avaliação do efeito antitumoral de TNZ-B, 24 horas após a última administração do tratamento descrito, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.m.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. O líquido ascítico foi coletado da cavidade peritoneal e o volume foi medido e expresso em mL. Uma alíquota foi retirada para a determinação da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão do azul de tripan. Para tanto, foram incubados volumes semelhantes de líquido ascítico e de uma solução de 0,4% do corante, seguido de análise das células em câmara de Neubauer. Este ensaio avalia a habilidade de células viáveis, com membrana plasmática intacta, excluírem o corante azul de tripan, permitindo assim, a quantificação dessas células (RENZI; VALTOLINA; FORSTER, 1993).

A massa do tumor foi determinada pela diferença dos pesos dos camundongos antes e depois da retirada do líquido ascítico e expresso em gramas (g).

A quantidade total de células viáveis no peritônio dos animais foi expressa como total celular ($\times 10^7$ células), que foi obtido como o produto do volume do tumor, expresso em mL, pela viabilidade celular, expressa como a quantidade de células $\times 10^6$ /mL.

5.2.1 Investigação do mecanismo de ação antitumoral

Para investigação do mecanismo de ação antitumoral de TNZ-B foi escolhida a dose de 3 mg/kg, por ter sido a dose que apresentou melhor resultado em todos os parâmetros avaliados no estudo de atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

5.2.1.1 Avaliação do efeito antiangiogênico

Os animais transplantados com células de CAE foram tratados por sete dias com TNZ-B conforme descrito no item 5.2. No dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle, TNZ-B (3 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.m.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. O peritônio foi cortado e o revestimento posterior da cavidade peritoneal dos animais de todos os grupos foi examinado e fotografado para investigação da microdensidade vascular peritumoral, com o auxílio de um programa computacional (AVSOFT®). A microdensidade dos vasos foi determinada pela área ocupada por vasos sanguíneos dividido pela área total selecionada (AGRAWAL et al., 2011).

5.2.1.2 Avaliação do estresse oxidativo

5.2.1.2.1 Ensaio do DCFH

Foi utilizada metodologia previamente descrita (HASUI et al., 1989 adaptado) que se baseia na oxidação do reagente 2'7 – dicloro dihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Os animais transplantados com células de CAE foram tratados por sete dias com TNZ-B conforme descrito no item 4.2. No dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle, TNZ-B (3 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.m.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. O líquido peritoneal foi lavado com

PBS a 1000 r.p.m., 4 °C, durante 5 minutos. Após três repetições desse processo, $3,0 \times 10^5$ células de CAE, 200 µL de solução de DCF (0,3 mM) e PBS q.s.p. 1mL foram incubados em estufa de CO₂ durante 30 minutos a 37°C. Em seguida os tubos foram colocados em gelo triturado para suspender a reação de marcação do DCFH-DA até o momento da análise. Em seguida, as amostras foram analisadas em citômetro de Fluxo (FacsCanto II, BD, EUA) em 530 nm de fluorescência e 485 nm de comprimento de excitação. A quantificação do *burst* ou espécies reativas de oxigênio (ROS) foi estimada pela intensidade média de fluorescência.

5.2.1.2.2 Quantificação dos níveis de nitrito

Os níveis de nitrito no líquido peritoneal foram quantificados espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess, constituído de 0,1% de N- 1-naphthyl-etilenodiamina, 1% de sulfanilamida em solução de ácido fosfórico a 2,5%, utilizando NaNO₂ como padrão (GREEN et al., 1982, adaptado). Para isto, os animais transplantados com células de CAE foram tratados por sete dias com TNZ-B conforme descrito no item 5.2. No dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle, TNZ-B (3 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. O líquido peritoneal foi coletado e centrifugado a 5000 rpm, 20°C, durante 10 minutos. Para a montagem das placas, foi adicionado 100 µL do sobrenadante de células em quadruplicada nos poços previamente adicionados da solução de Griess.

Após 10 minutos à temperatura ambiente, as placas foram lidas em espectrofotômetro UV/visível de microplacas com filtro de 560 nm. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio. Os testes foram feitos em quadruplicata e os valores expressos em µ molar.

5.2.2 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich

5.2.2.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos pelo tratamento com TNZ-B, os animais dos grupos controle, TNZ-B (3 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg), descritos no item 5.2, foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados os consumos de água e de ração.

5.2.2.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

Os animais transplantados com CAE foram tratados por sete dias com TNZ-B conforme descrito no item 5.2. No dia seguinte após a última administração, após jejum de quatro horas, os animais dos grupos controle, TNZ-B (3 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.), e amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada.

Para a análise dos parâmetros bioquímicos (ureia, creatinina, aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT) o sangue foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm para obtenção do plasma. Já para as análises hematológicas foi utilizado sangue total heparinizado e realizada avaliação das séries vermelha e branca (eritrograma e leucograma).

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se *kits* específicos para o analisador bioquímico automático Flexor EL-200® (Elitech) e o analisador hematológico celular automático Hematoclin 2.8 Vet (Bioclin/ Midray), respectivamente. As extensões sanguíneas foram coradas com coloração panótica e analisadas em microscópio óptico, para realização da contagem diferencial de leucócitos (MOURA et al., 2016).

5.2.2.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Após a coleta de sangue descrita no item 5.2.2.2, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e os órgãos (timo, baço, fígado, rins e coração) foram removidos e pesados para o cálculo dos seus índices. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

5.3 Análise estatística

Os resultados obtidos nos estudos *in vivo* foram expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e analisados empregando-se o teste *t-Student* não pareado, para análise de duas populações distintas, e teste de análise de variância (ANOVA) *one-way*, para a comparação de mais de duas amostras, seguido do teste de Tukey (para variáveis paramétricas). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Estudos toxicológicos

6.1.1 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

No ensaio de toxicidade pré-clínica aguda foi observado que TNZ-B provocou morte de todos os animais na dose de 50 mg/kg (i.p.). Seguindo o guia da OECD 423/2001, quando ocorre a morte de dois ou mais animais deve-se repetir o ensaio, porém, com uma dose menor, de 5 mg/kg. No ensaio realizado com a dose de 5 mg/kg TNZ-B não induziu morte de nenhum dos animais. De acordo com o mesmo guia, quando há morte de apenas um ou nenhum animal, deve-se repetir o teste com a mesma dose. Na repetição, TNZ-B (5mg/kg) também não induziu morte de nenhum dos animais tratados. Os resultados são mostrados na Figura 7.

O valor de DL50 foi estimado, segundo o guia OECD 423, em torno de 25 mg/kg (i.p.) e TNZ-B foi classificado na categoria 2 da *Globally Harmonized Classification System* (GHS).

Entre os efeitos comportamentais avaliados foi evidenciado contorções abdominais, que desapareceram nos primeiros minutos após o tratamento, e perda do reflexo corneal e auricular, nas primeiras 4 horas, que desapareceu em seguida.

Figura 7. Efeitos da administração aguda de TNZ-B* (i.p.) em camundongos

Grupo		M/T	Efeitos comportamentais
Controle		0/3	Nenhum
50mg/kg	Experimento 1	3/3	Perda de reflexo corneal e auricular, contorções abdominais
	Experimento 2	0/3	Perda de reflexo corneal e contorções abdominais
5 mg/kg	Experimento 1	0/3	Perda de reflexo corneal e contorções abdominais
	Experimento 2	0/3	Perda de reflexo corneal e contorções abdominais

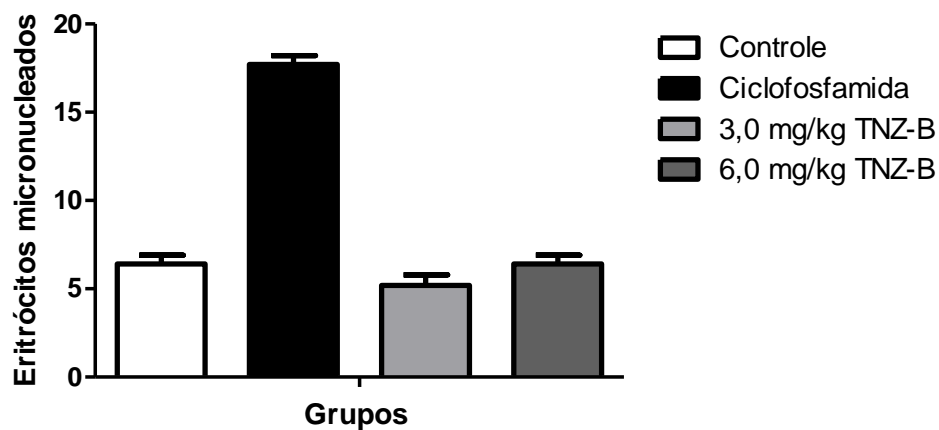
M/T: Morte/Tratado.

*TNZ-B: Tonantzitolone B.

6.1.2 Avaliação da genotoxicidade

O tratamento dos animais com as doses de 3,0 e 6,0 mg/kg do TNZ-B não induziu aumento no número de eritrócitos micronucleados no sangue periférico ($5,2 \pm 0,8$ e $6,7 \pm 0,5$, respectivamente), quando comparados ao grupo controle ($6,4 \pm 0,5$). Como esperado, a ciclofosfamida induziu aumento significativo no número de eritrócitos micronucleados ($17,7 \pm 1,3$; $p < 0,05$), em comparação ao grupo controle ($6,4 \pm 0,5$) (Figura 8).

Figura 8. Número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com TNZ-B* (3,0 ou 6,0 mg/kg) e ciclofosfamida (50 mg/kg), por via intraperitoneal.



Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

*TNZ-B: Tonantzitlolone B.

