

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

ANA PAULA GOMES MOURA

**TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DE UM DERIVADO SINTÉTICO 2-
AMINOTIOFENO**

**João Pessoa – PB
2017**

ANA PAULA GOMES MOURA

**TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DE UM DERIVADO SINTÉTICO 2-
AMINOTIOFENO**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos, do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal da
Paraíba, para obtenção do título de
doutora em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos, Área de
concentração: FARMACOLOGIA

ORIENTADORA:
Prof^a. Dr^a. Marianna Vieira Sobral

João Pessoa – PB
2017

**Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

M929t Moura, Ana Paula Gomes.

Toxicidade e potencial antitumoral de um derivado
sintético 2-aminotiofeno / Ana Paula Gomes Moura. -
João Pessoa, 2017.
133 f. : il.

Orientação: Marianna Vieira Sobral.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Carcinoma ascítico de Ehrlich. 2. Tiofenos. 3.
Efeito antiangiogênico. I. Sobral, Marianna Vieira. II.
Título.

UFPB/BC

ANA PAULA GOMES MOURA

TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DE UM DERIVADO
SINTÉTICO 2-AMINOTIOFENO

APROVADA EM 21 /02 / 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Marianna Vieira Sobral

Orientadora



Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Examinador Interno

Prof^a. Dr^a. Liana Clébia de Moraes Pordeus

Examinadora Externa



Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhaes

Examinador externo

Prof^a. Dr. Fábio Henrique Tenório de Souza

Examinador externo

Dedico este trabalho,

*Aos meus pais, Darcy e João Amílcar, meus exemplos
de valores, princípios e respeito a Deus.*

*Ao meu querido esposo Daniel, meu companheiro e
amigo, e aos frutos do nosso amor, João Lucas e
Natália, minha fonte de luz e inspiração.*

Por eles e para eles!

AGRADECIMENTOS

A realização do presente estudo traduz o esforço e a ajuda coletiva de um conjunto de pessoas, entre eles, professores, funcionários, amigos e familiares, sem os quais não seria possível o desenvolvimento do mesmo, portanto, seria desonesto não exprimir o meu reconhecimento e gratidão, em especial:

A Deus que conduz minha vida. A Ele entrego tudo, tudo que sou e tenho! Meu respeito, amor e gratidão a Deus é inabalável... Se iniciei e encerrei mais essa etapa de minha vida foi porque Ele com sua infinita misericórdia me ajudou em cada segundo, inclusive colocando anjos em minha vida para me auxiliar, os quais vou citar alguns aqui, mas só alguns, por que seria impossível lembrar de todos, e certamente alguns eu nem cheguei a saber o nome.

Aos meus pais, **João Amilcar e Darcy**, que me incentivam desde sempre a estudar e não desistir nunca! Se hoje eu acredito que o conhecimento transforma o ser humano é porque eles não cansaram de guiar meu caminho baseado nesse princípio. Aos meus pais toda gratidão pela educação que me deram!

Ao meu esposo **Daniel Farias** que com maestria foi mãe e pai por vários dias durante minha ausência, principalmente nessa reta final. Obrigada, meu amor, pela compreensão, paciência e companheirismo. Sobretudo, por ter respeitado meus momentos de estresse e pelos sequestros que me fizeram “desplugar” da tese e relaxar, esses momentos foram cruciais para manter minha saúde mental.

Aos meus filhos **João Lucas e Natália** que me reabasteciam de força e coragem a cada momento juntos. Vocês nasceram durante o doutorado, e em nenhum momento vocês foram fardo, e sim meu combustível, minha fortaleza, minha certeza que tudo valeria a pena.

À nossa Jú, **Juliana Salvino**, por auxiliar no cuidado de nossos filhos com dedicação e carinho nos deixando tranquilos nos momentos de nossa ausência.

A TODA minha família Gomes e aos agregados e a família Moura, que a cada etapa intercederam por mim nas orações, ajudaram no que estava ao alcance e comemoraram as vitórias, principalmente, minhas irmãs **Glaúcia, Kenya, Jussara**, meu irmão **Emídio** e de forma muito especial minha sobrinha **Mirely Gadelha** que além de me inspirar com sua admirável disciplina, me prestou valiosa ajuda na reta final.

Para minha formação acadêmica Deus caprichou na escolha da minha orientadora, **Dra. Marianna Viera Sobral**. Ele me presenteou com uma orientadora competente por excelência, compromissada, inteligente, e sobretudo humana. Uma relação orientador/orientanda leve e respeitosa, uma convivência tão agradável que transcendeu a vida acadêmica para vida pessoal, ganhei uma amiga, uma pessoa que admiro e me inspira a ser cada dia melhor.

A minha família do Laboratório de Oncofarmacologia (ONCOFAR), **Monalisa Brito, Daiene Martins, Aline Xavier, Tatianne Mota, Tatyanna Kelvia, Vivianne Mangueira, Jephesson Alex, Ryldene Marques, Daiana, Renata Abrantes, Rafael Ferreira, Flávia Barbosa, Ana Luisa, Ana Luiza** além da ajuda em equipe nos experimentos que demandava toda a equipe, cada um, de alguma forma muito especial foi importante na construção desse trabalho, sem vocês seria impossível! Essa equipe se destaca pela beleza e unidade. Desse grande grupo ganhei amigos que levarei para a vida, amizade que foi construída a cada conversa gostosa que descontraia a tensão do momento. Tive também amigo e parceiro de experimento inseparável (**Jephe**). Com alguns eu tive as mais belas demonstrações de parceria e cumplicidade, e assim experimentei os mais belos sentimentos de gratidão! Cada um sabe a importância que tem em meu coração!

Sou muito grata a **todos** que fazem parte da **equipe NUCAL**. A fase de escrita de uma tese é, sem dúvida, a mais sofrida devido a solidão, quase um isolamento que exige muita disciplina, mas eu tive anjos que transformaram esses inúmeros dias, noites e madrugadas em momentos agradáveis, e que nunca estive só, a companhia de vocês me deu força e o nosso cafezinho muita energia (rs)! E nessa empreitada da escrita sou eternamente grata também as minhas amigas **Vivi, Tati e Taty** que além da fiel companhia no NUCAL todos os dias foram alicerce essencial tanto para construção do trabalho, como apoio nos mais diversos ramos de “personal stylist e diet” a apoio metal (rs)!!!

Ao professor **Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior** pela colaboração no fornecimento da amostra em estudo.

Ao auxílio do amigo do Laboratório de Imunofarmacologia (CBiotec/UFPB), **Dr. Fagner Leite** com os estudos imunológicos, e da **Profa. Dra. Giciane Carvalho**, com os estudos histopatológicos. Assim como ao amigo **Msc. Renan** do Laboratório de psicofarmacologia (CBiotec/UFPB) que auxiliou com presteza nos protocolos que precisamos.

Em especial aos funcionários do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IpeFarM), ao amigo **sr. Josué** pelo apoio e disponibilidade, sempre disposto a ajudar; o **sr. José Crispim Duart, Luis Cordeiro e Mateus Monteiro** pela prestatividade quando precisamos dos animais de laboratório.

A secretária da pós-graduação, **Nilmar** e em especial **Caroline Medeiros Mangueira** pelos serviços prestados com efetividade e presteza sempre.

Ao técnico **Jean Aguiar** pela disposição, paciência e boa vontade para sempre nos ajudar, quando preciso, nas análises bioquímicas.

Aos professores doutores, **Liana Clébia, Robson Veras e Isabele Beserra** pela preciosa contribuição na qualificação deste trabalho possibilitando a melhoria do trabalho.

Aos professores doutores **Hemerson Magalhães, Reinaldo Nóbrega, Liana Clébia** e ao meu amigo **Fábio Tenório** pela gentileza de aceitarem o convite de participar da avaliação final desse trabalho colaborando para o aperfeiçoamento do produto final. Esta banca de avaliadores foi escolhida com muito carinho pela admiração que tenho por vocês tanto no âmbito profissional como pessoal.

Aos amigos funcionários da esterilização de odontologia (UFPB), **Francinaldo, Ana Carla e Sônia** pela compreensão dos meus horários, por tolerarem meu estresse e principalmente, a ajuda imprescindível das estagiárias **Raisa, Rúbia, Ketley e Marcília** e ainda desopilavam minha mente com as mais diversas conversas que sempre acabavam em ótimas gargalhadas! As amigas “Bacanas” as odontólogas **Manuela, Mariangela e Samara** que não cansaram de repetir “vai dar certo”, sempre incentivando. As demais funcionárias do departamento de odontologia restauradora (DOR/CCS/UFPB) em especial **Ivone, Dona Rita, Marconi, Mabel** que estão sempre postos a ajudar; como também a todos os professores doutores deste departamento, em especial **Pádua** que não mediu esforços para facilitar minha jornada dulpa e **Roseane Uchoa**.

E aos amigos do lado A, B, C do alfabeto todo kkk...porque de maneira direta ou indireta contribuíram para a produção desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), por oferecer seus recursos e oportunidades, e ao Biotério Prof. Dr. Thomas George (IPeFarM/CCS/UFPB) pelo fornecimento dos animais.

A todos os professores ministrantes das disciplinas do doutorado, pelos ensinamentos científicos, assim como, aos amigos do doutorado, turma 2012, pelo companheirismo e incentivo.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Prof. Dr. **Josean Fechine**, pela atenção concedida sempre que necessário.

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

“A adversidade desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis, teríam ficado adormecidas”

Horácio

MOURA, A. P. G. TOXICIDADE E POTENCIAL ANTITUMORAL DE UM DERIVADO SINTÉTICO 2-AMINOTIOFENO. 2017. 133f. **Tese** (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB / CCS, João Pessoa.

RESUMO

O 2-[(1H-indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (SB-44) é um derivado do anel 2-amino-tiofeno que possui relatos de atividade anti-leishmania e antitumoral. Todavia, não há dados na literatura relacionados ao seu mecanismo de ação antitumoral. Sendo assim, o presente trabalho objetivou avaliar a toxicidade e a atividade antitumoral de SB-44 em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich, bem como, investigar possíveis mecanismos de ação envolvidos nesse efeito. Inicialmente foi avaliada a toxicidade não clínica aguda de SB-44 em camundongos por via intraperitoneal (i.p.). SB-44 (2000 mg/kg) não induziu morte nos animais experimentais. A DL50 (dose letal 50%) foi estimada como maior que 5000 mg/kg, considerando o guia n. 423 da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), o que indica baixa toxicidade aguda da substância. Ainda, na triagem farmacológica comportamental, o único efeito induzido pelo SB-44 foi ptose, que desapareceu após quatro horas do tratamento. Para a avaliação da genotoxicidade foi realizado o teste do micronúcleo, sendo observado que SB-44 (2000 mg/kg, i.p.) não induziu aumento no número de eritrócitos micronucleados, sugerindo baixa genotoxicidade. Em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich, observou-se que SB-44 (100 mg/kg, i.p.) reduziu de forma dose dependente o parâmetro de viabilidade celular ($p<0,05$). A avaliação do mecanismo de ação antitumoral iniciou com a análise do ciclo celular. Observou-se que SB-44 (100 mg/kg) induziu o aparecimento do pico sub-G1 ($p<0,001$), o que é sugestivo de apoptose. Foi determinada a microdensidade dos vasos no peritônio dos animais para caracterização de efeitos antiangiogênicos, sendo observada redução deste parâmetro ($p<0,001$) após tratamento com SB-44 (100 mg/kg). Em relação à avaliação da influência de SB-44 (100 mg/kg) em mediadores inflamatórios do microambiente tumoral, pode-se observar redução nos níveis das citocinas IL-10 e IFN- γ ($p<0,05$), o que indica modulação da resposta imune contra o tumor. Considerando o vasto papel do estresse oxidativo na propagação de tumores, foi avaliado o efeito de SB-44 por meio do ensaio fluorimétrico do 2,7-dichlorofluoresceina diacetato (DCFH-DA). Observou-se redução do nível de estresse oxidativo após tratamento com SB-44 (100 mg/kg) ($p<0,05$), o que sugere efeitos antioxidantes. Ainda, foi detectado que SB-44 (100 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. Entre todos os parâmetros de toxicidade avaliados (parâmetros metabólicos, bioquímicos, hematológicos e histológicos), foi observado que SB-44 (100 mg/kg) induziu apenas hepatotoxicidade, caracterizada pela detecção de esteatose e apoptose no tecido hepático. Os dados apresentados, em conjunto, sugerem que SB-44 possui atividade antitumoral por interferir na progressão do ciclo celular e exercer efeitos imunomoduladores, além de apresentar atividade antioxidante e reduzir os níveis de NO, o que, possivelmente, está relacionado ao seu efeito antiangiogênico.

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

MOURA, A. P. G. TOXICITY AND ANTITUMOR POTENCIAL OF A SYNTHETIC DERIVED 2-AMINOTIOFHENE. 2017. 133f. Thesis (PhD in Natural Products and Synthetic Bioactive. – UFPB / CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

The 2 - [(1H-indol-3-yl-methylidene) -amino] -5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta [b] thiophene-3-carbonitrile (SB-44) is a derived from 2-amino-thiophene ring that has reports of anti-leishmania and antitumor activities. However, there is no literature data related to its mechanisms of antitumor action. Therefore, this work aimed to evaluate the toxicity and antitumor activity of SB-44 in Ehrlich ascites carcinoma model, as well as, to investigate possible mechanisms of action involved in this effect. Initially, the SB-44 acute not clinical toxicity was evaluated in mice per intraperitoneal route (i.p.). SB-44 (2000 mg/kg) did not induced death. Still, in the pharmacological behavioral screening the only effect induced by SB-44 was ptosis, that disappeared after 4 hours of treatment. The DL50 (50% lethal dose) was estimated as higher than 5000mg/kg, considering the guide n. 423 from *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), what indicates acute toxicity lower of the substance. For the genotoxicity evaluation the test of micronuclei was performed, being observed that SB-44 (2000 mg/kg, i.p.) did not induced increase in the numbers of micronuclei erythrocytes, suggesting low genotoxicity. In a model of Ehrlich's Ascitic Carcinoma, was observed that SB-44 (100 mg/kg, i.p.) reduced the forma dose dependente o parameters cell viability ($p<0.05$). The evaluation of the antitumor action mechanism began with the cell cycle analysis. It was observed that SB-44 (100 mg/kg) induced the appearance of the sub G1 peak ($p<0.001$), what is suggestive of apoptosis. It was determined the vessels microdensity in the peritoneum, being observed a reduction of this parameter ($p<0.001$) after the treatment with SB-44 (100 mg/kg). In relation to the influence of SB-44 (100 mg/kg) in inflammatory mediators of tumor microenvironment, it can be observed the reduction of cytokines IL-10 e IFN- γ ($p<0.05$), what indicates modulation of the immune fighting against the tumor. Considering the wide role the oxidative stress in the propagation of tumors, it was evaluated the effect of SB-44 by the fluorometric assay of 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). It was observed reduction on oxidative stress after the treatment with SB-44 (100 mg/kg) ($p<0.05$), what suggests antioxidant effects. Still, it was detected that SB-44 (100 mg/kg) promoted reduction of the nitric oxide (NO) ($p<0.05$), a key mediator involved in growth processes, angiogenesis and tumor metastasis. Among all toxicity parameters evaluated (metabolic parameters, biochemical, hematological and histological), it was observed that SB-44 (100 mg/kg) induced only hepatotoxicity, characterized by esteatosis and apoptosis in the hepatic tissue. Whole data shown suggests that SB-44 has antitumor activity by interfering in the cell cycle progression and to exert immunomodulators effects, besides presenting antioxidant activity and reduction of NO levels, what, possibly, is related to its antiangiogenic effect.

Keywords: Thiophenes, Ehrlich ascitic carcinoma, Antiangiogenic effect, Antioxidant activity, Hepatotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características biológicas do câncer.....	24
Figura 2. Representação esquemática das fases do ciclo celular.....	28
Figura 3. Estrutura do tiofeno.....	53
Figura 4. Derivados tiofênicos com atividade antitumoral	54
Figura 5. Síntese para obtenção do composto SB-44.....	61
Figura 6. Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral de SB-44 (1H-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4H-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina	65
Figura 7. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) na histologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.	90
Figura 8. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) na histologia dos fígados de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	92
Figura 9. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) na histologia dos fígados de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais classes de antiangiogênicos	33
Quadro 2. Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e sua ação na carcinogênese.....	40
Quadro 3. Diversas ações do óxido nítrico (NO) no câncer: Papel promotor tumoral do NO.....	44
Quadro 4. Características físico-químicas do SB-44.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito do tratamento de nove dias (i.p) com SB44* (25; 50 ou 100 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	77
Gráfico 2. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg) na distribuição de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas diferentes fases do ciclo celular.....	78
Gráfico 3. Efeito do tratamento com SB-44* (100 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	79
Gráfico 4. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg) na concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	80
Gráfico 5. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 mg/kg, i.p.) na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em modelo de tumor de Ehrlich.	82
Gráfico 6. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 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 de Ehrlich.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos da administração de doses únicas (2000 mg/kg, i.p.) de SB-44* em camundongos.....	75
Tabela 2. Efeito da administração de dose única de SB44* (2000 mg/kg, i.p.) e ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p.) no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após 48 horas do tratamento.	76
Tabela 3. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 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.	84
Tabela 4. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 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.....	85
Tabela 5. Efeito do tratamento de nove dias com SB44** (100 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.	87
Tabela 6. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 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.	88

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	5- fluroacil
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDK	Cinase ciclina-dependentes
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CH₅₀	Concentração que produz 50% de hemólise
CHCM	Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média
CI₅₀	Concentração que produz 50% de inibição no crescimento celular
CO₂	Dióxido de carbono
CPQBA	Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas
DL50	Dose que causa 50% da letalidade dos animais
DMSO	Dimetilsulfóxido de sódio
DO	Densidade óptica
dUTP	Trifosfato de deoxiuridina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FdUMP	5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato
FUTP	5-fluorouridina-5'-trifosfato
GS	Glutationa
GSH	Glutationa reduzida
H.E.	Hematoxilina e eosina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HELA	Célula imortal derivada de câncer cervical
HL-60	<i>Human promyelocytic leukemia cells</i>
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer

IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
M/T	Mortos/Vivos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetillyiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
NaCl	Cloreto de sódio
ONCOFAR	Laboratório de Oncofarmacologia
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução Tampão Fosfato
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
TH1	Linfócito T auxiliar tipo I
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1	Aspectos Gerais do Câncer	21
2.2	Ciclo celular, angiogênese e microambiente tumoral.....	27
2.3	Estresse oxidativo e o papel do óxido nítrico no contexto do câncer ..	38
2.4	Estudos da toxicologia/farmacologia de drogas com potencial antitumoral	45
2.5	Derivados Tiofênicos.....	51
3	OBJETIVOS.....	58
3.1	Objetivo geral.....	58
3.2	Objetivos específicos	58
4	MATERIAL.....	60
4.1	Locais da pesquisa.....	60
4.2	Reagentes.....	60
4.3	Síntese do 2-[(1H-indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-44)	60
4.4	Animais e condições experimentais	62
4.5	Linhagem de células tumorais.....	63
4.6	Equipamentos	63
5	MÉTODOS.....	65
5.1	Estudos toxicológicos.....	66
5.1.1	Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda.....	66
5.1.2	Avaliação da genotoxicidade	66
5.2	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich	67
5.2.1	Volume do tumor, viabilidade e total celular	67
5.2.2	Investigação do mecanismo de ação antitumoral	68
5.2.3	Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich	71
5.3	Análise estatística	73
6	RESULTADOS	75
6.1	Estudos toxicológicos.....	75
6.1.1	Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda.....	75

6.1.2	Avaliação da genotoxicidade	75
6.2	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.....	76
6.2.1	Volume do tumor, viabilidade e total celular	76
6.2.2	Investigação do mecanismo de ação antitumoral.....	78
6.2.3	Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich	83
7	DISCUSSÃO.....	95
8	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS.....	109
	ANEXOS	130

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O termo câncer compreende um conjunto de doenças que se caracterizam pela presença de células em crescimento contínuo e descontrolado, com propriedades de indução de angiogênese, invasão e destruição do tecido adjacente, bem como, de crescimento em outros sítios diferentes do tumor primário (metastização) (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Essas propriedades geralmente são ocasionadas por um acúmulo de mutações nos oncogenes, nos genes supressores de tumor e/ou nos genes reparadores de DNA (KASALA et al., 2015).

Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que a incidência global do câncer aumenta constantemente, sendo considerada a segunda causa de morte no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (TAVAKOLI et al., 2012; UKRAINTSEVA et al., 2016). Portanto, no contexto atual, o câncer é um dos problemas mais complexos que o sistema de saúde mundial enfrenta devido à sua magnitude epidemiológica, social e econômica (FERNANDES et al., 2014).

Terapias convencionais, incluindo intervenções cirúrgicas, radioterapia e quimioterapia são muitas vezes ineficazes na cura da doença, além de produzirem graves efeitos indesejáveis, bem como o desenvolvimento de resistência por parte das células tumorais, o que, em conjunto, representam sérias limitações frequentemente observadas no tratamento dessa doença (GAO et al., 2014). Dessa forma, a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos antineoplásicos são crescentes no mundo inteiro.

A descoberta e a síntese de moléculas, bem como, alterações em suas estruturas são partes do desenvolvimento de novos candidatos a fármacos seguros e eficazes. De maneira geral, as modificações moleculares podem alterar a estereoquímica, as dimensões, a flexibilidade das estruturas moleculares, bem como as propriedades físico-químicas, dentre estas, basicidade, lipofilicidade e distribuição eletrônica. Portanto, as modificações moleculares podem alterar a resposta biológica de uma substância, visto que, as propriedades estruturais, conformacionais e físico-químicas determinam a forma como uma substância interage com seu(s) alvo(s) molecular(es) (GALDINO; PITTA; BOUCHERLE, 2011).

Nesse contexto, destacam-se os compostos heterocíclicos os quais correspondem a cerca de 65% dos fármacos atualmente empregados na

terapêutica. Entre estes, 25% apresentam átomos de enxofre (tiofenos) em sua composição química (MOURA et al., 2015).

A classe dos tiofenos e seus derivados despertam grande interesse por apresentarem a possibilidade de introdução de novos grupos substituintes no anel heterocíclico, os quais lhes conferem diferentes propriedades químicas e biológicas. De particular interesse, os 2-aminotiofenos substituídos têm demonstrado um amplo espectro de atividades farmacológicas, tais como, antimicrobiana (ARORA et al., 2013), antifúngica (MOURA; LIMA; JUNIOR, 2015), antileishmania (RODRIGUES et al., 2015) antioxidante (GOUDA et al., 2013) e antitumoral (LOU et al., 2011; ROMAGNOLI et al., 2014; SAMIR; ABOUZIED; HAMED, 2016).

Entre os compostos 2-aminotiofenos descritos na literatura pode-se citar o 2-[(1H-indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (SB-44), um derivado tiofênico de fácil obtenção, que apresenta relatos de atividade antileishmania (RODRIGUES, 2015) e antitumoral *in vitro* e *in vivo* (modelo murino sarcoma 180) (OLIVEIRA, 2013). Todavia não há relatos na literatura dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antitumoral do SB-44.

Portanto, considerando a necessidade de desenvolvimento de novos candidatos a fármacos com potencial antitumoral que possuam efeitos colaterais mínimos e a atividade antitumoral descrita para o SB-44, o presente trabalho se propôs a investigar sua toxicidade e potencial antitumoral em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich. Sabendo que células tumorais compartilham características, tais como, a desregulação do ciclo celular, a indução de angiogênese e de estresse oxidativo, bem como a formação de um microambiente que sustenta o crescimento do tumor, esses foram o foco de nossa avaliação.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos Gerais do Câncer

O organismo é formado por milhões de células que se reproduzem por meio do processo de divisão celular. Em condições normais, esse processo é ordenado, controlado e responsável pela formação, crescimento e regeneração dos tecidos saudáveis do corpo, porém, além desse processo, é possível observar formas de crescimento celular não controladas. A hiperplasia, a metaplasia e a displasia são exemplos de crescimento controlado, enquanto que as neoplasias correspondem a proliferação anormal do tecido, que foge parcial ou totalmente ao controle do organismo e tende à autonomia e à perpetuação, com efeitos agressivos sobre o hospedeiro (DIAZ-CANO et al., 2012). Na prática, as neoplasias são denominadas de tumores, os quais classificam-se em benignos ou malignos (ATKINSON; TAPIO, 2009).

Os tumores benignos são formados por células bem diferenciadas, estrutura típica do tecido de origem, possuem crescimento progressivo e organizado, massa bem delimitada sem capacidade de invadir ou infiltrar tecidos adjacentes. São exemplos de tumores benignos, o lipoma que tem origem no tecido gorduroso, o mioma que tem origem no tecido muscular liso e o adenoma que é tumor benigno das glândulas. Os tumores malignos, por sua vez, manifestam um maior grau de autonomia, são formados por células anaplásicas de crescimento celular rápido, porém, sem diferenciação, caracterizado por mitoses anormais e numerosas, com massa tumoral pouco delimitada com capacidade de invadir tecidos vizinhos e formar metástases, e podem ser resistentes ao tratamento e causar a morte do hospedeiro (ISRAEL et al., 2016).

A denominação dos tumores malignos deriva, em geral, dos tecidos que os originam, dessa forma os principais tipos de tumores malignos classificam-se em **carcinomas** quando originados do tecido epitelial, compreendendo o câncer de mama, pulmão, bexiga, estômago e de ovário, entre outros; **sarcomas** quando se originam em ossos, cartilagens, gordura, músculo, vasos sanguíneos ou tecidos moles, os mais comuns são sarcoma de Kaposi e osteossarcoma (BAROSA et al., 2014); **leucemias** quando advém das células hematopoiéticas, e caracterizam-se pelo acúmulo de células jovens (blásticas) anormais na medula óssea, as mais

comuns são leucemia linfóide aguda ou linfoblástica, leucemia mielóide crônica e leucemia linfocítica crônica; e por fim os **linfomas** que são tumores malignos do sistema linfático, os linfomas mais comuns são o linfoma de Hodgkin e o linfoma não-Hodgkin (ONO et al., 2014)

Com base no último documento publicado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), é inquestionável que o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, uma vez que, mais de 12 milhões de pessoas no mundo são diagnosticadas todo ano com câncer e dessas 8,2 milhões vão a óbito. Os tipos de câncer mais frequentes no mundo em homens são pulmão (16,7%) e próstata (15,0%), e em mulheres são mama (25,2%) e intestino (9,2%) (STEWART; WILD, 2016).

A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes. Se medidas efetivas não forem tomadas, haverá 26 milhões de casos novos e 17 milhões de mortes por ano no mundo em 2030 (INCA, 2015).

O perfil epidemiológico das populações tem passado por importantes mudanças devido a redefinição dos padrões de vida, a partir das condições de trabalho, nutrição e consumo desencadeada pelo processo global de industrialização, e as alterações demográficas, com redução das taxas de mortalidade e natalidade, que indicam o prolongamento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional, levando ao aumento da incidência de doenças crônico-degenerativas, especialmente as cardiovasculares e o câncer (STEWART; WILD, 2016).

A explicação para este aumento está na maior exposição dos indivíduos a fatores de risco carcinogênicos, sendo os fatores ambientais responsável por cerca de 80-90% dos casos de câncer e apenas 5-10% corresponde ao câncer hereditário. Entende-se por fatores de risco ambiental o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (indústrias químicas e outros locais de trabalho insalubres), o ambiente de consumo (alimentos e medicamentos) e o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida). Estão entre os principais causadores de

câncer o fumo, má alimentação, excesso de álcool e radiação solar (RILEY et al, 2012).

A sequência de eventos que leva a formação de um tumor tem por base as mutações genéticas, epigenéticas e mudanças no perfil de expressão gênica que permitem as células sobreviver e replicar-se, se evadindo dos mecanismos fisiológicos de controle da apoptose, proliferação e ciclo celular. Esse conceito foi fundamentado na descoberta de mutações que levam a oncogenes com dominante ganho de função e genes supressores de tumor com recessiva perda de função (VICENTE-DUEÑAS, 2013).

Vários oncogenes, incluindo RAS (GILLIES, 2008; TAKASHIMA; FALLER, 2013), MYC (CAIRNS, 2011; NGO, 2015; GRIFFITHS, 2013) e mTOR (LAPLANTE; SABATINI, 2012) podem ser ativados por mutações pontuais nos genes que codificam as proteínas (GUTSCHNER; DIEDERICHS, 2012), ao passo que, diferentes genes supressores de tumor, que codificam proteínas tais como a p53 e a retinoblastoma (pRb), também podem sofrer mutações, o que leva a redução da capacidade de supressão do desenvolvimento tumoral (MUÑOZ-FONTELA, et al., 2016). Essas alterações em conjunto não só mantém a bioenergética celular, mas também reprogramam o metabolismo e geram biomassa necessária para a divisão celular exacerbada (WARD; THOMPSON, 2012).

Nesse contexto, o processo de carcinogênese, ou desenvolvimento do câncer, ocorre lentamente. No primeiro estágio, células sofrem o efeito de agentes cancerígenos que alteram seus genes, fase esta chamada de iniciação. No estágio de promoção, elas são transformadas em células cancerosas após o contínuo e longo contato com o agente cancerígeno. No estágio final, chamado de progressão, ocorre a multiplicação celular descontrolada e irreversível, sendo a fase em que surgem os primeiros sintomas (GREENSTEIN, 2016).

A natureza complexa das células cancerosas tem sido exaustivamente estudada ao longo das últimas décadas, abrangendo uma complexa rede de biomoléculas e cascatas de sinalização. Em um esforço para consolidar a riqueza de dados experimentais e clínicos em um quadro conceitual coerente, Hanahan e Weinberg classificaram em 2000 e revisaram em 2011 as manifestações fenotípicas das células cancerosas (*The Hallmarks of Cancer*) definindo as características do câncer, as quais lhe conferem capacidades biológicas essenciais ao desenvolvimento (Figura 1), ao crescimento e a disseminação de todos os cânceres

humanos. Essas características incluem: **proliferação sustentada, evasão de supressão do crescimento, resistência à morte celular, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase, desregulação da energética celular, fuga da destruição imune e inflamação crônica** (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011; PICKUP, 2014).

Figura 1. Características biológicas do câncer



Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg (2011).

Nos últimos 25 anos houve um grande avanço no entendimento das bases moleculares da carcinogênese e da progressão tumoral. O aprofundamento do entendimento da fisiopatologia e genética do câncer tem fornecido ferramentas importantes para o diagnóstico molecular e o monitoramento da doença e já proporcionou a identificação de diversos alvos terapêuticos (IORIO; CROCE, 2012).

Após o diagnóstico do câncer passa-se ao estadiamento (avaliação da extensão da doença) e, sequencialmente, a seleção do tratamento. Em caso de tumor ressecável e operável, procede-se com a cirurgia. Após a cirurgia o tratamento poderá ser complementado, dependendo do tipo de tumor e do risco de recidiva, por quimioterapia, hormonoterapia, imunoterapia, terapias-alvo e/ou radioterapia (NHI,

2015). Dentre as formas de tratamento do câncer, a quimioterapia é a mais frequente, e até 70% dos tumores necessitam de tratamento quimioterápico em algum momento do curso da doença (DeSANTIS et al, 2014).

Os compostos utilizados na quimioterapia de doenças neoplásicas exibem acentuada variação em sua estrutura e mecanismo de ação. Estes incluem: **agentes alquilantes** que interferem na integridade e na função do DNA, induzindo a morte celular nos tecidos de proliferação rápida, tais como as Mostardas Nitrogenadas (Ciclofosfamida), utilizada na Leucemia linfocítica aguda e crônica, e os complexos de Coordenação da Platina (Cisplatina), comumente utilizados no câncer de ovário; **agentes antimetabólicos** que bloqueiam a síntese de DNA, agindo na fase S do ciclo celular, como por exemplo, o análogo do ácido fólico (Metotrexato) e análogo da pirimidina (5-fluorouracil), ambos eficazes no câncer de mama; **produtos naturais** como os agentes que causam lesão nos microtúbulos interferindo na mitose, tais como os alcaloides da vinca (vinblastina e vincristina), e os agentes que se ligam ao DNA inibindo a síntese do ácido nucléico (como o antibiótico doxorrubicina), ambas as classes utilizadas na Doença de Hodgkin e linfoma não Hodgkin (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013).

