

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

VIVIANNE MENDES MANGUEIRA

EFEITOS ANTITUMORAL E ANTINOCICEPTIVO DO n'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide (ACS-AZ), UM NOVO DERIVADO ACRIDÍNICO

**João Pessoa – PB
2019**

VIVIANNE MENDES MANGUEIRA

EFEITOS ANTITUMORAL E ANTINOCICEPTIVO DO n'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide (ACS-AZ), UM NOVO DERIVADO ACRIDÍNICO

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

2019

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

M277e Mangueira, Vivianne Mendes.
Efeitos antitumoral e antinociceptivo do
n?-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide
(acs-az), um novo derivado acridínico / Vivianne Mendes
Mangueira. - João Pessoa, 2019.
147 f. : il.

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

1. Derivados acridínicos. 2. Carcinoma Ascítico de
Ehrlich. 3. Atividade Antinociceptiva. 4. Toxicidade.
5. Imunomodulação. I. Sobral, Marianna. II. Título.

UFPB/BC

VIVIANNE MENDES MANGUEIRA

FEFEITOS ANTITUMORAL E ANTINOCICEPTIVO DO n'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide (ACS-AZ), UM NOVO DERIVADO ACRIDÍNICO

APROVADA EM / /

Marianna Vieira Sobral

Prof^a. Dr^a. Marianna Vieira Sobral

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Marcia Regina Piuvezam

Examinador Interno



Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães

Examinador interno

Prof^a. Dr^a. Jaciana dos Santos Aguiar

Examinador externo

Prof^a. Dr^a. Karina Carla de Paula Medeiros

Examinador externo

A realização do presente trabalho 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:

À **Deus**, por estar sempre ao meu lado e conduzir a minha vida, iluminando meus passos e me amando incondicionalmente. Quero agradecer por todas as oportunidades a mim concedidas, e, sobretudo pela fé, força e coragem, que me levam a prosseguir, além da proteção constante. A Ele entrego tudo, tudo que sou e tenho! Obrigada Senhor!

Aos meus pais, **Izabel Mendes Feitosa Mangueira** e **Vivaldo Mangueira Andriola**, por todo amor, carinho e cuidado que sempre dedicaram e continuam dedicando a mim. Por nunca medirem esforços para me educar (e eu sei que foram muitos), além das inúmeras renúncias que fizeram e fazem por mim até hoje e, que me permitiram chegar até aqui. Vocês representam o bem mais precioso que tenho! Que estas palavras expressem um pouquinho da minha gratidão por vocês. Amo muito vocês. Muito Obrigada!

Ao meu irmão **Wagner Mendes Mangueira** pelo companheirismo, incentivo, carinho, apoio e presença nos momentos mais difíceis, além da torcida nessa longa caminhada. Por fazer com que eu me sinta sempre protegida. Te amo Neguinho!

À **Maria Vitória**, minha sobrinha, uma princesa linda! Por um amor que não se mede e nem define, por brilhar constantemente em nossas vidas trazendo o que existe de melhor e mais puro. O maior e melhor presente que eu poderia ganhar! Titia te ama muito, Princesa!

Aos meus padrinhos, **Maria de Fátima Mangueira** e **José Augusto de Oliveira**, pelo amor, apoio e confiança, permitindo que eu realizasse meus sonhos e essa conquista! Vocês são referências para mim.

Aos meus tios, tias, primos e primas por representarem minha família, pelo incentivo, torcida e apoio sempre. Obrigada pela força!

Ao meu namorado, **Inácio Bento de Moraes Neto** por conseguir em tão pouco tempo, representar tantas coisas, se tornando tão importante e presente em minha vida, e ainda, por demonstrar sua torcida e apoio constantes por mim!

A minha cunhada, **Sheva Alencar** pela torcida, apoio e disponibilidade em me ajudar em todos os momentos que precisei.

À **Maria do Socorro Sousa**, amiga e muitas vezes mãe. Por estar sempre ao meu lado. Agradeço por todo amor, carinho, acolhida e todas as palavras de incentivo e apoio, além da grande torcida, sempre demonstrada, pelo meu sucesso.

A minha amiga, **Tatianne Mota Batista** por tantos anos de convivência, pela força, por se fazer presente e me escutar em todos os momentos, até nas horas em que não podia, tornando esses dias mais alegres e leves. Foram tantas as vezes que rimos e choramos, brigamos, aconselhamos, brincamos, pelas trocas de ensinamentos e conselhos pessoais (que foram muitos) e profissionais, enfim, por fazer parte da minha vida.