6.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich

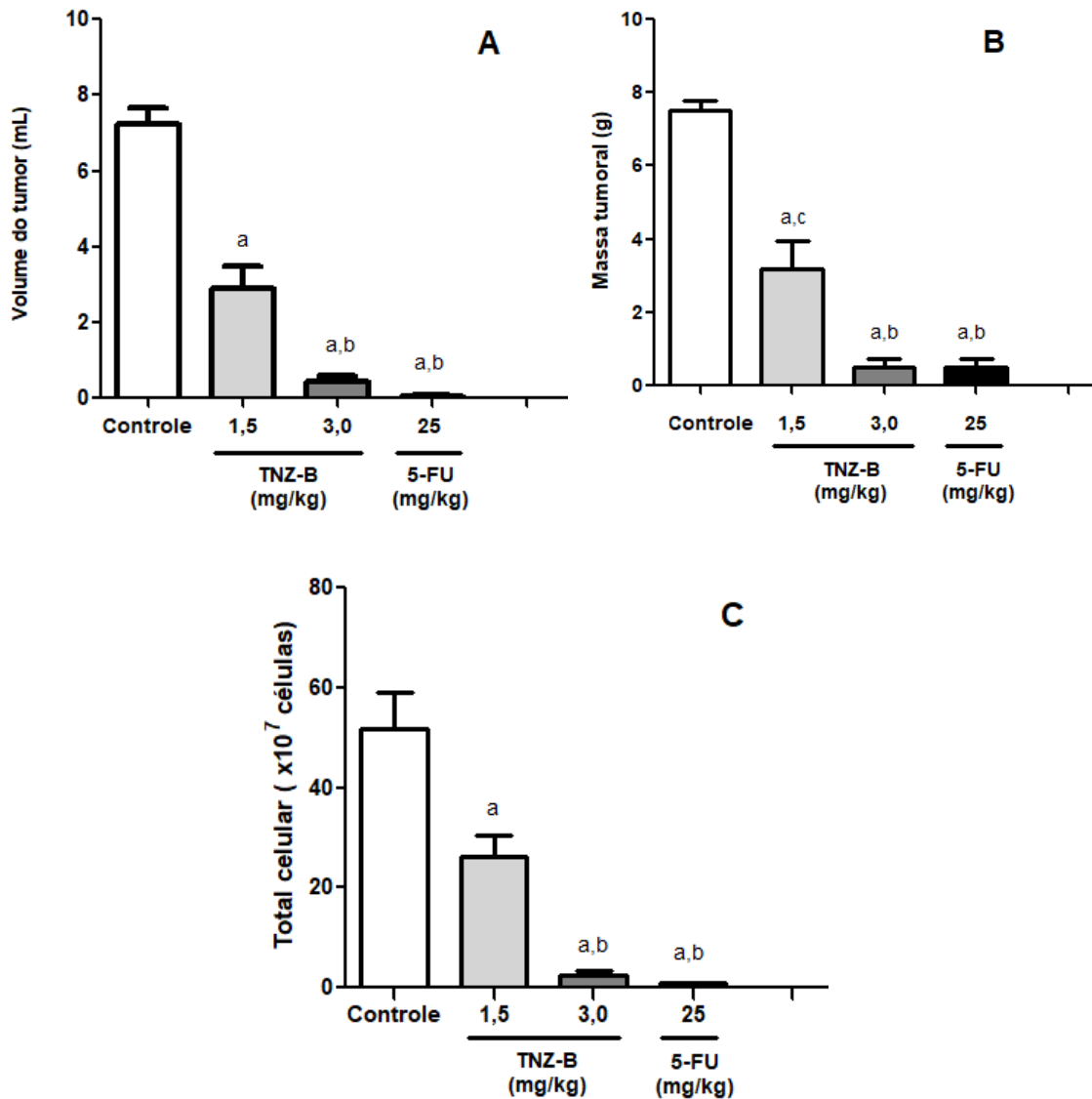
Foi observado uma redução significativa do volume do tumor nos grupos tratados com as doses de 1,5 ou 3,0 mg/kg de TNZ-B ($2,91 \pm 0,56$ mL; $0,43 \pm 0,17$ mL; $p < 0,05$ para ambos, respectivamente), quando comparados ao grupo controle ($7,25 \pm 0,41$ mL). Foi observado também que, entre o grupo tratado com a dose de 3,0 mg/kg de TNZ-B e

o grupo padrão, 25 mg/kg 5-FU ($0,06 \pm 0,02$ mL; $p < 0,05$ em comparação ao controle) não houve diferença significativa (Figura 9A).

A massa do tumor também apresentou redução significativa nas doses de 1,5 ou 3,0 mg/kg de TNZ-B ($3,16 \pm 0,76$ g; $0,50 \pm 0,23$ g; $p < 0,05$ para ambos, respectivamente), quando comparados ao grupo controle ($7,5 \pm 0,28$ g). O grupo tratado com 25 mg/kg de 5-FU reduziu significativamente a massa do tumor ($0,55 \pm 0,13$, $p < 0,05$), porém, não houve diferença em relação a dose de 3,0 mg/kg de TNZ-B (Figura 9B).

Os animais tratados com a dose de 1, 5 ou 3,0 mg/kg de TNZ-B apresentaram total celular significativamente reduzido ($26,17 \pm 4,17 \times 10^7$ células; $2,33 \pm 0,82 \times 10^7$ células; $p < 0,05$ para ambos), quando comparados ao grupo controle ($51,83 \pm 7,36 \times 10^7$ células). O mesmo foi observado para os animais tratados com 25 mg/kg de 5-FU ($0,66 \pm 0,22 \times 10^7$ células; $p < 0,05$) (Figura 9C).

Figura 9. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com TNZ-B* (1,5 e 3 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.



LEGENDA- A: volume do tumor, B: massa tumoral, C: total celular.

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de oito animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a*p* < 0,05 comparado ao grupo controle; ^b*p* < 0,05 comparado ao grupo tratado com TNZ-B (1,5 mg/kg).

*TNZ-B: Tonantzitlone B

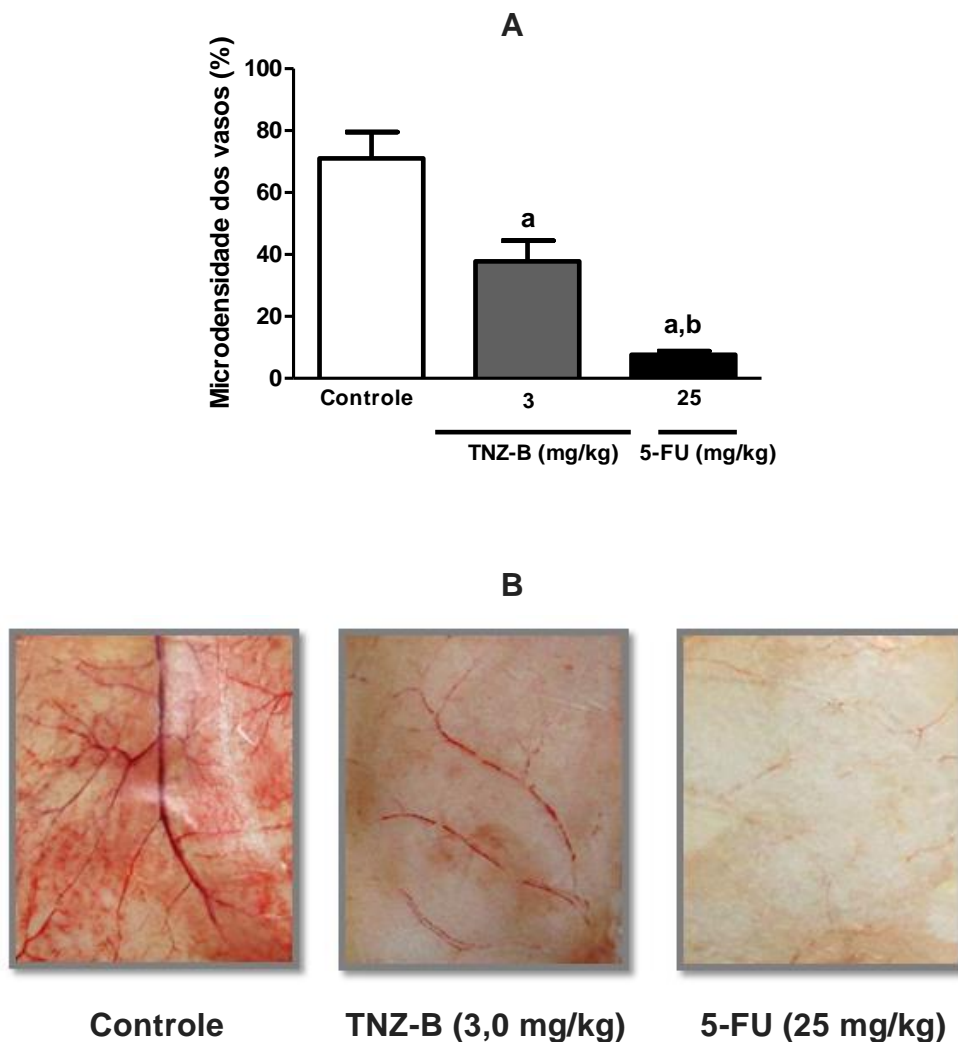
** 5-FU: 5-fluorouracila

6.2.1 Investigação do mecanismo de ação

6.2.1.1 Avaliação do efeito antiangiogênico

Pode-se observar uma redução significativa na microdensidade dos vasos peritoneais no grupo tratado com TNZ-B ($37,7 \pm 0,67\%$; $p < 0,05$) assim como no grupo tratado com a droga padrão 5-FU ($7,6 \pm 0,01\%$; $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle ($72 \pm 0,08\%$; $p < 0,05$) (Figura 10A).

Figura 10. Efeito do tratamento com TNZ-B* (3,0 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.



LEGENDA: A: densidade de microvasos (%) foi determinada selecionando a área do vaso sanguíneo por campo em áreas vascularizadas selecionadas, divididas por toda a área. Figuras foram cortadas em

tamanho padrão (1 cm x 1 cm). B: Imagens representativas da inibição da angiogênese peritoneal pelo tratamento com TNZ-B, tal como observado pela redução da neovascularização. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de oito animais por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com TNZ-B.