São também utilizados na terapêutica os **hormônios e antagonistas** que interrompem o eixo estimulador criado por reservatórios sistêmicos de androgênios e estrogênios, inibindo a produção de hormônios ou a ligação a seus receptores e, por fim, bloqueiam a complexa expressão de genes que promovem o crescimento e a sobrevida de tumores, a saber os glicocorticoides (prednisona) e antiestrogênios (tamoxifeno). Esses fármacos demonstram ser efetivos em aumentar o tempo de sobrevida do paciente e retardar ou impedir a recidiva do tumor nos cânceres de mama e testículos (HAUSHEER, 2016).

Um dos grandes desafios atuais é o desenvolvimento de drogas alvo-específicas, capazes de eliminar a célula tumoral atuando sobre as vias de sinalização envolvidas com a angiogênese, proliferação e morte celular nos tumores, sem causar danos às células normais ou que possam ser usadas em associação a terapias convencionais. São os chamados **agentes dirigidos** para alvos moleculares específicos tais como os inibidores das proteínas tirosinocinases que inibe a BCR-ABL cinase (imatinibe), utilizado na clínica para leucemia mieloide crônica; os inibidores da angiogênese (bevacizumabe), um anticorpo humanizado dirigido contra o fator de crescimento do endotélio vascular do tipo A (VEGF-A), o

qual retarda a progressão do câncer de células renais e, em associação com quimioterapia citotóxica, trata efetivamente os cânceres de pulmão, colorretal e mama (TOCCHETTI et al., 2013; MOLINARO et al., 2015); os inibidores de mTOR que são os análogos da rapamicina e seus congêneres que exercem efeitos imunossupressores, inibem a progressão do ciclo celular e a angiogênese e promovem a apoptose, com aplicações importantes na oncologia para o tratamento do câncer renal e hepatocelular, além de linfomas; os inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), cetuximabe, que liga-se especificamente ao domínio extracelular do EGFR e impede a sinalização e a dimerização do receptor dependente de ligante, bloqueando, assim, os sinais de crescimento celular e sobrevida, utilizado na clínica para câncer de cabeça e pescoço, e câncer de colo metastático (GONG et al., 2012; WELTI et al., 2013).

Ainda dentro dos **agentes dirigidos** tem-se os modificadores da resposta biológica que incluem citocinas ou anticorpos monoclonais (rituximabe) que afetam de modo benéfico a resposta biológica do paciente para neoplasias linfoides e tumores sólidos (FORTEA et al., 2013). Nesse grupo estão incluídos agentes que atuam indiretamente para mediar seus efeitos antitumorais, como por exemplo, intensificando a resposta imune às células neoplásicas, ou diretamente, por meio de sua ligação a receptores nas células tumorais. As proteínas que atualmente estão em uso clínico incluem os interferons (IFN- α), as interleucinas (IL-2) que atuam estimulando a proliferação das células T ativadas e a secreção de citocinas pelas células *natural killer* (NK) e pelos monócitos, efetivo para câncer de rins metastático; os fatores de crescimento hematopoiéticos, como a eritropoietina; o fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF), como o filgrastim; e o fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), como o sargramostim (GARCIA et al., 2014; SINGH; AGARWAL; PAL, 2015).

Considerando os aspectos abordados, é possível observar que o tratamento do câncer pode ser realizado utilizando-se várias possibilidades farmacológicas. Porém, apesar dos avanços científicos no tratamento do câncer, a terapia antineoplásica existente ainda apresenta sérias dificuldades por problemas de resistência por parte das células tumorais aos fármacos, baixa seletividade e alta toxicidade (HEIDI et al., 2009; SZAKÁCS et al., 2014).

Os efeitos indesejáveis ocasionados pelos quimioterápicos relacionam-se ao fato da sua não-especificidade pelas células tumorais, já que os tecidos formados

por células de rápida proliferação, como tecido hematopoiético, tecido germinativo, folículo piloso e tecido de revestimento gastrointestinal, apresentam semelhança às células neoplásicas em relação a alta atividade mitótica e ciclos celulares curtos. Em função disso, os efeitos dos quimoterápicos não se restringem às células neoplásicas, atuando também sobre as células normais, promovendo assim, os principais efeitos colaterais como alopecia, mielossupressão e imunossupressão, alterações gastrointestinais (náuseas, vômitos, constipação intestinal, diarreia), além de outros efeitos, tais como, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, toxicidade pulmonar, neurotoxicidade, disfunção reprodutiva, toxicidade vesical e renal, alterações metabólicas e toxicidade dermatológica (MARTINS et al., 2015).

Nesse contexto, a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos na área oncológica continua sendo necessária na perspectiva de superar os obstáculos relacionados à efetividade, toxicidade e resistência.

2.2 Ciclo celular, angiogênese e microambiente tumoral

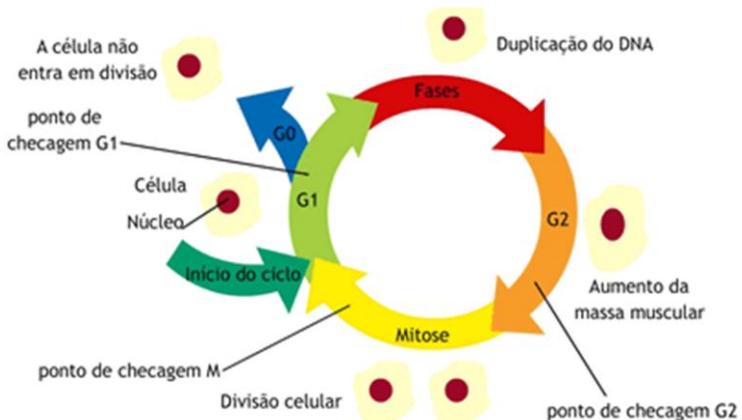
A desregulação do ciclo celular, a indução de angiogênese e a formação de um microambiente tumoral são características do câncer essenciais para promover a iniciação, o crescimento, a migração e a metástase de células tumorais.

O ciclo celular é um conjunto de eventos organizado e monitorado que é responsável pela divisão celular a partir de uma célula progenitora em duas células filhas, cada uma contendo cromossomos idênticos aos da célula-mãe. Esse processo inclui uma sucessão de etapas que demandam energia e que requerem uma série de eventos ordenados para garantir a correta duplicação e segregação do genoma, os quais envolvem fases sequenciais que vão desde a imobilidade (fase G0), à proliferação (G1, S, G2 e M) e a volta ao estado quiescente (DIAZ-MORALLI et al., 2013).

As fases mais importantes são a fase S, quando a replicação do DNA ocorre, e a fase M (mitose) quando a célula se divide em duas células filhas. Separando a fase S da fase M existem duas fases *gap* referidas como G1 e G2. Na fase G1 a célula é sensível aos sinais positivos e negativos a partir de redes de sinalização de crescimento. Em G2 a célula completa o crescimento e se prepara para a entrada em mitose. A fase G0 representa um estado em que as células foram retiradas de

forma reversível do ciclo celular em resposta a densidade celular elevada ou privação mitogênica (BERTOLI; SKOTHEIM; DE BRUIN, 2013) (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática das fases do ciclo celular



Fonte: www.sobiologia.com.br

A progressão através das fases do ciclo celular é monitorada por meio de mecanismos sensores, chamados de pontos de verificação (*checkpoints*). Os *checkpoints* do ciclo celular impedem a transição para a próxima fase até que a anterior seja totalmente concluída. O objetivo final é assegurar a detecção e reparação de danos genéticos, impedir a divisão celular descontrolada e garantir que as duas células-filhas herdem uma cópia completa e fiel do genoma. Esses pontos de verificação são ativados quando os problemas são detectados, induzindo parada do ciclo celular até que o problema seja resolvido, se possível, ou então, se o reparo não for realizado, a célula é direcionada a senescência ou apoptose. A desregulação desse processo pode resultar em muitas doenças, incluindo o câncer (LIM; KALDIS, 2013).

Entre os inúmeros elementos que participam deste processo, a ativação sequencial de complexos ciclinas e cinases dependentes de ciclina (CDKs) tem sido descrito como o evento regulador-chave. Ciclinas são pequenas proteínas cuja expressão é alterada durante o ciclo celular, a depender do estímulo mitogênico, enquanto que as CDKs são cinases serina/treonina específicas. A atividade cinase de CDKs é regulada pela ligação a ciclinas, por eventos de fosforilação/desfosforilação, e pela ligação a inibidores de CDKs. Em mamíferos,

duas classes de inibidores de CDKs são descritas, a família Cip/Kip e a família Ink4, as quais interferem com o ciclo celular em resposta a sinais intra e extracelulares (RIZZOLIO et al., 2010; MANCHADO et al., 2012)

No contexto do câncer, a principal e fundamental característica das células tumorais é a sua capacidade de sustentar a proliferação crônica. Estudos genéticos mostram que esse processo envolve mutações hiperativadas nas redes de sinalização de crescimento tumoral associadas à perda de função de proteínas supressoras de tumor, além do estímulo nas células do estroma tumoral para hipersecretarem fatores de crescimento, da indução de estimulação autócrina proliferativa, e do aumento da expressão de receptores para fatores de crescimento tornando as células tumorais hiperresponsivas (HANAHAN; WEINBERG; 2011).

Todavia, a maioria dos estudos relacionados ao ciclo celular está focado nas CDKs, uma vez que esta família de proteínas controla, direta ou indiretamente, a maioria dos passos na progressão do ciclo (RIZZOLIO et al., 2010). Nesse sentido, a atividade de CDKs é frequentemente desregulada em células tumorais, como consequência de alterações genéticas ou epigenéticas que interferem nos complexos ciclina-CDKs, bem como, de uma regulação negativa de vários inibidores de CDKs. Sendo assim, esses reguladores são considerados alvos potenciais na terapia anticâncer. O exemplo mais conhecido de compostos com potencial antitumoral que atua por inibir CDKs é o flavopiridol, atualmente em fase de pesquisa clínica (BAPTISTA, 2013).

Outro processo necessário para o crescimento e progressão do câncer é a indução de angiogênese. A angiogênese envolve a formação de novos microvasos a partir da germinação e brotação de vasos preexistentes, sendo um elemento essencial de crescimento para formar tecidos normais ou neoplásicos (YADAV et al., 2015).

Do ponto de vista fisiológico, a angiogênese ocorre no desenvolvimento tecidual, na embriogênese e no processo de cicatrização de feridas, mas também ocorre em condições patológicas como artrite reumatoide, psoriase, diabetes *mellitus*, crescimento tumoral e disseminação metastática. Em contraste com o processo ordenado, regulado e autolimitado da vascularização normal, a angiogênese patológica é um processo onde a multiplicação vascular ocorre de

modo descontrolado (JEBREEL et al., 2007; CARMELIET; JAIN, 2011; TECCHIO; CASSATELLA, 2013).

Angiogênese, crescimento e metástase tumoral são três processos estreitamente relacionados. O desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura existente é considerado um evento crítico no crescimento tumoral, uma vez que, para o tumor crescer além de 2 a 3 mm³ requer a formação de novos vasos sanguíneos para proporcionar nutrientes e oxigênio, remover resíduos metabólicos, além de influenciar a passagem metastática, o que determina e contribui para a gravidade clínica da doença (CARMELIET et al., 2008; FALCON, et al., 2016). Os vasos tumorais não possuem desenvolvimento hierárquico entre arteríolas, capilares e vênulas, são também desorganizados, tortuosos e altamente permeáveis (HEATH; BICKNELL, 2009).

Em todas as fases da angiogênese, as células endoteliais desempenham um papel crucial constituindo o principal cerne deste processo que envolve uma variedade de eventos coordenados, incluindo migração e proliferação de células endoteliais, formação de lúmen e anastomose de brotos. A base molecular deste mecanismo é o aumento da produção de fatores angiogênicos e/ou redução de inibidores da angiogênese (NAZER et al., 2011).

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é reconhecido como um dos principais reguladores da angiogênese, sendo liberado pelas células tumorais e do estroma tumoral (incluindo macrófagos, células endoteliais e fibroblastos). O VEGF possui várias funções no microambiente tumoral quando interage com seu receptor tirosina-cinase (VEGFR) que é expresso em diferentes tipos celulares e superexpresso em várias condições patológicas, dentre elas o câncer. O VEGF atua de diversas formas para regular o processo angiogênico: estimula o crescimento e proliferação de células endoteliais, age como fator de sobrevivência para as células endoteliais, além de impedir a apoptose destas células e regular a permeabilidade vascular (VAN DER VELDT et al., 2012).

As demais moléculas que são conhecidas, até o momento, como reguladores positivos da angiogênese são: o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que está envolvido na maturação dos vasos e recrutamento de pericitos; o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), que atua na promoção da proliferação celular, migração e diferenciação das células endoteliais vasculares; o fator de crescimento epidérmico (EGF) que ativa a via do seu receptor (EGFR) na regulação de fatores

pró-angiogênicos, tais como o VEGF, sendo, portanto, visto como regulador indireto da angiogênese; as metaloproteinases da matriz (MMPs), que degradam a matriz extracelular, liberando mitógenos angiogênicos; o fator de necrose tumoral (TNF) que atua como um fator de ativação de macrófagos que, por sua vez, secretam fatores angiogênicos; e, por fim, o fator de crescimento transformante (TGF) e angiopoietinas, que tem propriedades pró e antiangiogênicas a depender dos seus níveis (YADAV et al., 2015).

Assim, a mudança para um fenótipo angiogênico é regulada por uma alteração no equilíbrio entre reguladores positivos e negativos da angiogênese (CASTAÑEDA-GILL, 2016). No câncer, em contraste ao que acontece em tecidos saudáveis, um “switch” angiogênico é quase sempre ativado estimulando o brotamento contínuo para a formação de novos vasos, sustentando a expansão do crescimento neoplásico e o desenvolvimento metastático (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Esses fatores angiogênicos podem ser inibidos, ao passo que, fatores antiangiogênicos podem ser ativados com o objetivo de inibir esse processo. Dentre os fatores antiangiogênicos, podem ser citados o interferon, as interleucinas, os inibidores de MMPs, a angiotatina e a endostatina (CASTAÑEDA-GILL, 2016).

Outro mediador importante no processo da angiogênese é o óxido nítrico (NO). Embora as funções exatas das enzimas que sintetizam o NO (sintases de óxido nítrico - NOS) na progressão do câncer ainda estejam sob investigação, alguns estudos recentes destacaram repetidamente papéis das enzimas NOS induzível (iNOS) e NOS endotelial (eNOS) no desenvolvimento da angiogênese no câncer. De acordo com os últimos achados, eNOS deve ser a isoforma de NOS mais importante envolvida na angiogênese (HALDER et al., 2016). Foi demonstrado que NO induz e promove a angiogênese por meio da dilatação de vasos arteriolares, liberação de VEGF, ativação de COX-2 e aumento da produção de prostaglandina (PGE2), resultando em aumento da permeabilidade da vasculatura tumoral (BURKE et al., 2013).

Considerando que o suprimento vascular é um dos requisitos fundamentais para o crescimento tumoral, a terapia antiangiogênica é uma estratégia eficaz na terapia da neoplasia maligna, que não atua de forma curativa, mas sim citostática, sendo especialmente eficaz em combinação com agentes citotóxicos. Porém, um dos grandes desafios na concepção de terapias antiangiogênicas é incluir cada um

dos possíveis mecanismos pelos quais os tumores podem induzir o crescimento de novos vasos sanguíneos (YADAV et al., 2015). Ou seja, embora os compostos antiangiogênicos tenham sido apenas recentemente incorporados à clínica, eles anunciam uma nova era, em que a biologia do tumor é a base para a terapêutica do câncer.

As três classes principais de agentes antiangiogênicos são: os anticorpos monoclonais anti-VEGF que têm como alvo o VEGF ou o seu receptor; os inibidores de tirosina-cinase (TKI); e os inibidores da proliferação de células endoteliais, como descritos no Quadro 1. Estes agentes são utilizados atualmente na prática clínica ou estão em investigação como monoterapia ou em combinação com quimioterapia citotóxica ou radiação.

Quadro 1. Principais classes de antiangiogênicos.

Agentes antiangiogênicos	Mecanismo de ação	Estado clínico atual	Toxicidade clínica associada
Inibidores VEGF/VEGFR			
Bevacizumabe	Anticorpo monoclonal recombinante contra o VEGF	Aprovado	Atraso na cicatrização de feridas, hemorragia
Sunitinibe	Inibidor de VEGFR	Aprovado	Cardiotoxicidade
Motesanibe	Inibidor de VEGFR, de PDGFR e de receptor SCF	Em testes clínicos	Cardiotoxicidade
Pazopanibe	Inibidor de VEGFR-1, -2, -3 e de PDGFR- α/β	Aprovado	Cardiotoxicidade
Tivozanibe	Inibidor de VEGFR	Em testes clínicos	Cardiotoxicidade
Vandetanibe	Inibidor de VEGFR e de EGFR	Aprovado	Cardiotoxicidade
Vatalanibe	Inibidor de VEGFR, de PDGFR e de receptor c-KIT	Retirado	Toxicidades sistêmicas
SU5416	Inibidor de VEGFR-2	Retirado	Toxicidades sistêmicas
Axitinibe	Inibidor do receptor VEGFR 1-3, c-KIT e inibidor de PDGFR	Aprovado	Cardiotoxicidade
Cabozantinibe	Inibidor de VEGFR-2	Aprovado	Toxicidades sistêmicas
Inibidor multicitinase			
Sorafenibe	Inibidor de multicitinases	Aprovado	Cardiotoxicidade
Flavopiridol	Inibição de cinases dependentes de ciclina com atividade anti-angiogênica	Retirado	Toxicidades sistêmicas
Suramina	Inibição de bFGF	Retirado	Toxicidades sistêmicas
Regorafenibe	Inibidor de multicitinases	Aprovado	Cardiotoxicidade e hepatotoxicidade
Inibidor da proliferação das células endoteliais			
Talidomida	Apoptose de células endoteliais, inibição da angiogênese induzida pelo bFGF	Aprovado	Teratogênico
TNP-470	Inibição da proliferação e da migração das células endoteliais	Retirado	Neurotoxicidade
Combretastatina	Agente perturbador vascular, apoptose das células endoteliais	Retirado	Toxicidades sistêmicas
Erlotinibe	Inibidor tirosina-cinase de EGFR	Aprovado	Toxicidades sistêmicas

FONTE: Adaptado de Chimote et al. (2014).

O VEGF pode também afetar a função de células do sistema imunológico que estão presentes no microambiente tumoral e, consequentemente, influenciar a resposta do hospedeiro ao tumor (YAOQOOB et al., 2012).

A percepção do câncer como um microambiente tumoral, onde interagem células geneticamente alteradas, células do estroma (fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células endoteliais) e proteínas que compõem a matriz extracelular, tem se mostrado muito mais satisfatória na compreensão do desenvolvimento tumoral (WEINSTEIN; STORKUS, 2015). Esse repertório diversificado de células do microambiente tumoral produz uma interação única entre as células do sistema imunológico do hospedeiro e as células tumorais, que são capazes de prover as principais características do câncer, como o escape da vigilância imunológica, a ativação da angiogênese, a invasão e a metástase, além de dar suporte à resistência terapêutica. Portanto, a compreensão do papel do estroma tumoral e sua comunicação com as células neoplásicas pode levar à identificação de alvos na terapia antineoplásica (SOLÍS et al., 2015).

Nesse contexto, uma das características da inflamação associada ao tumor é a modificação do microambiente, fornecendo uma fonte de fatores de crescimento, macrófagos associados ao tumor (TAM), mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas, prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio, e promovendo o remodelamento tecidual, angiogênese e metástase (MANTOVANI et al., 2008; MAN et al., 2013; SMITH; KANG, 2013).

As citocinas podem ser classificadas de várias formas, sendo a mais comum classificação àquela relacionada à sua origem celular. As citocinas derivadas de linfócitos T auxiliares (T helper, Th) são classificadas em Th1, Th2 e mais recentemente Th17. As citocinas Th1, em sua maioria pró-inflamatórias como as interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, fator de necrose tumoral (TNF α) e interferon γ (INF γ), estimulam a fagocitose de células infectadas por meio da ativação de macrófagos, desencadeiam a produção de anticorpos e ativam o sistema complemento que contribui para a opsonização das partículas a serem fagocitadas, na tentativa de combater o tumor (VILSMAIER et al., 2016). As citocinas tipo Th2 como, por exemplo, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, medeiam a defesa humoral e tem caráter anti-inflamatório, estimulando a produção de anticorpos contra抗ígenos extracelulares, sendo também responsáveis por inibir as funções macrofágicas, favorecendo o crescimento tumoral (SPRAGUE; KHALIL, 2009).

Os macrófagos associados ao tumor normalmente apresentam dois fenótipos. O fenótipo M1 responde à ativação clássica por IFNy e promove ações antitumorais, já o fenótipo M2 é ativado em resposta a IL-4 e IL-13 e promove remodelamento tecidual, imunorregulação e progressão tumoral (MANTOVANI; SICA, 2010), além de ser capaz de atenuar as atividades dos macrófagos M1. O perfil M2 é estimulado por IL-4, IL-10 e IL-13, sendo que a IL-4 e IL-10 são, também, produzidas pelo próprio tumor, portanto, a ação destas citocinas favorece a progressão tumoral (CHAVEZ-GALAN et al., 2015).

Nesse sentido, durante o curso da malignidade dos tumores, o microambiente inflamatório combate as respostas imunes inata e adaptativa para promover o crescimento tumoral, impedindo o recrutamento, a sobrevivência e a função das células efetoras imunológicas antitumorais (RABINOVICH; GABRILOVICH; SOTOMAYOR, 2007; DIAZ-CANO, 2012). Alguns dos fatores chave que facilitam esta supressão imunológica são a abundância de quimiocinas e citocinas inflamatórias incluindo o fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), CCL2, CCL20, CXCL5, CXCL12, TNF- α , fator de crescimento transformante beta (TGF- β), IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-23, que são secretadas por tecido tumoral assim como outras células imunológicas e estromais para promover a supressão de muitos tipos de células imunes (MANTOVANI et al., 2008). Portanto, uma vez que o sistema imunológico tem o papel fundamental de combater a formação e progressão de neoplasias incipientes, a promoção do tumor requer que o microambiente imune proporcione condições para evitar uma resposta imunológica eficaz (CUNHA et al., 2016).

Neste contexto, a IL-10 surge como a citocina imunossupressora mais potente, desempenhando um papel crucial no escape do tumor ao sistema imunológico. IL-10 é uma citocina anti-inflamatória pleiotrópica, produzida e detectada pela maioria das células hematopoiéticas (ZIGMOND et al., 2014). A elevação da IL-10 sérica foi detectada em numerosos tipos de câncer, o que é consistente com o papel previamente identificado de que a IL-10 estimula a proliferação e inibe a apoptose de células tumorais, além de aumentar a susceptibilidade a metástases, por meio da conversão de TAMs a um fenótipo M2 (FOGUER et al., 2016). Isso é corroborado pelos altos níveis de IL-10, associados a um comportamento mais agressivo e ao pior prognóstico, em vários tipos de câncer, dentre estes, câncer de tireoide, da orofaringe (BRAGA et al., 2012; 2013) de

pulmão e melanoma (CUNHA et al., 2016), além de também está associado a um comprometimento da resposta inicial a quimioterapia (ALEXANDER et al., 2016).

Porém, atualmente, sabe-se que, apesar dos primeiros estudos relacionarem a sua produção com a inibição da imunidade antitumoral, o papel da IL-10 no câncer pode ser dual. Estudos recentes sugeriram que a IL-10 no microambiente tumoral promoveu respostas de células T CD8+ aumentando os níveis de interferon gama (IFN- γ) e a expressão de enzimas citotóxicas, o que é consistente com outros estudos que mostram que a IL-10 pode suprimir o crescimento tumoral e a metástase. De fato, baixos níveis de IL-10 estão associados com o aumento no risco de câncer de próstata, por exemplo (LI et al., 2016).

IL-4 é uma citocina multifuncional envolvida na regulação de respostas da imunidade humoral e adaptativa. Foi inicialmente reconhecida por sua capacidade de promover a estimulação das células B e a proliferação de células T. A IL-4 é conhecida por ter efeitos pleiotrópicos sobre diferentes células do sistema imunológico (RIOU et., 2006). Esta citocina tem sido frequentemente associada à sua atividade proliferativa, antiapoptótica de células tumorais e angiogênica (HALLETT; VENMAR; FINGLETON, 2012). Estudos preliminares sugeriram que essa via de pró-sobrevivência mediada pela IL-4 deveria ser um promissor alvo terapêutico. Adicionalmente, o antagonismo de IL-4 aumentou a eficácia e a duração da resposta quimioterápica em camundongos com tumores (TODARO et al., 2007). Estudos desse tipo sugerem a possibilidade de uma terapia antitumoral que envolva diminuição na secreção e/ou função de IL-4 (TOOMER; CHEN, 2014).

IL-1 é uma citocina abundante que pode ser secretada pelas células malignas ou pelo microambiente e afeta a inflamação, hematopoese e imunidade, além de potencializar a capacidade de invasão das células neoplásicas através da estimulação de fatores de crescimento, angiogênese e metástase. Ou seja, ela está envolvida em todas as fases do processo maligno, tais como a tumorigênese, a invasividade tumoral e progressão, assim como a ativação e supressão de imunidade antitumoral. IL-1 α e IL-1 β são os principais tipos de IL-1 (ZHANG, et al., 2012). Estudos tem demonstrado que IL-1 α e IL-1 β no processo maligno, em muitos casos, executam funções distintas. A IL-1 β é um mediador da inflamação, que promove a carcinogênese (GABAY; LAMACCHIA, 2010; TAKEUCHI, 2010). A imunossupressão induzida por IL-1 β no microambiente do tumor, principalmente por meio da indução de células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC),

normalmente inibe ou mascara a imunidade celular antitumoral. Na tumorigênese, a IL-1, originada no microambiente tumoral, pode propagar mutações iniciais induzidas por ROS ou NO, produzidos por fagócitos ou outras células do microambiente, incluindo as próprias células malignas (VORONOV et al., 2013).

IL-12 é considerada uma molécula chave no sistema imune. Suas atividades principais ocorrem sobre as células T e *natural killer* (NK), sendo uma função biológica importante a indução de IFN- γ , que por sua vez dirige a resposta imunológica para o fenótipo Th1 citotóxico, diminuindo a produção das citocinas Th2. Outros mecanismos também contribuem para atividade antitumoral de IL-12, como os seus efeitos antiangiogênicos e na remodelação da matriz extracelular do tumor e do estroma do microambiente tumoral (KERKAR et al., 2013).

Os interferons (IFNs) são um grupo de citocinas pleiotrópicas que desempenham papéis importantes na comunicação intercelular durante as respostas imunes inatas e adquiridas, e na defesa do hospedeiro contra infecções virais e bacterianas, bem como no controle de neoplasias malignas (ZAIDI; MERLINO, 2011). Linfócitos T citotóxicos e células NK ativadas secretam várias moléculas com o intuito de lisar as células tumorais, dentre elas o IFN- γ , que reforça a apresentação de抗ígenos e promove a proliferação, sobrevivência e expansão das células T CD8+. Esta citocina é considerada um agente útil na terapia de neoplasias malignas, pois inibe diretamente a proliferação das células tumorais e aumenta a resposta imunológica contra o tumor, inibindo desta forma sua progressão (MILLERET al., 2009). Porém, estudos têm mostrado que o IFN- γ tem um comportamento dual, podendo ser citostático/citotóxico, bem como podendo apresentar efeitos proliferativos, a depender das circunstâncias, tais como do microambiente em que se encontra e da intensidade de sinalização (WAJANT, 2009).

O TNF- α é produzido principalmente por células imunitárias, especialmente macrófagos, linfócitos, células dendríticas e mastócitos. Atualmente o TNF- α é a mais pleiotrópica de todas as citocinas descritas em mamíferos (SEDGER; McDERMOTT, 2014). Ao ser produzido e liberado, o TNF- α irá ligar-se aos seus receptores específicos TNF-R I e II, para assim produzir seu efeito biológico. Esta citocina exerce uma variedade de atividades biológicas incluindo inflamação, proliferação, diferenciação, apoptose, sobrevivência celular e imunomodulação, promovendo a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias (AGGARWAL, GUPTA, BASU, 2012; AGGARWAL; LIMDI, 2015). Entretanto, TNF- α pode ser considerado

um agente pró ou anti-tumorigênico, uma vez que esta citocina induz potentes efeitos angiogênicos que estimulam crescimento tumoral e metástase (SHIN et al., 2014).

As quimiocinas compreendem uma grande família de citocinas quimiotáticas estruturalmente homólogas, com aproximadamente 8 a 10 kDa de tamanho. Uma característica comum ao grupo é a capacidade de estimular a motilidade (quimiocinese) e os movimentos dirigidos (quimiotaxia) dos leucócitos como as células NK e células T, além de recrutar outros tipos de células imunológicas, e também atuam em células mesenquimais para promover a angiogênese durante a inflamação. Várias condições fisiológicas e patológicas requerem a participação das quimiocinas, incluindo inflamação, infecção, trauma tecidual, alergia, doenças cardiovasculares, assim como os tumores malignos (SCAPINI et al., 2000).

CCL2 faz parte do grupo de quimiocinas com interrelações com os principais agentes da resposta imune, permitindo uma avaliação indireta, mas abrangente, de diversos aspectos da interação tumor-hospedeiro, sendo responsáveis pela migração de vários tipos celulares para o foco inflamatório, sendo mais conhecida pelo seu papel na sinalização de recrutamento e polarização de macrófagos durante a inflamação. CCL2 regula a adesão e a quimiotaxia de macrófagos através da ativação das integrinas p1 e vias de sinalização p38/MAPK (YAO et al., 2016), afim de iniciar ou incrementar a resposta imunológica do hospedeiro contra a implantação tumoral ou ainda inibir a neovascularização. Entretanto, pode haver uma ação contrária, favorecendo o crescimento neoplásico e a metastatização, por aumento da proliferação celular, estimulando a mobilidade e migração celular ou potencializando a angiogênese no tecido tumoral (BALKWILL, 2004; FALCÃO JÚNIOR, 2008; HAO, 2012).

2.3 Estresse oxidativo e o papel do óxido nítrico no contexto do câncer

Estresse oxidativo/nitrosativo é uma situação associada a um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes (espécies reativas de oxigênio – ROS e de nitrogênio – RNS) e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, levando ao acúmulo dessas espécies reativas que desempenham papel nos vários contextos

patológicos, incluindo na inflamação, doenças cardiovasculares, alterações metabólicas e câncer (PANIERI; SANTORO, 2016).

Esta condição pode causar danos aos tecidos por diferentes mecanismos que incluem: **i)** danos ao DNA (quebras de DNA, modificações de bases, e ligações cruzadas no DNA, o que leva a erros de replicação e instabilidade genômica, associadas com a iniciação tumoral (SOSA et al., 2013; KUNDU; SURH, 2012). **ii)** peroxidação lipídica; **iii)** danos em proteínas e oxidação de enzimas; e **iv)** indução da liberação de citocinas pró-inflamatórias a partir de monócitos e macrófagos (KATAKWAR; NAIK; MITTAL, 2016).

No contexto do câncer, é descrito que ROS estão envolvidas em todos os estágios da doença: iniciação, promoção e progressão. Dados da literatura suportam a participação de ROS na fase de **iniciação** do câncer, considerando a presença de danos oxidativos no DNA em tecidos tumorais (KATAKWAR; NAIK; MITTAL, 2016).

Na fase de **promoção**, caracterizada pela expansão clonal das células iniciadas, o estresse oxidativo está largamente envolvido, considerando que ROS modulam genes relacionados à proliferação e morte celular, além de regular a atividade de fatores transpcionais, tais como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e o p53, os quais, em conjunto, controlam o crescimento celular e a oncogênese, o que culmina com o estímulo a proliferação sustentada e/ou inibição de apoptose. Ainda, o estresse oxidativo pode ativar as vias de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), tais como, ERK/MEK, além da via fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K)/AKT, o que pode resultar na inativação de proteínas pró-apoptóticas e na regulação de genes antiapoptóticos (TAKASHIMA; FALLER, 2013; KATAKWAR; NAIK; MITTAL, 2016). A via das MAPKs possui papel importante na tumorigênese, principalmente por ativar fatores de transcrição como c-Jun e c-Fos, que regulam a expressão de genes envolvidos na proliferação celular, diferenciação, transformação, inflamação, entre outros (DHILLON, 2007). Já a PI3K está relacionada à via da RAS, que possui papel fisiológico importante na sobrevivência celular (TAKASHIMA; FALLER, 2013).