A minha amiga, **Tatyanna Kelvia** por ser uma pessoa maravilhosa e muito presente, permitindo que cultivássemos uma amizade que vai muito além do laboratório e da vida acadêmica, tendo o prazer de conviver.

A minha orientadora e amiga, Profa. Dra. **Marianna Vieira Sobral**, pela orientação e principalmente pela inteira dedicação e ensinamentos transmitidos. Agradeço pelo apoio e pelos momentos de aprendizado. Sua prestatividade, inteligência e constante alegria servirão de referência para minha vida pessoal e profissional, bem como suas palavras de acalento, carinho e força que muitas vezes são fundamentais para nos fazer continuar e jamais pensar em desistir! Agradeço pelo grande exemplo de vida, competência, profissionalismo, perseverança, amor e pela amizade construída. **Admiro muito!**

As minhas queridas amigas **Renata Abrantes e Ana Paula Gomes** por serem muito presentes, permitindo que cultivássemos uma amizade linda, forte e sempre buscando a Deus.

Aos amigos de pós-graduação do Laboratório de Oncofarmacologia (Oncofar), Daiana Frade, Thaís Honorato, Rafael Ferreira, Samia, Ana Luisa, Ana Luiza, Valgricia Sousa e Francisco de Assis pela ajuda e torcida durante toda essa caminhada, em especial, as amigas **Tatianne Mota e Tatyanna Kelvia, Renata Abrantes, Ana Paula Gomes e Ryldene Marques** pelo apoio e pela agradabilíssima convivência, estando sempre ao meu lado durante toda essa jornada independente do horário e dia da semana, sempre com alegria e boa vontade.

Ao auxílio dos amigos do Laboratório de Psicofarmacologia (CBiotec/UFPB), **Humberto Hugo e Renan Braga** com os estudos antinociceptivos.

Aos meus amigos de infância **Flávia Maiele, Thaise Maria e Francisco Barbosa** e a minha prima **Vanessa Alencar**, pela amizade e confiança, pela torcida e pelo apoio sempre, onde nem mesmo a distância nos afastou!

Aos amigos unidos pelo coração, Marlla Oliveira e Thales Linhares que mesmo de longe são bem presentes e muito especiais!

Aos professores doutores **Hemerson Iury Ferreira Magalhaes, Jaciana dos Santos Aguiar, Karina Carla de Paula Medeiros e Marcia Regina Piuvezam** pela gentileza de participar da avaliação deste trabalho.

Ao Professor Dr. **Ricardo Olimpio de Moura**, pela colaboração no fornecimento do material.

A minha turma de doutorado por tantos momentos desafiadores juntos, agradeço pelas experiências compartilhadas e pela amizade que cultivamos.

A todos os professores do doutorado, pelos ensinamentos científicos e lições de vida.

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

Ao amigo **José Crispim Duarte** pelo constante incentivo e apoio.

Ao funcionário e amigo **Seu Josué** pelo carinho e alegria contagiante.

A todos os **funcionários** do IPeFarM e as secretárias da Pós-graduação Nilmar e em especial, **Caroline Medeiros Mangueira** pelos serviços prestados.

A **Fátima do Laboratório Cardiovascular** pela disponibilidade, torcida e ajuda.

Ao **Biotério** Prof. Dr. Thomas George do IPeFarM pelo fornecimento dos animais.

A **CAPES** pela bolsa concedida durante o período de doutorado.

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

Muito obrigada!

Vivianne Mendes Mangueira

“A liberdade é tudo
E está nas tuas mãos
E ainda que o mundo queira me prender
Eu sei que posso viver
Pois livre sou, pois teu eu sou
A liberdade está em te servir
E ainda que me digam que sou tolo
Vou continuar assim
No inverso deste mundo
Que só pensa em receber
Sempre vou ser.
Livre como o vento
Amado como filho
Sem medo e sem lamento
Viver assim querendo
Amar-te sempre mais
Servir-te sempre mais
Buscando a tua vida
Teu infinito amor.
Toda verdade está na tua voz
E ainda que o ruído deste mundo
Tente me ensurdecer
Vou te seguir, vou te ouvir
A liberdade é reconhecer
Que a tua voz é fonte de certeza
De vida plena
Em tuas mãos seguras
Quero me sentir assim
Sempre assim!”