*TNZ-B: Tonantzitolone B

** 5-FU: 5-fluorouracila

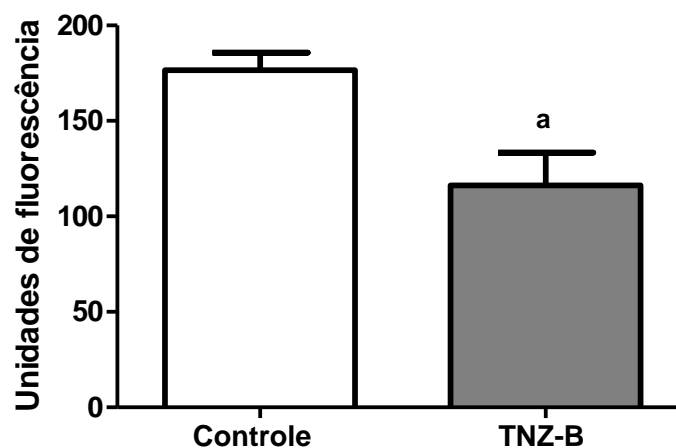
6.2.1.2 Avaliação do estresse oxidativo

6.2.1.2.1 Ensaio do DCFH

A figura 11 representa o efeito do tratamento de sete dias com TNZ-B (3,0 mg/kg, i.p.) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em modelo de tumor ascítico de Ehrlich.

TNZ-B reduziu a produção de ROS ($116,3 \pm 17,1$ unidades de fluorescência; $p < 0,05$), em relação ao grupo controle ($176,2 \pm 9,2$ unidades de fluorescência).

Figura 11. Efeito do tratamento de sete dias com TNZ-B (3mg/kg, i.p.) na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em modelo de tumor de Ehrlich.



LEGENDA: Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisado por *t* student seguido de Mann Whitney. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

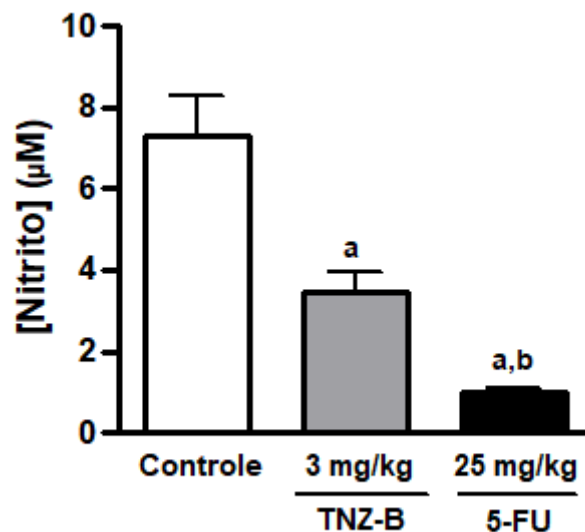
* TNZ-B: Tonantzitolone B

** 5-FU: 5-fluorouracila.

6.2.1.2.2 Quantificação dos níveis de nitrito

Foi observada significativa redução na concentração de nitrito dos animais tratados com TNZ-B ($3,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$; $p < 0,05$), assim como com o 5-FU ($1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$; $p < 0,05$), quando comparados com os animais do grupo controle ($7,3 \pm 1,0 \mu\text{M}$) (Figura 12).

Figura 12. Efeito do tratamento de sete dias com TNZ-B* (50 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) na produção de nitrito no fluido peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico Ehrlich.



LEGENDA: Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de oito animais analisados. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de Tukey ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo TNZ-B.

* TNZ-B: Tonantzilolone B

** 5-FU: 5-fluorouracila.

6.2.2 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich

6.2.2.1 Avaliação ponderal e consumo de água e ração

Os dados expressos na figura 13 são referentes ao consumo de água e ração, bem como a evolução ponderal dos animais, durante o tratamento de sete dias. Pode-se observar que houve redução significativa no consumo de água no grupo tratado com 3,0

mg/kg de TNZ-B ($60,0 \pm 5,0$ mL; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($83,3 \pm 8,3$ mL). Resultado semelhante foi observado para o grupo tratado com 25 mg/kg de 5-FU ($35,9 \pm 2,4$ mL; $p < 0,05$), em comparação ao controle.

Foi observada redução no consumo de ração por parte dos animais tratados com 3,0 mg/kg de TNZ-B ($44,7 \pm 7,33$ g; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($60,3 \pm 10,8$ g). O tratamento com 5-FU também reduziu o consumo de ração ($38,4 \pm 2,3$ g), quando comparado ao controle. Em relação ao peso corporal, o tratamento com TNZ-B, assim como o 5-FU, reduziu significativamente o peso final dos animais ($28,2 \pm 0,4$ g e $26,6 \pm 0,8$ g, respectivamente; $p < 0,05$ para ambos), após sete dias de tratamento, quando comparados ao grupo controle ($38,13 \pm 0,87$ g).

Figura 13. Efeito do tratamento de sete dias com TNZ-B* (3,0 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) no consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.

Grupos	Dose (mg/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	-	$83,3 \pm 8,3$	$60,3 \pm 10,8$	$32,8 \pm 0,6$	$38,1 \pm 0,8$
5- FU**	25	$35,9 \pm 2,4^a$	$38,4 \pm 2,3^a$	$32,0 \pm 0,6$	$26,6 \pm 0,8^a$
TNZ-B*	3,0	$60,0 \pm 5,0^a$	$44,7 \pm 7,3^a$	$31,1 \pm 1,2$	$28,2 \pm 0,4^a$

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais, analisados por ANOVA seguido por Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle;.

* TNZ-B (Tonantzitlolone B)

** 5-FU – 5-fluorouracila

6.2.2.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

A análise toxicológica dos efeitos de TNZ-B incluiu também a avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos, que são mostrados nas tabelas 4 e 5.

Não houve diferença em nenhum dos parâmetros bioquímicos avaliados (AST, ALT, ureia e creatinina) após tratamento com TNZ-B (3,0 mg/kg) ou 5-FU (25 mg/kg).

Figura 14. Efeito do tratamento de sete dias com TNZ-B* (3,0 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.

Grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Controle	-	165,9 ± 12,6	170,1 ± 10,8	35,4 ± 3,0	0,8 ± 0,0
5- FU**	25	154,4 ± 8,5	176,6 ± 3,4	35,4 ± 3,1	0,8 ± 0,0
TNZ-B*	3,0	160,0 ± 9,5	152,6 ± 9,7	35,4 ± 3,5	0,8 ± 0,0

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de oito animais, analisados por ANOVA seguido por Tukey.

*TNZ-B: Tonantzitlolone B.

** 5-FU: 5-fluorouracila.

No que diz respeito à avaliação hematológica, foi evidenciada redução apenas no número de eritrócitos nos animais tratados com TNZ-B 3,0 mg/kg ($8,6 \pm 0,1 \cdot 10^6/\text{mm}^3$; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($10,0 \pm 0,3 \cdot 10^6/\text{mm}^3$) (Figura 14).

Nos animais tratados com a droga padrão 5-FU, em relação ao eritrograma, observou-se redução do número de eritrócitos ($5,8 \pm 0,2 \cdot 10^6/\text{mm}^3$; $p < 0,05$), hemoglobina ($11,8 \pm 0,3 \text{ g/dL}$; $p < 0,05$) e hematócrito ($35,0 \pm 1,1\%$; $p < 0,05$) em comparação aos seus respectivos controles ($10,0 \pm 0,3 \cdot 10^6/\text{mm}^3$; $14,8 \pm 0,3 \text{ g/dL}$; $50,8 \pm 1,2\%$, respectivamente) (Figura 14).

Em relação ao leucograma, é possível observar que o 5-FU induziu redução de leucócitos totais ($3,7 \pm 0,3 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; $p < 0,05$), segmentados ($9,4 \pm 0,9\%$; $p < 0,05$) e de monócitos ($1,0 \pm 0,3\%$; $p < 0,05$), quando comparados aos valores dos grupos controle ($13,1 \pm 0,9 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; $19,0 \pm 1,1\%$ e $2,9 \pm 0,3\%$, respectivamente). Ainda, foi observado um aumento no percentual de linfócitos ($88,0 \pm 1,1\%$; $p < 0,05$), em comparação ao grupo controle ($77,0 \pm 1,0\%$) (Figura 15).

Figura 15. Efeito do tratamento de sete dias com TNZ-B* (3,0 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.

Parâmetro	Controle	5-FU 25 mg/kg	TNZ-B 3,0 mg/kg
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	10,0 ± 0,3	5,8 ± 0,2 ^a	8,6 ± 0,1 ^{a,b}
Hemoglobina (g/dL)	14,8 ± 0,3	11,8 ± 0,3 ^a	13,9 ± 0,2 ^b
Hematócrito (%)	50,8 ± 1,2	35,0 ± 1,1 ^a	50,1 ± 0,6 ^b
VCM (fm ³)	56,6 ± 3,6	63,8 ± 1,7	58,6 ± 0,7
HCM (pg)	14,7 ± 0,1	22,0 ± 0,4 ^a	15,4 ± 0,1 ^b
CHCM (g/dL)	29,1 ± 0,2	37,6 ± 1,9 ^a	26,5 ± 0,3 ^b
Leucócitos totais (10 ³ /mm ³)	13,1 ± 0,9	3,7 ± 0,3 ^a	14,5 ± 1,0 ^b
Linfócitos (%)	77,0 ± 1,0	88,0 ± 1,1 ^a	77,5 ± 2,8 ^b
Segmentados (%)	19,0 ± 1,1	9,4 ± 0,9 ^a	17,3 ± 1,1 ^b
Monócitos (%)	2,9 ± 0,3	1,0 ± 0,3 ^a	3,3 ± 0,5 ^b
Eosinófilos (%)	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,3	1,3 ± 0,2

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de oito animais, analisados por ANOVA seguido por Tukey. ^a*p*<0,05 dados analisados em comparação com grupo controle. ^b*p*<0,05 dados analisados em comparação com grupo 5-FU.