Ainda, ROS também contribuem para o último estágio, a **progressão** do câncer. Nesse caso, a geração de grandes quantidades de ROS pode contribuir na indução de mutações, inibição de antiproteinases, e indução de metaloproteinases de matriz (MMPs) (SHINOHARA et al., 2010). Além disso, o aumento dos níveis de bases de DNA modificadas por oxidação pode contribuir para a instabilidade genética e potencial metastático das células tumorais no câncer, efeito este

potencializado pelos efeitos angiogênicos de ROS, essenciais para o processo de metastização (KATAKWAR; NAIK; MITTAL, 2016).

Sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos trabalham sinergicamente para proteger células e órgãos contra os danos produzidos pelo estresse oxidativo e, portanto, contra o câncer (JAWANDA, 2009).

No entanto, sob condições que promovem o estresse oxidativo/nitrosativo, antioxidantes endógenos podem não ser suficientes. Os antioxidantes enzimáticos mais eficazes são a glutationa peroxidase, a catalase e a superóxido-dismutase. Os antioxidantes não-enzimáticos incluem a vitamina E e C, antioxidantes tiol (glutationa, tiorredoxina e ácido lipóico), além de melatonina, carotenoides, flavonoides naturais, e outros compostos (Quadro 2) (CHOUDHARI et al., 2014). Há cada vez mais evidências para apoiar uma ligação entre o aumento dos níveis de ROS/RNS e atividades reduzidas de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos em várias doenças (BIRK et al., 2013; RAHMAN, 2007; VALKO et al., 2007; KURUTAS, 2016).

Quadro 2. Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e sua ação na carcinogênese.

Nome do antioxidante e sua natureza	Ação do antioxidante	Significância na carcinogênese
Antioxidantes enzimáticos		
Superóxido dismutase (SOD)	Destroi O_2^- . Cu, Zn-SOD catalisam a dismutação do ânion superóxido para oxigênio e água	Mn-SOD tem atividade antitumoral
Catalase	Tem altas taxas de rotatividade. Conversão do H_2O_2 em água e oxigênio molecular	Associado à capacidade aumentada de uma variedade de tumores para desintoxicar H_2O_2
Glutationa peroxidase	Glutationa peroxidase dependente de selênio catalisa a conversão de H_2O_2 ou peróxido orgânico em água ou álcool	Principal fonte de proteção contra baixos níveis de estresse oxidativo
Antioxidantes não enzimáticos		
Vitamina C	Trabalha em ambiente aquoso, protege membranas contra a oxidação. Reduz a degradação da vitamina E	Reduz a incidência de câncer de estômago devido a sua ação inibitória na geração de compostos N-nitroso. Efeito protetor em câncer de pulmão e colorretal

Vitamina E – Alfa tocoferol (α -Tocoferol) – forma mais ativa da vitamina E em humanos	Fornece proteção contra peroxidação lipídica Principal/importante antioxidante ligado à membrana empregado pela célula Causa inibição de formação de radicais livres e ativação de endonucleases Inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas em células cancerígenas	γ - e δ - tocoferóis são preventivos de câncer Efeito protetor contra o tabagismo Atividade inibitória em câncer de pulmão e colo e câncer colorretal Tocoferóis mistos têm sido descobertos para prevenir carcinogênese mamária em estudos com animais
Antioxidante tiol – glutationa	Principal tampão redox tiol-dissulfeto da célula Cofator para várias enzimas desintoxicantes Elimina os radicais hidroxila e oxigênio singuleto diretamente, regenera Vitaminas C e D	N-acetil-L-cisteína inibe mutações espontâneas e induzidas em bactérias, previne formação <i>in vivo</i> de DNA-carcinogênico e suprime ou atrasa o desenvolvimento de tumores ou lesões pré-neoplásicas em roedores Pode prevenir a iniciação tumoral, e reduzir tióis pode defender contra o estresse oxidativo Pode ser útil para prever o risco de carcinogênese oral em consumidores saudáveis de tabaco e para prever a sobrevivência de pacientes com câncer oral
Carotenoides – pigmentos que são encontrados em plantas e microorganismos	Extingue oxigênio singuleto sem degradação Previne dano em compartimentos lipofílicos em baixa pressão parcial de oxigênio Imunomodulação, estimulação de aumento nos números de linfócitos T-helper e células NK, bem como de células com receptores de IL-2	Pode prevenir ou inibir certos tipos de câncer, pode causar inibição de mutagênese, inibição do crescimento de células cancerosas Pode agir como um pró-oxidante
Flavonoides – grupo de metabólitos secundários da classe dos polifenóis.	Podem eliminar radicais peroxil e são inibidores eficazes da peroxidação lipídica, podem quelar metais redox-ativos e assim prevenir a quebra catalítica de H_2O_2	Agentes antitumorais e anticancerígenos. Modificam as atividades de enzimas envolvidas na carcinogênese, no crescimento tumoral ou na metástase.

FONTE: Adaptado de CHOUDHARI e colaboradores (2014).

Há, certamente, um grande campo a ser estudado, no que se refere a uma melhor compreensão de todos os mecanismos reguladores e regulados pelo estresse oxidativo/nitrosativo e sua possível aplicação em prevenção, diagnóstico precoce e tratamento do câncer.

O NO é uma molécula pleiotrópica altamente instável, e tem uma meia-vida de 1-5 segundos *in vivo* (GLADWIN et al., 2003). As ações do NO são tipicamente mediadas através de vias dependentes ou independentes de monofosfato de

guanosina cíclico (cGMP). 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 (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; RIDNOUR et al., 2015). O elétron não emparelhado do NO permite reações com moléculas inorgânicas (oxigênio, superóxido ou metais de transição), com o ácido desoxirribonucleico (DNA), e com grupos prostéticos (isto é, heme) ou proteínas, explicando assim a sua variedade de atividades biológicas (SINGH; GUPTA, 2011). Extensa investigação tem sido realizada na perspectiva de estudar os efeitos do óxido nítrico (NO) na biologia do câncer. Dados experimentais da literatura são inconclusivos e conflitantes, o que reflete a dificuldade em decifrar o papel do NO na doença. Esses efeitos dicotômicos do NO no câncer resultam da sua capacidade de interferir com vários processos relacionados ao desenvolvimento e evolução da doença, tais como, o crescimento tumoral, migração, invasão, sobrevivência, angiogênese e metástase (Quadro 3). Portanto, os resultados conflitantes são, na realidade, consequência da natureza dual dos efeitos celulares mediados por NO, que dependem de vários fatores, como, a concentração de NO (HALDER et al., 2016), o microambiente e o ciclo celular no tumor (RIDNOUR et al., 2008; HALDER et al., 2016), o estado redox (MOCELLIN; BRONTE; NITTI, 2007) e o tempo de exposição (VILLALOBO, 2007).

Nesse contexto, vários relatos associam o aumento dos níveis de NO e da expressão de iNOS a diferentes tipos de câncer (KUNDU; SURH, 2012) incluindo tumores de pulmão (OKAYAMA et al., 2013), cólon (AMBS et al., 1999), mama (GLYNN et al., 2010), melanoma (GRIMM et al., 2010) e pâncreas (XIONG et al., 2001). Os mecanismos pelos quais o NO e seu derivado, o peroxinitrito, induzem carcinogênese associada à inflamação envolvem a indução de danos no DNA, a supressão de enzimas de reparo do DNA, a modificação de proteínas, o aumento da proliferação celular, da angiogênese e de metástases, além da inibição da apoptose e da imunidade antitumoral (KUNDU; SURH, 2012).

Os efeitos do NO podem ser descritos mais especificamente em relação a eventos característicos do câncer, tais como, proliferação, apoptose e angiogênese (BURKE et al., 2013).

Em relação à proliferação, o NO inibe a proliferação celular e induz senescência, em algumas situações; entretanto, ele também pode estimular o

crescimento celular (SOHN et al., 2012), sendo estes efeitos diretamente dependentes da concentração de NO (BURKE et al., 2013). Os mecanismos de estimulação da proliferação celular mediados por NO incluem o aumento da sinalização do fator de crescimento de fibroblastos (ZHENG et al., 2006), a estimulação de vias de proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs), a ativação da eNOS pela via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/Akt, e/ou recrutamento de proteína de choque térmico (VILLALOBO, 2007), além de modificação de proteínas (ARANDA et al., 2012).

Em relação ao processo de morte celular por apoptose, dados da literatura mostram que o NO pode induzir ou inibir esse processo, por regular muitas moléculas e organelas envolvidas, dentre estas, a proteína p53, membros da família BCI-2, caspases e mitocôndria (TARR; EGGLETON; WINYARD, 2006; KUNDU; SURH, 2012).

De forma semelhante, no que diz respeito a angiogênese, o NO é um mediador chave no processo agindo como um mediador *downstream* de vários efetores angiogênicos, porém, seus mecanismos são complexos e envolvem múltiplas vias. Fatores angiogênicos, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), a esfingosina-1-fosfato, angiopoietinas, estrogênio, estresse metabólico, entre outros, induzem a liberação de NO a partir do endotélio por estimular a via eNOS. O NO também exerce efeitos pró-angiogênicos por inibir fatores antiangiogênicos endógenos, tais como a trombospondina 1. Outra evidência para a inibição de fatores antiangiogênicos está no fato de que o L-NAME, um inibidor da síntese de óxido nítrico, aumentou os níveis de angiostatina, um agente antiangiogênico, em células endoteliais vasculares, sugerindo que o NO estaria exercendo efeitos pró-angiogênicos por inibir esse mediador (MATSUMAGA et al., 2002; BURKE et al., 2013).

No contexto da angiogênese, o NO promove maturação e dilatação dos vasos (FUKUMURA; KASHIWAGI; JAIN, 2006), liberação de VEGF, ativação de COX-2 e aumento da produção de prostaglandina (PGE2), aumento da permeabilidade da vasculatura tumoral (BURKE et al., 2013; CHOUDHARI et al., 2013), além de recrutar células derivadas da medula óssea e células perivasculares, com consequente aumento da angiogênese (BURKE et al., 2013).

Considerando todos os aspectos descritos, pode-se dizer que o NO pode ter efeitos pró ou antitumorigênicos, como consequência, diferentes abordagens que

interferem com a via do NO são investigadas para o tratamento do câncer. Dentre estas podem ser citadas: o uso de inibidores de NOS, no caso dos tumores dependentes de NO para seu crescimento; e os doadores de NO, com o objetivo de aumentar os níveis de NO de forma a atingir uma concentração citotóxica, o que é usado em tumores que não são dependentes de NO, considerando que estes não estão adaptados a altos níveis desse mediador, o que é particularmente utilizado na sensibilização para radioterapia e quimioterapia (ARANDA et al., 2012).

Quadro 3. Diversas ações do óxido nítrico (NO) no câncer: Papel promotor tumoral do NO.

Papel promotor do tumor	
Papel do óxido nítrico (NO)	Mecanismo pelo qual o NO atua
Mecanismos genotóxicos	Formação de espécies tóxicas e mutagênicas Modificação direta do DNA – ruptura, oxidação e desaminação de ácidos nucleicos Inibição dos sistemas requeridos para reparar lesões no DNA
Efeitos antiapoptóticos	Mutações GC para AT na p53 – perda da sua atividade repressora Inibição direta da atividade da caspase através da s-nitrosilação da cisteína tiol Inibição da liberação do citocromo C Aumento na expressão do Bcl-2 Supressão da geração de ceramida Ativação da ciclo-oxigenase
Indução e promoção da angiogênese (iNOS e eNOS)	Dilatação dos vasos arteriolares pelo eNOS Liberação de VEGF e estimulação do NO da hiperpermeabilidade do endotélio vascular Produção aumentada de PGE2, resultando em aumento da permeabilidade da vasculatura tumoral Ativação da COX-2, a qual estimula a produção de fatores pró-angiogênicos e prostaglandinas
Limitação da resposta imune do hospedeiro contra o tumor	Supressão da proliferação e da infiltração de leucócitos Baixa interação leucócito-endotélio
Promoção de metástase	Promoção da linfangiogênese e propagação para linfonodos possivelmente através do envolvimento do VEGF-C <i>Upregulation</i> de MMP-2 e MMP-9 <i>Downregulation</i> de TIMP-2 e TIMP-3

FONTE: Adaptado de CHOUDHARI e colaboradores (2013).

2.4 Estudos da toxicologia/farmacologia de drogas com potencial antitumoral

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos em causar danos à saúde humana. O teste de toxicidade aguda é o primeiro ensaio na avaliação da segurança de novas drogas. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica são utilizados para classificar e, apropriadamente, rotular substância de acordo com o seu potencial de letalidade ou nocividade como estabelecido pela legislação (CHAPMAN et al., 2010).

Além da letalidade, outros parâmetros são investigados nestes estudos, como identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação dose-resposta. Baseia-se na administração em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração. Assim sendo, o objetivo principal de estudos toxicológicos pré-clínicos identificar o potencial toxicológico do candidato a fármaco, bem como a forma de preveni-los, e a reversibilidade dos efeitos adversos (CEKANOVA; RATHORE, 2014).

Considerando que as substâncias citotóxicas não são letais às células neoplásicas de modo seletivo, o conhecimento acurado da toxicidade da substância em estudo requer o claro conhecimento a respeito dos mecanismos de toxicidade e dos fatores de risco correspondentes (MAHAJAN et al., 2015).

O desenvolvimento de novos fármacos antitumorais torna-se mais complexo que o desenvolvimento de novos fármacos de outras classes terapêuticas. A atividade de um fármaco antineoplásico baseia-se na busca da destruição de células tumorais, que têm como característica comum se dividirem muito mais rápido que a maioria das células normais. Porém, podem ocorrer efeitos secundários em células normais de crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e as células sanguíneas (especialmente na medula óssea), causando efeitos como anorexia, diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e maior susceptibilidade às infecções (BRANDÃO et al., 2010).

Vários são os fármacos quimioterápicos usados na clínica com perfil de toxicidade significativa, entre eles o 5-fluoruracil (5-FU) apresenta como efeitos colaterais mais conhecidos a mielosupressão, alterações gastrointestinais, alterações hematológicas e também está associado a reações cardíacas (ROQUE; FORONES, 2006; STEGER; HAUTMANN; KOLBL, 2012); o metotrexato, o

docetaxel e a cisplatina que desencadeiam toxicidade renal (BEZERRA et al., 2008); a doxorrubicina que induz cardiotoxicidade e mielossupressão (PRADOS et al., 2012); e a ciclofosfamida que induz cistite hemorrágica. A importância de se conhecer os efeitos tóxicos dos fármacos utilizados na clínica está na possibilidade de prevenir/ tratar os efeitos indesejáveis e assim possibilitar seu uso com melhor qualidade e adesão do paciente ao tratamento.

Nesse contexto, o principal desafio da terapia antitumoral encontra-se na descoberta de fármacos que, além de possuírem elevada potência, possuam grande seletividade para as células cancerígenas, aumentando a segurança de seu uso. Diante disso, é evidente a importância da avaliação do balanço entre a atividade antitumoral *versus* toxicidade de um determinado produto para verificar sua aplicabilidade farmacológica. Modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, são importantes para a obtenção de informações sobre a toxicidade de uma droga em estudo (TALMADGE et al., 2007).

Os ensaios agudos são obrigatórios para todo tipo de material em teste, independentemente do tempo de uso proposto para a espécie humana, pois evidenciam o risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de preveni-las, permitindo dessa forma, conhecer o índice de letalidade, a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste, os órgãos alvo, as alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte (LARINI, 1999).

Várias metodologias podem ser utilizadas para a realização de estudos de toxicidade aguda, uma delas e a mais bem aceita é o guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária em 2013, onde ressalta que estudos para a determinação de DL50 (dose que induz morte de 50% dos animais experimentais) não são necessários (ANVISA, 2013). O protocolo para avaliação da toxicidade aguda é feito a partir da administração em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias. Podem ser utilizados métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um menor número de animais, tais como os preconizados nos guias da OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) “Guidelines for Testing of Chemicals”, como por exemplo o Guia de no 423 (OECD, 2001).

Baseado neste guia da OECD, para o ensaio de toxicidade aguda administra-se uma dose da substância teste a um grupo de três animais, e dependendo da relação sobrevivência/morte, o estudo é repetido com outros animais recebendo doses maiores ou menores da mesma substância. A dose inicial utilizada é selecionada a partir de uma das quatro opções preconizadas pelo guia, tais quais: 5, 50, 300 ou 2000 mg/kg. Quando não existe qualquer informação sobre a substância que será testada, por razões de proteção dos animais, deve-se a utilizar uma dose inicial de 300 mg/kg. Ainda de acordo com o guia n. 423 da OECD, bem como com as instruções da *Food Drug Administration* (FDA) para estudos de toxicidade aguda, apenas um gênero é estudado em um ensaio de toxicidade aguda; geralmente, assume-se a fêmea como o gênero mais sensível aos efeitos tóxicos agudos de produtos químicos (OKOMODA; ATAGUBA; AYUBA, 2013).

No contexto da avaliação da toxicidade de novos candidatos a fármacos antitumorais, o estudo dos efeitos genotóxicos assume papel relevante considerando o potencial tóxico de muitos antineoplásicos sobre o material genético das células não tumorais. O conhecimento do potencial genotóxico de um fármaco ou de compostos presentes no meio ambiente é uma informação essencial para as agências regulatórias, no que se refere ao estabelecimento de riscos para o homem e para o ambiente (LEE et al., 2016).

Segundo protocolos internacionais de estudos pré-clínicos *in vivo*, para o estudo de potenciais fármacos, a análise de parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos no sentido da investigação do potencial toxicológico é necessária (MAGALHÃES et al., 2010). É de indicação para esses estudos farmacológico/toxicológico a análise de parâmetros que avaliem a função hepática (a exemplo das dosagens das transaminases alanina e aspartato aminotransferases) e renal (a exemplo das dosagens de uréia e creatinina), além dos parâmetros hematológicos. As análises histológicas, por avaliarem os aspectos micro e macroscópicos de possíveis lesões e/ou alterações funcionais em nível celular, mostram-se também de utilidade na investigação (MAGALHÃES et al., 2010).

A genotoxicidade é um campo de conhecimento relativamente recente, e se situa na interface entre toxicologia e genética, por isso denominada, frequentemente, também de genética toxicológica. Esta visa o estudo dos processos que alteram a base genética da vida, quer seja em sua estrutura físico-química do DNA (ácido desoxirribonucléico), processo classificado como mutagênese; quer seja na

alteração do determinismo genético em níveis celulares ou orgânicos, identificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese (OLIVEIRA, 2012).

Dentre os testes disponíveis para avaliação do dano genético está o teste do micronúcleo com eritrócitos. Micronúcleos são estruturas cromatídicas delimitadas por membrana, separados do núcleo principal e visíveis em células interfásicas. Podem ser resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal devido à ação de substâncias clastogênicas ou aneugênicas (RIBEIRO et al., 2003).

O teste do micronúcleo baseia-se na observação de células que sofrem quebra de cromátides, ou alterações na distribuição de suas cromátides, devido à ação de agentes genotóxicos. Durante a anáfase (fase da divisão celular em que há a segregação dos cromossomos), os fragmentos provenientes das quebras ou cromossomos inteiros, não acompanham a migração para os pólos da célula. Consequentemente, na telofase (fase em que os cromossomos se descondensam e ocorre a formação de um novo invólucro nuclear em torno de cada conjunto de cromossomos), tais fragmentos cromatídicos não são incluídos nos núcleos das células filhas, formando um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células. Assim, quando um produto em teste aumenta a frequência de eritrócitos micronucleados, há a indicação de que ela interfere na divisão nuclear dos eritroblastos da medula, quebrando cromossomos ou interferindo no fuso, levando ao aparecimento de fragmentos de cromatina, ou cromossomos inteiros, que não se incorporaram ao núcleo das células-filhas, os micronúcleos (COSTA- SILVA; NEPOMUCENO, 2010; FERIGOLO; SAGRILLO, 2013; TSUZUKI, 2016).

Dentre os métodos para investigação de toxicidade genética *in vivo*, o teste do micronúcleo, realizado em roedores, tem sido amplamente empregado e aceito pelas agências reguladoras e comunidade científica, como a “Organisation for Economic Co-operation and Development” (OECD), em seu “*Guidelines for the testing of chemicals/ section 4: Health Effects – Mammalian Erythrocytes Micronucleus Test: nº 474*” e recomendado pelo *Gene - Tox Program, Environmental Protection Agency – EPA/US*. Este guia é recomendado pelos órgãos nacionais que regulamentam os estudos pré-clínicos de fármacos, por meio do “Guia para condução de estudos não-clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (OECD et al., 2001; ANVISA, 2013).

Nos estudos farmacológicos/toxicológicos, após exposição às drogas, são analisados parâmetros que avaliam possíveis alterações na função hepática, como as transaminases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), que são duas enzimas de extrema importância para avaliação da função hepática, usadas como indicadoras de danos hepatocelulares. A ALT está elevada em uma variedade de alterações hepáticas incluindo infecções virais, cirrose, esteatose não alcoólica e toxicidade por drogas (MONTEIRO, 2010; LIMA, 2009). Assim como são avaliados a função renal, como ureia e creatinina, bem como os parâmetros hematológicos como o eritrograma, leucograma e plaquetograma. Adicionalmente, exames histológicos (macro e microscópicos) são de extrema importância, pois analisam estrutura e função, em nível celular (BEZERRA et al., 2009).

Os tumores experimentais têm grande importância para o estabelecimento de padrões de replicação neoplásica. O carcinoma de Ehrlich ascítico (CEA) é um dos mais comuns entre esses tumores. É uma neoplasia experimental transplantável de origem epitelial maligna, correspondendo ao adenocarcinoma mamário espontâneo de camundongo fêmea que é mantido na forma ascítica por passagens através de transplantes intraperitoneais semanais das células tumorais para outro camundongo (GURGEL et al., 2009).

A primeira referência a esse tumor se deu em uma fêmea murino que apresentou um carcinoma mamário espontâneo. Ehrlich e Apolant, em 1905, usaram espécimes desse tumor para transplantes subcutâneos sucessivos entre ratos (EHRLICH, 1906).

Lettre, em estudos realizados a partir da década de 1940 forneceu padronização não só para medição desse tumor, mas também para conversões que o tornaram adequados para pesquisas qualitativas e quantitativas (LETTRE et al., 1972).

Após 1948 houve uma rápida difusão do CEA em centros de pesquisa em todo o mundo. Trata-se de um carcinoma indiferenciado, originalmente hiperdiploide, altamente transplantável, isento de regressão espontânea, com curto período de vida e rápida proliferação. Não se identificaram抗ígenos específicos anti-tumor de Ehrlich. Essa neoplasia, quando injetada no peritônio, provoca efusão, caracterizando ascite. Frequentemente, a virulência tumoral aumenta a partir de transplantes repetidos, de maneira que o grau de proliferação celular tumoral sofre

incremento gradativo. Contudo, a desdiferenciação cede gradualmente e as células obtém controle independente de crescimento, heterotransplantabilidade e conversão na forma ascética (OSIPOV et al., 2014).

O líquido ascítico típico do CEA tem coloração cinza-claro, algumas vezes apresenta certa viscosidade. Contém em torno de 10 milhões de células neoplásicas em cada 0,1ml, caracterizadas por sua homogeneidade de distribuição, o que permite uma precisão quantitativa nos transplantes e possibilita a contagem de células por sistemas simples. O tumor de Ehrlich pode ser transplantado para o peritoneo, produzindo a forma ascética, mas também pode ser implantado no tecido celular subcutâneo, produzindo a forma sólida (VERÇOSA et al., 2007; AZEVEDO et al., 2014). Outra vantagem do CEA é que suas células não aderem a superfícies sintéticas *in vitro*. Observa-se que de 4 a 7 dias após o transplante há formação de em torno de 10 ml de líquido ascítico. A replicação celular se dá em duas fases: a primeira de proliferação, na qual há um crescimento exponencial do número de células, seguida por um “plateau”, secundado por uma fase de quiescência, na qual o número de células permanece quase constante (FERNANDES et al,2015).

Durante a transição entre a fase proliferativa e o “plateau” ocorrem mudanças morfológicas e metabólicas nas células, como deterioração estrutural, diminuição do número de mitocôndrias, declínio da síntese de RNA e DNA e perda de purinas e pirimidinas intracelulares, nucleotídeos, nucleosídeos e bases. Além disso, é observado declínio na concentração de ATP. Há rápida divisão celular na fase proliferativa e o acúmulo de ascite ocorre paralelamente à proliferação celular. A morte do animal se dá em período variável, em decorrência do aumento da pressão intraabdominal e compressão dos órgãos adjacentes (OZASLAN et al., 2011).

Observou-se que há aumento da permeabilidade microvascular no peritoneo de animais portadores de CEA, com consequente ascite, provavelmente mediada por um fator vascular produzido pelas células tumorais. Sabe-se que esse fator não tem aparente efeito nos vasos sistêmicos. Há também referência a inibição da proliferação celular na medula óssea do hospedeiro do CEA, e a sua intensidade depende do tempo de instalação do tumor (SENGER et al., 1983).

Do ponto de vista citomorfológico as células do carcinoma de Ehrlich se caracterizam por se situarem isoladas, grandes, arredondadas, com citoplasma delicado escasso e microvacuolizado. Os núcleos são volumosos com inversão da relação núcleo/citoplasma. Apresentam cromatina granular, irregularmente

distribuída. Os nucléolos são proeminentes e de configuração anormal (ANJOS et al., 2008).

Quando inoculado na cavidade abdominal, as células tumorais crescem na sua forma ascítica desenvolvendo uma carcinomatose peritoneal. Essa forma tem como característica grande acúmulo de fluidos no abdome (ascite) e uma baixa resposta inflamatória, com pequena infiltração de macrófagos e um influxo tardio de células polimorfonucleares para a cavidade (a partir de sexto dia após a inoculação) (FECCHIO, 1990; HOSSNE, 2002; FERREIRA, 2006).

O tumor de Ehrlich possui características agressivas, podendo induzir mielossupressão e afetar a resposta inflamatória por meio do aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL1 β e MCP1, além de prostaglandina E2 (PGE2) e óxido nítrico (SANTOS et al., 2016; FERNANDES et al., 2015).

As características acima descritas situam o carcinoma de Ehrlich como um tumor experimental de tipificação morfológica definida, comportamento biológico previsível e facilidade de transplante. Além disso, a sua reproduzibilidade é fácil, o que permite sua utilização nos diversos centros de pesquisa do mundo de maneira comparável (GURGEL et al., 2009).

2.5 Derivados Tiofénicos

A pesquisa e desenvolvimento de fármacos tem sido moldada pelo envolvimento de várias áreas do conhecimento como a química, a fisiopatologia, a farmacologia, a microbiologia, a bioquímica, a biologia molecular, entre outras. As ferramentas biotecnológicas, associadas aos métodos de química medicinal, como a síntese racional de novos fármacos, ganham papel de destaque no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica (FERREIRA, 2012).

As estratégias de modificação molecular consistem na realização de pequenas modificações químicas em um composto protótipo matriz, possuidor de estrutura química e atividades biológicas bem conhecidas (mantendo constante seu grupo farmacofórico) obtendo-se novos compostos análogos ou homólogos, sem perda das principais propriedades do composto matriz (MONTANARI, 2001; MADIGAN et al., 2010). A validação de um novo alvo por método químico ou genético tem conduzido, frequentemente, ao estudo da otimização das propriedades

farmacológicas e toxicológicas para o tratamento de diversas doenças (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010)

O planejamento racional de fármacos auxilia na identificação de um composto-protótipo candidato a novo fármaco, de forma que muitas estratégias podem ser empregadas nesse processo, permitindo que as descobertas sejam mais planejadas, racionais e menos dispendiosas a fim de reunir farmacóforos em uma única molécula e obter sinergismos de atividade (DO AMARAL; MONTANARI, 2002; WELSCH et al., 2010). Essas modificações permitem que dois fármacos estruturalmente semelhantes, diferenciando-se apenas por um átomo ou posição que este ocupa na molécula, podem apresentar diferenças quanto às suas propriedades físicoquímicas e, consequentemente, quanto à atividade biológica, tanto do ponto de vista quantitativo como qualitativo (WERMUTH, 2003; TAVARES, 2004)

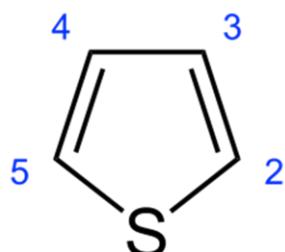
Fazendo uma análise das estruturas químicas dos fármacos comercialmente disponíveis, observa-se que a grande maioria contém pelo menos um composto heterocíclico (DESIMONE et al., 2004; BOTELHO, 2014). A crescente procura por novas substâncias para o tratamento de doenças vem demonstrando que os heterocíclicos são de grande importância na síntese de compostos de interesse biológico (EL-SHARKAWY, EL-SAYED, ZAKI, 2012). Muitos destes compostos heterocíclicos são fármacos mundialmente consumidos que apresentam atividades farmacológicas diversificadas, tais como anti-hipertensiva (losartana); antiviral (ribavirina); antitumoral (fluorouracil); antifúngica (fluconazol); antiprotozoária (metronidazol) e antibacteriana (tazobactam) (MAHAMMAD et al., 2012).

Portanto, a importância dos compostos heterocíclicos é incontestável, particularmente no que se refere ao fato de inúmeros usos como medicamentos. Neste contexto, diversas substâncias sintéticas são obtidas a partir de derivações de anéis heterocíclicos, dentre as quais, destaca-se o tiofeno devido à sua potencialidade como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos (ANDES; PASCUAL; MARCHETTI, 2009).

O anel tiofeno é uma estrutura pentamérica com a presença de um heteroátomo de enxofre (na posição 1) e duas duplas ligações (nas posições 2 e 4). A literatura destaca a descoberta e caracterização de propriedades físico-químicas dos tiofenos (Figura 3) na década de 1880 e foi atribuída a Victor Meyer (HELLIWELL et al., 2011). Sua ocorrência se dá em vários organismos vivos.

Derivados tiofênicos já foram identificados como metabólitos secundários em alguns organismos como fungos e plantas, como a *Tagetes pátula* L. e *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) (MARGL et al., 2001).

Figura 3. Estrutura do tiofeno.



Fonte: <http://chem.libretexts.org/>

A estrutura do anel tiofênico, em particular, tornou-se atrativa para a química medicinal a partir do momento em que várias atividades biológicas foram atribuídas a este núcleo (FAKHR et al, 2008; BEHBEHANI, 2012;). A literatura relata diversas propriedades entre as quais se destacam as atividades antifúngica (CHAN et al., 1975; RYU et al., 2005) e antitumoral (DALLEMAGNE et al., 2003; WANG, et al., 2011).

Exemplos de fármacos comerciais contendo o anel tiofênico são olanzapina, dorzolamida, duloxetina, sertaconazol, o derivado benzotiofênico, um anti-HIV e o raltitrexed (Tomudex®) fármaco utilizado no tratamento do câncer de colo retal (BRAULT et al., 2005).