Pe. Fábio de Melo

MANGUEIRA, V. M. **EFEITOS ANTITUMORAL E ANTINOCICEPTIVO DE UM NOVO DERIVADO ACRIDÍNICO.** 2019. 147f. **Tese** (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

O câncer é considerado uma das causas mais comuns de mortalidade no mundo e designa um conjunto de doenças determinadas pela presença de células com alterações morfológicas e bioquímicas, e com proliferação sustentada. Problemas relacionados a eficácia, segurança e desenvolvimento de resistência ao tratamento impulsionam pesquisas de novas moléculas com potencial antitumoral. Além disso, efeitos fisiopatológicos associados ao câncer, como a dor, também são tratados com baixa efetividade. Os derivados acridínicos são descritos por apresentar diversas atividades biológicas, dentre essas, antitumoral e antinociceptiva. O objetivo deste trabalho foi investigar a toxicidade e as atividades antitumoral e antinociceptiva, bem como, os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito do derivado acridínico inédito n’-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide” (ACS-AZ). A toxicidade não clínica aguda de ACS-AZ em camundongos por via intraperitoneal (i.p.) nas doses de 300 ou 2000 mg/kg e sua DL50 (dose letal 50%) foi estimada em torno de 500 mg/kg, considerando o guia n. 423 da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD). A genotoxicidade foi realizado o teste do micronúcleo em sangue periférico de camundongos, sendo observado que ACS-AZ (150 mg/kg, i.p.) não induziu aumento no número de eritrócitos micronucleados, sugerindo baixa genotoxicidade *in vivo*. ACS-AZ (25 ou 50 mg/kg), após sete dias de tratamento (i.p.), mostrou significante atividade antitumoral *in vivo* em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE), considerando todos os parâmetros avaliados (volume, massa e viabilidade celular) ($p<0,05$). Em relação aos mecanismos de ação antitumoral, foi observado que ACS-AZ reduziu a microdensidade vascular peritumoral ($p<0,05$), bem como os níveis das citocinas IL-1 β e da quimiocina CCL-2 ($p<0,05$). Entretanto, aumentou os níveis de TNF- α e IL-4 ($p<0,05$) mostrando que ACS-AZ foi capaz de modular o microambiente tumoral inflamatório para exercer seu efeito antitumoral. Considerando o vasto papel do estresse oxidativo na propagação de tumores, foi avaliado o efeito de ACS-AZ por meio do ensaio fluorimétrico do 2,7-dichlorofluoresceina diacetato (DCFH-DA). Observou-se redução do nível de estresse oxidativo após tratamento com ACS-AZ (50 mg/kg) ($p<0,05$), o que sugere efeitos antioxidantes. Ainda, foi detectado que ACS-AZ (50 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 os parâmetros de toxicidade avaliados (parâmetros metabólicos, bioquímicos, hematológicos e histológicos), foi observado que ACS-AZ (50 mg/kg) induziu apenas hepatotoxicidade, caracterizada pela detecção de esteatose grau leve e processos degenerativos no tecido hepático. Em relação aos testes de antinocicepção, ACS-AZ (50 mg/kg, i.p.) apresentou potente atividade antinociceptiva de ação central nos testes de placa quente e, em ambas as fases do teste formalina ($p<0,05$), envolvendo a participação da via opioide nessa resposta. Portanto, é possível inferir que o ACS-AZ apresenta baixa toxicidade, atividade antitumoral via efeitos antiangiogênicos e imunomoduladores, e atividade antinociceptiva que envolve a via opioide.

Palavras-chave: Derivados acridínicos. Carcinoma Ascítico de Ehrlich. Atividade Antinociceptiva. Toxicidade. Imunomodulação.