*TNZ-B: Tonantzitlolone B.

**5-FU: 5-fluorouracila.

6.2.2.3 Avaliação do índice dos órgãos

O tratamento com TNZ-B induziu aumento significativo nos índices de coração ($4,2 \pm 0,2$ mg/g; $p < 0,05$), baço ($6,2 \pm 0,6$ mg/g; $p < 0,05$), fígado ($57,5 \pm 1,2$ mg/g; $p < 0,05$) e rins ($11,0 \pm 0,4$ mg/g; $p < 0,05$), quando comparado aos grupos controles ($2,9 \pm 0,2$ mg/g; $3,6 \pm 0,3$ mg/g; $48,9 \pm 1,9$ mg/g e $8,8 \pm 0,3$ mg/g, respectivamente) (Figura 16). Para o 5-FU, foi observado aumento no índice de coração ($4,1 \pm 0,3$; $p < 0,05$), de fígado ($63,4 \pm 1,3$; $p < 0,05$) e de rins ($11,1 \pm 0,4$; $p < 0,05$), em comparação aos seus respectivos controles.

Figura 16. Índices dos órgãos de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias com TNZ-B* (3,0 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.).

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de coração (mg/g)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)
Controle	-	$2,9 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,3$	$48,9 \pm 1,9$	$8,8 \pm 0,3$
5-FU	25	$4,1 \pm 0,3^a$	$2,3 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,1$	$63,4 \pm 1,3^a$	$11,1 \pm 0,4^a$
TNZ-B	3,0	$4,2 \pm 0,2^a$	$2,1 \pm 0,3$	$6,2 \pm 0,6^{a,b}$	$57,5 \pm 1,2^a$	$11,0 \pm 0,4^a$

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de oito animais, analisados por ANOVA seguido por Tukey.

^a $p < 0,05$ dados analisados em comparação com grupo controle. ^b $p < 0,05$ dados analisados em comparação com grupo 5-FU.

*TNZ-B: Tonantzitlolone B.

**5-FU: 5-fluorouracila.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Apesar do recente desenvolvimento de novas terapias, o câncer ainda é considerado uma doença de difícil tratamento, e a alta taxa de mortalidade comprova a necessidade de busca por terapias mais eficientes (SKOVLUND; LEUFKENS; SMYTH, 2018).

Dessa forma, considerando a importância dos produtos naturais como fonte de substâncias ativas contra o câncer, e ainda, reconhecendo o potencial antitumoral de diversos diterpenos (XU et al., 2018), este estudo se propôs a avaliar a toxicidade e o potencial antitumoral de tonantzitolone B (TNZ-B), um diterpeno isolado de *Stillingia loranthaceae* (Euphorbiaceae) que não apresenta relatos na literatura de estudos *in vivo*.

Considerando que a aplicabilidade de um potencial fármaco depende da relação entre o seu perfil de toxicidade e seu potencial biológico, os estudos de toxicidade são imprescindíveis para a determinação das doses a serem usadas nos ensaios farmacológicos.

O passo inicial na determinação do perfil de toxicidade de uma amostra é a avaliação da toxicidade não clínica aguda. Os testes que avaliam a toxicidade aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de toxicidade ou letalidade (VALADARES, 2006). Dessa forma, o presente estudo iniciou com a avaliação da toxicidade aguda de TNZ-B.

A partir dos resultados obtidos pode-se estimar a DL⁵⁰ de TNZ-B em 25 mg/kg e classificá-la na categoria 2 do *Globally Harmonized Classification System*, sugerindo que a mesma apresenta alta toxicidade aguda, por via intraperitoneal. Todavia, entre os parâmetros comportamentais avaliados observou-se apenas perda do reflexo corneal e auricular, e contorções abdominais, porém, até quatro horas após os tratamentos, esses sinais desapareceram. Sendo assim, essas alterações isoladas não são suficientes para caracterizar a toxicidade, ou mesmo, sugerir causa da morte dos animais.

Considera-se que, em geral, se a DL₅₀ da substância de ensaio é três vezes maior do que a dose mínima eficaz, a substância é considerada como um bom candidato para estudos posteriores (ODEGHE; UWAKWE; MONAGO, 2012; AMELO; NAGPAL; MAKONNEN, 2014). Dessa forma, o resultado do ensaio de toxicidade aguda foi utilizado para a determinação de doses seguras a serem utilizadas nos ensaios farmacológicos, de maneira a permitir a determinação de uma janela terapêutica suficiente para minimizar efeitos indesejáveis nos ensaios farmacológicos.

Testes moleculares e citogenéticos são importantes para avaliar a toxicidade celular e identificar potenciais agentes mutagênicos, permitindo assim, avaliar alterações no DNA ou nos cromossomos (NAI et al., 2015). O teste do micronúcleo tem sido amplamente utilizado para testar a genotoxicidade de diversas amostras, este teste permite identificar um aumento na frequência de mutação em células de sangue periférico ou medula óssea (BELCAVELLO et al., 2012).

Os micronúcleos são originados de cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos que no momento da divisão celular não foram incluídos nos núcleos das células filhas. Esse fenômeno pode ser induzido por alguns fatores como exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos, vários defeitos genéticos envolvendo mal funcionamento dos pontos de verificação do ciclo celular e/ou reparo de DNA (PARDINI et al., 2017), bem como pelo uso de drogas antineoplásicas que podem causar efeitos colaterais que incluem indução de genotoxicidade em células não tumorais (MANGUEIRA et al., 2017).

Considerando que o tratamento com TNZ-B nas doses de 3,0 mg/kg (dose terapêutica determinada a partir do ensaio de toxicidade aguda e estudos farmacológicos piloto) e 6,0 mg/kg (dobro da dose terapêutica) não provocou um aumento significativo no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico dos animais tratados, pode-se sugerir que o mesmo não possui efeito genotóxico no sistema eritroide. Não há dados na literatura de genotoxicidade para diterpenos flexibilano. Todavia, diferentes diterpenos, incluindo o paclitaxel, um antineoplásico utilizado clinicamente para o tratamento de vários tipos de cânceres humanos, é capaz de induzir dano ao DNA em teste de micronúcleo em sangue periférico (BRANHAM et al., 2004).

Com base nessas informações e em triagens preliminares, foi possível confirmar as doses de 1,5 e 3,0 mg/kg de TNZ-B para a avaliação de sua atividade antitumoral *in vivo*.

Para a avaliação da atividade antitumoral *in vivo* de TNZ-B foi utilizado o modelo de tumor de Ehrlich que se constitui como uma neoplasia experimental transplantável de origem epitelial maligna, correspondendo ao adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea. No ensaio, o 5-fluorouracil (5-FU) foi utilizado como droga padrão. O 5-FU, um análogo do uracil e também da timina, é um agente quimioterápico classificado como antimetabólito, pertencente à classe dos fármacos análogos da pirimidina. É uma droga específica que atua na fase G1 e na fase S do ciclo celular, inibindo a síntese do RNA ou do DNA, respectivamente (CHEN; ZENG, 2018). Para exercer sua ação tóxica, a

droga precisa ser ativada metabolicamente, gerando por reações enzimáticas os compostos trifosfato de fluorouridina (FUTP), monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP) ou trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP). Dessa forma, pode atuar de duas maneiras: inibindo a atividade da enzima timidilato sintase (TS) e conseqüentemente afetando a produção do nucleotídeo timina ou sendo incorporado ao DNA e/ou RNA da célula, impedindo seu funcionamento normal e induzindo apoptose (SAVVA-BORDALO et al., 2010; PENNA, 2017).

No presente estudo, 5-FU induziu potente atividade antitumoral por reduzir todos os parâmetros avaliados (volume, massa e total celular), o que justifica a escolha deste fármaco como droga padrão em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

O tratamento de sete dias com TNZ-B em animais transplantados com carcinoma de Ehrlich reduziu significativamente os parâmetros volume tumoral, massa tumoral e total celular, não havendo diferença significativa entre o efeito produzido pelo TNZ-B (3,0 mg/kg) e pela droga padrão utilizada (5-FU, 25 mg/kg), o que indica que TNZ-B apresenta potente atividade antitumoral. Esses resultados corroboram resultados de atividade antitumoral *in vitro* em células U937 (Linfoma), para o composto TNZ-B (PFEFFER et al., 2016). Todavia, não há dados de atividade antitumoral *in vivo* para diterpenos flexibilano. Corroborando o resultado obtido, outros diterpenos são descritos na literatura por apresentarem atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, tais como docetaxel (GHASSAMI et al., 2018), paclitaxel (BOHLMANN.; KEELING. 2008) e ingenol (KITAMURA et al., 2006).

Diante de resultados promissores relacionados à atividade antitumoral de TNZ-B, e ainda considerando a atividade antiangiogênica (TONISSI et al, 2015) e antioxidante (HABTEMARIAM.; VARGHESE, 2015) de outros diterpenos, a presente pesquisa prosseguiu com a investigação de possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antitumoral de TNZ-B. Para isso, foi investigado a capacidade de TNZ-B induzir efeito antiangiogênico e/ou alterar o estado redox para induzir morte celular.

Vários fármacos existentes no mercado, atualmente utilizados para o tratamento do câncer, exercem seus efeitos por induzir ação antiangiogênica. Isso por que a angiogênese é um processo essencial para a nutrição e crescimento dos tumores, bem como para o surgimento de metástases. Sendo assim, drogas com atividade antiangiogênica são consideradas importantes na perspectiva de usá-las isoladamente e, especialmente, em combinação com drogas citotóxicas, para maximizar a efetividade da terapia (HIGASHI et al., 2018).