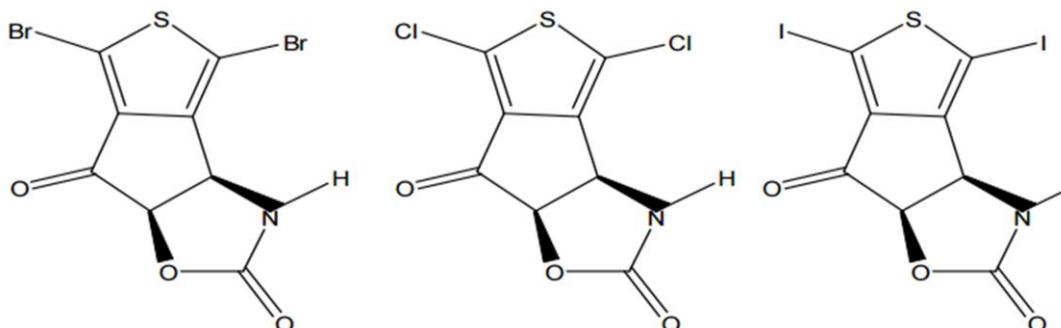
Além dos fármacos com núcleo tiofênico já inseridos na terapêutica, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas em ensaios pré-clínicos e clínicos com os derivados tiofênicos. As reações de substituição nos 2-amino-tiofenos representam uma forma versátil de obtenção de novos compostos biologicamente ativos. Diversos derivados desse anel são relatados na literatura por apresentarem promissoras atividades biológicas, dentre as quais: antileishmania (RAM et al, 1997; LIMA et al, 2009); antimicrobiana (QUEIROZ et al., 2006; ARORA et al, 2013; SUBBA, 2013), antifúngica (PINTO et al., 2008; OLIVEIRA, 2013; MOURA; LIMA; JUNIOR, 2015); antiviral (RASHAD et al., 2010), anti-inflamatória (FAKHR et al.,

2009), antinociceptiva (GONCALES et al., 2005; MOTA, 2012; PENHA, 2014), antipsicótico (CALLIGARO et al., 1997), anticonvulsivante (GHOGARE et al, 2010), ansiolítica (AMR et al., 2010 FORTES et al, 2013) e antioxidante (GOUDA et al, 2013).

Além disso, o núcleo tiofênico exibe atividade antitumoral relatada em vários trabalhos. Pode atuar no processo de angiogênese atuando, possivelmente, em mecanismos de transdução de sinais tais como cinases, fosfolipase A2, metabolismo do ácido aracdônico, receptores de fosforilação (EGF) e Ca⁺⁺-ATPase (CHAN et al., 2004; ALQASOUMI, et al., 2009).

Estudos realizados por Dallemande e colaboradores (2003) relataram a síntese e a citotoxicidade de vários compostos relacionados ao ciclopenta[c]tiofeno, entre os quais alguns exercem uma atividade antitumoral *in vivo*.

Figura 4. Derivados tiofénicos com atividade antitumoral



Atividade antitumoral também foi descrita por Ferreira e colaboardores (2009) em derivados 2-acil-3-ferrocenil-benzo[b]tiofenos contra algumas linhagens de células tumorais humanas MCF-7 e MCF-7-ADR (adenocarcinoma de mama), A431 (carcinoma epidermóide), HCT-15, A549 (carcinoma de pulmão), obtendo resultados melhores do que a droga referência Cisplatina. Assim como, Shchekotinhin e colaboradore (2009) realizaram testes com derivados antra[2,3-*b*]tiofeno-5,10-dionas comprovando atividade contra linhagens de células tumorais L1210 (leucemia linfocítica), Molt4/C8 (leucemia linfoblástica aguda), CEM (leucemia linfoblástica aguda), K562 (leucemia mielóide crônica). Uma série de derivados contendo indol-2-ona apresentaram atividade citotóxica contra as linhas celulares tumorais humanas HT-29 (adenocarcinoma de mama), H460 (carcinoma de pulmão), MDA-MB-

231(adenocarcinoma de mama) e SMMC-772 (Heterocarcinoma) (WANG, et al., 2011).

Outros resultados mostraram que vários derivados 2-aminotifeno possuem grande potencial antiproliferativo em células humanas de adenocarcinoma cervical (HeLa), adenocarcinoma pancreático humano (PANC-1), interferindo com a progressão do ciclo celular (DE AGUIAR et al., 2016).

Na avaliação da citotoxicidade sobre eritrócitos humanos de derivados tiofênicos realizado por Rodrigues e colaboradores (2015) onde investigou a atividade hemolítica de 32 derivados tiofênicos indólicos e todos, inclusive o nosso objeto de estudo o 2-[(1H-indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (SB-44), apresentaram CH₅₀ > 400 µg/mL, demonstrando, assim, a segurança destes compostos para eritrócitos (BARBALHO, 2016). Neste mesmo estudo foi demonstrado que 10 derivados tiofênicos demonstraram atividade inibitória contra formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, sendo os derivados contendo anel indólico, SB-200, SB-44 e SB-83, os mais efetivos (RODRIGUES, 2015).

Por fim, a avaliação da atividade antiproliferativa de 16 derivados do cicloheptil [b] tiofeno, o SB-44 foi o mais citotóxico inibindo mais de 97% do crescimento das linhagens de células tumorais humanas HT29 (câncer de cólon), NCI H-292 (câncer de pulmão) e HEP (câncer de laringe) pelo método do MTT (SOUZA et al, 2012).

O SB-44 também apresentou citotoxicidade frente as linhagens de células T47D (câncer de mama), NG97 (glioblastoma multiforme), CCRF-CEM (leucemia linfoblástica aguda) e HL60 (leucemia promielocítica) e redução significativa da massa tumoral de sarcoma 180 em ensaios *in vivo* (OLIVEIRA, 2013).

Considerando a busca incessante por novos fármacos pela indústria farmacêutica na identificação de moléculas potentes e seletivas, capazes de exercer seu efeito em um alvo terapêutico específico, diretamente relacionado à patogênese da doença aliada ao promissor grupo dos aminotiofenos o qual o composto SB-44 faz parte, tendo ainda uma vantagem adicional sobre compostos naturais e outros compostos sintéticos por serem sintetizado com bom rendimento e pela possibilidade de obtenção em grandes quantidades, incluindo uma escala industrial, o presente trabalho se propôs a avaliar a toxicidade da referida substância com o

objetivo de fornecer dados relativos à segurança de seu uso, bem como avaliar seu potencial antitumoral e seus possíveis mecanismos de ação.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade e o potencial antitumoral do derivado tiofênico sintético 2-[(1H-indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (SB-44) por meio de ensaios *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a toxicidade pré-clínica aguda do SB-44 em camundongos;
- Avaliar a genotoxicidade do SB-44 em camundongos;
- Estudar a atividade antitumoral *in vivo* do SB-44 em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE);
- Analisar as alterações no perfil do ciclo celular induzidas por SB-44;
- Avaliar o efeito antiangiogênico do SB-44;
- Investigar a participação de citocinas no mecanismo de ação antitumoral do SB-44;
- Investigar o efeito antioxidante do SB-44: quantificação de espécies reativas de oxigênio e do óxido nítrico;
- Avaliar o perfil de toxicidade do SB-44 após tratamento antitumoral em modelo de CAE.

MATERIAL

4 MATERIAL

4.1 Locais 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 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®); Kit ELISA (eBioscience®) para dosagem de citocinas.

4.3 Síntese do 2-[(1H-indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (LPSF/SB-44)

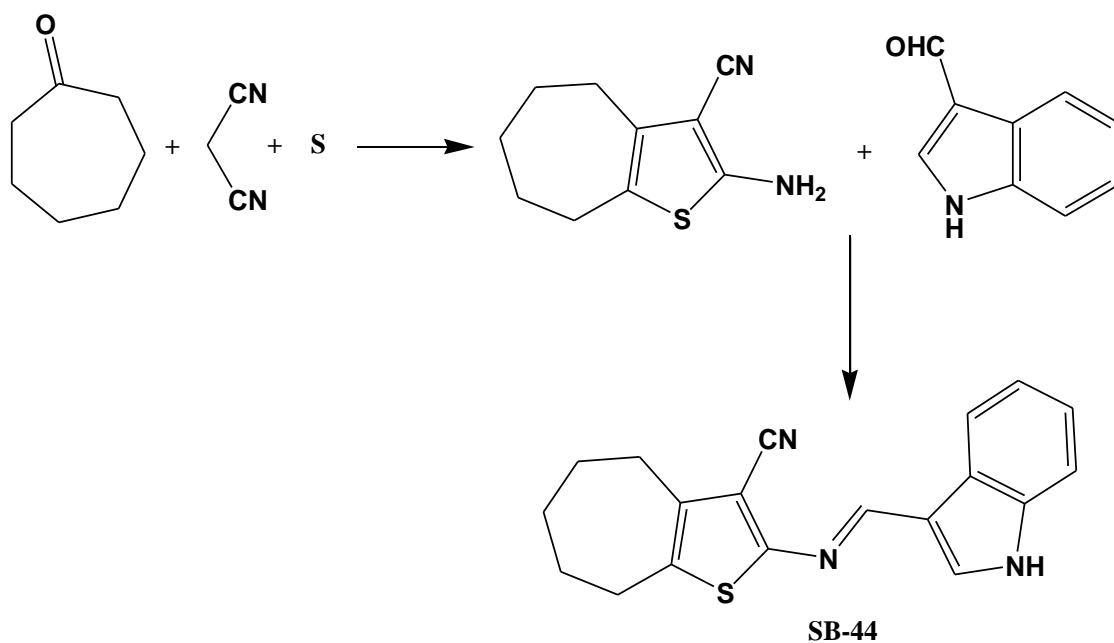
O derivado 2-[(1H-indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (designado como derivado tiofênico SB-44) utilizado neste trabalho, foi sintetizado e fornecido pelo Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, do Laboratório de Síntese e Votorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba, UEPB.

Para obtenção do composto SB-44 foi empregada uma rota sintética já descrita anteriormente (MENDONÇA JUNIOR et al., 2011; SOUZA et al., 2012) composta por duas etapas reacionais, conforme a esquema a seguir.

A primeira etapa consistiu na reação de Gewald, onde malononitrila, cicloheptanona e enxofre elementar foram postos a reagir em etanol sob catálise

básica, numa reação multicomponente gerando o aducto de Gewald: 2-amino-5,6,7,8-tetrahidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila. Após devidamente purificado, esse intermediário, foi posto a reagir com indol-3-carboxaldeído numa proporção equimolar, em meio ácido, através de uma reação de condensação, gerando o composto desejado SB-44. A estrutura química do composto resintetizado foi comprovada por comparação de suas propriedades físico-químicas e sinais no RMN ¹H.

Figura 5. Síntese para obtenção do composto SB-44



Quadro 4. Características físico-químicas do SB-44

Código	LogP	Rendimento (%)	Ponto de Fusão	Razão de Frente Sistema	Massa Molecular	Fórmula Molecular	Aparência
SB-44	5,29	97%	110-111 °C	0,54 <i>n</i> -Hex./AcO Et 9,5:0,5	319,11 g/mol	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ S	Sólido de cor amarelo

FONTE: RODRIGUES, 2015.

Para os testes *in vitro*, os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido – (DMSO) (Mallinckrodt Chemicals, St. Louis, EUA) e posteriormente diluídos nos meios de cultura apropriados até atingir as concentrações finais desejadas, não ultrapassando a concentração de 0,5% de DMSO. Para os experimentos *in vivo*, o composto avaliado foi emulsificado em solução salina 0,9% com 5% de Tween 80 e administrado conforme a proporção de 0,1 mL/10 g de peso corporal. A preparação ocorreu sempre minutos antes de cada administração.

4.4 Animais e condições experimentais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) machos e fêmeas, pesando entre 25 e 35 g obtidos da Unidade de Produção Animal/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.

As técnicas utilizadas para induzir a nocicepção em camundongos foram selecionadas de acordo com a aceitação internacional e os procedimentos experimentais realizados conforme o Guia de cuidados e uso de animais de laboratório (National Academy of Sciences, 2011), respeitando-se os limites de exposição do animal aos testes, a fim de evitar lesão tecidual (ALMEIDA, 2006).

No dia do experimento os animais foram separados em gaiolas de polietileno e mantidos na sala de experimentação aproximadamente 120 minutos antes da realização do teste, com a finalidade de se adaptarem ao novo ambiente, além de serem privados de ração e água 60 minutos antes dos ensaios.

As bancadas e os aparelhos utilizados foram higienizados com álcool 70%, no entanto, durante os testes, foi utilizado etanol com baixa graduação (10%), a fim de minimizar odores que viessem interferir no comportamento dos animais.

Após todos os ensaios *in vivo*, os animais foram anestesiados com uma solução de xilasina (16 mg/kg – i.p.) e cetamina (100 mg/kg – i.p.) 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 pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UFPB sob certidão N° 0611/11 (ANEXO I).

4.5 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.

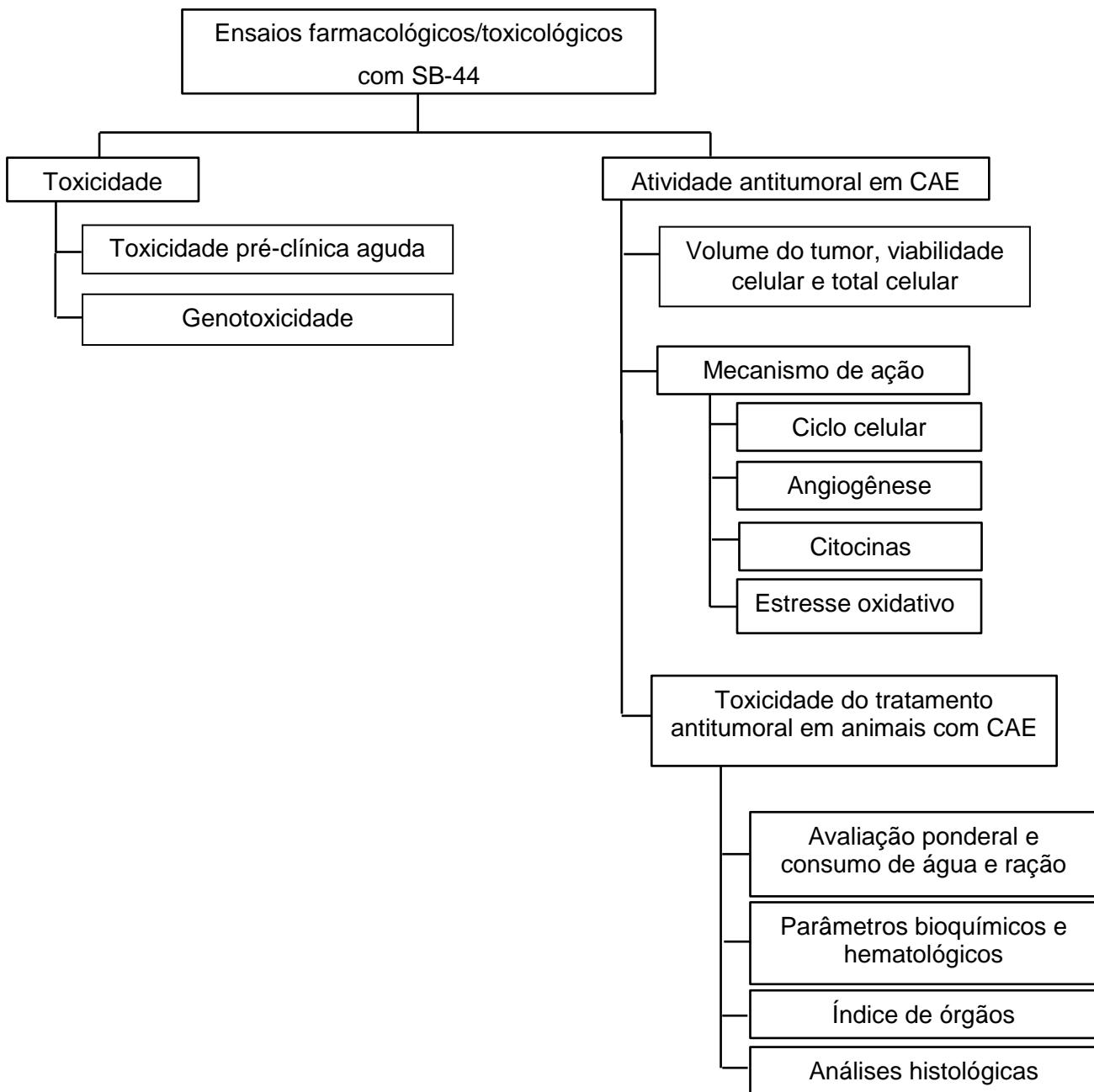
4.6 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: Centrífuga (HETTICH-Zentrifugen- Rotina 380 R); Microscópio invertido (Olympus); 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

Figura 6. Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral de SB-44 (1H-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4H-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina



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, incluindo o controle, foram submetidos a doses únicas de 2000 mg/kg de SB-44 por via intraperitoneal e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (solução a 5% de Tween 80 em salina). De acordo com o guia n. 423/2001 da OECD, após a realização do primeiro ensaio com a dose de 2000 mg/kg, e havendo morte de apenas um ou nenhum animal, realiza-se outro ensaio com a mesma dose. 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.

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, catatonia, 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 do SB-44 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 2000 mg/kg (i.p.) do SB-44. 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 submetidos a uma pequena incisão na cauda e obtenção de uma amostra de

sangue 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 ($0,5\text{ mL} - 4 \times 10^6$ células/mL) nos camundongos experimentais ($n=6$ fêmeas/grupo) (DOLAI et al., 2012). Vinte e quatro horas após o implante, SB-44 foi solubilizado em Tween 80 (5%) e administrado diariamente por via intraperitoneal (i.p.), nas doses de 25, 50 ou 100 mg/kg, por nove dias. O grupo controle foi tratado com uma solução de 5% de Tween 80 e um quinto grupo de animais foi tratado com 5-Fluorouracil (5-FU), 25 mg/kg, como droga padrão.

5.2.1 Volume do tumor, viabilidade e total celular

Para a avaliação do efeito antitumoral de SB-44, 24 horas após a última administração do tratamento descrito no item 4.2, os animais 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 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 $\times 10^6/\text{mL}$.

5.2.2 Investigação do mecanismo de ação antitumoral

Para investigação do mecanismo de ação antitumoral do SB-44 foi escolhida a dose de 100 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 descrito no item 5.2.1.

5.2.2.1 Análise do ciclo celular

Os animais transplantados com células de CAE foram tratados por nove dias com SB-44 conforme descrito no item 4.2. Um dia após a última administração, os animais dos grupos controle, SB-44 (100 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. As células coletadas da cavidade peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos foram ressuspensas em solução de NaCl 0,9% (p/v) a fim de se obter uma concentração final de 1×10^6 células/mL. Para a análise do ciclo celular, as suspensões celulares foram centrifugadas a 3000 rpm, por cinco minutos, o sobrenadante foi desprezado e a suspensão foi homogeneizada. Foram adicionados 300 µL da solução fluorocrômica hipotônica (HFS) [citrato de sódio 0,1% (p/v) e Triton X-100; 0,1% (p/v)], 50 µg/mL de Iodeto de Propídeo (PI) e completou-se com água ultrapura até chegar ao volume de 50 mL. Em seguida, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FacsCanto II, BD, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Os dados foram obtidos com o programa *Flowing Software* 2.5.1 e tratados no programa *GraphPad Prism* 5.0 (POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004).

5.2.2.2 Avaliação do efeito antiangiogênico

Os animais transplantados com células de CAE foram tratados por nove dias com SB-44 conforme descrito no item 4.2. No dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle, SB-44 (100 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 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).

5.2.2.3 Quantificação das citocinas IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, CCL2, TNF- α e IFN- γ no lavado peritoneal

Para a quantificação de citocinas, os animais foram divididos em grupos ($n=6$ /grupo) para implante das células de CAE, e tratados conforme descrito no item 4.2. No dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle, SB-44 (100 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 ascítico coletado da cavidade peritoneal dos animais foi centrifugado a 1200 rpm, por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e armazenado a – 20 °C para posterior dosagem das citocinas, por meio de ELISA, de acordo com o protocolo especificado no *Kit* do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

Brevemente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-IL-1 β , anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IL-12, anti-CCL2, anti-TNF- α e anti-IFN- γ , solubilizados em tampão fosfato, e incubadas *overnight* a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de soro fetal bovino), por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e foram adicionadas tanto as amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações das citocinas recombinantes IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-12, CCL2, TNF- α e

IFN- γ para a obtenção da curva. As placas foram novamente incubadas *overnight* a 4 °C. Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas e o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotinilado foi adicionado às placas que foram incubadas por uma hora. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e então foi adicionado o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP). As placas foram incubadas por mais meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1N e a leitura realizada em leitor de placa a 450 nm. A quantidade de citocinas foi calculada a partir das curvas-padrão.

5.2.2.4 Investigaçāo do estresse oxidativo

5.2.2.4.1 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 nove dias com SB-44 conforme descrito no item 4.2. No dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle, SB-44 (100 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 lavado com PBS a 1000 r.p.m., 4 °C, durante 5 minutos. Após três repetições desse processo, $2,0 \times 10^5$ células de CAE, 200 µL de solução de DCFH-DA (0,3 mM) e PBS q.s.p. 1mL foram encubados em estufa de CO₂ durante 30 minutos a 37 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (3000 r.p.m., 4 °C, durante 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 µL de PBS para leitura 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.

5.2.2.4.2 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 nove dias com SB-44 conforme descrito no item 4.2. No dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle, SB-44 (100 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 dez minutos. Para 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 560nm. 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 µmolar.

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

5.2.3.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos pelo tratamento com SB-44, os animais dos grupos controle, SB-44 (100 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg), descritos no item 4.2, foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados os consumos de água e de ração.

5.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

Os animais transplantados com CAE foram tratados por nove dias com SB-44 conforme descrito no item 4.2. No dia seguinte após a última administração, após jejum de quatro horas, os animais dos grupos controle, SB-44 (100 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).

5.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Após a coleta de sangue descrita no item 4.2.3.2, 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).

5.2.3.4 Análises histológicas

Após a pesagem dos órgãos, descrita no item 4.2.3.3, fígado e rins dos animais dos grupos controle, SB-44 (100 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram

seccionados, fixados em formalina (solução de formol a 10%) tamponada e após 24 horas foram resseccionados para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xanol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais. Em micrótomo rotativo semi-automático, os fragmentos tissulares emblocados em parafina, foram seccionados em espessura de 3,0 µm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson, este último destinado ao estudo do tecido hepático. Em seguida foram examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As análises histológicas foram realizadas com a colaboração da Profa. Dra. Giciane Carvalho Vieira do Departamento de Morfologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

5.3 Análise estatística

Os resultados obtidos nos estudos *in vivo* foram expressos em média ± 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 SB-44 não provocou mortes na dose de 2000 mg/kg (i.p.). Seguindo o guia da OECD 423/2001, repetiu-se o ensaio com a mesma dose e o mesmo número de animais, e, novamente, observou-se que não houve nenhuma morte (Tabela 1). O valor de DL50 foi estimado, segundo o guia OECD 423, em torno de 5000 mg/kg e SB-44 foi classificado na categoria 5 da *Globally Harmonized Classification System* (GHS).

Entre os efeitos comportamentais avaliados, foi evidenciado apenas ptose no primeiro experimento, que desapareceu após 4 horas do tratamento com SB-44.

Tabela 1. Efeitos da administração de doses únicas (2000 mg/kg, i.p.) de SB-44* em camundongos.

Grupo	M/T	Efeitos comportamentais
Controle	0/3	Nenhum
2000 mg/kg	Experimento 1	Ptose
	Experimento 2	Nenhum

M/T – Morte/Tratado

*SB-44: (*1H*-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4*H*-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina

6.1.2 Avaliação da genotoxicidade

Para avaliar o possível efeito genotóxico *in vivo* de SB-44 foi realizado o ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos, cujo resultado está apresentado na Tabela 2.

Como esperado, o tratamento com a ciclofosfamida induziu um aumento no número de eritrócitos micronucleados ($18,40 \pm 0,52$; $p<0,05$) em comparação com o controle ($6,00 \pm 0,57$).

O tratamento dos animais com a dose de 2000 mg/kg de SB-44 não induziu aumento no número de eritrócitos micronucleados ($5,16 \pm 0,47$) em sangue periférico, quando comparado ao grupo controle ($6,00 \pm 0,57$).

Tabela 2. Efeito da administração de dose única de SB44* (2000 mg/kg, i.p.) e ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p.) no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após 48 horas do tratamento.

Grupos	Dose (mg/kg)	Número de eritrócitos micronucleados
Controle	-	$6,00 \pm 0,57$
Ciclofosfamida	50	$18,40 \pm 0,52^a$
SB-44	2000	$5,16 \pm 0,47$

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais. ^a p<0,05 comparado ao grupo controle (5% Tween 80) analisado aos pares por Teste *t*-Student.

*SB-44: (1*H*-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4*H*-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina

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

6.2.1 Volume do tumor, viabilidade e total celular

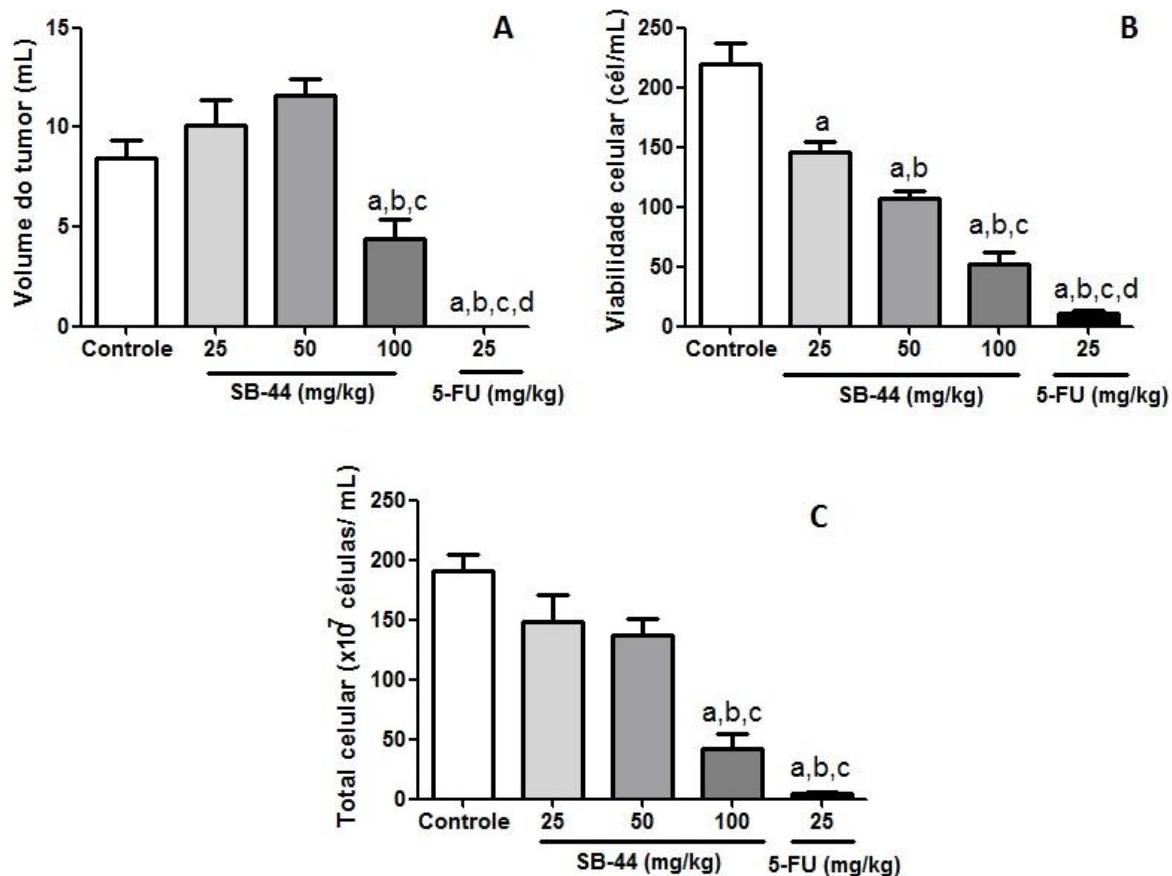
Uma redução significante foi observada no volume tumoral do grupo tratado com a dose de 100 mg/kg de SB-44 ($4,41 \pm 1,00$ mL; p<0,05) quando comparado ao grupo controle ($8,46 \pm 0,88$ mL). Já nas doses de 25 e 50 mg/kg, SB-44 não induziu alteração neste parâmetro (Gráfico 1A).

Em relação à viabilidade celular, observou-se que SB-44 induziu redução significativa, de maneira dose-dependente, nas doses de 25 mg/kg ($145,80 \pm 9,08 \times 10^6$ células/mL; p<0,05), 50 mg/kg ($106,6 \pm 7,07 \times 10^6$ células/mL; p<0,05) e 100 mg/kg ($52,41 \pm 10,13 \times 10^6$ células/mL; p<0,05), quando comparado ao grupo controle ($220 \pm 16,57 \times 10^6$ células/mL) (Gráfico 1B).

Para o parâmetro total celular, pode-se observar que SB-44 induziu redução significativa na dose de 100 mg/kg ($42,09 \pm 12,48 \times 10^7$ células; p<0,05), em comparação ao grupo controle ($190,4 \pm 13,98 \times 10^7$ células; p<0,05) (Gráfico 1C).

Os animais tratados com 5-FU apresentaram redução significante em todos os parâmetros avaliados (volume tumoral: $0,01 \pm 0,01$ mL; viabilidade celular: $10,33 \pm 3,07 \times 10^6$ células/mL; total celular: $5,20 \pm 1,21 \times 10^7$ células) (Gráfico 1).

Gráfico 1. Efeito do tratamento de nove dias (i.p) com SB44* (25; 50 ou 100 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.



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

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^ap < 0,05 comparado ao grupo controle; ^bp < 0,05 comparado ao grupo tratado com SB-44 (25 mg/kg); ^cp < 0,05 comparado ao grupo tratado com SB-44 (50 mg/kg); ^dp < 0,05 comparado ao grupo tratado com SB-44 (100 mg/kg)

* SB-44 (1*H*-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4*H*-ciclohepta[b]fiofen-2-il)-amina

** 5-FU – 5-fluorouracila

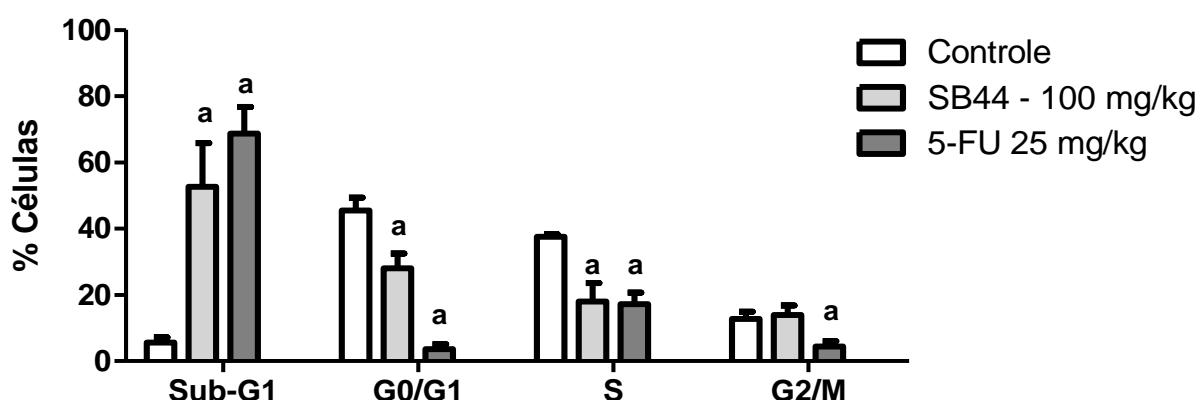
6.2.2 Investigação do mecanismo de ação antitumoral

6.2.2.1 Análise do ciclo celular

O tratamento de nove dias com SB-44 induziu alterações significativas na distribuição das células tumorais nas diferentes fases do ciclo celular (Gráfico 2). Após o tratamento com SB-44 (100 mg/kg), foi possível observar um aumento significativo no conteúdo de DNA sub-diploide, identificado no pico sub-G1 ($52,6 \pm 13,3\%$; $p<0,001$), em comparação ao controle ($5,6\% \pm 1,6$), acompanhado de uma redução no percentual de células na fase G0/G1 ($28,0\% \pm 4,5$; $p<0,05$) e na fase S ($18,0\% \pm 5,6$; $p<0,01$) em comparação ao controle ($45,5\% \pm 3,9$ e $37,5\% \pm 0,9$ respectivamente). Não foi observada alteração na fase G2/M do ciclo, nesta dose analisada.