MANGUEIRA, V. M. **ANTITUMORAL AND ANTINOCICEPTIVE EFFECTS OF A NEW ACRIDINE DERIVATIVES.** 2019. 147f. Thesis (PhD in Natural Products and Synthetic Bioactive) – UFPB / CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Cancer is considered one of the most common causes of mortality in the world and designates a set of diseases determined by the presence of cells with morphological and biochemical modifications, and with a sustained proliferation. Problems in the efficacy, safety and development of treatment resistance stimulates the research of new molecules with antitumor potential. In addition, pathophysiological effects associated with cancer, such as pain, are also treated with low effectiveness. Acridine derivatives are described as having several biological activities, among them, antitumor and antinociceptive activities. This study aimed to investigate the toxicity, the antitumor and the antinociceptive activities, as well as the possible mechanisms of action involved in the effect of the unpublished acridine derivative *n'*-(6-chloro-2-methoxy-acridin-9-yl)-2-cyanoacetohidrazide (ACS-AZ). Initially, the acute non-clinical toxicity evaluation of ACS-AZ in mice per intraperitoneal route (i.p.) were performed. ACS-AZ (300 or 2000 mg / kg) and its LD50 (50% lethal dose) was estimated around 500 mg / kg, according the guide n. 423 of the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). For the evaluation of the ACS-AZ (150 mg / kg, i.p.) genotoxicity, the micronucleus assay in the peripheral blood of mice were performed, ACS-AZ (150 mg / kg, i.p.) did not induce an increase in the number of micronucleated erythrocytes, suggesting low genotoxicity in vivo. ACS-AZ (25 or 50 mg / kg) after seven days of treatment (i.p.) showed significant in vivo antitumor activity in Ehrlich Ascitic Carcinoma (CAE) model, considering all parameters evaluated (volume, mass and cell viability) ($p<0,05$). Regarding the mechanisms of antitumor action, it was observed that ACS-AZ reduced peritumoral vascular microdensity ($p<0,05$), as well as the levels of IL-1 β cytokines and CCL-2 chemokine ($p<0,05$), and also increased the levels of TNF- α and IL-4 ($p <0.05$) showing that ACS-AZ was able to modulate the inflammatory tumor microenvironment to exercise its anti-tumor effect. Considering the large role of the oxidative stress in tumor propagation, the effect of ACS-AZ was evaluated by the fluorometric test of 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). Reduction of the oxidative stress level after treatment with ACS-AZ (50 mg / kg) ($p <0.05$) was observed, suggesting antioxidant effects. Furthermore, ACS-AZ (50 mg / kg) was shown to reduce nitric oxide (NO) production ($p <0.05$), a key mediator involved in growth, angiogenesis and tumor metastasis. Among all the parameters of toxicity evaluated (metabolic, biochemical, hematological and histological parameters), it was observed that ACS-AZ (50 mg / kg) induced only mild hepatotoxicity, characterized by the detection of mild grade steatosis and degenerative processes in hepatic tissue. Regarding the antinociceptive tests, ACS-AZ (50 mg / kg, i.p.) showed potent central-acting antinociceptive activity in hot plate tests and, in both phases of the formalin test ($p <0.05$), involving the participation of the opioid pathway in this response. Therefore, it is possible to infer that ACS-AZ presents low toxicity, antitumor activity via antiangiogenic and immunomodulatory effects, and antinociceptive activity involving the opioid pathway.

Key words: Acridine derivatives. Ehrlich Ascitic Carcinoma. Antinociceptive activity. Toxicity. Immunomodulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características biológicas do câncer	28
Figura 2. “Switch” angiogênico de vasos de células tumorais	30
Figura 3. Ilustração do microambiente tumoral	33
Figura 4. Representação do estresse oxidativo como desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes (à esquerda) e antioxidantes (à direita)	39
Figura 5. Estrutura do acridínico n’-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide (ACS-AZ)	54
Figura 6. Síntese para obtenção do composto ACS-AZ	59
Figura 7. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS-AZ (12,5; 25 ou 50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	77
Figura 8. Efeito do tratamento com ACS-AZ (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	78
Figura 9. Efeito do tratamento com ACS-AZ (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) na concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	80
Figura 10. Efeito do tratamento de sete dias com ACS-AZ (50 mg/kg, i.p.) na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em modelo de tumor de Ehrlich	81
Figura 11. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS-AZ (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) na produção de nitrito no fluido peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico Ehrlich	82
Figura 12. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS-AZ (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) na histologia de fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	88
Figura 13. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS-AZ (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) na histologia de rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	92
Figura 14. Efeito da administração de dose única (i.p.) de ACS-AZ (50 mg/kg) e morfina (6 mg/kg) na primeira e segunda fase do teste da formalina em camundongos.	94
Figura 15. Efeito da administração de dose única (i.p.) de ACS-AZ (50 mg/kg) e morfina (10 mg/kg) no teste da placa quente em camundongos	95