No presente trabalho, considerando que TNZ-B reduziu a microdensidade dos vasos peritumorais, pode-se inferir que seus efeitos antitumorais envolvem, pelo menos parcialmente, uma ação antiangiogênica. Não há dados na literatura de atividade antiangiogênica para diterpenos do tipo flexibilano. Todavia, esses dados corroboram dados da literatura que mostram que outros diterpenos de diversas classes, tais como, poncidina e oridonina também exercem seus efeitos antitumorais por induzir ações antiangiogênicas (CUNHA, 2006).

A inibição da angiogênese pode estar relacionada a uma redução de fatores pró-angiogênicos ou ao aumento de fatores antiangiogênicos. Para o diterpeno paclitaxel, por exemplo, foi observado efeito antiangiogênico via redução na expressão de VEGF and Ang-1 em células tumorais, além do aumento da secreção de TSP-1 no microambiente tumoral (BOCCI.; DI-PAOLO.; DANESI, 2015). Portanto, estudos adicionais devem ser realizados na perspectiva de identificar o(s) alvo(s) molecular(es) relacionado(s) ao efeito antiangiogênico de TNZ-B.

O aumento de ROS tem sido identificado em vários tipos de cânceres, sugerindo que os radicais livres podem conduzir a diversas formas de danos celulares e auxiliar na progressão tumoral (MUNHOZ et al., 2016). Por causa da natureza difusa do estresse oxidativo, uma célula pode manifestar diferentes respostas em diferentes compartimentos celulares e em diferentes níveis de estresse (MURRAY; MIRZAYANS; MCBRIDE, 2018).

O tratamento por sete dias com TNZ-B reduziu os níveis de ROS em células de tumor de Ehrlich, o que permite inferir que parte do seu mecanismo de ação antitumoral envolve seu potencial antioxidante. Sendo assim, TNZ-B atua reduzindo níveis celulares de ROS e combatendo seus efeitos pró-tumorais relacionados ao estímulo de diversas vias de sinalização envolvidas com proliferação e sobrevivência. Além disso, considerando os efeitos pró-angiogênicos de ROS (MOURA, 2017), pode-se sugerir que TNZ-B induz seus efeitos antiangiogênicos por modular o estresse oxidativo celular.

Estes resultados corroboram dados da literatura que mostram que alguns diterpenos apresentam atividade antioxidante (SOUSA et al., 2018), como a casearina, um diterpeno do tipo clerodano que mostrou proteger o DNA contra diferentes tipos de danos e agir como um antioxidante induzindo a produção de enzimas desintoxicantes em células HepG2 (LI.; MORRIS-NATSCHKE.; LEE, 2017). O ácido carnósico também mostrou ser um potente antioxidante tanto em ensaios *in vivo* como *in vitro* (DAS et al., 2018), assim como o ferruginol, um outro importante diterpeno com atividade antioxidante

(SAIJO et al., 2015). Outro exemplo é o carnosol, um diterpeno fenólico que, assim como TNZ-B, apresenta atividade antiangiogênica e antioxidante em células tumorais. Dessa forma, é perceptível essa marcante característica dos diterpenos em produzir seu efeito antitumoral por meio desses mecanismos (CHUN et al., 2014).

No contexto do estresse oxidativo/nitrosativo, o óxido nítrico (NO) apresenta-se como um importante mediador, que possui efeitos dicotômicos no câncer, resultantes da sua capacidade de interferir com o crescimento tumoral, migração, invasão, sobrevivência, angiogênese e metástase (BURKE et al., 2013; KUNDU; SURH, 2012). Especialmente relacionado à angiogênese, sabe-se que o NO é um importante mediador desse processo da indução do crescimento de células endoteliais e também via regulação do fluxo sanguíneo.

Aliado aos dados obtidos de efeitos antiangiogênicos e antioxidantes para o TNZ-B, foi observado também que este diterpeno reduziu os níveis de NO no microambiente tumoral, sugerindo que este mediador também foi modulado pelo TNZ-B para produzir seus efeitos antiangiogênicos. Em conjunto os dados sugerem que TNZ-B induz seu efeito antitumoral por exercer ação antiangiogênica via modulação de ROS e NO.

A quimioterapia é umas das modalidades de tratamento que possui maior índice de cura e a que mais aumenta a sobrevida dos pacientes oncológicos (BONASSA; GATO, 2012). Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atuam de forma não-específica lesando todas as células em proliferação descontrolada, sem distinguir as células malignas das normais e, deste modo, tem como consequência o aparecimento de efeitos tóxicos, diminuindo a qualidade de vida dos pacientes (ANDRADE et al., 2018).

Diante disso, foi realizada também a investigação de possíveis efeitos tóxicos do TNZ-B na dose de 3,0 mg/kg no experimento de avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de tumor de Ehrlich, após o tratamento de sete dias. Esse ensaio permite avaliar os efeitos tóxicos produzidos pelo acúmulo da substância no organismo por meio de administrações repetidas.

Consumo de água e de ração, bem como a evolução ponderal são parâmetros que avaliam possíveis sinais toxicidade provocado por, por exemplo, alterações gastrointestinais, típico de drogas antineoplásicas. O tratamento antineoplásico está associado a efeitos colaterais indesejáveis (náuseas, vômitos, mucosite, diarreia, constipação e anorexia) que podem refletir diretamente no estado nutricional, levando à perda de peso corporal (CUSTODIA-SANTOS et al., 2018).

Nesse estudo, o tratamento com TNZ-B reduziu o consumo de água e ração, bem como, o peso dos animais. Da mesma forma aconteceu para os animais tratados com 5-FU, como já era esperado para este antineoplásico. A desnutrição é muito prevalente em pacientes oncológicos. Dentre suas causas destaca-se o aumento do estresse metabólico, anorexia e o efeito das drogas antineoplásicas nos enterócitos, capazes de alterar a função do trato digestivo com conseqüente má absorção (PEIXOTO et al., 2015). Considera-se que os sintomas gastrointestinais comprometeram a ingestão alimentar dos animais, justificando assim, a redução da ingestão de água e ração e peso dos animais provocados por TNZ-B.

O fígado é o maior e mais importante órgão do corpo humano. Sua função está relacionada com o metabolismo dos nutrientes e com a biotransformação de drogas e produtos químicos, protegendo assim o organismo contra substâncias tóxicas. Sendo assim, o fígado fica exposto a uma elevada concentração de substâncias e seus metabólitos o que pode levar a uma lesão hepática (AL-ASMARI et al., 2014).

As transaminases, aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT) podem ser encontradas em todos os tecidos e são responsáveis pela maioria das reações químicas do corpo. Algumas são identificadas no plasma ou no soro e a mensuração de sua taxa sanguínea pode indicar um estado de normalidade ou de dano celular (YONEDA, 2016).

AST não é uma enzima específica do fígado, quando órgãos são lesados (necrose do tecido), há liberação da AST para o soro, sendo ela quantificada através de exames bioquímicos. Como não há um método laboratorial para saber qual a origem da AST encontrada no sangue, o diagnóstico da causa do seu aumento deve levar em consideração a possibilidade de lesão em qualquer um dos órgãos onde é encontrada (JORGE, 2006; FONSECA, 2009). Por sua vez, a enzima ALT apresenta concentrações elevadas apenas no fígado (citoplasma), sendo a sua avaliação a mais útil na investigação das doenças do órgão. A enzima é liberada pelo fígado após a destruição do tecido hepático e encontrada rapidamente no sangue (FONSECA, 2009).

O tratamento com TNZ-B não alterou os níveis de AST e ALT, indicando que o mesmo não foi capaz de provocar dano hepático. Apesar do tratamento com TNZ-B não ter induzido alterações nas transaminases AST e ALT, foi observado aumento do índice do fígado. A ausência de alteração nas enzimas hepáticas mesmo com aumento do índice de fígado pode ser explicada considerando o fato de que alterações mais graves e persistentes no tecido hepático podem resultar em níveis plasmáticos normais ou

diminuídos das enzimas AST e ALT (FRANCISCATO et al., 2006; MIAZZO et al., 2005). Todavia, estudos histopatológicos devem ser realizados para permitir a correta avaliação dos danos observados em nível de índice hepático.

Os rins têm um papel principal na purificação do plasma sanguíneo, remoção de metabólitos indesejáveis, como ureia e creatinina pelos processos de filtração, secreção tubular, e reabsorção de alguns compostos bioquímicos. Os rins também regulam a concentração de constituintes líquidos do corpo, como a quantidade de água e eletrólitos no corpo, ajudando a regular o sangue fluxo e filtração glomerular (HAASE-FIELITZ et al., 2009).

A creatinina é um dos principais componentes da urina e é um produto final do metabolismo muscular. A taxa de creatinina excretada na urina é quase constante e é usada como um padrão para normalização da variação da água em urinálise. A creatinina é o componente da urina comumente utilizado para o teste de depuração renal, que mede a função de filtração renal. Também é valioso na avaliação de prejuízo e pode fornecer informações úteis sobre a saúde do rim (WANG et al, 2010).

A ureia é o principal metabólito nitrogenado proveniente de degradação de proteínas no corpo. O rim é responsável por eliminar 90% da ureia metabolizada, enquanto o restante é excretado pelo trato gastrointestinal. Embora a ureia não seja específica para o diagnóstico de distúrbios renais em geral, é considerado sensível para a detecção de distúrbios renais iniciais (SAATKAMP et al., 2016).

Um dos parâmetros para avaliar a função renal é a determinação de ureia sérica. No entanto, elevações no nível de ureia são frequentemente, mas nem sempre, devido a uma diminuição da taxa de filtração glomerular. Alguns fatores não associados à disfunção renal, tais como hemorragia gastrointestinal, terapia com corticosteróide e dieta rica em proteínas podem levar ao aumento da produção de ureia (KLEIN et al., 2008).