O tratamento com a droga padrão 5-FU induziu aumento significativo do pico sug-G1 ($68,7\% \pm 8,0$; $p<0,001$), ao passo que reduziu a porcentagem de células nas fases G0/G1 ($2,3\% \pm 0,7$, $p<0,001$), S ($25,9\% \pm 7,1$ $p<0,01$) e G2/M ($2,8\% \pm 0,5$ $p<0,001$), em comparação com seus respectivos controles ($5,6\% \pm 1,6$; $45,5\% \pm 3,9$; $37,5\% \pm 0,9$ e $14,0\% \pm 1,8$, respectivamente).

Gráfico 2. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg) na distribuição de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas diferentes fases do ciclo celular.



LEGENDA: Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey.

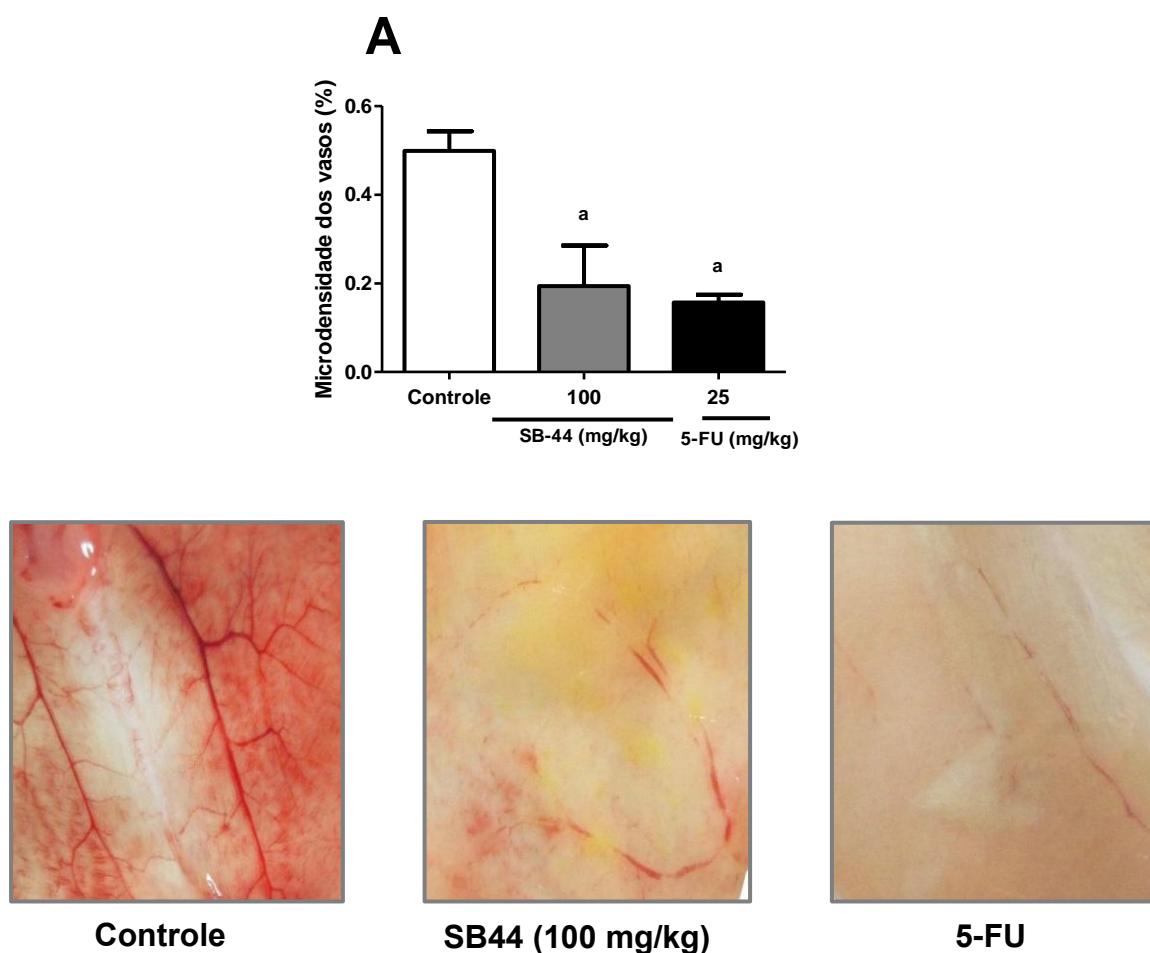
SB-44: 1*H*-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4*H*-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina

* $p<0,05$ comparado ao grupo controle.

6.2.2.2 Investigação do efeito antiangiogênico

Pode-se observar uma redução significativa na microdensidade dos vasos no grupo tratado com SB-44 ($0,2 \pm 0,1\%$; $p < 0,001$), assim como no grupo tratado com a droga padrão 5-FU ($0,15 \pm 0,01\%$; $p < 0,001$), quando comparados ao grupo controle ($0,50 \pm 0,04\%$) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Efeito do tratamento com SB-44* (100 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.



LEGENDA: A: Microdensidade dos vasos. Determinado pela área ocupada por vasos sanguíneos divididos pela área total selecionada. B: Imagens representativas de membrana peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos. Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. $^a p < 0,001$ comparado ao grupo controle.

* SB-44 (1H-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4H-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina

** 5-FU – 5-fluorouracila

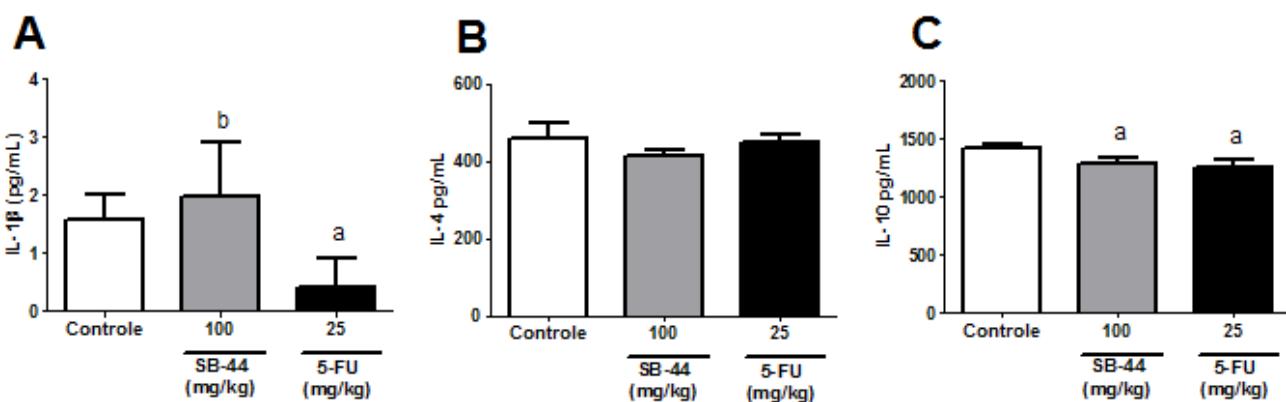
6.2.2.3 Quantificação das citocinas IL-1, IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ , CCL-2

SB-44 (100 mg/kg) não induziu alteração nos níveis das citocinas IL-1 β , IL-4, TNF- α , nem na quimiocina avaliada CCL-2 no lavado peritoneal dos animais experimentais, quando comparados aos seus respectivos controles.

Pode-se observar que SB-44 induziu uma redução da IL-10 ($1282 \pm 23,8$ pg/mL; $p < 0,05$) e IFN- γ ($3334 \pm 28,8$ pg/mL; $p < 0,05$); $p < 0,05$ quando comparado aos seus respectivos controles ($1421 \pm 43,5$ pg/mL; $3639 \pm 31,0$ pg/mL) (Gráfico 4 C e D).

Nos animais tratados com o 5-FU foi detectado redução de IFN- γ ($3474 \pm 21,5$ pg/mL; $p < 0,05$), TNF- α ($6,6 \pm 0,58$ pg/mL; $p < 0,05$), IL-10 ($1211 \pm 45,4$ pg/mL; $p < 0,05$) e da quimiocina CCL2 ($15,8 \pm 2,8$ pg/mL, $p < 0,05$), em comparação com os respectivos controles (IFN- γ : $3636 \pm 25,54$ pg/mL; TNF- α : $25,5 \pm 2,5$ pg/mL; IL-10: $1421 \pm 43,5$ pg/mL; CCL2: $2520 \pm 580,6$ pg/mL) (Gráfico 4).

Gráfico 4. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg) na concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.

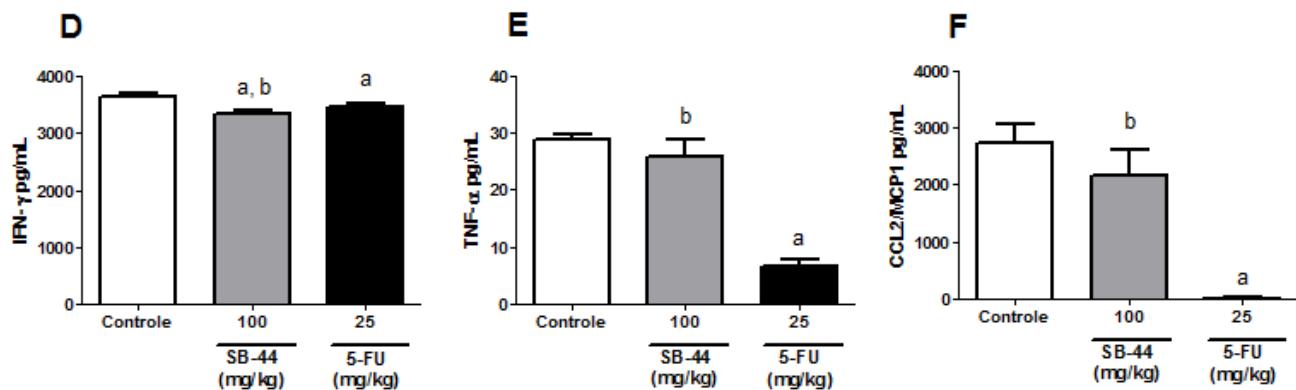


LEGENDA: A: IL-1. B: IL-4. C: IL-10. Dados analisados ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU.

* SB-44 (1H-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4H-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina

** 5-FU – 5-fluorouracila

Gráfico 4. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg) na concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich (**continuação**).



LEGENDA: D: IFN- γ . E: TNF- α . F: CCL2/ MCP1. Dados analisados ANOVA seguido de Tukey. ^ap < 0,05 comparado ao grupo controle. ^bp<0,05 comparado ao grupo 5-FU.

* SB-44 (1H-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4H-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina

** 5-FU – 5-fluorouracila

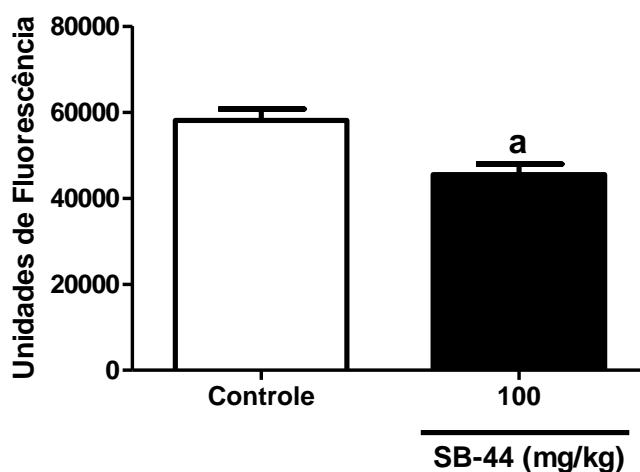
6.2.2.4 Investigação do estresse oxidativo

6.2.2.4.1 Ensaio do DCFH

O gráfico 5 representa o efeito do tratamento de nove dias com SB-44 (100 mg/kg, i.p.) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em modelo de tumor ascítico de Ehrlich.

SB-44 reduziu a produção de ROS (45520 ± 2435 unidades de fluorescência; p<0,05), em relação ao grupo controle (58090 ± 2654 unidades de fluorescência).

Gráfico 5. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 mg/kg, i.p.) na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em modelo de tumor de Ehrlich.



LEGENDA: Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado por *t* student. ^ap < 0,05 comparado ao grupo controle.

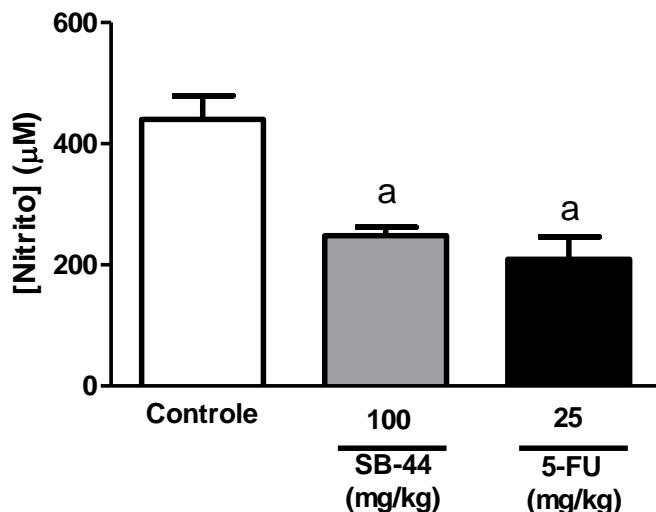
*SB-44: 1*H*-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4*H*-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina

6.2.2.4.2 Quantificação dos níveis de nitrito

Foi observando um aumento na concentração de nitrito nos animais controle ($440,4 \pm 38,66 \mu\text{M}$; $p<0,05$) quando comparada com os animais sadios ($66,73 \pm 7,64 \mu\text{M}$).

Os tratamentos com 100 mg/kg de SB-44 ($248,00 \pm 14,32 \mu\text{M}$; $p<0,05$) ou 25 mg/kg de 5-FU ($209,1 \pm 37,05 \mu\text{M}$; $p<0,05$) reduziram significativamente a concentração de nitrito quando comparados ao grupo controle ($440,4 \pm 38,66 \mu\text{M}$; $p<0,05$) (Gráfico 6).

Gráfico 6. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 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 de Ehrlich.



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

* SB-44 (1*H*-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4*H*-ciclohepta[b]fiofen-2-il)-amina

** 5-FU – 5-fluorouracila

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

6.2.3.1 Avaliação ponderal e consumo de água e ração

Na tabela 3 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração, bem como a evolução ponderal dos animais.

De acordo com os resultados obtidos, não foram observadas alterações significativas do consumo de água por parte dos animais tratados com SB44 (100 mg/kg). Também não houve diferença significativa com relação ao consumo de água no grupo tratado com o 5-FU. Todavia, o consumo de ração foi significativamente reduzido no grupo tratado com SB-44 ($19,3 \pm 2,6$ g; $p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle ($30,5 \pm 2,1$) e com 5-FU ($35,9 \pm 2,4$). Foi observado também

aumentado do consumo no grupo tratado com 5-FU ($35,9 \pm 2,4$ g; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($30,5 \pm 2,1$).

Em relação ao peso corporal, ao serem avaliados os animais após a retirada/drenagem do volume de tumor ascítico residual, foi observado que, SB-44 reduziu o peso final ($23,2 \pm 0,4$; $p < 0,05$), assim como o grupo tratado com 5-FU ($26,6 \pm 0,8$).

Tabela 3. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 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 ração (g)	Consumo de água (mL)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	-	$30,5 \pm 2,1$	$38,6 \pm 3,4$	$31,9 \pm 0,5$	$31,5 \pm 1,2$
5-FU *	25	$35,9 \pm 2,4^a$	$38,4 \pm 2,3$	$32,0 \pm 0,6$	$26,6 \pm 0,8^a$
SB-44**	100	$19,3 \pm 2,6^{a,b}$	$39,3 \pm 3,7$	$32,9 \pm 0,5$	$23,2 \pm 0,4^{a,b}$

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.

^b $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU

* 5-FU – 5-fluorouracila

** SB-44 (1*H*-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4*H*-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina

6.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

A análise toxicológica dos efeitos de SB-44 incluiu também a avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos.

Não se observou diferença em nenhum dos parâmetros avaliados (AST, ALT, ureia e creatinina) após tratamento com SB-44 (100 mg/kg) ou 5-FU (25 mg/kg), como pode-se observar na tabela 4.

Tabela 4. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 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)
Parâmetros normais*	-	70 – 400	25 – 100	15 – 40	0,2 – 0,6
Controle	-	96,4 ± 6,7	25,3 ± 3,8	40,4 ± 2,7	0,2 ± 0,01
5- FU**	25	155,2 ± 20,8	22,3 ± 4,5	37,8 ± 1,7	0,3 ± 0,01
SB-44***	100	107,3 ± 0,6	21,5 ± 4,2	44,9 ± 6,5	0,3 ± 0,01

Dados apresentados como média ± erro padrão da média

*Parâmetros bioquímicos normais segundo GAD (2007).

** 5-FU – 5-fluorouracila

*** SB-44 (1*H*-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4*H*-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina

No que diz respeito à avaliação dos parâmetros hematológicos e hematimétricos foi observado que nos grupos controle (11,2 ± 0,4 g/dL; p<0,05), 5-FU (11,5 ± 0,4 g/dL; p<0,05), e SB-44 (11,4 ± 0,4 g/dL; p<0,05), houve uma redução significativa da hemoglobina em relação ao grupo sadio (13,2 ± 0,3 g/dL). Especificamente para o grupo controle, foi observado ainda uma redução de HCM (10,3 ± 1,0 pg; p<0,05), em relação ao grupo sadio (14,1 ± 0,6) (Tabela 5).

Pode-se observar um aumento do HCM no grupo tratado com SB-44 (14,5 ± 0,7 pg; p<0,05) quando comparado ao grupo controle (10,3 ± 1,0 pg), assim como uma redução significativa de linfócitos (40,6 ± 3,8%; p<0,05), quando comparado com o controle (77,0 ± 3,4%). Ainda para o SB-44, é possível observar um aumento significativo dos segmentados (57,0 ± 3,3%; p<0,05), em comparação ao grupo controle (15,2 ± 3,2) e ao grupo sadio (20,5 ± 4,0) (Tabela 5).

Nos animais tratados com a droga padrão 5-FU, em relação ao hemograma, observou-se redução do hematocrito (29,7 ± 2,0%; p<0,05) e VCM (44,0 ± 1,2 fm³; p<0,05), em comparação aos seus controles (40,8 ± 2,3%; 52,3 ± 2,2 fm³, respectivamente), bem como em relação ao grupo sadio (45,5 ± 2,1%; 52,5 ± 0,6 fm³, respectivamente), além de redução das hemácias (6,8 ± 0,5 10⁶/mm³; p<0,05),

quando comparado ao valor do grupo sadio ($9,0 \pm 0,2 \text{ } 10^6/\text{mm}^3$), e aumento do HCM ($17,4 \pm 1,6 \text{ pg}$; $p<0,05$), em comparação ao grupo controle ($10,3 \pm 1,0 \text{ pg}$) (Tabela 5).

Em relação ao leucograma, é possível observar que 5-FU induziu redução de leucócitos totais ($5,8 \pm 1,6 \text{ } 10^3/\text{mm}^3$; $p<0,05$) e de segmentados ($5,8 \pm 0,5\%$; $p<0,05$), quando comparados aos valores dos grupos controle e sadio, respectivamente ($10,3 \pm 1,0 \text{ } 10^3/\text{mm}^3$ e $20,5 \pm 4,0\%$), além de aumento no percentual de linfócitos ($92,3 \pm 0,6\%$; $p<0,05$), em comparação aos grupos controle e sadio ($77,0 \pm 3,4\%$; $76,5 \pm 4,2\%$, respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito do tratamento de nove dias com SB44** (100 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	Parâmetros normais *	Sadio	Controle	5-FU** 25 mg/kg	SB-44*** 100 mg/kg
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	9,0 – 11,5	9,0 ± 0,2	7,9 ± 0,4	6,8 ± 0,5 ^a	8,0 ± 0,5
Hemoglobina (g/dL)	14,5 – 17,5	13,2 ± 0,3	11,2 ± 0,4 ^a	11,5 ± 0,4 ^a	11,4 ± 0,4 ^a
Hematórito (%)	45,0 – 57,0	45,5 ± 2,1	40,8 ± 2,3	29,7 ± 2,0 ^{a,b}	39,8 ± 1,8 ^c
VCM (fm ³)	45,0 – 55,0	52,5 ± 0,6	52,3 ± 2,2	44,0 ± 1,2 ^{a,b}	48,4 ± 1,3
HCM (pg)	13,0 – 16,0	14,1 ± 0,6	10,3 ± 1,0 ^a	17,4 ± 1,6 ^b	14,5 ± 0,7 ^b
CHCM (g/dL)	29,0 – 34,0	27,8 ± 0,5	27,7 ± 1,0	39,1 ± 2,5	30,1 ± 1,0
Leucócitos totais (10 ³ /mm ³)	1,0 – 12,0	9,65 ± 0,6	10,3 ± 1,0	5,8 ± 1,6 ^b	13,1 ± 1,0 ^c
Linfócitos (%)	60 – 90	76,5 ± 4,2	77,0 ± 3,4	92,3 ± 0,6 ^{a,b}	40,6 ± 3,8 ^{a,b,c}
Segmentados (%)	10 – 40	20,5 ± 4,0	15,2 ± 3,2	5,8 ± 0,5 ^a	57,0 ± 3,3 ^{a,b,c}
Monócitos (%)	0 – 6	2,2 ± 0,6	2,2 ± 0,6	1,6 ± 0,5	2,0 ± 0,5
Eosinófilos (%)	0 – 5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0

Dados apresentados como média ± desvio padrão.

^ap < 0,05 dados analisados em comparação com grupo sadio por ANOVA seguido de Tukey.

^bp < 0,05 dados analisados em comparação com grupo controle por ANOVA seguido de Tukey.

^cp < 0,05 dados analisados em comparação com grupo 5-FU por ANOVA seguido de Tukey

*Parâmetros bioquímicos normais segundo GAD (2007)

** SB-44 (1*H*-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4*H*-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina

*** 5-FU – 5-fluorouracila

6.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos

O tratamento com SB-44 não induziu alterações significativas nos índices de coração, timo e rins. Foi observado um aumento significativo do índice de baço ($7,9 \pm 0,7$ mg/g; $p<0,05$) e fígado ($94,2 \pm 7,8$ mg/g; $p<0,05$) no grupo tratado com SB-44, comparado aos respectivos grupos controles ($4,8 \pm 0,7$ mg/g; $67,2 \pm 4,3$ mg/g) e ao 5-FU ($5,0 \pm 0,4$ mg/g; $55,4 \pm 2,4$ mg/g) (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 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.

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	-	$4,0 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,7$	$67,2 \pm 4,3$	$11,0 \pm 0,4$
5-FU *	25	$4,0 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,4$	$55,4 \pm 2,4$	$11,8 \pm 1,0$
SB-44**	100	$3,4 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,5$	$7,9 \pm 0,7^{a,b}$	$94,2 \pm 7,8^{a,b}$	$11,7 \pm 0,5$

Dados apresentados como média \pm desvio padrão.

^a $p < 0,05$ dados analisados em comparação com grupo controle por ANOVA seguido de Tukey.

^b $p < 0,05$ dados analisados em comparação com grupo 5-FU por ANOVA seguido de Tukey.

* SB-44 (1*H*-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4*H*-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina

**5-FU – 5-fluorouracila

6.2.3.4 Análises histológicas

Os cortes histológicos dos rins dos grupos controle transplantado, ou tratados com 5-FU (25 mg/kg) ou SB-44 (100 mg/kg) apresentaram-se dentro dos limites de normalidade histológica. Os lobos renais do grupo controle apresentavam-se bem definidos com glomérulos renais e labirinto cortical preservados (Figura 6A). Na região medular, as alças de Henle, os ductos coletores, túbulos coletores e vasos retos estavam conservados (Figura 6B). As artérias e veias interlobares apresentavam-se regularmente distribuídas.

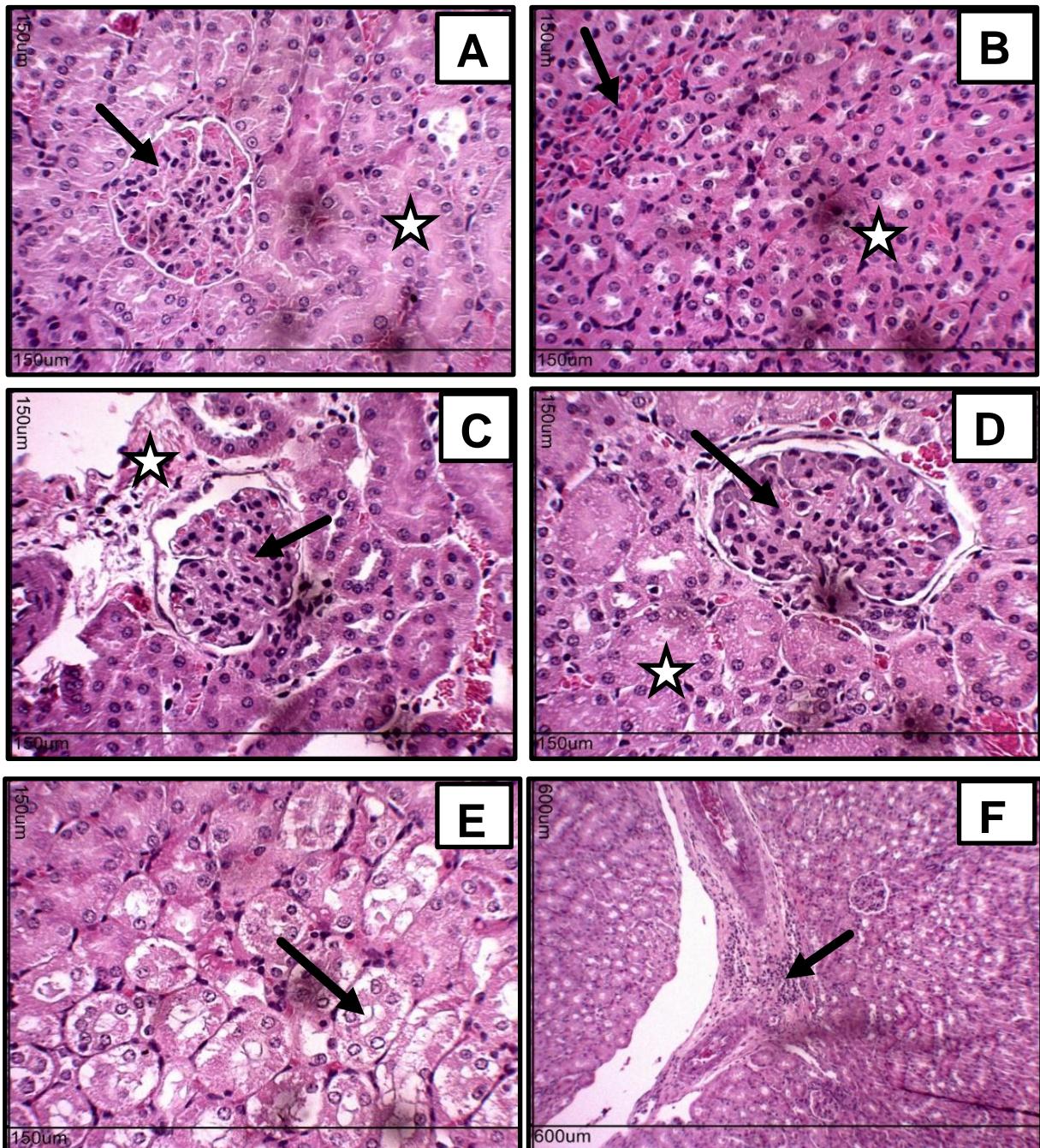
O grupo 5-FU apresentou a região cortical conservada com parênquima glomerular preservado e estroma desorganizado (Figura 6C), e região medular preservada.

No grupo SB-44, os lóbulos estavam conservados com corpúsculos renais (corpúsculo de Malpighi) preservados, envolvidos por fina cápsula de Bowmann (folheto visceral e folheto parietal) e glomérulos sustentados por delicado mesângio (Figura 6D). O labirinto cortical, os túbulos contorcidos proximais e distais (Figura 6E), alça de Henle, ductos e túbulos coletores estavam revestidos por epitélio com altura variável, de colunar a pavimentoso, típico do tecido renal, apresentando destruição celular em algumas regiões (Figura 6E). A região cortical apresentou infiltrado celular na região perivascular (Figura 6F).

Ao exame microscópico, os fígados dos animais do grupo controle apresentaram arquitetura do tipo lobular preservada, espaços portais regularmente distribuídos comportando tríades hepáticas (ducto biliar, ramos da veia porta e ramo da artéria hepática) e hepatócitos organizados em placas (Figura 7A). O espaço de Möll - entre a tríade hepática – apresentou infiltrado celular (Figura 7B). O infiltrado celular diminuiu no grupo tratado com 5-FU (C e D). O grupo tratado com SB-44 apresentou diminuição do infiltrado celular no espaço porta e congestão nos ramos da veia porta (Figura 7E e F).

No grupo tratado com SB-44 foi observado proliferação hepatocelular devido a observação de células em mitose, alteração no tamanho do núcleo das células além de alteração na afinidade ao corante promovendo alteração na coloração do citoplasma e do núcleo dos hepatócitos (Figuras 8A e B). Abaixo da cápsula de Glisson (cápsula hepática) foi observado presença de grande quantidade de células (Figura 8C) de características mononucleares e células em apoptose (Figura 8D). Na região em torno da veia centrolobular, as placas de hepatócitos se apresentaram desorganizadas (Figura 8E) e com formação de corpos apoptóticos, destruição de hepatócitos e diminuição dos sinusóides hepáticos (Figura 8F).

Figura 7. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) na histologia dos rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.

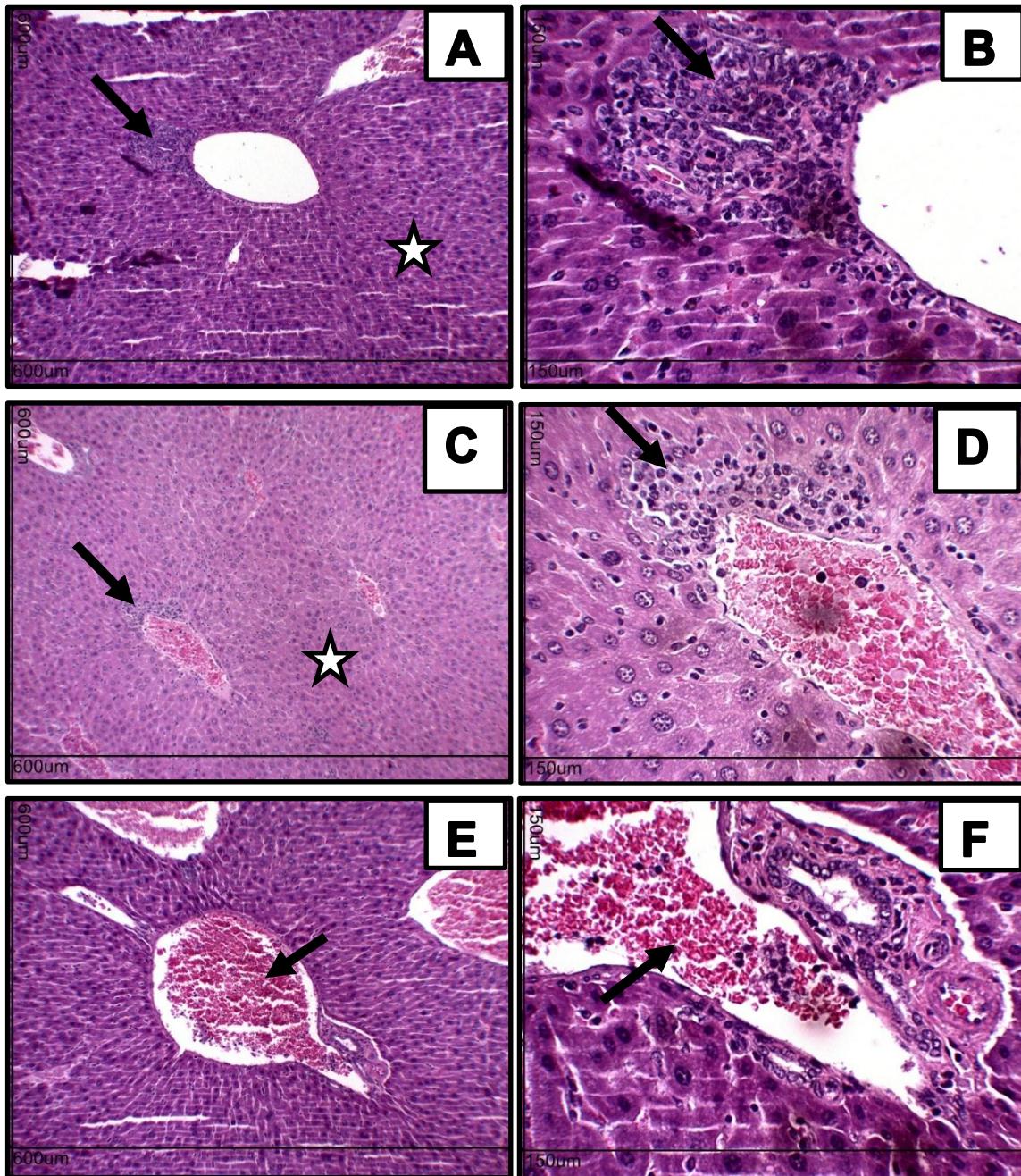


LEGENDA: Controle, 5-FU 25 mg/kg e SB-44. **(A)** Controle transplantado, região cortical, glomérulo renal (seta) e labirinto cortical (estrela). **(B)** Controle transplantado, região medular, túbulos coletores (estrela), alça de Henle e vasos retos (seta). **(C)** Grupo 5-FU, região cortical, glomérulo renal (seta) e estroma renal (estrela). **(D)** Grupo SB-44, região cortical, glomérulo renal (seta) e labirinto cortical (estrela). **(E)** Grupo SB-44, região medula, túbulos coletores, demonstrando destruição (seta). **(F)**

Grupo SB-44, região cortical, infiltrado celular na região perivasicular (seta). **A, B, C, D e E** – HE, A.T. x400. **F** – HE, A.T. x100.