Figura 16. Efeito da administração de dose única (i.p.) da nal (5 mg/kg) sobre a 96
atividade antinociceptiva do ACSAZ (50 mg/kg) e morfina (6 mg/kg), na
primeira e segunda fase do teste da formalina em camundongos

Figura 17. Efeito da administração de dose única (i.p.) da NXZ (10 mg/kg) 97
sobre a atividade antinociceptiva do ACSAZ (50 mg/kg) e morfina (6 mg/kg), na
primeira e segunda fase do teste da formalina em camundongos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos da administração de doses únicas de ACS-AZ em camundongos	74
Tabela 2. Efeito da administração de dose única (i.p.) de ACS-AZ (150 mg/kg) e ciclofosfamida (50 mg/kg) no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após 48 horas do tratamento	75
Tabela 3. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS-AZ (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) no consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	83
Tabela 4. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS-AZ (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	84
Tabela 5. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS-AZ (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich	86
Tabela 6. Índices dos órgãos de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias (i.p.) com ACS-AZ (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg)	87
Tabela 7. Tempo de permanência na barra giratória (rota-rod) de camundongos submetidos ao tratamento (i.p.) com ACS-AZ (50 mg/kg) e Diazepam (1 mg/kg)	93

LISTA DE QUADROS E FLUXOGRAMAS

Quadro 1. Características físico-químicas do ACS-AZ	59
Fluxograma 1. Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade, atividade antitumoral e antinociceptiva de ACS-AZ	62

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	5-fluroacil
5-HT	5-hidroxitriptamina
μ	Receptor Peptídico Opiode Mú
AAM	Macrófagos Alternativamente Ativados
ACM	Macrófagos Classicamente Ativados
ACS-AZ	n'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide
AINES	Anti-Inflamatórios Não-Esteroidais
ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
CAE	Carcinoma Ascítico de Ehrlich
CC	β -Quimiocina
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDK	Cinase Ciclina-Dependentes
CDKI	Inibidores de Cinase Ciclina-Dependentes
CHCM	Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média
CO₂	Dióxido de Carbono
COX	Ciclo-Oxigenase
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
CXC	α -Quimiocina
DL50	Dose que causa 50% da letalidade dos animais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECM	Matriz Extracelular
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FdUMP	5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
GSH	Glutationa Reduzida

HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
ITQ	Inibidores de Tirosina Cinase
M/T	Mortos/Vivos
NO	Óxido Nítrico
ONCOFAR	Laboratório de Oncofarmacologia
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução Tampão Fosfato
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PLGF	Fator de Crescimento Placentário
PG	Prostaglandinas
PPgPNSB	Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
RNA	Ácido Ribonucleico
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SBED	Sociedade Brasileira de Estudos em Dor
SFB	Soro Fetal Bovino
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TH1	Linfócito T Auxiliar Tipo 1
TH2	Linfócito T Auxiliar Tipo 2
TH17	Linfócito T Auxiliar Tipo 17
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
2.1	Aspectos Gerais do Câncer	24
2.2	Angiogênese e microambiente tumoral	28
2.3	Estresse oxidativo e o papel do óxido nítrico no contexto do câncer	38
2.4	Considerações gerais sobre a dor	43
2.5	Farmacoterapia do câncer	48
2.6	Derivados acridínicos e o n'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide (ACS-AZ)	51
3	OBJETIVOS	56
3.1	Objetivo geral	56
3.2	Objetivos específicos	56
4	MATERIAL	58
4.1	Locais da pesquisa	58
4.2	Reagentes	58
4.3	Síntese do ACS-AZ	58
4.4	Linhagem de células tumorais	59
4.5	Animais e condições experimentais	60
4.6	Equipamentos	60
5	MÉTODOS	62
5.1	Estudos toxicológicos	63
5.1.1	Avaliação da toxicidade não clínica aguda	63
5.1.2	Avaliação da genotoxicidade	64
5.2	Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich	64
5.2.1	Volume do tumor, massa tumoral e viabilidade celular	64
5.2.2	Investigação do mecanismo de ação antitumoral	65