Os níveis de ureia e creatinina não foram alterados após o tratamento de sete dias com TNZ-B, dessa forma, pode-se sugerir que TNZ-B não provocou nenhum dano renal. Entretanto, foi observado um aumento do índice dos rins tanto para o TNZ-B como para o 5-FU, antineoplásico que apresenta conhecida toxicidade renal. A toxicidade renal é uma característica de muitos fármacos antineoplásicos, porém, o nível de toxicidade observado para o 5-FU não permite comprometer o funcionamento renal e a qualidade de vida dos pacientes, sendo assim, o 5-FU continua sendo um dos quimioterápicos mais utilizados para o tratamento de diversos tipos de câncer.

O sangue é um tecido fundamental para a manutenção de todos os demais tecidos e órgãos do organismo. Ele é composto pelo plasma sanguíneo, líquido constituído por água e por diversos elementos dissolvidos e coloidais, e pelos elementos figurados, que são as células e as plaquetas (TORTORA; DERRICKSON, 2017), sendo assim, o equilíbrio e a manutenção da produção dos elementos sanguíneos são essenciais para a manutenção da homeostase do organismo.

A hematopoiese é um processo de alta atividade mitótica e rápida proliferação celular. Esta característica faz com que a medula óssea seja extremamente susceptível aos efeitos de fármacos utilizados para o tratamento do câncer. Estudos mostram que os quimioterápicos são mielossupressores ou mielotóxicos, pois deixam a medula óssea incapaz de repor os elementos figurados do tecido sanguíneo, provocando assim anemia, leucopenia e trombocitopenia. A literatura relata que a quimioterapia é a alternativa que resulta em maiores índices de cura para muitos tumores, mesmo os mais avançados, e a que mais aumenta a sobrevivência dos pacientes. Entretanto, os efeitos colaterais, em relação ao padrão hematológico são preocupantes, pois afetam a qualidade de vida dos pacientes, visto que as células sanguíneas exercem funções importantes e indispensáveis para o bom funcionamento do organismo (BONASSA; GATO, 2012).

Os agentes antineoplásicos normalmente são tóxicos aos tecidos com um elevado índice mitótico e ciclo celular curto o que torna a toxicidade hematológica comum à maioria dos antineoplásicos (FERDINANDI; FERREIRA, 2009). Apesar de TNZ-B ter reduzido o número de hemácias após tratamento de sete dias em modelo de tumor de Ehrlich, nenhum outro parâmetro hematológico foi alterado, resultado que difere da maioria dos antineoplásicos.

De forma geral, relatos na literatura mostram hepatotoxicidade (WANG et al, 2014) e nefrotoxicidade (ZHANG et al, 2014) para diterpenos de diversas classes. Além disso, a literatura também mostra efeitos mielotóxicos para essa classe de substâncias (CHEN et al, 2013). Portanto, os dados da administração repetida de TNZ-B (sete dias) mostram que este diterpeno, diferentemente de outros com potencial farmacológico, apresenta baixa toxicidade na dose utilizada (3,0 mg/kg), avaliando-se parâmetros bioquímicos e hematológicos

Esse trabalho apresenta, em conjunto, o potencial farmacológico de TNZ-B relacionado à sua atividade antitumoral via mecanismos antiangiogênicos e antioxidantes, além da caracterização de possíveis efeitos tóxicos decorrentes de sua administração, o que subsidia a realização de testes pré-clínicos adicionais na

perspectiva de contribuir com o estudo de novos candidatos a fármacos antitumorais de diterpenos do tipo flexibileno.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

De acordo com os estudos realizados com o diterpeno tonantzitolone B (TNZ-B) pode-se concluir que:

- ✓ TNZ-B apresentou alta toxicidade aguda, quando administrado por via intraperitoneal em camundongos;
- ✓ TNZ-B não apresentou genotoxicidade *in vivo*;
- ✓ TNZ-B apresentou potente atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich;
- ✓ TNZ-B exerce seu efeito antitumoral por produzir efeitos antiangiogênicos e antioxidantes;
- ✓ TNZ-B induziu baixa toxicidade *in vivo* em animais com carcinoma de Ehrlich submetidos ao tratamento de doses repetidas (sete dias), considerando-se os parâmetros bioquímicos e hematológicos. Todavia, levando em consideração as alterações observadas nos índices dos órgãos avaliados, estudos histopatológicos devem ser realizados para melhor caracterização desses efeitos;

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AUGUSTIN, H. G. Commentary on folkman: "How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? **The Journal of Cancer Research**, v. 76, n. 10, p. 2854–2856, 2016.

AUGUSTO, M.; AIRES, M. Novas terapias com alvo-molecular para o câncer de pulmão de não-pequenas células. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 5, p. 65–69, 2018.

AMARAL, J. B. Do. **Células MCF-7 como modelo 3D no estudo de câncer de mama humano**. 2010. 137 f. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas, 2010.

ARCIDIACONO, P.; FRANCESCO R.; ANNA S.; et al. Antitumor activity and expression profiles of genes induced by sulforaphane in human melanoma cells. **European journal of nutrition**, p. 1-23, 2017.

HAASE-FIELITZ, A et al., "Novel and conventional serum biomarkers predicting acute kidney injury in adult cardiac surgery—a prospective cohort study," **Crit. Care Med.** 37(2), 553–560 (2009).

BANSAL, A.; SIMON, M. C. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. **Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 7, p. 2291–2298, 2018.

BAR-ZEEV, M.; LIVNEY, Y. D.; ASSARAF, Y. G. Targeted nanomedicine for cancer therapeutics: Towards precision medicine overcoming drug resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 31, p. 15-30, 2017.

BEHL, C.; ZIEGLER, C. **Cell Aging: Molecular Mechanisms and Implications for Disease**, p. 9-19, 2014.

BOIN, C.; LAMBERT, S.; THOMANN, P.; et al. Maladie de Castleman: désensibilisation rapide après une réaction d'hypersensibilité au rituximab. **Revue de Medecine Interne**, v. 37, n. 6, p. 433–436, 2016.

BOCCI, L.; DI PAOLO, U.; DANESI, R. The pharmacological bases of the antiangiogenic activity of paclitaxel. **Angiogenesis**, v. 16, p. 481, 2013.

BUTLER, D. E.; CHRISTOPHER, M.; HANNAH, F. W.; et al. Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway activates autophagy and compensatory Ras/Raf/MEK/ERK signalling in prostate cancer. **Oncotarget**, v. 8, p. 56698-56713, 2017.

BURKE, A. J.; SULLIVAN, F. J.; GILES, F. J.; GLYNN, S. A. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 3, p. 503-512, 2013.

BRETAGNE, M.; BOUDOU-ROUQUETTE, P.; HUILLARD, O.; et al. Inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'angiogenèse et sujets âgés: tolérance, évaluation pré-thérapeutique et gestion des effets indésirables. **Bulletin du Cancer**, v. 103, 2015.

CAPP, C.; ZENNIG, N.; WAJNER, S.; et al. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. **Clinical & Biomedical Research**, v. 29, n. 1, p. 51–59, 2009.

CARVALHO, E. V. M. M.; OLIVEIRA, W. F.; COELHO, L. C. B. B.; et al. Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed. **Life Sciences**, v. 207, p. 152–157, 2018.

CEBORSKA, M. Structural investigation of the β -cyclodextrin complexes with chiral bicyclic monoterpenes—Influence of the functionality group on the host-guest stoichiometry. **Journal of Molecular Structure**. v. 1145, p. 204-210, 2017.

COSTA, A. M.; SILVA, V. V. Estratégias nanotecnológicas para diagnóstico e tratamento do câncer. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 5, p. 1–13, 2017.

COTA, B. B.; JOHANN, S.; OLIVEIRA, D. M.; et al. Biological potential of *Stillingia oppositifolia*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 1, p. 70–77, 2011.

CUI, Y.; WANG, Y.; DENG, J.; et al. Chrysofile effects on the expression of anti-oncogene P53 and P16 and oncogene C-jun and C-fos in Wistar rats' lung tissues. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–11, 2017.

CHEN, Z.; SHI, T.; ZHANG, L.; et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. **Cancer Letters**, v. 370, p. 153-164, 2016.

CHEN, Y.Y.; GUO, J.M.; QIAN, Y.F.; GUO, S.; MA, C.H.; DUAN, J.A. Toxicity of daphnane-type diterpenoids from Genkwa Flos and their pharmacokinetic profile in rat. **Phytomedicine**, v. 21, p. 82, 2013.

DA SILVA, I. L.; EMERSON, S. V.; IVY N. N. G.; et al. Qa-2 expression levels is related with tumor-infiltrating lymphocytes profile during solid Ehrlich tumor development. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 750-756, 2017.

DA SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 38–42, 2014.

DAY, D.; ARTA M. M.; ELAD S.; et al. From famine to feast: developing early-phase combination immunotherapy trials wisely. **Clin Cancer Res**, v. 23, p. 4980-4991, 2017.

DE OLIVEIRA, G. A.; et al. Inducible nitric oxide synthase in the carcinogenesis of gastrointestinal cancers. **Antioxidants & redox signaling**, v. 26, n. 18, p. 1059-1077, 2017.

DE PALMA, M.; BIZIATO, D.; PETROVA, T. V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 8, p. 457–474, 2017.

DE SOUSA, I. P.; TEIXEIRA, M. V. S.; FURTADO, N. A. J. C. Uma visão geral da biotransformação e toxicidade de diterpenos. **Molecules**, v. 23, 2018.

DIAS, D. M. **Imunoterapia baseada em células dendríticas no cancro pancreático**. 2016. 45 f. Monografia (mestrado integrado) – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2016.

EL-MAGD, M. A.; ABEER, K.; SAMAH, K. N. E.; et al. Trehalose enhances the antitumor potential of methotrexate against mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 870-878, 2017.

FARAJI, F.; EISELE, D. W.; FAKHRY, C. Emerging insights into recurrent and metastatic human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Laryngoscope investigative otolaryngology**, v. 2, n. 1, p. 10-18, 2017.