* SB-44 (1*H*-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4*H*-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina; **5-FU – 5-fluorouracila

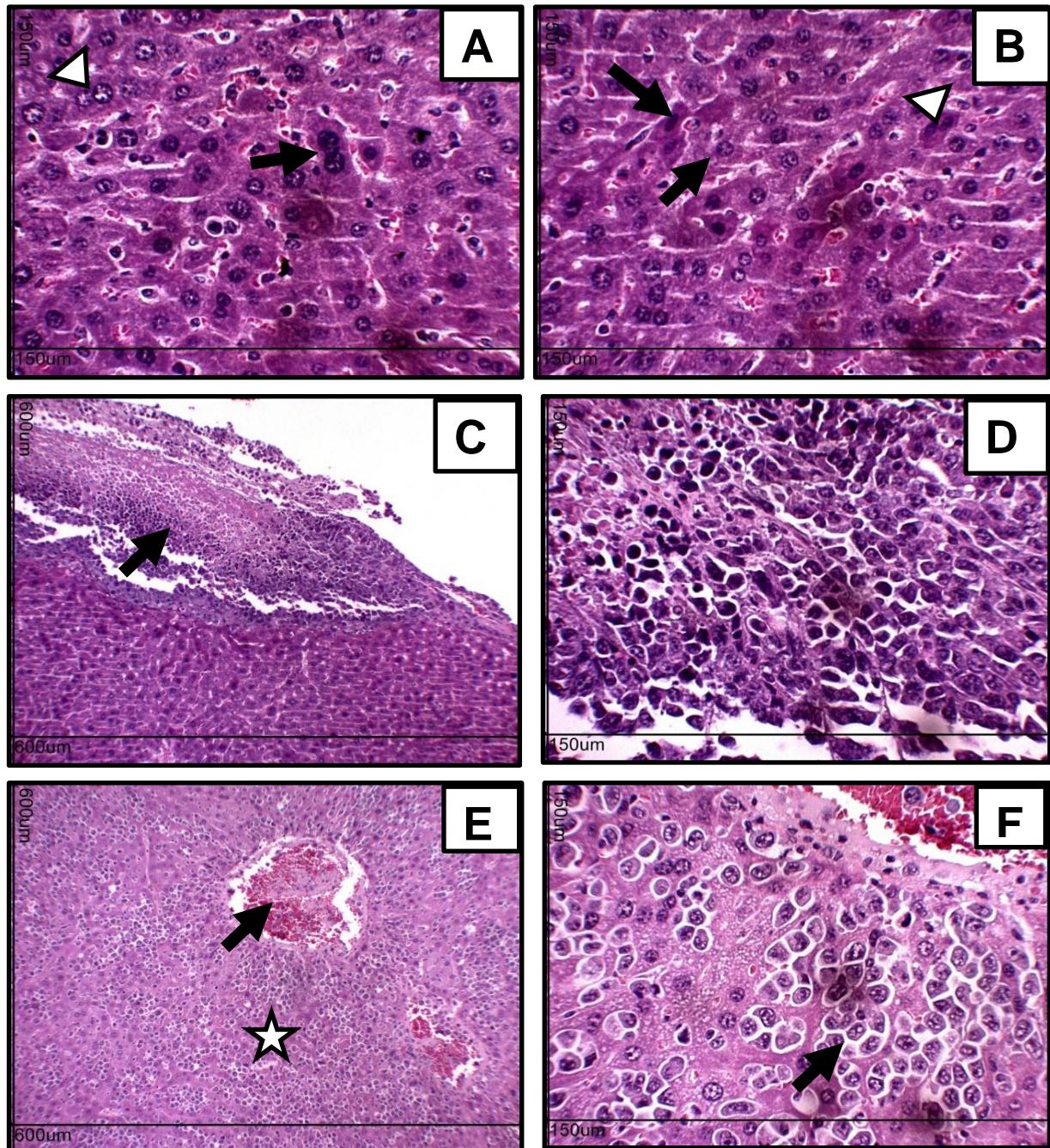
Figura 7. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) na histologia dos fígados de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.



LEGENDA: Controle, 5-FU 25 mg/kg e SB-44. Grupo controle: **(A)** tríade hepática, infiltrado celular (seta), placas de hepatócitos (estrela), **(B)** tríade hepática, infiltrado celular (seta); 5-FU: **(C)** tríade hepática, infiltrado celular (seta) e placas de hepatócitos (estrela), **(D)** infiltrado celular (seta); SB-44: **(E)** espaço porta, ramo da veia porta (seta), **(F)** tríade hepática, ramo da veia porta (seta). **A, C e E** – HE, A.T. x100. **B, D e F** – HE, A.T. x400.

* SB-44 (1*H*-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4*H*-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina; **5-FU – 5-fluorouracila

Figura 8. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) na histologia dos fígados de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.

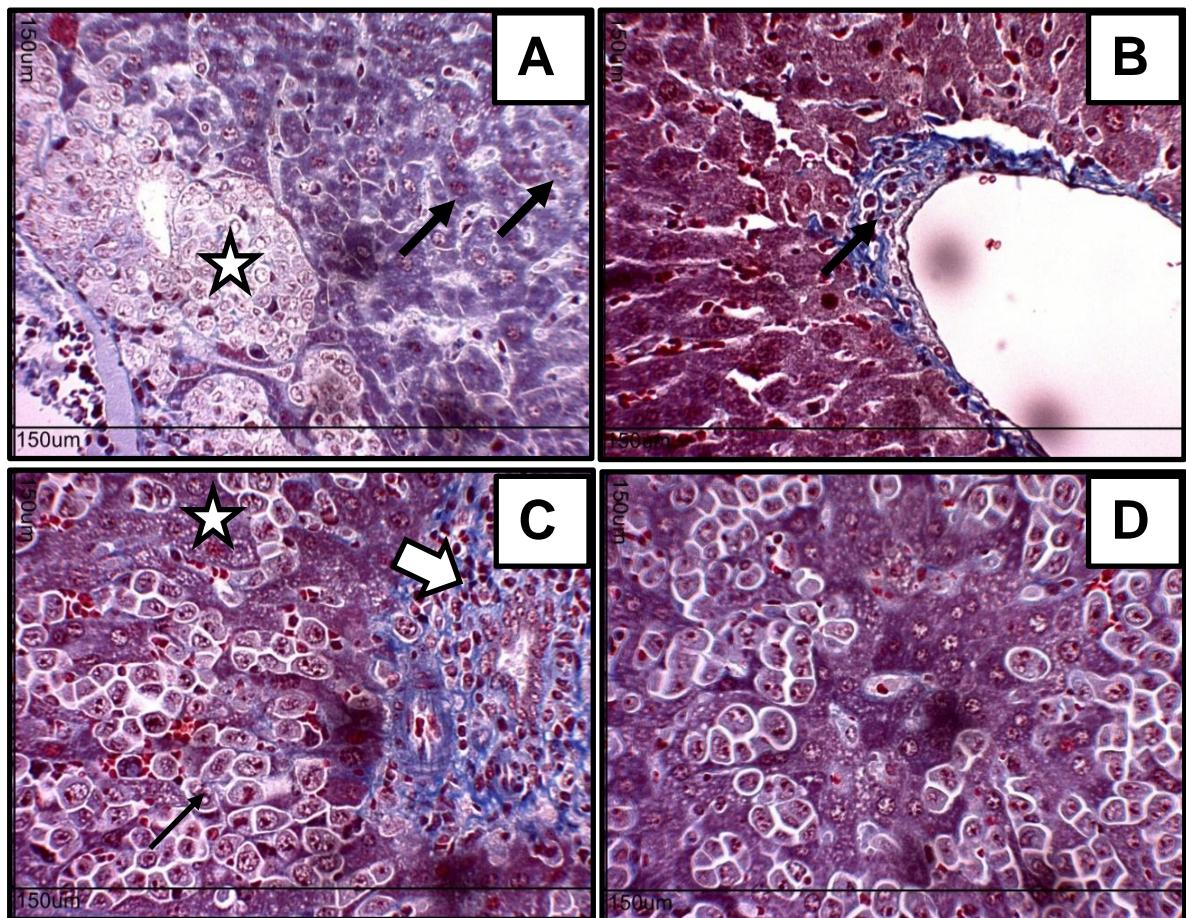


LEGENDA: (A) placa de hepatócitos, hepatócitos em divisão mitótica (seta), diferença no tamanho dos núcleos dos hepatócitos (ponta de seta); (B) placa de hepatócitos, mudança na cor do citoplasma dos hepatócitos (seta) e divisão celular (ponta celular); (C) região subcapsular, infiltrado celular (seta); (D) infiltrado celular, macrófagos e hepatócitos em apoptose; (E) veia centrolobular (seta) placa de hepatócitos destruídas (estrela); (F) corpos apoptóticos (seta). **A, B, D e F – HE, A.T. x400. C e E – HE, A.T. x100.**

* SB-44 (*1H*-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4*H*-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina; **5-FU – 5-fluorouracila

As alterações observadas no grupo tratado com SB-44 foram enfatizadas pela coloração de Tricrômio de Masson. Alterações no tamanho do núcleo dos hepatócitos e na afinidade ao corante foi observada pela variação na coloração do citoplasma e do núcleo das células (Figura 9A). Além disso, foi observado infiltrado celular perivasicular (Figura 9B), grande número de hepatócitos em apoptose formando corpos apoptóticos e infiltrado celular em torno de ductos biliares (Figura 9C), assim como destruição da organização lobular, diminuição dos sinusoides hepáticos, esteatose e apoptose hepática (Figura 9D).

Figura 9. Efeito do tratamento de nove dias com SB44* (100 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) na histologia dos fígados de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.



LEGENDA: **(A)** corpos apoptóticos (estrela), hepatócitos com coloração citoplasmática e tamanhos nucleares diferentes (seta); **(B)** infiltrado celular (seta); **(C)** hepatócitos em apoptose (seta), destruição hepatocitária (estrela) e infiltrado celular (seta grossa); **(D)** destruição das placas de hepatócitos. **A, B, C e D** – Tricrômio de Masson, A.T. x400.

* SB-44 (*1H*-Indol-3-ilmetileno)-(5-6,7,8-4*H*-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amina; **5-FU – 5-fluorouracila

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Grandes avanços no entendimento da biologia do câncer, bem como na farmacoterapia da doença foram obtidos nas últimas décadas. Apesar disso, muitos tipos de câncer permanecem sem tratamento adequado, considerando os aspectos efetividade, toxicidade, farmacocinética e resistência por parte das células tumorais. Assim, a pesquisa por novas drogas com potencial antitumoral continua crescendo no mundo inteiro (CALGAROTTO et al., 2012).

Nesse contexto, o SB-44 (2-[(1H-indol-3-il-metilideno)-amino]-5,6,7,8-tetrahidro 4Hciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila) é um derivado tiofênico que apesar de demonstrar propriedade antitumoral (OLIVEIRA, 2013), não existem relatos na literatura sobre os mecanismos de ação envolvidos nessa atividade farmacológica. Assim, este trabalho se propôs a investigar a toxicidade e a eficácia antitumoral deste composto em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich, bem como elucidar possíveis mecanismos de ação envolvidos nesse efeito, de modo a contribuir para os estudos de derivados tiofênicos potencialmente ativos para o tratamento do câncer.

O estudo com o derivado tiofênico SB-44 iniciou-se com o ensaio de toxicidade pré-clínica aguda em camundongos, objetivando determinar doses seguras a serem utilizadas nos ensaios farmacológicos, bem como investigar uma possível toxicidade do composto, uma vez que, estudos toxicológicos pré-clínicos são imprescindíveis para a seleção de candidatos a fármacos a serem avaliados na pesquisa clínica (IMINJAN et al., 2014).

Segundo o guia 423 da OECD, quando a literatura apresenta informações de baixa toxicidade de substâncias quimicamente semelhantes, sugerindo que estas não produzem mortes na mais alta dose a ser estudada, deve ser realizado o teste limite, utilizando a dose de 2000 mg/kg (OECD, 2001). Assim, considerando que um derivado 2-amino-cicloalquil[b]tiofeno-3-carbonitrila (SB-83), análogo do SB-44, não induziu mortes quando administrado, por via intraperitoneal, em doses únicas de 300 ou 2000 mg/kg em camundongos (DA FRANCA RODRIGUES; 2015), foi realizado o teste limite para a avaliação da toxicidade aguda do SB-44.

Nesse ensaio, além da estimativa da DL50 realizou-se uma triagem comportamental, que é um teste preliminar de fácil execução que possibilita

investigar de forma qualitativa algumas de suas ações sobre o Sistema Nervoso Central e Sistema Nervoso Autônomo (ALMEIDA et al., 1999; ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Considerando a DL50 em torno de 5000 mg/kg, a classificação na categoria 5 de acordo com o GHS, bem como o fato de que o único efeito observado, característico de depressão do SNC (ptose), desapareceu após 4 horas do tratamento, pode-se inferir que SB-44 possui baixa toxicidade pré-clínica aguda em camundongos, por via intraperitoneal.

Ainda, dados da literatura mostram que, em geral, se a DL50 de uma substância 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).

Outros estudos de toxicidade realizados com derivados tiofénicos demonstraram baixa toxicidade para essa classe. Mota (2012) avaliou a toxicidade aguda (i.p.) do derivado tiofênico 2-[(4-nitro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN10) e não ocorreu nenhuma morte nas doses testadas (250, 500 ou 1000 mg/Kg), sendo observadas somente algumas alterações comportamentais na maior dose, como diminuição da resposta ao toque e da força para agarrar. Penha (2014) avaliou a toxicidade aguda (i.p.) do derivado tiofênico 2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-benzotiofeno-3-carbonitrila (6CN) e os resultados também demonstraram se tratar de um composto de baixa toxicidade. Dessa maneira, os dados de baixa toxicidade obtidos para SB-44 corroboram dados da literatura que mostram baixa toxicidade pré-clínica aguda para os derivados tiofénicos.

Muitos antineoplásicos podem causar efeitos indesejáveis que incluem indução de genotoxicidade em células não tumorais (VIEIRA; PAULA; CHEN-CHEN, 2010; VIEIRA et al., 2010). Dentre os métodos disponíveis para a avaliação do potencial genotóxico de uma substância destaca-se o ensaio do micronúcleo, que detecta tanto clastogenicidade – quebra de cromossomos, quanto aneugenicidade – aneuploidia ou segregação cromossômica anormal devido a disfunções no aparato mitótico (HAYASHI et al., 2000; BONASSI; EL-ZEIN; BOLOGNESI, 2011). Assim, para avaliar a possível genotoxicidade *in vivo* do SB-44, foi realizado o ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos.

Considerando que SB-44 não induziu a formação de micronúcleos, pode-se sugerir que o mesmo não possui efeito genotóxico (clastogênico e/ou aneugênico) *in*

vivo, no modelo avaliado, característica importante na avaliação de sua aplicabilidade terapêutica.

O estudo da genotoxicidade de outros derivados aminotiofenos demonstrou que os compostos 3-amino-4-metiltiofeno-2-carboxilato e o 2-acetil-4-clorotiofeno não possuem efeito genotóxico, avaliado pelo ensaio do cometa, porém, no mesmo estudo foi observado que o composto 3-amino-4-metiltiofeno promoveu dano no DNA (LEPAILLEUR et al., 2014).

Após a verificação da baixa toxicidade do SB-44, o estudo prosseguiu com a avaliação da sua atividade antitumoral. Para isso, utilizou-se a linhagem de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE), um modelo tumoral que possui alto índice de invasividade, e tem sido utilizado no estudo dos efeitos de drogas sobre o crescimento, patogênese, imunologia e terapêutica de células tumorais. Uma de suas principais vantagens é o controle do número de células a serem inoculadas, de forma a padronizar os experimentos. Portanto, através de modelos como esse, os animais tratados podem ter a evolução tumoral analisada ao longo do tratamento com a substância candidata, além de terem suas características clínicas observadas, verificando a efetividade sistêmica da aplicação *in vivo* (SOLIMAN, 2015; COSTA; PEREIRA, 2016).

Como tratamento antitumoral padrão foi utilizado o 5-fluorouracil (5-FU), um dos fármacos mais prescritos no tratamento do câncer (GONZÁLEZ-VALLINAS, 2013). 5-FU é um antimetabólito que interfere na duplicação e transcrição do DNA. Embora o mecanismo de ação desse fármaco ainda não tenha sido completamente elucidado é provável que seja pela ligação do fluorodeoxiribonucleotídeo monofosfatado (FdUMP), um metabólito da droga, à timidilato sintetase, inativando-a, e, portanto, impedindo a síntese das timinas e consequentemente a síntese do DNA. Um segundo mecanismo é a incorporação de outro metabólito, o Furd, ao RNA mensageiro no momento de sua transcrição, no lugar da uracila, formando, assim, um falso RNA (COSTA, 2015; LENZ; STINTZING; LOUPAKIS, 2015). No presente estudo, 5-FU induziu potente atividade antitumoral por reduzir todos os parâmetros avaliados, o que justifica a escolha deste fármaco como fármaco padrão em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

Em relação ao tratamento com SB-44, pode-se observar que houve redução na viabilidade celular de forma dose-dependente. Apenas a maior dose (100 mg/kg) reduziu os parâmetros volume e total celular, o que sugere que SB-44

nas doses de 25 e 50 mg/kg não foi capaz de reverter a ascite peritoneal induzida pelo tumor. Nesse sentido, a dose de 100 mg/kg foi selecionada para o estudo do mecanismo de ação antitumoral e da toxicidade de SB-44.

A investigação do mecanismo de ação de SB-44 iniciou-se pela análise da distribuição das células de carcinoma de Ehrlich nas diferentes fases do ciclo celular, uma vez que, muitos antineoplásicos e novos candidatos a fármacos atuam interferindo nesse processo (XIAO et al., 2011). Por exemplo, podem ser citados o 5-FU, que atuam inibindo a síntese de DNA durante a replicação celular YASUI; TSURITA; IMAI, 2014).

O ensaio para análise do ciclo celular baseia-se na diferenciação de células nos diversos estágios do ciclo celular pela marcação do DNA com o iodeto de propídio (PI), um intercalante de DNA. As células na fase G0/G1 contêm duas cópias dos cromossomos, ou seja, apresentam ploidia típica ($2n$) de células que ainda não entraram em mitose. Já as células que entraram em processo de divisão celular e iniciaram a síntese de material genético na fase S, apresentam uma maior quantidade de DNA ($>2n$) e, consequentemente, uma maior intensidade de marcação. As células que já tiveram seu material genético duplicado ($4n$) e estão prestes a sofrer citocinese (fase G2/M), apresentam o dobro de fluorescência comparado a população G0/G1. As células situadas no pico hipodiplóide (sub-G1) possuem conteúdo de DNA menor que $2n$ e podem representar aumento na ocorrência de *debris* celulares ou DNA fragmentado, característico de apoptose (MONTEIRO, 2012; SHIRALI et al., 2014).

Sendo assim, o aparecimento do pico sub-G1 na análise do ciclo celular após tratamento com SB-44 sugere que a atividade antitumoral deste derivado tiofênico está associada a indução de apoptose. Todavia, métodos específicos utilizando marcadores do processo apoptótico devem ser utilizados para avaliar esse efeito.

Relatos da literatura descrevem que outros derivados tiofénicos, de forma semelhante ao SB-44, induzem o aparecimento do pico sub-G1 (LOU et al., 2011; AGUIAR et al., 2016). Além disso, diferentes derivados tiofénicos podem também atuar em outras fases, induzindo parada do ciclo nas fases G0/G1, S ou G2/M (AGUIAR et al., 2016), ou inibindo a polimerização da tubulina e, consequentemente, parando o ciclo celular na fase G2/M (ROMAGNOLI et al., 2007; 2014).

Além da desregulação do ciclo celular, sabe-se que a angiogênese é outra característica das células no câncer, a qual representa um evento importante para o

crescimento tumoral e metástase (RIBATTI et al., 2016). Considerando que SB-44 diminuiu significativamente a capacidade angiogênica do carcinoma ascítico de Ehrlich, pode-se inferir que o mecanismo de ação antitumoral deste derivado aminotiofênico envolve, pelo menos parcialmente, um efeito antiangiogênico. Esse é um importante efeito, uma vez que contribui terapeuticamente no combate a diferentes pontos chave do contexto tumoral, não apenas na citotoxicidade contra a célula tumoral em si.

Dados da literatura mostram que uma série de derivados tiofênicos 6,7-dimetoxi-quinazolin-4-il-amino-tiofeno-2-carboxamidas apresentam efeito antiangiogênico, via antagonismo do receptor de VEGF (VEGFR-1 e VEGFR-2). Outros análogos tiofênicos também exibiram potência de inibição de VEGFR-1 e VEGFR-2 (ASHOK et al., 2016).

Vários mediadores contribuem para a angiogênese durante o desenvolvimento tumoral, incluindo citocinas (TECCCHIO; CASSATELLA, 2013) quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) (LI et al., 2013) e o óxido nítrico (NO) (HALDER et al., 2016).

Além do envolvimento de citocinas com o processo de angiogênese, esses mediadores são considerados moléculas chave no câncer, pois modulam a resposta imune inata e adaptativa, e podem mediar a atividade antitumoral. Nesse contexto, fatores relacionados ao microambiente tumoral, incluindo a heterogeneidade da massa tumoral, o estresse metabólico e as moléculas de sinalização inflamatória, podem modular o papel do sistema imunológico no câncer. Assim, embora os efeitos da vigilância imunológica e o favorecimento de efeitos pró-tumorigênicos seja o resultado do *cross talk*, mediado por citocinas, entre células tumorais e infiltrado imune celular, estudos independentes também mostram seus efeitos supressores de tumor (YANG et al., 2016).

IL-10 é uma citocina imunomoduladora que é frequentemente superregulada em vários tipos de câncer, todavia, seu papel biológico no câncer é complexo. No entanto, sua presença em metástases avançadas e a correlação positiva entre níveis séricos de IL-10 e os níveis de progressão da doença indicam um papel crítico de IL-10 no microambiente tumoral em inibir apoptose e induzir proliferação e metástase (SATO et al., 2011; MANNINO et al., 2015).

Em relação ao IFN- γ , apesar da ampla evidência de seu papel na vigilância imunitária do tumor, estudos sugerem que ele pode também ter efeitos pró-

tumorigênicos sob determinadas circunstâncias, uma vez que as atividades pró e anti-tumorigênicas são dependentes da especificidade do tumor, das células, dos fatores microambientais, e/ou da intensidade de sinalização e contexto molecular (ZAIIDI; MERLINDO, 2011).

Portanto, no presente estudo, a redução das citocinas IL-10 e INF- γ induzida por SB-44 sugere que o potencial antitumoral desse derivado aminotiofeno pode envolver, de forma discreta, a modulação da resposta imune relacionada ao controle do tumor, considerando que SB-44 não foi capaz de modular várias citocinas e quimiocina, incluindo IL-1 β , IL-4, TNF- α e CCL-2.

Pouco se conhece sobre o envolvimento de citocinas no mecanismo de ação antitumoral de derivados aminotiofenos. Porém, algumas substâncias dessa classe, incluindo derivados 5-substituído-2,3-diariltiofenos podem induzir efeitos anti-inflamatórios por modular citocinas (TSUJI et al., 1998). Ainda, um estudo da atividade anti-leishmania de SB-44 mostrou que esse efeito farmacológico não está relacionado à imunomodulação (RODRIGUES et al., 2015).

No contexto do câncer, sabe-se que ROS estão envolvidas desde a fase de iniciação até a fase de progressão da doença. Nesse sentido, ROS atuam induzindo danos ao DNA, RNA, proteínas e lipídeos, estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, ativando vias de sinalização que estimulam a proliferação celular, angiogênese e metástase, além de inibir vias pró-apoptóticas (TAKASHIMA; FALLER, 2013).

Portanto, a avaliação da modulação do estresse oxidativo é essencial para a caracterização do efeito antitumoral de um candidato a fármaco. Aliado a isso, é bem descrito na literatura o potencial antioxidante de derivados tiofénicos (QUEIROZ et al., 2007; FADDA et al., 2012; MOHAN; SARAVANAN, 2012; GOUDA et al., 2013). Para o SB-44, a redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio observada em modelo de tumor de Ehrlich sugere que a redução do estresse oxidativo é, pelo menos parcialmente, parte do seu mecanismo de ação antitumoral.

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). Sabe-se que diferentes fatores, tais como, a sua concentração (HALDER et al., 2016), o microambiente e o ciclo celular no tumor (RIDNOUR et al.,

2008; HALDER et al., 2016), o estado redox (MOCELLIN; BRONTE; NITTI, 2007) e o tempo de exposição (VILLALOBO, 2007) interferem no seu efeito final no tecido tumoral.

Portanto, considerando que ROS e NO estão envolvidos na regulação de diferentes eventos relacionados ao câncer, incluindo a angiogênese, e tendo o SB-44 reduzido esses mediadores em modelo de tumor de Ehrlich, pode-se sugerir que os efeitos antiangiogênicos de SB-44 estão associados ao seu efeito antioxidante. Ainda, considerando que os antioxidantes protegem as células e órgãos contra danos causados pelas células tumorais por meio de mecanismos imunológicos, via genética molecular, e estimulação da diferenciação celular (KATAKWAR; NAIK; MITTAL, 2016), outras vias de sinalização moduladas por ROS e NO devem também ser investigadas para melhor caracterização dos efeitos do SB-44.

A atividade antioxidante dos tiofenos é bem estabelecida na literatura, vários trabalhos relatam os derivados tiofénicos com atividade antioxidante (MITRA; SAHA; ROY, 2010; HARINATH et al., 2013; RASOOL et al, 2016). Ainda, estudos realizados com derivados tiofénicos para avaliação de suas atividades antioxidante e antitumoral demonstram resultados promissores (ABU-HASHEM; EL-SHEHRY; BADRIA, 2010; FADDA et al., 2012; GOUDA et al., 2013).

Tendo em vista que a toxicidade de quimioterápicos é considerada o fator limitante na escolha da dose e do esquema terapêutico, o que se relaciona a sua baixa especificidade para o tumor e, consequentemente, alta toxicidade (PAVELIC, 2014), a utilização de ensaios de toxicidade que avaliem possíveis alterações da homeostasia do organismo exposto à quimioterapia é imprescindível.

Sendo assim, considerando o potencial antitumoral do SB-44 observado nos ensaios farmacológicos em modelo carcinoma ascítico de Ehrlich, na sequência, procedeu-se a investigação dos possíveis efeitos tóxicos do SB-44 no mesmo modelo experimental.

Para o parâmetro de consumo de água, de ração e evolução ponderal, foi observado apenas alteração no consumo de ração e evolução ponderal. Os camundongos tratados com SB-44 reduziram o consumo de ração que, como esperado, foi acompanhado de redução da evolução ponderal. Já os animais tratados com 5-FU aumentaram o consumo de ração e reduziram o peso. Parâmetros metabólicos, como o consumo de água e de alimentos, e a avaliação ponderal, devem ser analisados nos estudos pré-clínicos para investigação da

toxicidade de uma amostra em estudo sobre o sistema gastrintestinal. Esses dados remetem ao fato de que a lesão no TGI pode ocasionar uma redução da absorção de nutrientes e assim ocasiona a anorexia dos animais mesmo com o aumento do consumo de ração como uma tentativa para suprir as necessidades nutricionais (AKAH et al., 2010).

O fígado é o órgão de detoxificação dos mamíferos e os rins o órgão excretor mais importante, e ambos são susceptíveis aos antineoplásicos. Como exemplos, pode-se citar disfunções hepáticas induzidas por mitramicina e toxicidade renal causada por docetaxel (BEZERRA et al., 2008).

A avaliação da função renal pode ser realizada por meio da determinação das concentrações sanguíneas de ureia e creatinina. A ureia é um produto de degradação do metabolismo dos aminoácidos, constitui a forma como o organismo elimina o nitrogênio dessas moléculas, e sua eliminação se dá principalmente através dos rins. Já a creatinina, por sua vez, é um produto da degradação da creatina muscular. Essa substância não é utilizada pelo organismo, é totalmente inativa, sendo também excretada pelos rins. Quando ocorre falha renal, produtos de degradação do metabolismo, que seriam eliminados pelos rins, particularmente substâncias nitrogenadas como a ureia e a creatinina, se acumulam levando a um aumento dos seus níveis sanguíneos (HENRY, 2008).

Considerando que SB-44 não induziu alterações nos níveis plasmáticos de ureia e creatinina, pode-se inferir que este derivado tiofênico possui baixa toxicidade renal, resultado este que foi confirmado pela ausência de quaisquer alterações na avaliação histológica dos rins. Esse dado possui importante significado clínico, já que vários antineoplásicos são capazes de causar lesões nefrotóxicas, tais como metotrexato, docetaxel, cisplatina, dentre outros (BEZERRA, 2008; PFALLER; GSTRAUNTHALER, 1998).

Em relação à avaliação da função hepática, os principais indicadores de dano são as enzimas hepáticas identificadas no plasma ou no soro, sendo, portanto, utilizadas como indicativo de estado de normalidade ou de dano celular.

Apesar do tratamento com SB-44 não ter induzido alterações nas transaminases AST e ALT, foi observado aumento do índice do fígado, além de alterações hepáticas demonstradas na avaliação histológica deste órgão”, incluindo, proliferação hepatocelular, relacionado à presença de células em mitose, redução do sinusóide hepático, esteatose e células em apoptose, o que indica toxicidade

hepática para esse tiofeno. A ausência de alteração nas enzimas hepáticas mesmo na presença de dano histológico pode ser explicada considerando o fato de que alterações mais graves e persistentes no tecido hepático podem produzir pouco extravasamento hepatocelular, o que resulta em níveis plasmáticos normais ou diminuídos das enzimas AST e ALT (FRANCISCATO et al., 2006; MIAZZO et al., 2005).

Adicionalmente pode-se dizer que o fígado é um órgão com alta capacidade regenerativa e adaptativa e até mesmo quando áreas de necrose coagulativa do parênquima estão presentes, mas o tecido conjuntivo está preservado, a regeneração é completa (MEIRELES et al., 2016).

Diversos medicamentos disponíveis no mercado, e amplamente utilizados pela população, são capazes de causar algum grau de hepatotoxicidade, como é o caso do paracetamol, cetoconazol, isotretinoína, fenitoína, dentre outros (HAYASHI; FONTANA, 2014). Na verdade, muitas outras drogas também exercem toxicidade hepática direta a depender da dose, em particular alguns agentes antineoplásicos (ciclofosfamida, bussulfano e 5-FU), que quando administrados por via intravenosa em doses elevadas podem causar lesão hepatocelular aguda ou síndrome de obstrução sinusoidal. Uma análise atual descreve que outros antineoplásicos (azatioprina, clorambucil, temozolomida) amplamente utilizados na clínica causam lesões hepáticas em doses convencionais (BJÖRNSS; HOOFNAGLE, 2016).