5.2.2.1	Avaliação do efeito antiangiogênico	65
5.2.2.2	Quantificação das citocinas IL-1 β , TNF- α , CCL-2, IL-4, IL-10 no lavado peritoneal	66
5.2.2.3	Investigação do estresse oxidativo	66
5.2.2.3.1	Ensaio do 2'7 – dicloro dihidrofluoresceína	66
5.2.2.3.2	Quantificação dos níveis de nitrito	67
5.2.3	Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich	67
5.2.3.1	Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração	67
5.2.3.2	Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos	68
5.2.3.3	Avaliação dos índices dos órgãos	68
5.2.3.4	Análises histológicas	69
5.3	Estudos psicofarmacológicos	69
5.3.1	Teste do <i>Rota rod</i>	69
5.3.2	Avaliação da atividade antinociceptiva	70
5.3.2.1	Teste da formalina	70
5.3.2.2	Teste da placa quente	71
5.3.2.3	Avaliação dos mecanismos de ação antinociceptiva	71
5.3.2.3.1	Participação do sistema opioide	71
5.3.2.3.2	Participação dos receptores opioidérgicos seletivos μ 1	72
5.4	Análise estatística	72
6	RESULTADOS	74
6.1	Estudos toxicológicos	74
6.1.1	Avaliação da toxicidade não clínica aguda	74
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, massa tumoral e viabilidade celular	76
6.2.2	Investigação do mecanismo de ação antitumoral	77

6.2.2.1	Avaliação do efeito antiangiogênico	77
6.2.2.2	Quantificação das citocinas IL-1 β , TNF- α , CCL-2, IL-4, IL-10	79
6.2.2.3	Investigação do estresse oxidativo	81
6.2.2.3.1	Ensaio do 2'7 – dicloro dihidrofluoresceína	81
6.2.2.3.2	Quantificação dos níveis de nitrito	82
6.2.3	Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich	83
6.2.3.1	Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração	83
6.2.3.2	Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos	84
6.2.3.3	Avaliação dos índices dos órgãos	87
6.2.3.4	Análises histológicas	87
6.2.4	Estudos psicofarmacológicos	93
6.2.4.1	Teste do <i>Rota rod</i>	93
6.2.4.2	Avaliação da atividade antinociceptiva	94
6.2.4.2.1	Teste da Formalina	94
6.2.4.2.2	Teste da placa quente	95
6.2.4.2.3	Avaliação dos mecanismos de ação antinociceptiva	95
6.2.4.2.3.1	Participação do sistema opioide	95
6.2.4.2.3.2	Participação dos receptores opioidérgicos seletivos μ 1	97
7	DISCUSSÃO	99
8	CONCLUSÃO	114
	REFERÊNCIAS	116
	ANEXOS	143

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o termo que designa um conjunto de doenças determinadas pela presença de células alteradas morfológica e bioquimicamente, as quais compartilham várias características, dentre elas: proliferação sustentada, propriedades de invasão e metástase, indução de angiogênese, inflamação promotora do tumor e evasão da destruição imune (HANAHAN, 2014; BENEDICTO; ROMAYOR; ARTETA, 2017; SANTOS et al., 2018).

Atualmente, o câncer é considerado uma das causas mais comuns de mortalidade no mundo. De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2018, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), no ano de 2018, houve 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes por câncer em todo o mundo, o que caracteriza a doença como um grave problema de saúde pública (FERLAY et al., 2018).

Em relação ao tratamento, várias abordagens podem ser utilizadas, tais como, cirurgia, radioterapia, imunoterapia, hormonoterapia, terapia alvo e quimioterapia, as quais podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação. A quimioterapia, modalidade mais comum de tratamento da doença, consiste em induzir uma variedade de lesões no DNA, que, por sua vez, ativa mecanismos de morte celular. No entanto, essa modalidade de tratamento apresenta muitas desvantagens, a exemplo da baixa especificidade, elevada toxicidade em células sadias e desenvolvimento de resistência que, em conjunto, diminuem a eficiência do tratamento (SALEM et al., 2016; PAJUELO-LOZANO et al., 2018).

Em relação aos efeitos fisiopatológicos associados com qualquer tipo de câncer, a dor é um dos sintomas mais temidos da doença e pode estar presente em qualquer fase do processo tumoral, constituindo um dos maiores danos ao indivíduo com câncer. Sendo assim, a dor representa um problema médico significativo, com alto custo social, para o qual cerca de metade dos indivíduos acometidos com a doença não recebem tratamento eficiente (HABBERSTAD et al., 2018).