FISCHER, A.; WIGNAND, W. D.; MÜHLHÄUSER, B. W.; et al. Membrane localization of acetylated CNK1 mediates a positive feedback on RAF/ERK signaling. **Science advances**, v. 3, p. e1700475, 2017.

FIUZA, M.; RIBEIRO, L.; MAGALHÃES, A.; et al. Organização e implementação de uma consulta de cardio-oncologia. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 35, p. 485-494, 2016.

FUKAMI, M.; ERINA, S.; MAKI, I.; et al. Gain-of-function mutations in G-protein–coupled receptor genes associated with human endocrine disorders. **Clinical endocrinology**, v. 88, p. 351-359, 2018.

GARCÍA-LEÓN, F. J.; GARCÍA-ESTEPA, R.; ROMERO-TABARES, A.; et al. Tratamiento del cáncer de laringe avanzado y calidad de vida. Revisión sistemática. **Acta Otorrinolaringologica Espanola**, v. 68, n. 4, p. 212–219, 2017.

GELETA, B.; MAKONNEN, E. Cyclic Dependent Kinase (CDK): Role in Cancer Pathogenesis and as Drug Target in Cancer Therapeutics. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 8, n. 6, p. 160–167, 2016.

GOMES, R. V.; RODRIGUES, M. Â.; RODRIGUES, J. B. S. R. Expressão do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) em colangiocarcinomas: fatores preditivos e sobrevida. **Revista Col Bras Cir**, v. 45, n. 3, p. 1–9, 2018.

GONZÁLEZ, Ó.; CARLES, Z.; ENRIC, C.; et al. Biopsia selectiva del ganglio centinela en el carcinoma papilar de tiroides en pacientes sin evidencia preoperatoria de metástasis ganglionar. **Endocrinología, Diabetes y Nutrición**, v. 64, p. 451-455, 2017.

GUERREIRO, D. D.; CARVALHO, A. A.; LIMA, L. F.; et al. Impacto dos agentes antineoplásicos sobre os folículos ovarianos e importância das biotécnicas reprodutivas na preservação da fertilidade humana. *Reprodução & Climatério*, v. 30, p. 90-99, 2015.

HASANPOURGHADI, M; PANDURANGAN, A. K; MUSTAFA, M. R. Modulation of oncogenic transcription factors by bioactive natural products in breast cancer. *Pharmacological research*, v.128, p. 376 – 388, 2017.

HILBIG, J.; PRISCILA, B. P.; VALDELÚCIA M. A. S. G.; et al. Aqueous extract from pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell show activity against breast cancer cell line MCF-7 and Ehrlich ascites tumor in Balb-C mice. *Journal of ethnopharmacology*, v. 211, p. 256-266, 2018.

HIGASHI, T.; OZAWA, K.; TAKAGI, S.; et al. A case of recurrent breast cancer with complete response to Eribulin monotherapy after Bevacizumab plus Paclitaxel Combination therapy. *Gan Para Kagaku Ryoho*. v. 45, p. 1093-1095, 2018.

HABTEMARIAM, S.; VARGHESE, G.K. A novel diterpene skeleton: identification of a highly aromatic, cytotoxic and antioxidant 5-methyl-10-demethyl-abietane-type diterpene from *Premna serratifolia*. *Phytother Res*. v. 29, p. 80-5, 2015.

JEIHOONI, A. K.; DINDARLOO, S. F.; HARSINI, P. A. Effectiveness of Health Belief Model on Oral Cancer Prevention in Smoker Men. *Journal of Cancer Education*, 2018.

JERÓNIMO, A.; RODRIGUES, G.; VILAS-BOAS, F.; et al. Hydrogen peroxide regulates angiogenesis-related factors in tumor cells. *Biochemistry and Cell Biology*, v. 95, n. 6, p. 679–685, 2017.

JIAN, BAIYU; ZHANG, HAO; LIU, JICHENG. Structural Diversity and Biological Activities of Diterpenoids Derived from *Euphorbia fischeriana* Steud. *Molecules*, v. 23, n. 4, p. 935, 2018.

JIA, XUE-DONG; SHUO, W.; MING-HUA, W.; et al. Synthesis and in vitro antitumor activity of novel naphthyridinone derivatives. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, p. 235-239, 2017.

KALIKS, R. A.; MATOS, T. F.; SILVA, V. A.; et al. Diferenças no tratamento sistêmico do câncer no Brasil: meu SUS é diferente do teu SUS. **Braz J Oncol**, v. 13, p. 1-12, 2017.

KASALA, E. R.; BODDULURU, L. N.; MADANA, R. M.; et al. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. **Toxicology letters**, v. 233, p. 214-225, 2015.

KITAMURA, M.; HIROKAWA Y.; MAEZAKI, N.; Chem. Eur. J. 2009, 15, 9911; Ríos, J. L.; Giner, R. M.; Prieto, J. M. **Stud. Nat. Prod. Chem.** v. 26, p. 183, 2006.

KHATAMI, M. Cancer; an induced disease of twentieth century! Induction of tolerance, increased entropy and 'Dark Energy': loss of biorhythms (Anabolism v. Catabolism). **Clinical and Translational Medicine**, v. 7, n. 1, p. 20, 2018.

KUNDU, J. K.; SURH, Y-J. Emerging avenues linking inflammation and cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 9, p. 2013-2037, 2012.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging biological principles of metastasis. **Cell**, v. 168, p. 670-691, 2017.

LEITE, C. A. V. G.; CALLADO, R. B.; RIBEIRO, R. A. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 8, n. 29, p. 130–142, 2012.

LENAIN, C.; CAROLYN, A. DE G.; LUDO, P.; et al. Massive reshaping of genome–nuclear lamina interactions during oncogene-induced senescence. **Genome research**, v. 27, p. 1-11, 2017.

LITTY, J.; JESSIL, M. A.; SREEDHARA, R. P.; et al. Promising anticancer activities of J. simplex in cellular and animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, 2017.

LORION, R.; BLADOU, F.; SPATZ, A.; et al. Microenvironnement du cancer de la prostate: structure, fonctions et applications thérapeutiques. **Progres en Urologie**, v. 26, n. 8, p. 464–476, 2016.

LUDZKI, A. C.; PATAKY, M. W.; CARTEE, G. D.; HOROWITZ, J. F. Acute endurance exercise increases Vegfa mRNA expression in adipose tissue of rats during the early stages of weight gain. *Appl Physiol Nutr. Metab.* p. 1–15, 2018.

MARTINS, G. G. **Estudo de efeitos antineoplásicos e toxicológicos da *Gochnatua polymorpha ssp. floccosa* em ratos com tumor Walker-256**. 2014. 58 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, 2014.

MATELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio, p. 54–57, 2017.
MATTOX, T. W. Cancer cachexia: cause, diagnosis, and treatment. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 32, p. 599-606, 2017.

MORGADO-CARRASCO, D.; TERC, F.; ERTEKIN, S. S.; et al. FR-Imunoterapia en el cáncer cutáneo avanzado Immunotherapy For Advanced Skin Cancer. **Actas dermosifiliográficas**, p. 1–4, 2018.

MOURA, A.P.G. Toxicidade e potencial antitumoral de um derivado sintético 2-aminotiofeno. 2017. 134 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, 2017.

MOYSÉS, A. M. B.; DURANT, L.C.; ALMEIDA, A. M.; et al. Integrative review of factors related to the nursing diagnosis nausea during antineoplastic chemotherapy. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 24, 2016.

MURRAY, D.; MIRZAVANS, R.; MCBRIDE, WH. Defesas contra forças pró-oxidantes – Manutenção da integridade e longevidade celular e genômica. 2018.

NAGANO, T.; LUBLING, Y.; VARNAL, C.; et al. Cell cycle dynamics of chromosomal organisation at single-cell resolution. **Revista de Biology**, 2016.

OCHOA, M. C.; MINUTE, L.; RODRIGUEZ, I.; et al. Antibody-dependent cell cytotoxicity: Immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. **Immunology and Cell Biology**, v. 95, n. 4, p. 347–355, 2017.

OZFILIZ-KILBAS, P.; SARIKAYA, B.; OBAKAN-YERLIKAYA, P.; et al. Cyclin-dependent kinase inhibitors, roscovitine and purvalanol, induce apoptosis and autophagy related to unfolded protein response in HeLa cervical cancer cells. **Molecular Biology Reports**, 2018.

PAULO, J.; SERVATO, S. **Efeitos da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no desenvolvimento e progressão do carcinoma de células escamosas bucal experimental e humano**. 2016. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

PASTORI, T.; KUHN, A. W.; TEDESCO, M.; et al. Ação genotóxica e antiproliferativa de *Polygonum punctatum* Elliott (Polygonaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 186–194, 2015.

PIRES, P. A. C. **Papel do Óxido Nítrico Sintase e sua regulação nos tumores ginecológicos (Fibromiomas e carcinomas do colo do útero)**. 2017. Dissertação (mestrado) – Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 2017.

POLO, M. DE L. H.; ELIZABETH, D.; REJ, B.; et al. Surgical considerations when reporting MRI studies of soft tissue sarcoma of the limbs. **Skeletal radiology**, v. 46, p. 1667-1678, 2017.

POPRAC, P.; JOMOVA, K.; SIMUNKOVA, M.; et al. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 7, p. 592–607, 2017.

POSTOVIT, L.; WIDMANN, C.; HUANG, P.; et al. Harnessing Oxidative Stress as an Innovative Target for Cancer Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 10–11, 2018.

PUNEET; KAZMI, H. R.; KUMARI, S.; et al. Epigenetic Mechanisms and Events in Gastric Cancer-Emerging Novel Biomarkers. **Pathology and Oncology Research**, p. 1–14, 2018.

PRABHU, V. V.; DEVARAJ, N. Tirocina Quinase do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico: um Alvo Potencial no Tratamento do Carcinoma Pulmonar de Células Não Pequenas. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v. 36, p. 151-158, 2017.