Portanto, a hepatotoxicidade apresentada pelo SB-44 é comum a uma série de antineoplásicos atualmente usados na prática clínica, e, portanto, não descarta a continuidade dos estudos farmacológicos relacionados ao potencial antitumoral deste derivado tiofênico. O conhecimento dos danos hepáticos, ou de quaisquer outros efeitos indesejáveis que uma substância possa gerar, é importante na caracterização da sua potencial toxicidade clínica, o que contribui para o desenvolvimento de medidas profiláticas e de possíveis tratamentos relacionados à intoxicação (BITTENCOURT et al., 2011).

Diferentemente da maioria dos agentes antineoplásicos, SB-44 não provocou alterações na maioria dos parâmetros hematológicos dos animais tratados. A literatura descreve que a anemia é a mais comum alteração encontrada em pacientes com câncer (GASPAR et al, 2014). A supressão da hematopoiese, que inclui todos os elementos do sangue como leucócitos, plaquetas e hemácias é uma das consequências mais comuns da quimioterapia antineoplásica, e é um dos mais

incapacitantes efeitos colaterais no tratamento do câncer, o que limita o esquema terapêutico (MAGALHÃES et al., 2010). Pacientes portadores de doenças neoplásicas apresentam alta frequência de anormalidades das células sanguíneas relatadas na literatura como anemia e trombocitopenia. Essas alterações são responsáveis pela morbidade e mortalidade com impacto negativo sobre a progressão da doença e a terapia antineoplásica. Dados apresentados nesse estudo ratificam esse achado, uma vez que, em todos os grupos nos quais houve implante de células tumorais (controle, 5-FU e SB-44) foi observado diminuição da hemoglobina.

Os índices hematimétricos são parâmetros de avaliação das hemácias no que diz respeito ao tamanho destas células e à distribuição da hemoglobina nestas, por isso são importantes e servem especialmente para a classificação das anemias (HENRY, 2008; XAVIER, 2015). Para o SB-44, houve aumento do HCM (quantidade de hemoglobina em termos de peso que cada um dos eritrócitos carrega) em comparação ao grupo controle, todavia, esse aumento foi no sentido de restabelecer seus níveis normais encontrados no grupo sadio. Ainda, considerando que essa alteração não foi acompanhada por alteração significante na CHCM (média, em porcentagem, de quanto o eritrócito está preenchido pela hemoglobina), esta não possui significado clínico relevante.

Em relação ao leucograma, uma importante alteração em pacientes com neoplasia e que ocorre devido à complexa interação entre as células neoplásicas com o sistema imunológico e com a inflamação peritumoral é a leucocitose. A leucocitose neutrofílica está fortemente associada ao pior prognóstico e mortalidade em seres humanos com neoplasia, sobretudo naqueles em tratamento quimioterápico (DIETL et al., 2007; CONNOLLY et al., 2010; Da SILVA et al., 2014). Os dados sugerem que SB-44 não induz imunossupressão, considerando que os valores de leucócitos totais não alteraram. Apesar da redução de linfócitos observada após tratamento com SB-44 foi compensada pelo aumento de segmentados, não interferindo no número de leucócitos totais. Portanto, SB-44 não promoveu mielossupressão como a grande maioria dos agentes antitumorais, dentre estes o 5-FU, como pode ser observado na redução de leucócitos totais apresentada no presente estudo (PITA, 2009).

Esse trabalho apresenta, em conjunto, o potencial farmacológico de SB-44 relacionado à sua atividade antitumoral via mecanismos antiangiogênicos e

antioxidantes, além da caracterização de possíveis efeitos tóxicos decorrentes de sua administração, o que subsidiam a realização de testes pré-clínicos adicionais na perspectiva de contribuir com o estudo de novos candidatos a fármacos antitumorais a classe dos aminotiofenos.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

De acordo com os estudos realizados com o derivado do 2-aminotiofeno (SB-44) pode-se concluir que:

- SB-44 apresentou baixa toxicidade aguda, quando administrado por via intraperitoneal em camundongos;
- SB-44 apresentou baixa genotoxicidade *in vivo*;
- SB-44 apresentou atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich;
- SB-44 exerce seu efeito antitumoral por interferir na progressão do ciclo celular, além de exercer efeitos antiangiogênicos, imunomoduladores e antioxidantes;
- SB-44 apresentou baixa toxicidade renal e hematológica, porém mostrou hepatotoxicidade em animais transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich submetidos a tratamento de doses repetidas (nove dias).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABU-HASHEM, A.; EL-SHEHRY, M.; BADRIA, F. Design and synthesis of novel thiophenecarbohydrazide, thienopyrazole and thienopyrimidine derivatives as antioxidant and antitumor agents. **Acta pharmaceutica**, v. 60, n. 3, p. 311-323, 2010.
- AGGARWAL, B. B.; GUPTA, S. C.; KIM, J. H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. **Blood**, v. 119, n. 3, p. 651-665, 2012.
- AGGARWAL, D.; LIMDI, K. Anti-TNF therapy is associated with a reduction in radiation exposure in patients with Crohn's disease. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 27, n. 1, p. 13-19, 2015.
- AGRAWAL, N.; FREDERICK, M. J.; PICKERING, C. R.; BETTEGOWDA, C.; CHANG, K.; LI, R. J.; ZHANG, N. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. **Science**, v. 333, n. 6046, p. 1154-1157, 2011.
- AKAH, P.A.; OSIGWE, C.C.; NWORU, C.S. Reversal of Coumarin-Induced Toxicity by the Extracts and Fractions of *Ageratum conyzoides*. **Asian Journal of Medical Sciences**, v.2, n.3, pp. 121-126, 2010.
- ALEXANDER, E. T., MINTON, A. R., PETERS, M. C., VAN RYN, J.; GILMOUR, S. K. Thrombin inhibition and cisplatin block tumor progression in ovarian cancer by alleviating the immunosuppressive microenvironment. **Oncotarget**, 2016.
- ALMEIDA, F.; OLIVEIRA, F.; ALMEIDA, R. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. **Almeida RN. Psicofarmacologia: Fundamentos práticos. 1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.[Links]**, 2006.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.
- ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem farmacológica comportamental. In: **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap.11, p. 131-137, 2006.
- ALQASOUMI, S.; GHORAB, M. M.; ISMAIL, Z. H.; ABDEL-GAWAD, S. M.; EL-GABY, M. S.; ALY, H. M. Novel antitumor acetamide, pyrrole, pyrrolopyrimidine, thiocyanate, hydrazone, pyrazole, isothiocyanate and thiophene derivatives containing a biologically active pyrazole moiety. **Arzneimittelforschung**, v. 59, n. 12, p. 666-671, 2009.

- ANJOS, J. V.; MENDONÇA, F. J. B.; COSTA-SILVA, J. H.; SOUZA, I. A.; MELO, S. J. Estudo preliminar da toxicidade e das atividades anti-edematógenas e anti-nociceptivas da 3,4-diidro- 2-fenil-6-para-flúor-fenil-4-OxO-pirimidina-5-carbo-nitrila. *Lat Am J Pharm.* v. 8, p. 2-343, 2008.
- ARORA, M.; SARAVANAN, J.; MOHAN, S.; BHATTACHARJEE, S. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some schiff bases of 2-amino-N-(P-acetamidophenyl carboxamido)-4, 5, 6, 7-tetramethylene thiophenes. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* v. 5, 2013.
- ASHOK, A.; THANUKRISHNAN, K.; BHOJYA NAIK, H. S.; SHAIK, A. G. 6, 7-Dimethoxy-quinazolin-4-yl-amino-thiophene-2-carboxamides as Potent Inhibitors of VEGF Receptors 1 and 2. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2016.
- ATKINSON, M. J.; TAPIO, S. Tumorigênese. In: **O Impacto da biologia do tumor sobre o Câncer Tratamento e Estratégias Multidisciplinar**. Springer Berlin Heidelberg, p. 1-17, 2009.
- AZEVEDO, M.; PALOS, M.; OSUGUI, L.; LAURINDO, M.; MASUTANI, D.; NONOGAKI, S.; BACHI, A.; MELO, F.; MARIANO, M. B-1 cells and concomitant immunity in Ehrlich tumour progression. *Immunobiology*, v. 2014, p. 1-3, 2014.
- BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, n. 7, p. 540-550, 2004.
- BAPTISTA, Ana Isabel Alves. Inibidores de receptores dependentes de ciclina como terapêutica anti tumoral. 2013.
- BAROSA, J.; RIBEIRO, J.; AFONSO, L.; FERNANDES, J.; MONTEIRO, E. Head and neck sarcoma: analysis of 29 cases. *European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases*, v. 131, n. 2, p. 83-86, 2014.
- BERTOLI, C.; SKOTHEIM, J. M.; DE BRUIN, R. A. M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 14, n. 8, p. 518-528, 2013.
- BEZERRA, D. P.; MARINHO FILHO, J. D.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, O. D.; TORRES, M. C.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, F. A.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. *Chemistry & Biodiversity*, v. 6, n. 8, p. 1224-1231, 2009.
- BIRK, J.; MEYER, M.; ALLER, I.; HANSEN, H. G.; ODERMATT, A.; DICK, T. P.; MEYER, A. J.; APPENZELLER-HERZOG, C. Endoplasmic reticulum: reduced and oxidized glutathione revisited. *J Cell Sci*, v. 126, n. 7, p. 1604-1617, 2013.
- BITTENCOURT, P. L. Epidemiologia da hepatotoxicidade por drogas. *Rev. Suplemento Hepatotoxicidade*, v. 30, p. 14-16, 2011.
- BOTELHO, S. P. S. Planejamento, síntese e análise in silico de novos N-heterociclos. 2014.

BRAGA, M. S.; CHAVES, K. B.; CHAMMAS, R.; SCHOR, N.; BELLINI, M. H. Endostatin neoadjuvant gene therapy extends survival in an orthotopic metastatic mouse model of renal cell carcinoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 66, n. 4, p. 237-241, 2012.

BRAGA, M. S.; TURAÇA, T. L.; FOGUER, K.; CHAVES, K. C. B.; PESQUERO, J. B.; CHAMMAS, R.; BELLINI, M. H. Vascular endothelial growth factor as a biomarker for endostatin gene therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 6, p. 511-515, 2013.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. A situação do câncer no Brasil/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância. -Rio de Janeiro: INCA, 2006.

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.

CAIRNS R. A.; HARRIS, M. T. W. Regulação do metabolismo da célula cancerosa. **Nat Rev Cancer** 11 (2): 85-95(2011)

CALGAROTTO, A. K.; PEREIRA, G. J. S.; BECHARA, A.; PAREDES-GAMERO, E. J.; BARBOSA, C. M.; HIRATA, H.; DE SOUZA, M. L. Q.; SMAILI, S. S.; BINCOLETTI, C. Autophagy inhibited Ehrlich ascitic tumor cells apoptosis induced by the nitrostyrene derivative compounds: relationship with cytosolic calcium mobilization. **European journal of pharmacology**, v. 678, n. 1, p. 614, 2012.

CARMELIET, P.; BAES, M. Metabolism and Therapeutic Angiogenesis. **New England Journal Of Medicine**, v. 358, n. 23, p. 2511-2512, 2008.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 298-307, 2011.

CASTAÑEDA-GILL, Jessica M; Vishwanatha, J. KAntiangiogenic mechanisms and factors in breast cancer treatment. **Journal of carcinogenesis**, v. 15, n. 1, p. 1, 2016.

CEKANOVA, M.; RATHORE, K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 1911- 1922, 2014.

CHAN, G. F. Q.; TOWERS, G. H. N.; MITCHELL, J. C. Ultraviolet-mediated antibiotic activity of thiophene compounds of Tagetes. **Phytochemistry**, v. 14, n. 10, p. 2295-2296, 1975

CHAN, L.; PEREIRA, O.; REDDY, T. J.; DAS, S. K.; POISSON, C.; COURCHESNE, M.; ROY, C. Discovery of thiophene-2-carboxylic acids as potent inhibitors of HCV

NS5B polymerase and HCV subgenomic RNA replication. Part 2: tertiary amides. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 14, n. 3, p. 797-800, 2004.

CHAPMAN, K. C. S.; KUPFERSCHMIDT, H.; BOND, G. R.; WILKS, M. F.; ROBINSON, S. The value of acute toxicity studies to support the clinical management of overdose and poisoning: A cross-discipline consensus. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 58, n. 3, p. 354-359, 2010.

CHÁVEZ-GALÁN, L.; OLLEROS, M. L.; VESIN, D.; GARCIA, I. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 263, 2015.

CHIMOTE, G.; SREENIVASAN, J.; PAWAR, N.; SUBRAMANIAN, J.; SIVARAMAKRISHNAN, H.; SHARMA, S. Comparison of effects of anti-angiogenic agents in the zebrafish efficacy-toxicity model for translational anti-angiogenic drug discovery. **Drug design, development and therapy**, v. 8, p. 1107, 2014.

CHOUDHARI, S. K.; CHAUDHARY, M.; BAGDE, S.; GADBAIL, A. R.; JOSHI, V. Nitric oxide and cancer: a review. **World journal of surgical oncology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2013.

CHOUDHARI, S. K.; CHAUDHARY, M.; GADBAIL, A. R.; SHARMA, A.; TEKADE, S. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: a review. **Oral oncology**, v. 50, n. 1, p. 10-18, 2014.

CONNOLLY, G. C., KHORANA, A. A., KUDERE, N. M., CULAKOVA, E., FRANCIS, C. W., LYMAN, G. H. Leukocytosis, thrombosis and early mortality in cancer patients initiating chemotherapy. **Thrombosis Research**. Vol. 126 no. 2 pp. 113-118, 2010.

COSTA E SILVA, A.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, v. 1, p. 167-179, 2010.

COSTA, C.; PEREIRA, S. S. Avaliação da atividade antitumoral "in vitro" e "in vivo" da cubebina (tumor sólido de Ehrlich), isolada do extrato bruto de Piper cubeba (Piperaceae). 2016.

COSTA, E. S. L. Anticancer Effects of The Seaweed Compounds Fucoxanthin And Phloroglucinol, Alone And in Combination With 5-Fluorouracil in Colon Cells. 2015.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. **New England journal of medicine**, v. 358, n. 5, p. 502-511, 2008.

- DALLEMAGNE, P.; KHANH, L. P.; ALSAÏDI, A.; VARLET, I.; COLLOT, V.; PAILLET, M.; BUREAU, R.; RAULT, S. Synthesis and biological evaluation of five-membered heterocycles fused to cyclopenta [c] thiophene as new antitumor agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 11, n. 7, p. 1161-1167, 2003.
- DE AGUIAR, A. C. V.; DE MOURA, R. O.; MENDONÇA, J. F. B.; DE OLIVEIRA ROCHA, H. A.; CÂMARA, R. B. G.; SCHIAVON, M. D. S. C. Evaluation of the antiproliferative activity of 2-amino thiophene derivatives against human cancer cells lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 403-414, 2016.
- DE GROOT, D. J. A.; DE VRIES, E. G. E.; GROEN, H. J. M.; & De Jong, S. Non-steroidal anti-inflammatory drugs to potentiate chemotherapy effects: from lab to clinic. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 61, n. 1, p. 52-69, 2007.
- DE SOUZA, C. M.; VISACRI, M. B.; FERRARI, G. B.; TUAN, B. T.; COSTA, A. P.; BARBOSA, C. R.; LIMA, C. S.; MAZZOLA, P. G.; MORIEL, P. Nausea, vomiting and quality of life of patients with cancer undergoing antineoplastic treatment: an evaluation by pharmacists. **International Journal of Pharmacy Practice**, v. 23, n. 5, p. 357-360, 2015.
- DECAT, C. S. Avaliação diagnóstica do distress: Contribuições para rotina de atendimento em serviço de oncologia. 2010.
- DESANTIS, C. E.; LIN, C. C.; MARIOTTO, A. B.; SIEGEL, R. L.; STEIN, K. D.; KRAMER, J. L.; ALTERI, R.; ROBBINS, A. S.; JEMAL, A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 64, n. 4, p. 252-271, 2014.
- DHILLON, A. S.; HAGAN, S.; RATH, O.; KOLCH, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279-3290, 2007.
- DI CARLO, E. Interleukin-30: A novel microenvironmental hallmark of prostate cancer progression. **Oncoimmunology**, v. 3, n. 2, p. e27618, 2014.
- DIAZ-CANO, Salvador J. Tumor heterogeneity: mechanisms and bases for a reliable application of molecular marker design. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 2, p. 1951-2011, 2012
- DIAZ-MORALLI, S.; TARRADO-CASTELLARNAU, M.; MIRANDA, A.; CASCANTE, M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 255-271, 2013.
- DIETL, B., MARIENHAGEN, J., SCHÄFE, C., KÖLBL, O. The Prognostic Value of Anaemia at Different Treatment Times in Patients with Locally Advanced Head and Neck Cancer Treated with Surgery and Postoperative Radiotherapy. **Clinical Oncology**. Vol. 19, no. 4, pp. 228-233, 2007.
- DO AMARAL, A. T.; MONTANARI, C. A. Química medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 25, n. Supl 1, p. 39-44, 2002.

EHRLICH, P., Experimentelle carcinoma studien an Mäusen. Königliches Anstalt für Experimentelle Therapie. p. 78-80, 1906.

Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

FADDA, A. A.; BERGHOT, M. A., AMER, F. A., BADAWY, D. S.; BAYOUMY, N. M. Synthesis and antioxidant and antitumor activity of novel pyridine, chromene, thiophene and thiazole derivatives. **Archiv Der Pharmazie**, v. 345, n. 5, p. 378-385, 2012.

FALCÃO JÚNIOR, J. O. de A. Avaliação de quimiocinas séricas em mulheres com câncer epitelial de ovário. 2008. 73 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2008. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/93111>>.

FALCON, B. L.; CHINTHARLAPALLI, S.; UHLIK, M. T.; PYTOWSKI, B. Antagonist antibodies to vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) as anti-angiogenic agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 164, p. 204-225, 2016.

FERIGOLO, P. C.; SAGRILLO, M. R. Genotoxicidade relacionada ao consumo de chimarrão. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria. v. 14, n. 1, p. 1-13, 2013.

FERNANDES, G. M. D. M.; LEME, C. V. D.; RUIZ-CINTRA, M. T.; PAVARINO, É. C.; NETINHO, J. G.; GOLONI-BERTOLLO, E. M. L. Clinical and epidemiological evaluation of patients with sporadic colorectal cancer. **Journal of Coloproctology**, v. 34, n. 4, p. 216-223, 2014.

FERNANDES, P. D.; GUERRA, F. S.; SALES, N. M.; SARDELLA, T. B.; JANCAR, S.; NEVES, J. S. Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor development. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 71, p. 83-89, 2015

FERNANDES, Patrícia Dias; Guerra, F. S; Sales, N. M; Sardella, T. B; Jancar, S; Neves, J. S. Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor development. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 71, p. 83-89, 2015.

FERREIRA, A.; DA SILVA, J. L. F.; DUARTE, M. T.; DA PIEDADE, M. F. M.; ROBALO, M. P.; HARJIVAN, S. G.; MARQUES, M. Synthesis and characterization of new organometallic benzo [b] thiophene derivatives with potential antitumor properties. **Organometallics**, v. 28, n. 18, p. 5412-5423, 2009.

FERREIRA, E. I. Planejamento de Fármacos na Área de Doença de Chagas: Avanços e Desafios; Revista Virtual de Química, 4 (3), 225-246, 2012.

FERREIRA, I. C.; CALHELHA, R. C.; ESTEVINHO, L. M.; QUEIROZ, M. J. Screening of antimicrobial activity of diarylamines in the 2,3,5-trimethylbenzo[b]thiophenes series: a structure-activity evaluation study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 23, p. 5831-5833, 2004.

FERREIRA, M. A. N. D. Avaliação da angiogênese, inflamação e crescimento tumoral em camundongos com deleção gênica dos receptores para o PAF (PAFR-KO). 2006.

FOGUER, K.; DE SOUZA BRAGA, M.; PERON, J. P. S.; BORTOLUCI, K. R.; BELLINI, M. H. Endostatin gene therapy inhibits intratumoral macrophage M2 polarization. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 79, p. 102-111, 2016.

FORMAN, Henry J.; DAVIES, Kelvin JA; URISINI, Fulvio. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 24-35, 2014.

FORTEA ORMAECHEA, J. I.; LOZANO MAYA, M.; ADÁN MERINO, L.; BARRIO ANTORANZ, J.; MARTÍN CHAVARRI, S., CORCHETE PRATS, E.; ALDEGUER MARTÍNEZ, M. Remisión a largo plazo con rituximab en paciente con crioglobulinemia grave asociada al virus de la hepatitis C. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 105, n. 8, p. 490-493, 2013.

FORTES, A.; FORTES, A. C.; ALMEIDA, A. A. C.; MENDONÇA-JÚNIOR, F. J. B.; FREITAS, R. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; SOARES, M. F. D. L. R. Anxiolytic properties of new chemical entity, 5TIO1. **Neurochemical research**, v. 38, n. 4, p. 726-731, 2013.

FRANKS, Alexis L.; SLANSKY, Jill E. Multiple associations between a broad spectrum of autoimmune diseases, chronic inflammatory diseases and cancer. **Anticancer research**, v. 32, n. 4, p. 1119-1136, 2012.

GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 4, p. 232-241, 2010.

GABRILOVICH, D. I.; NAGARAJ, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 3, p. 162-174, 2009.

GAD, S. C. **Animal Models in Toxicology**. 2 ed. Flórida: CRC Press, 2007.

GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; BOUCHERLE, A. Descoberta de fármacos. **MONTANARI, C.(Org..); Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos**. São Paulo: EDUSP, p. 7-46, 2011.

GARCIA, J. A.; ELSON, P.; TYLER, A.; TRIOZZI, P.; DREICER, R. Sargramostim (GM-CSF) and lenalidomide in castration-resistant prostate cancer (CRPC): results from a phase I-II clinical trial. In: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. Elsevier., p. 33. e11-33. e17, 2014.

GILLIES, R. J.; ROBEY I.; GATENBY, R. A. Causas e consequências do aumento do metabolismo de glicose de cânceres. *J Nucl Med* 49 (Suppl 2): 24S-42S, 2008

GONG, J. H.; LIU, X. J.; LI, Y.; ZHEN, Y. S. Pingyangmycin downregulates the expression of EGFR and enhances the effects of cetuximab on esophageal cancer cells and the xenograft in athymic mice. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 69, n. 5, p. 1323-1332, 2012.

GONZÁLEZ-VALLINAS, M. M.; MOLINA, S.; VICENTE, G.; DE LA CUEVA, A.; VARGAS, T.; SANTOYO, S.; DE MOLINA, A. R. Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. **Pharmacological research**, v. 72, p. 61-68, 2013.

GOUDA, M. A.; ELDIEN, H. F.; GIRGES, M. M.; BERGHOT, M. A. Synthesis and Antioxidant Activity of Novel Series of Naphthoquinone Derivatives Attached to Benzothiophene Moiety. **Medicinal Chemistry**, v. 2013, 2013.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GREENSTEIN, Jesse P. **Biochemistry of cancer**. Elsevier, 2016.

GRIFFITHS, B.; LEWIS, C. A.; BENSAAD, K.; ROS, S.; ZHANG, Q.; FERBER, E. C.; KONISTI, S.; PECK, B.; MIESS, H.; EAST, P.; WAKELAM, M.; HARRIS, A. L.; SCHULZE, A. Sterol regulatory element binding protein-dependent regulation of lipid synthesis supports cell survival and tumor growth. *Cancer & metabolism*;1:3, 2013

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, 2010.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

GURGEL, A. P. D. G; SILVA, J. G.; GRANGEIRO, A. R. S.; OLIVEIRA, D. C.; LIMA, C. M. P.; SILVA, A. C. P.; In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectrathus amboinicus* (Lour) spreng (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol*. v. 3, p. 125-361, 2009.

GUTSCHNER, T.; DIEDERICHS, S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. **Rna Biology**, v. 9, n. 6, p. 703-719, 2012.

HALDER, A. K.; MUKHERJEE, A.; ADHIKARI, N.; SAHA, A.; JHA, TARUN. Nitric Oxide Synthase (NOS) Inhibitors in Cancer Angiogenesis. **Current Enzyme Inhibition**, v. 12, n. 1, p. 49-66, 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HAO, N. B.; LÜ, M. H.; FAN, Y. H.; CAO, Y. L.; ZHANG, Z. R.; YANG, S. M. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clinical and Developmental Immunology**, 2012.

HARINATH, Y., REDDY, D. H. K., KUMAR, B. N., APPARAO, C.; SESHAIAH, K. Synthesis, spectral characterization and antioxidant activity studies of a bidentate Schiff base, 5-methyl thiophene-2-carboxaldehyde-carbohydrazone and its Cd (II), Cu (II), Ni (II) and Zn (II) complexes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 101, p. 264-272, 2013.

HAUSHEER, Frederick H. **Compositions and methods of use of compounds to increase cancer patient survival time**. U.S. Patent n. 9,320,760, 26 abr. 2016.

HEATH, V. L.; BICKNELL, R. Anticancer strategies involving the vasculature. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 6, n. 7, p. 395-404, 2009.

HELLIWELL, M.; NASIOPPOULOU, D. A.; HARRIS, P. A.; KOTALI, A.; JOULE, J. A. N'-[1-(2, 4-Dioxo-3, 4-dihydro-2H-1-benzopyran-3-ylidene) ethyl] thiophene-2-carbohydrazide. **Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online**, v. 67, n. 4, p. o1014-o1014, 2011.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 23, n. 5, p. 1011-1027, 2004.

IJEOMA, U. F.; ADERONKE, S. O.; OQBONNA, O.; AUGUSTINA, M. A.; IFEYINWA, C. N. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of crude extracts of Ipomoea involucrata leaves in mice and rats. **Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine**, v. 4, n. 2, p. 121-124, 2011.

IMINJAN, M.; NURMUHAMMAT, A.; LI, X.; UPUR, H.; AHMAT, D.; HE, B. Investigation into the toxicity of traditional Uyghur medicine Quercus infectoria galls water extract. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e90756, 2014.

IORIO, M. V.; CROCE, C. M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. **EMBO molecular medicine**, v. 4, n. 3, p. 143-159, 2012.

IORIO, M.; CROCE; V. CARLO, M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. **EMBO molecular medicine**, v. 4, n. 3, p. 143-159, 2012.

ISRAEL, Y.; RACHMIEL, A.; ZIV, G.; NAGLER, R. Benign and Malignant Salivary Gland Tumors—Clinical and Demographic Characteristics. **Anticancer Research**, v. 36, n. 8, p. 4151-4154, 2016.

JAWANDA, M. Antitumour activity of antioxidants: An overview. **International Journal of Dental Clinics**, v. 1, n. 1, 2009.

JEBREEL, A.; ENGLAND, J.; BEDFORD K.; MURPHY J.; KARSAI L.; ATKIN S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors expression and

microvascular density in benign and malignant thyroid diseases. **International Journal Of Experimental Pathology**, v. 88, n. 4, p. 271-277, 2007.

KASALA, E. R.; BODDULURU, L. N.; MADANA, R. M.; GOGOI, R.; BARUA, C. C. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. **Toxicology letters**, v. 233, n. 2, p. 214-225, 2015.

KATAKWAR, P.; R., NAIK, S., MITTAL, R. Oxidative stress marker in oral cancer: A review. 2016.

KERBEL, R. S. Tumor Angiogenesis. **New England Journal Of Medicine**, v. 358, n. 19, p. 2039-2049, 2008.

KERKAR, S. P.; LEONARDI, A. J.; VAN PANHUYSEN, N.; ZHANG, L.; YU, Z.; CROMPTON, J. G.; PAN, J. H.; PALMER, D. C.; MORGAN, R. A.; ROSENBERG, S. A.; RESTIFO, N. P. Collapse of the Tumor Stroma is Triggered by IL-12 Induction of Fas. **Molecular Therapy**, v. 21, n. 7, p. 1369-1377, 2013.

KIM, K. J.; LI, B.; WINER, J.; ARMANINI, M.; GILLETT, N.; PHILLIPIS, H. S.; FERRARA, N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. **Nature**, v. 362, n. 6423, p.841-844, 1993.

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.

KURUTAS, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 71, 2016.

LABIB, M. B.; LAMIE, P. F. Design, synthesis and biological evaluation of novel thiophene and theinopyrimidine derivatives as anticancer agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, n. 11, p. 2607-2618, 2016.

LANDSKRON, G., DE LA FUENTE, M., THUWAJIT, P., THUWAJIT, C.; HERMOSO, M. A. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. **Journal of immunology research**, v. 2014, 2014.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274-293, 2012.

LEE, W.; CHOI, S. H.; KANG, S.; SONG, C. H.; PARK, S.; LEE, Y. J.; KU, S. K. Genotoxicity testing of Persicariae Rhizoma (Persicaria tinctoria H. Gross) aqueous extracts. **Studies**, v. 27, p. 28, 2016.

LENZ, H. J.; STINTZING, S.; LOUPAKIS, F. TAS-102, a novel antitumor agent: a review of the mechanism of action. **Cancer treatment reviews**, v. 41, n. 9, p. 777-783, 2015.

LEPAILLEUR, A.; BUREAU, R.; HALM-LEMEILLE, M. P.; BOUQUET, M.; PECQUET, R.; PARIS-SOUBAYROL, C.; MAIRE, M. A. Assessment of the genotoxic and carcinogenic potentials of 3-aminothiophene derivatives using in vitro

and in silico methodologies. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 7, p. 775-786, 2014.

LETTRE, R.; PAWELETZ, N.; WERNER, D.; GRANZOW, C. Sublines of the Ehrlich-Lettre mouse ascites tumor: a new tool for experimental cell research. **Naturwissenschaften**, v. 59, p. 59-63, 1972.

LI, L.; MA, Y.; LIU, S.; ZHANG, J.; XU, X. Y. Interleukin 10 promotes immune response by increasing the survival of activated CD8+ T cells in human papillomavirus 16-infected cervical cancer. **Tumor Biology**, p. 1-9, 2016.

LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 140, n. 15, p. 3079-3093, 2013.

LOU, J.; LIU, Z.; LI, Y.; ZHOU, M., ZHANG, Z., ZHENG, S.; LI, J. Synthesis and anti-tumor activities of N'-benzylidene-2-(4-oxothieno [2, 3-d] pyrimidin-3 (4H)-yl) acetohydrazone derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 21, n. 22, p. 6662-6666, 2011.

LUENGO-FERNANDEZ, R.; Leal, J.; Gray, A.; Sullivan, R. Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis. **The lancet oncology**, v. 14, n. 12, p. 1165-1174, 2013.

LUO, X. J.; Qin, Q. P.; Li, Y. L.; Liu, Y. C.; Chen, Z. F.; Liang, H. Three platinum (II) complexes of 2-(methoxy-phenyl)-imidazo-[4, 5-f]-[1, 10] phenanthroline: cell apoptosis induction by sub-G1 phase cell cycle arrest and G-quadruplex binding properties. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 46, p. 176-179, 2014.

MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock. 12. Ed. Porto Alegre: Artmed, 1160 p. 2010.

MAGALHÃES, H. I.; FERREIRA, P. M.; MOURA, E. S.; TORRES, M. R.; ALVES, A. P.; PESSOA, O. D.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. In vitro and in vivo antiproliferative activity of Calotropis procera stem extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 2, p. 407-416, 2010.

MAN, Y. G.; STOJADINOVIC, A.; MASON, J.; AVITAL, I.; BILCHIK, A.; BRUECHER, B.; JEWETT, A. Tumor-infiltrating immune cells promoting tumor invasion and metastasis: existing theories. **J Cancer**, v. 4, n. 1, p. 84-95, 2013.

MANCHADO, E.; GUILLAMOT, M.; MALUMBRES, M. Killing cells by targeting mitosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 3, p. 369-377, 2012.

MANNINO, M. H.; ZHU, Z.; XIAO, H.; BAI, Q.; WAKEFIELD, M. R.; FANG, Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer letters**, v. 367, n. 2, p. 103-107, 2015.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-444, 2008.

- MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-444, 2008.
- MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Curr Opin Immunol**, v. 22, n. 2, p. 231-7, 2010.
- MARGL, L.; EISENREICH, W.; ADAM, P.; BACHER, A.; ZENK, M. H. Biosynthesis of thiophenes in *Tagetes patula*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 875-881, 2001.
- MARTINS, G. G.; LÍVERO, F. A.; STOLF, A. M.; KOPRUSZINSKI, C. M.; CARDOSO, C. C.; BELTRAME, O. C.; ACCO, A. Sesquiterpene lactones of Moquiniastrum polymorphum subsp. floccosum have antineoplastic effects in Walker-256 tumor-bearing rats. **Chemico-biological interactions**, v. 228, p. 46-56, 2015.
- MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; LIMA-NETO, R. G.; OLIVEIRA, T. B.; LIMA, M. C. A.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L.; CRUZ, R. M. D.; ARAÚJO, R. S. A.; NEVES, R. P. Synthesis and evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4,5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, p. 1492–1499, 2011.
- MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; LIMA-NETO, R. G.; OLIVEIRA, T. B.; LIMA, M. C. A.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L.; CRUZ, R. M. D.; ARAÚJO, R. S. A.; NEVES, R. P. Synthesis and evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4,5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, p. 1492–1499, 2011.
- MITRA, I.; SAHA, A.; ROY, K. Pharmacophore mapping of arylamino-substituted benzo [b] thiophenes as free radical scavengers. **Journal of molecular modeling**, v. 16, n. 10, p. 1585-1596, 2010.
- MOHAN, S.; SARAVANAN, J. Synthesis and Antimicrobial screening of some Novel Substituted Thiophenes. 2012.
- MOLINARO, M.; AMERI, P.; MARONE, G.; PETRETTA, M.; ABETE, P.; DI LISA, F.; DE PLACIDO, S.; BONADUCE, D.; TOCCHELLI, C. G. Recent advances on pathophysiology, diagnostic and therapeutic insights in cardiac dysfunction induced by antineoplastic drugs. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 138-148, 2015.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- MONTEIRO, P. A. Atividade anticâncer de extratos e frações obtidos de *Croton campestris* A. St.-Hil. 2012.
- MORI, K.; SHIBANUMA, M.; NOSE, K. Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. **Cancer research**, v. 64, n. 20, p. 7464-7472, 2004.
- MOTA, C. de A. X. et al. Efeito antinociceptivo e antiinflamatório do 2-[(4-nitrobenzilideno)-amino]-4, 5, 6, 7-tetraidro-benzo [b] tiofeno-3-carbonitrila (6CN10) em camundongos. 2012.

MOURA, W.; LIMA, Z.; JUNIOR, F.; MOURA, R. Desenvolvimento através da Síntese, Elucidação Estrutural e Avaliação Biológica de Derivados 2-Amino-Tiofênicos-Substituídos Como Potenciais Fármacos Antifúngicos. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 10, n. 2, 2015.

MOURA, W.; LIMA, Z.; JUNIOR, F.; MOURA, R. Desenvolvimento através da síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica de derivados 2-amino-tiofênicos-substituídos como potenciais fármacos antifúngicos. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 10, n. 2, 2015.

MOURA, W.; LIMA, Z.; JUNIOR, F.; MOURA, R. DESENVOLVIMENTO ATRAVÉS DA SÍNTESE, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE DERIVADOS 2-AMINO-TIOFÊNICOS-SUBSTITUÍDOS COMO POTENCIAIS FÁRMACOS ANTIFUNGICOS. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 10, n. 2, 2015.

MUÑOZ-FONTELA, C.; MANDINOVA, A.; AARONSON, S. A.; LEE, S. W. Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation. **Nature Reviews Immunology**, 2016.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Types of treatment**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>>. Acesso em: 21 set. 2016.

NAZER, B.; HUMPHREYS, B. D.; MOSLEHI, J.. Effects of Novel Angiogenesis Inhibitors for the Treatment of Cancer on the Cardiovascular System: Focus on Hypertension. **Circulation**, v. 124, n. 15, p.1687-1691, 2011.

NGO, D. C.; VERVERIS, K.; TORTORELLA, S. M.; KARAGIANNIS, T. C. Introduction to the molecular basis of cancer metabolism and the Warburg effect. **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 4, p. 819-823, 2015.

OECD. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. OECD Guideline for testing of chemicals n. 474, 1997.

OECD. Test No 423: Acute oral toxicity – acute toxic class method, 2001.

OKOMODA, V.T.; ATAGUBA, G.A.; AYUBA, V.O. Hematological Response of *Clarias gariepinus* Fingerlings Exposed to Acute Concentrations of Sunsate®, **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 9, n. 2, p. 271–278, 2013.

OLIVEIRA JÚNIOR, W. M.; BENEDITO, R. B.; PEREIRA, W. B.; TORRES, P. A.; RAMOS, C. A.; COSTA, J. P.; DA ROCHA, A. T.; DE SOUSA, D. P.; DE FREITAS, R. M.; DE FÁTIMA, M. D. M. F; DE ALMEIDA, R. N. Farnesol: antinociceptive effect and histopathological analysis of the striatum and hippocampus of mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 419-426, 2012.

OLIVEIRA, T. B. de. Síntese, determinação estrutural e avaliação biológica de novos derivados hidrazínicos e tiazolidinônicos tiofênicos. 2013.

ONO, A.; TANOUE, S.; YAMADA, Y.; TAKAJI, Y.; OKADA, F.; MATSUMOTO, S.; Mori, H. Primary malignant lymphoma of the gallbladder: a case report and literature review. **The British journal of radiology**, 2014.

OSIPOV, A. V.; TERPINSKAYA, T. I.; KRYUKOVA, E. V.; ULASCHIK, V. S.; PAULOVETS, L. V.; PETROVA, E. A.; BLAGUN, E. V.; STARKOV, V. G.; UTKIN, Y. N. Nerve Growth Factor from Cobra Venom Inhibits the Growth of Ehrlich Tumor in Mice. **Toxins**, v. 6, p. 786, 2014.

OSTRAND-ROSENBERG, S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 59, n. 10, p. 1593-1600, 2010.

OYEMITAN, I. A.; IWALEWA, E. O.; AKANMU, M. A.; OLUGBADE, T. A. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of essential oil of *Dennettia tripetala* G.Baker (Annonaceae) in rodents. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 5, p. 355-362, 2008.

OZASLAN, M.; KARAGOZ, I. D.; KILIC, I. H.; GULDUR, M. E. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p.2375-2378, 2011.

PENHA, A. R. S. et al. Atividade antinociceptiva e antioxidante do derivado tiofênico 2-amino-4, 5, 6, 7-tetrahidro-benzotiofeno-3-carbonitrila (6CN) em camundongos. 2014.

PICKUP, M. W.; MOUW, J. K.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. **Embo Reports**, v. 15, n. 12, p. 1243-1253, 2014.

PIERRON, G.; TIRODE, F.; LUCCHESI, C.; REYNAUD, S.; BALLET, S.; COHEN-GOGO, S.; PERRIN, V.; COINDRE, J. M.; DELATTRE, O. A new subtype of bone sarcoma defined by BCOR-CCNB3 gene fusion. **Nature genetics**, v. 44, n. 4, p. 461-466, 2012.

PINTO, E.; VALE-SILVA, L. A.; OLIVEIRA, J. F.; BEGOUIN, A.; BEGOUIN, J. M.; KIRSCH, G. Antifungal activity of synthetic di (hetero) arylamines based on the benzo [b] thiophene moiety. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 17, p. 8172-8177, 2008.

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. **Checkpoint Controls and Cancer: Volume 2: Activation and Regulation Protocols**, p. 301-311, 2004.

PRADOS, J.; MELGUIZO, C.; ORTIZ, R.; VÉLEZ, C.; ALVAREZ, P. J.; ARIAS, J. L.; RUÍZ, M. A.; GALLARDO, V.; ARANEGA, A. Doxorubicin-Loaded Nanoparticles: New Advances in Breast Cancer Therapy, **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1058-1070, 2012.

PRASAD, S.; RAVINDRAN, J.; AGGARWAL, B. B. NF-κB and cancer: how intimate is this relationship. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 336, n. 1-2, p. 25-37, 2010.

- QIU, B.; SIMON, M. C. Oncogenes strike a balance between cellular growth and homeostasis. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, v. 43, p. 3-10, 2015.
- QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423-1437, 2013.
- QUEIROZ, M. J. R.; FERREIRA, I. C.; CALHELHA, R. C.; ESTEVINHO, L. M. Synthesis and antioxidant activity evaluation of new 7-aryl or 7-heteroaryl amino-2, 3-dimethylbenzo [b] thiophenes obtained by Buchwald–Hartwig C–N cross-coupling. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 4, p. 1788-1794, 2007.
- RABINOVICH, G. A.; GABRILOVICH, D.; SOTOMAYOR, E. M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. **Annual review of immunology**, v. 25, p. 267, 2007.
- RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical interventions in aging**, v. 2, n. 2, p. 219, 2007.
- RASOOL, N., KANWAL, A., RASHEED, T., AIN, Q., MAHMOOD, T., AYUB, K.; ZIA-UL-HAQ, M. One Pot Selective Arylation of 2-Bromo-5-Chloro Thiophene; Molecular Structure Investigation via Density Functional Theory (DFT), X-ray Analysis, and Their Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 912, 2016.
- RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FOSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA**, v. 21, p. 89-96, 1993.
- REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.
- RILEY, B. D.; CULVER, J. O.; SKRYZINIA, C.; SENTER, L. A.; PETERS, J. A.; COSTALAS, J. W.; CALLIF-DALEY, F.; GRUMET, S. C.; HUNT, K. S.; NAGY, R. S.; MCKINNON, W. C.; PETRUCELLI, N. M.; BENNETT, R. L.; TREPANIER, A. M. Essential Elements of Genetic Cancer Risk Assessment, Counseling, and Testing: Updated Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. **Journal Of Genetic Counseling**, v. 21, n. 2, p. 151-161, 2011.
- RIOU, C.; DUMONT, A. R.; YASSINE-DIAB, B.; HADDAD, E. K.; SEKALY, R. P. IL-4 influences the differentiation and the susceptibility to activation-induced cell death of human naive CD8+ T cells. **Int Immunol**, vol. 18, p.827-835, 2006.
- RIZZOLIO, F.; TUCCINARDI, T.; CALIQIURI, I.; LUCCHETTI, C.; GIORDANO, A. CDK inhibitors: from the bench to clinical trials. **Current drug targets**, v. 11, n. 3, p. 279-290, 2010.
- RODRIGUES, K. A.; DIAS, C. N.; NÉRIS, P. L.; ROCHA, J. C.; SCOTTI, M. T.; SCOTTI, L.; MASCARENHAS, S. R.; VERAS, R. C.; DE MEDEIROS, I. A.; KEESEN, T. S.; DE OLIVEIRA, T. B.; DE LIMA, M. C.; BALLIANO, T. L.; DE AQUINO, T. M.; DE MOURA, R. O.; MENDONÇA JUNIOR, F. J.; DE OLIVEIRA, M. R. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and

immunomodulation in vitro. **European journal of medicinal chemistry**, v. 106, p. 1-14, 2015.

ROMAGNOLI, R.; BARALDI, P. G.; CARRION, M. D.; CARA, C. L.; PRETI, D.; FRUTTAROLO, F.; DI CRISTINA, A. Synthesis and biological evaluation of 2-and 3-aminobenzo [b] thiophene derivatives as antimitotic agents and inhibitors of tubulin polymerization. **Journal of medicinal chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2273-2277, 2007.

ROMAGNOLI, R.; BARALDI, P. G.; LOPEZ-CARA, C.; SALVADOR, M. K.; PRETI, D.; TABRIZI, M. A.; FU, X. H.. Design, synthesis and biological evaluation of 3, 5-disubstituted 2-amino thiophene derivatives as a novel class of antitumor agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 18, p. 5097-5109, 2014.

ROQUE, V. M. N.; FORONES, N. M. Avaliação da qualidade de vida e toxicidades em pacientes com câncer colorretal tratados com quimioterapia adjuvante baseada em fluoropirimidinas. **Arq. Gastroenterol.** v. 43, n.2, pp. 94-101, 2006.

RYU, C.K.; LEE, S. K.; HAN, J. Y.; JUNG, O. J.; LEE, J. Y.; JEONG, S. H. Synthesis and antifungal activity of 5-arylamino-4,7- dioxobenzo[b]thiophenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p. 2617–2620, 2005.

SAMIR, E. M.; ABOUZIED, A. S.; HAMED, F. I. The Synthesis and Cytotoxicity of Novel Thiophene Derivatives Derived from 2-(4-Oxo-4, 4-Dihydrothiazol-2-yl) Acetonitrile. **International Journal of Organic Chemistry**, v. 6, n. 02, p. 85, 2016.

SANTOS, O. J.; SAUAIA FILHO, E. N.; NASCIMENTO, F. R. F.; JÚNIOR, F. C. S.; FIALHO, E. M. S.; SANTOS, R. H. P.; SANTOS, R . A. P.; SERRA, I .C. P. B. Use of raw Euphorbia tirucalli extract for inhibition of ascitic Ehrlich tumor. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, p. 19-21, 2016.

SATO, T.; TERAI, M.; TAMURA, Y.; ALEXEEV, V.; MASTRANGELO, M. J.; SELVAN, S. R. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. **Immunologic research**, v. 51, n. 2-3, p. 170-182, 2011.

SCAPINI, P.; LAPINET-VERA, J. A.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BAZZONI, F.; CASSATELLA, M. A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunological reviews**, v. 177, n. 1, p. 195-203, 2000.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014.

SEDGER, L. M.; McDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants—past, present and future. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 25, n. 4, p. 453-472, 2014.

SENGER, D. R.; GALI, S. J.; DVORAK, M. A.; PERRUZZI, C. A.; HARVEY, V. S.; DVORAK, H. F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, v. 5, p. 219-983, 1983.

- SHCHEKOTIKHIN, A. E.; GLAZUNOVA, V. A.; DEZHENKOVA, L. G.; LUZIKOV, Y. N.; SINKEVICH, Y. B.; KOVALENKO, L. V.; HUANG, H. S. Synthesis and cytotoxic properties of 4, 11-bis [(aminoethyl) amino] anthra [2, 3-b] thiophene-5, 10-diones, novel analogues of antitumor anthracene-9, 10-diones. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 5, p. 1861-1869, 2009.
- SHCHORS, K.; EVAN, G. Tumor Angiogenesis: Cause or Consequence of Cancer?. **Cancer Research**, v. 67, n. 15, p. 7059-7061, 2007.
- SHIN, M. R.; KANG, S. K.; KIM, Y. S.; LEE, S. Y.; HONG, S. C.; KIM, E. C. TNF- α and LPS activate angiogenesis via VEGF and SIRT1 signalling in human dental pulp cells. **Internacional Endodontic Journal**, 2014.
- SHINOHARA, M.; ADACHI, Y., MITSUSHITA, J., KUWABARA, M., NAGASAWA, A., HARADA, S.; KAMATA, T. Reactive oxygen generated by NADPH oxidase 1 (Nox1) contributes to cell invasion by regulating matrix metalloprotease-9 production and cell migration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 7, p. 4481-4488, 2010.
- SHURIN, M.R.; SALTER, R.D. Dendritic cells in Cancer. 1a. Ed. Springer, 2009.
- SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox biology**, v. 4, p. 180-183, 2015.
- SILVA, A. H. C.; SILVA2, D. M., RIBAS, C. R., DITTRICH, R. L., DORNBUSCH, P. T., GUÉRIOS, S. D. ALTERAÇÕES NO HEMOGRAMA DE CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA. **Ciencia Animal Brasileira**, v.15, n.1, p. 87-92, 2014.
- SILVA, J. C.; LIMA-SARAIVA, S.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R.; ALMEIDA, J. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 94, p. 18-23, 2013.
- SINGH, P.; AGARWAL, N.; PAL, S. K. Sequencing systemic therapies for metastatic kidney cancer. **Current treatment options in oncology**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2015.
- SMITH, H. A.; KANG, Y. The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. **Journal of molecular medicine**, v. 91, n. 4, p. 411-429, 2013.
- SOLIMAN, A.M.; FAHMY, S.R.; EL-ABIED, S.A. Anti-neoplastic activities of sepia officinalis ink and coelatura aegyptiaca extracts against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Int J Clin Exp Pathol.** v. 8, p. 3543–3555, 2015.
- SOLÍS-MARTÍNEZ, R.; HERNÁNDEZ-FLORES, G.; OCHOA-CARRILLO, F. J.; ORTIZ-LAZARENO, P.; BRAVO-CCUELLAR, A. Macrófagos asociados a tumores contribuyen a la progresión del cáncer de próstata. **Gaceta Mexicana de Oncología**, v. 14, n. 2, p. 97-102, 2015.
- SOSA, V. M.; T., SOMOZA, R.; PACIUCCHI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, M. E. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing research reviews**, v. 12, n. 1, p. 376-390, 2013.

- SOUZA, B. C. C.; DE OLIVEIRA, T. B.; AQUINO, T. M.; DE LIMA, M. C.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L.; LIMA, E. O.; GONÇALVES-SILVA, T.; MILITÃO, G. C.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis. **Acta Pharmaceutica**, v. 15, p. 10-14, 2012.
- SOUZA, B. C. C.; DE OLIVEIRA, T. B.; AQUINO, T. M.; DE LIMA, M. C.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L.; LIMA, E. O.; GONÇALVES-SILVA, T.; MILITÃO, G. C.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis. **Acta Pharmaceutica**, v. 15, p. 10-14, 2012.
- SOUZA, Beatriz et al. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis. **Acta Pharmaceutica**, [s.l.], v. 62, n. 2, p.10-14, 2012.
- SPRAGUE, A. H.; KHALIL, R. A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochemical pharmacology**, v. 78, n. 6, p. 539-552, 2009.
- STEGER, F.; HAUTMANN, M. G.; KÖLBL, O. 5-FU-induced cardiac toxicity - an underestimated problem in radiooncology? **Radiation Oncology**, v. 7, p. 212, 2012.
- STEWART, B. and Wild, C. P. World cancer report 2014. **World**, 2016.
- SUBBA, R. D.; RASHEED, S.; THASLIM, B. S. K.; NAGA, R. C.; NARESH, K. SiO₂/ZnCl₂ catalyzed α-aminophosphonates and phosphonated N-(substituted phenyl) sulfonamides of 2-aminothiophene: synthesis and biological evaluation. **Der Pharma Chem**, v. 5, p. 61-74, 2013.
- SUZUKI, T.; GRÚZ, P.; HONMA, M.; ADACHI, N.; NOHMI, T. The role of DNA polymerase in translesion synthesis across bulky DNA adducts and cross-links in human cells. **Mutat Res.**, v. 791, p. 35–41, 2016.
- SZAKÁCS, G.; HALL, M. D.; GOTTESMAN, M. M.; BOUMENDJEL, A.; KACHADOURIAN, R.; DAY, B. J.; BAUBICHON-CORTAY, H.; DI PIETRO, A. Targeting the Achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance. **Chemical reviews**, v. 114, n. 11, p. 5753-5774, 2014.
- TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 157-170, 2013.
- TAHER, Y. A. Antinociceptive activity of *Mentha piperita* leaf aqueous extract in mice. **Libyan Journal Of Medicine**, v. 7, p. 1-5, 2012.
- TAKASHIMA, A.; FALLER, D. V. Targeting the RAS oncogene. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 17, n. 5, p. 507-531, 2013.
- TAKASHIMA, A.; FALLER, V. Targeting the RAS oncogene. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 17, n. 5, p. 507-531, 2013.

- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.
- TAVAKOLI, J.; MIAR, S.; ZADEHZARE, M. M.; AKBARI, H. Evaluation of Effectiveness of Herbal Medication in Cancer Care: A Review Study. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, v. 5, p. 144-156, 2012.
- TECCHIO, C.; CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived cytokines involved in physiological and pathological angiogenesis. In: **Angiogenesis, Lymphangiogenesis and Clinical Implications**. Karger Publishers, p. 123-137, 2013.
- TOCCHELLI, C. G.; GALLUCCI, G.; COPPOLA, C.; PISCOPO, G.; CIPRESSO, C.; MAUREA, C.; MAUREA, N. The emerging issue of cardiac dysfunction induced by antineoplastic angiogenesis inhibitors. **European journal of heart failure**, v. 15, n. 5, p. 482-489, 2013.
- TOOMER, K. H.; CHEN, Z. Autoimmunity as a double agent in tumor killing and cancer promotion. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 18, p. 1-14, 2014.
- TSUJI, K., NAKAMURA, K., OGINO, T., KONISHI, N., TOJO, T., OCHI, T.; MATSUO, M. Studies on anti-inflammatory agents. VI. Synthesis and pharmacological properties of 2, 3-diarylthiophenes. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 46, n. 2, p. 279-286, 1998.
- UKRAINTSEVA, S. V.; ARBEEV, K. G.; AKUSHEVICH, I.; KULMINSKI, A. M.; STALLARD, E.; YASHIN, A. I.. Factors That May Increase Vulnerability to Cancer and Longevity in Modern Human Populations. In: **Biodemography of Aging**. Springer Netherlands, 2016. p. 113-141.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VAN DER VELDT, A. A.; LUBBERINK, M.; BAHCE, I.; WALRAVEN, M.; DE BOER, M. P.; GREUTER, H. N.; ERIKSSON, J.; WINDHORST, A. D.; POSTMUS, P. E.; VERHEUL, H. M.; SERNÉ, E. H.; LAMMERTSMA, A. A.; SMIT, E. F. Rapid Decrease in Delivery of Chemotherapy to Tumors after Anti-VEGF Therapy: Implications for Scheduling of Anti-Angiogenic Drugs. **Cancer Cell**, v. 21, n. 1, p. 82-91, 2012.
- VERÇOSA, D.; MELOI, M.; CASSALI, G.; DANTAS-BARROSIII, A.; SILVA P. Influência de Agaricus blazei Murrill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 150-154, 2007.
- VICENTE-DUEÑAS, C.; ROMERO-CAMARERO, I.; COBALEDA, C.; SÁNCHEZ-GARCÍA, I. Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm. **The Embo Journal**, v. 32, n. 11, p. 1502-1513, 2013.

- VIEIRA, P. M. P. M.; COSTA, P. M. D.; SILVA, C. R. E.; CHEN-CHEN, L. Assessment of the Genotoxic, Antigenotoxic, and cytotoxic activities of the ethanolic fruit extract of *Solanum lycocarpum* A. St. Hill.(Solanaceae) by Micronucleus Test in Mice. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 6, p. 1409-1414, 2010.
- VILSMAIER, T.; RACK, B.; KÖNIG, A.; FRIESE, K.; JANNI, W.; JESCHKE, U. Influence of Circulating Tumour Cells on Production of IL-1 α , IL-1 β and IL-12 in Sera of Patients with Primary Diagnosis of Breast Cancer Before Treatment. **Anticancer Research**, v. 36, n. 10, p. 5227-5236, 2016.
- VOLTAN, R., CASCIANO, F., MILANI, D., ZAULI, G.; TISATO, V. Redox signaling and oxidative stress: cross talk with TNF-related apoptosis inducing ligand activity. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2016.
- VORONOV, E.; DOTAN, S.; KRELIN, Y.; SONG, X.; ELKABETS, M.; CARMI, Y.; RIDER, P.; COHEN, I.; ROMZOVA, M.; KAPLANOV, I.; APTE, R. N. Unique versus redundant functions of IL-1 α and IL-1 β in the tumor microenvironment. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 177, 2013.
- WAJANT, H. The role of TNF in cancer. In: **Death Receptors and Cognate Ligands in Cancer**. Springer Berlin Heidelberg, p. 1-15, 2009.
- WALDNER, M. J.; NEURATH, M. F. Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. In: **Seminars in immunopathology**, v. 31, n. 2, p. 249-256, 2009.
- WARD, P. S.; THOMPSON, C. B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 297-308, 2012.
- WEIDINGER, A.; KOZLOV, A. V. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 472-484, 2015.
- WEINSTEIN, A. M.; STORKUS, W. J. Therapeutic Lymphoid Organogenesis in the Tumor Microenvironment. **Advances in cancer research**, v. 128, p. 197- 233, 2015.
- WELTI, J.; LOGES, S.; DIMMELER, S.; CARMELIET, P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 8, p. 3190-3200, 2013.
- WILLINGHAM, A. T.; DEVEREAUX, Q. L.; HAMPTON, G. M.; AZA-BLANC, P. RNAi and HTS: exploring cancer by systematic loss-of-function. **Oncogene**, v. 23, n. 51, p. 8392-8400, 2004.
- WONG, M. M.; FISH, E. N. Chemokines: attractive mediators of the immune response. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2003. p. 5-14.
- WU, S.; RHEE, K. J.; ALBESIANO, E.; RABIZADEH, S.; WU, X.; YEN, H. R.; HUSO, D. L.; BRANCATI, F. L.; WICK, E.; MCALLISTER, F.; HOUSSEAU, F.; PARDOLL, D. M.; SEARS, C. L. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via

activation of T helper type 17 T cell responses. **Nature medicine**, v. 15, n. 9, p. 1016-1022, 2009.

XIAO, X. Y.; HAO, M.; YANG, X. Y.; BA, Q.; LI, M.; NI, S. J.; WANG, L. S.; DU, X. Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. **Cancer Letters**, v. 302, p. 69–75, 2011.

YADAV, L.; PURI, N., RASTOGI, V., SATPUTE, P.; SHARMA, V. Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors: a review. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 9, n. 6, p. 01, 2015.

YAO, M.; BRUMMER, G.; ACEVEDO, D.; CHENG, N. Chapter Eight-Cytokine Regulation of Metastasis and Tumorigenicity. **Advances in Cancer Research**, v. 132, p. 265-367, 2016.

YAQOOB, U.; CAO, S.; SHERGILL, U.; JAGAVELU, K.; GENG, Z.; YIN, M.; DE ASSUNÇÃO, T. M.; CAO, Y.; SZABOLCS, A.; THORGEIRSSON, S.; SCHWARTZ, M.; YANG, J. D.; EHMAN, R.; ROBERTS, L.; MUKHOPADHYAY, D.; SHAH, V. H. Neuropilin-1 Stimulates Tumor Growth by Increasing Fibronectin Fibril Assembly in the Tumor Microenvironment. **Cancer Research**, v. 72, n. 16, p. 4047-4059, 2012.

YING, L.; HOFSETH, L. J. An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. **Cancer Research**, v. 67, n. 4, p. 1407-1410, 2007.

ZAIIDI, M. R.; MERLINO, G. The two faces of interferon- γ in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 19, p. 6118-6124, 2011.

ZHANG, Y.; LIU, C.; PENG, H.; ZHANG, J.; FENG, Q. IL-1 receptor antagonist gene IL1-RN variable number of tandem repeats polymorphism and cancer risk: a literature review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e46017, 2012.

ZHU, D.; ZHANG, Y.; LAM, P. P.; DOLAI, S.; LIU, Y.; CAI, E. P.; CHOI, D.; SCHROER, S. A.; KANG, Y.; ALLISTER, E. M.; QIN, T.; WHEELER, M. B.; WANG, C. C.; HONG, W. J.; WOO, M.; GAISANO, H. Y. Dual role of VAMP8 in regulating insulin exocytosis and islet β cell growth. **Cell metabolism**, v. 16, n. 2, p. 238-249, 2012.

ZIGMOND, E.; BERNSSTEIN, B.; FRIEDLANDER, G.; WALKER, C. R.; YONA, S.; KIM, K. W.; JUNG, S. Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. **Immunity**, v. 40, n. 5, p. 720-733, 2014.

ANEXOS

ANEXO A- Certidão da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CAMPUS I – JOÃO PESSOA - PB

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

C E R T I D Ã O

João Pessoa, 01 de março de 2012

CEPA N° 0611/11

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Mariana Vieira Sobral Castello Branco

Orientando(a) : Ana Paula Gomes Moura

Departamento/Setor: CBiotec

Ref.:ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL E TOXICIDADE DE
ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Hyptis* DO NORDESTE..

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, ANALISOU e APROVOU a execução do projeto acima.

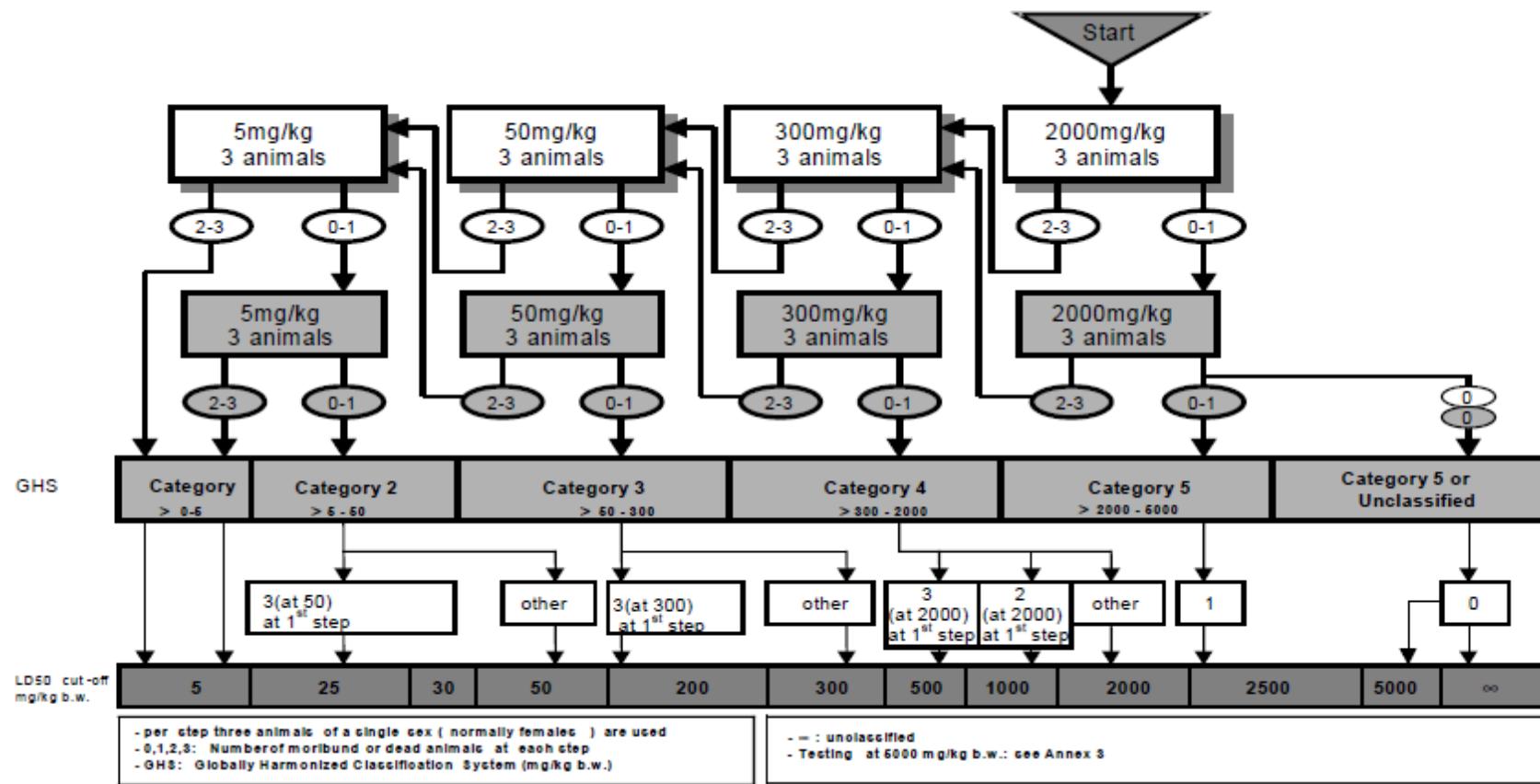
Número de animais: 186 camundongos.

Período: Até 06/2015.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do CBiotec/UFPB

ANEXO B – Fluxograma de realização do teste de toxicidade aguda com uma dose inicial de 2000 mg/kg



FONTE: OECD. Test Nº 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					
<u>Outras</u>					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
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					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					