RABELO, N. C. **Avaliação de extratos vegetais de *Azadirachta indica* A. Juss como inibidores reversíveis do ciclo celular de fibroblastos bovinos**. 2015. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, 2015.

RAMJIWAN, R. R.; GRIFFIOEN, A. W.; DUDA, D. G. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? **Angiogenesis**, v. 20, n. 2, p. 185–204, 2017.

REJHOVÁ, A.; OPATTOVÁ, A.; ČUMOVÁ, A.; et al. Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 582–594, 2018.

ROLIM, T. L.; MEIRELES, D. R. P.; BATISTA, T. M.; et al. Toxicity and antitumor potential of *Mesosphaerum sidifolium* (Lamiaceae) oil and fenchone, its major component. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 347, 2017.

ROSENQUIST, R.; ESTELLER, M.; PLASS, C. Introduction: Epigenetics in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, 2018.

ROZIMAMAT, R.; HU, R.; AISA, H. New isopimarane diterpenes and nortriterpene with cytotoxic activity from *Ephorbia alata* Boiss. **Fitoterapia**, v. 127, p. 328-333, 2018.

SAFARZADEH, E.; SHOTORBANI, S.S.; BARADARAN, B. Herbal Medicine as Inducers of Apoptosis in Cancer Treatment. **Adv Pharm Bull**, v. 4, p. 421-427, 2014.

SALES, T. L. F. **Efeitos da radiação ionizante em linhas celulares de cancro do pulmão de não pequenas células: estudos in vitro**. 2014. 131 f. Dissertação (mestrado) – Universidade de Coimbra, Faculdade de Ciência e Tecnologia, 2014.

SÁNCHEZ, J.; ESCUÍN, D. C. Nueva inmunoterapia y cáncer de pulmón. **Archivos de Bronconeumología**, 2017.

SILVA, S.; ANSELMO, M. G. V.; DANTAS, W. M.; et al. Estudo do potencial fitotóxico de extratos de *Bauhinia unguolata* L. sobre a divisão celular e atividade enzimática em plântulas de alface. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 577–584, 2015.

SINGH, S. R. Cancer stem cells: Recent developments and future prospects. **Cancer letters**, v. 338, p. 1-2, 2013.

SINGH, R. K.; KUMAR, S.; PRASAD, D. N.; et al. Therapeutic journey of nitrogen mustard as alkylating anticancer agents: Historic to future perspectives. **European journal of medicinal chemistry**, 2018.

SOMASUNDARAM V.; BASUDHAR D.; BHARADWAJ G.; et al. Molecular Mechanisms of Nitric Oxide in Cancer Progression, Signal Transduction, and Metabolism. **Antioxid Redox Signal**. 2018.

SOUZA, S. L. D. O. Avanços da terapia moderna no tratamento de câncer de mama. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade de Rio Verde, 2016.

SOUZA, F. D. C. **Generation and characterization of isogenic cell lines harboring p53 mutants: A model for the evaluation of p53 and p16INK4A replacement in the presence of p53R175H and p53R248Q**. 2011. 102 f. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, 2011.

SHANMUGAM, M. K.; ARFUSO, F.; ARUMUGAM, S.; et al. Role of novel histone modifications in cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 13, p. 11414–11426, 2018.

SLEIRE, L.; Hilde E. F.; Inger, A. N.; et al. Drug repurposing in cancer. **Pharmacological research**, v. 124, p. 74-91, 2017.

STORZ G. AND ZHENG M. Oxidative Stress. In: **Bacterial Stress Responses**. p. 47–59. 2000.

STUBBS, MATTHEW C.; KRIVTSOV, ANDREI V. Murine Retrovirally-Transduced Bone Marrow Engraftment Models of MLL-Fusion-Driven Acute Myelogenous Leukemias (AML). **Current protocols in pharmacology**, v. 78, p. 14.42. 1-14.42. 19, 2017.

TONISSI, F.; LATTANZIO, L.; MERLANO, M.C.; INFANTE, L.; LO-NIGRO, C.; GARRONE, O. The effect of paclitaxel and nab-paclitaxel in combination with anti-angiogenic therapy in breast cancer cell lines. **Investigational new drugs**, v. 33, p. 801-809, 2015.

VIJAYARAGHAVAN, S.; MOULDER, S.; KEYOMARSI, K.; LAYMAN, R. M. Inhibiting CDK in Cancer Therapy: Current Evidence and Future Directions. **Targeted Oncology**, v. 13, n. 1, p. 21–38, 2018.

VORON, T.; MARCHETEAU, E.; PERNOT, S.; et al. Control of the Immune Response by Pro-Angiogenic Factors. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n. April, p. 1–9, 2014.

WANG, H et al., “Quantitative analysis of creatinine in urine by metalized nanostructured parylene,” **J. Biomed. Opt.** p. 15, 2010.

WANG, X.; ZIANG, J.; CAO, W.; JIUAN, Z.; SOL, L.; ZHANG, L. Th17/Treg imbalance in triptolide-induced liver injury. **Fitoperapy**, v. 93, p. 245, 2014.

XIAO, S.; ZHONGBING, L.; RUOLAN, D.; et al. Aptamer-mediated gene therapy enhanced antitumor activity against human hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 258, p. 130-145, 2017.

ZAVERI, L.; DHAWAN, J. Cycling to Meet Fate: Connecting Pluripotency to the Cell Cycle. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, p. 1–19, 2018.

ZOU, Y.; FA-YING, L.; JUAN, W.; et al. Mutational analysis of the RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway in 260 Han Chinese patients with cervical carcinoma. **Oncology letters**, v. 14, p. 2427-2431, 2017.

ZHANG, WX.; ZHANG, Z.M.; ZHANG, Z.Q.; WANG, Y.; ZHOU, W. Andrographolide induced acute kidney injury: analysis of 26 cases reported in Chinese Literature. **Nefrology**, v. 19, p. 21, 2014.

ANEXOS

Anexo A: Certidão da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



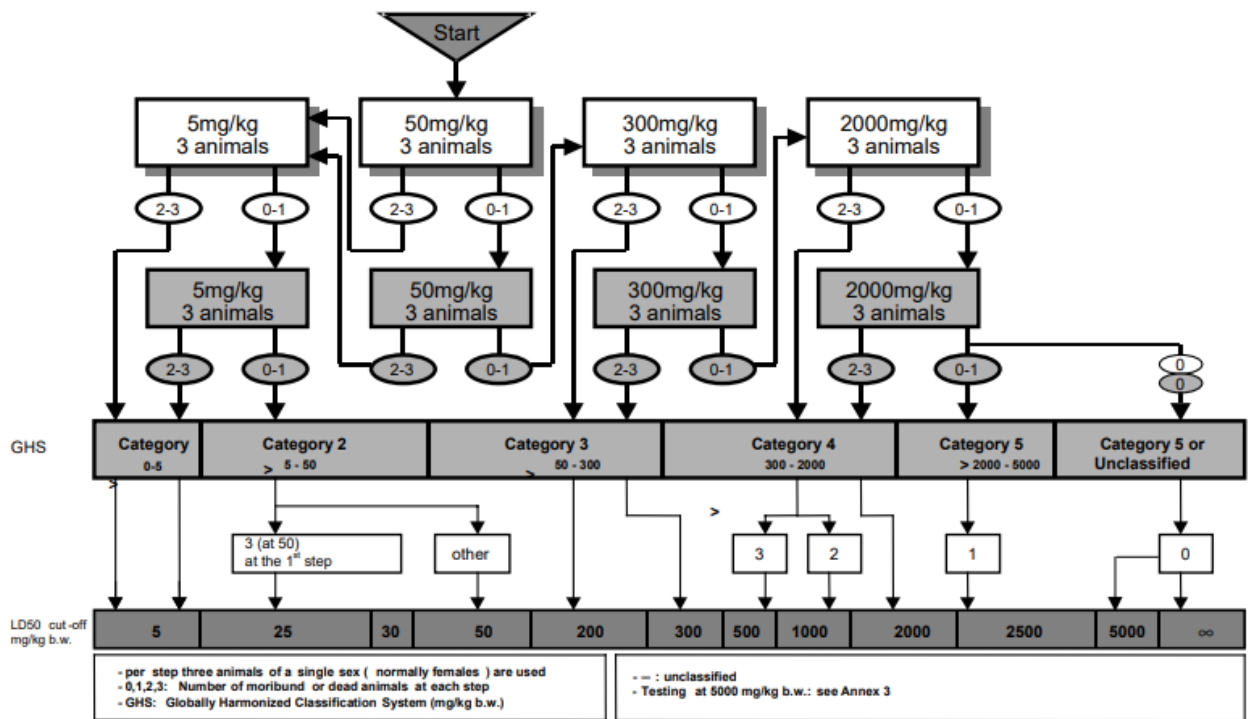
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo da toxicidade e potencial antitumoral dos nitratos orgânicos sintéticos 1,3-bis(pentyloxy)propano-2-yl nitrate e 1-(hexyloxy)-3-(pentyloxy)propano-2-yl nitrate em modelo de adenocarcinoma" protocolo nº 112/2017 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Mariana Vieira Sobral – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 05/10/2017.

Vigência do Projeto	2017 - 2019
Espécie/linhagem	Camundongo Swiss (<i>Mus musculus</i>)
Número de animais	406 animais
Idade/peso	6 – 8 semanas/ 28 - 32 g
Sexo	Fêmeas
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM - UFPB

Prof. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB

Anexo B: Fluxograma de realização do teste de toxicidade aguda com uma dose inicial de 50 mg/kg



11/14

FONTE: OECD. Test N° 423: Acute oral toxicity – acute toxic class method, 2001.

Anexo C: Triagem farmacológica comportamental

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	0 min	15 min	30 min	60 min	4 h
1 - SNC					
a - Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras					
b - Depressora					
Hipnose					
Prose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c - Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarreia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimajamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força para agarrar					
3 - MORTE					