A dor é frequentemente caracterizada como a resposta protetora do corpo a um estímulo potencialmente nocivo, mas também é um sintoma importante em um grande número de condições patológicas, como o câncer. Pode ser dividida em duas grandes categorias: dor fisiológica e dor patológica. A dor fisiológica (nociceptiva

aguda) é um sinal de alerta precoce essencial que geralmente provoca a retirada reflexa e, portanto, promove a sobrevivência, protegendo o organismo de (mais) lesão. Em contraste, a dor patológica (por exemplo, neuropática crônica) se refere a uma lesão que acomete o sistema somatossensorial (YAM et al., 2018). No câncer, a invasão tumoral no tecido causa pressão ou lesão direta do tecido neuronal, resultando em dor neuropática e ainda, o aumento na expressão de algumas citocinas inflamatórias (a exemplo de: IL1 β , CCL2 e IL6), também aumenta a sensibilidade a estímulos nociceptivos (ZHAO et al., 2014).

Assim, considerando a magnitude da problemática relacionada às duas condições mencionadas, câncer e dor, com o objetivo de investigar novos candidatos a fármacos em relação a seu potencial antitumoral e antinociceptivo, novos derivados acridínicos vêm sendo estudados, uma vez que essas estruturas apresentam relatos na literatura de atividade analgésica (SONDHI et al., 2004) e antitumoral (MANGUEIRA et al., 2017).

As acridinas são compostos heterocíclicos, derivados de antracenos, formados por dois anéis fundidos a um anel de piridina em posição central. É bem estabelecido que a estrutura planar desses anéis tricíclicos é o que lhes permite interferir com uma variedade de processos metabólicos, incluindo: inserção entre pares de bases de DNA, interação e inibição de enzimas celulares essenciais como topoisomerase tipo I e II, telomerase e proteínas quinases, e desta forma, promover diferentes atividades biológicas (SILVA et al., 2018; GOUVEIA et al., 2018).

Nesse contexto, vislumbrando o potencial farmacológico dos derivados da acridina e reconhecendo a importância descrita na literatura da amsacrina (m-AMSA), o protótipo do grupo utilizado clinicamente no tratamento de leucemias e linfomas, foi sintetizado o derivado acridínico n’-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide” (ACS-AZ), o qual não possui relatos na literatura de efeitos farmacológicos e toxicológicos. Desse modo, o presente trabalho se propôs a investigar a toxicidade e as atividades antitumoral e antinociceptiva, bem como, mecanismos de ação associados a esses efeitos do derivado acridínico ACS-AZ.

Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer

O genoma humano é constantemente desafiado pela espontaneidade do metabolismo do DNA, bem como de agentes ambientais, que podem induzir diferentes tipos de lesões no DNA, dentre as quais podem ser citadas, mutações genéticas (como quebra da dupla fita, substituição ou deleção de uma ou mais bases) e alterações epigenéticas (como metilação, acetilação ou fosforilação, além de uma grande variedade de modificações nas histonas). Assim, para manter a integridade genômica, as células possuem diversos mecanismos de reparo que são capazes de detectar e reparar os danos causados durante o processo de replicação do material genético (CICCIA; ELLEDGE, 2010; ROOS; THOMAS; KAINA, 2016; YANG et al., 2017a).

No entanto, defeitos no reparo dessas lesões podem induzir processos mutacionais que promovem o desenvolvimento de aberrações cromossômicas e, consequente, instabilidade genômica, o que permite o acúmulo de diferentes tipos de mutações. A instabilidade genômica é responsável por diferentes níveis de anormalidades cromossômicas resultando na tumorigênese, caracterizada pelo processo de formação de tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2011; CARTWRIGHT et al., 2017; NIK-ZAINAL; MORGANELLA, 2017).

Os tumores, ou neoplasias, correspondem a uma proliferação anormal do tecido, apresentando alterações morfológicas de forma parcial ou total, de tal modo que o seu tecido de origem pode ser irreconhecível, e são classificados em benignos ou malignos. As neoplasias benignas têm seu crescimento de forma organizada, geralmente lento e expansivo, e apresentam limites bem nítidos. Apesar de não invadirem os tecidos vizinhos, podem comprimir os órgãos e os tecidos adjacentes (YASMIN et al., 2015; ISRAEL et al., 2016).

São exemplos de tumores benignos: os osteomas, tumor ósseo primário, comum principalmente nas estruturas faciais e crânio (YUDOYONO et al., 2017); os lipomas, originados principalmente pelas células do tecido adiposo subcutâneo, mas ocasionalmente, podem se formar no tecido muscular (KOGURE et al., 2017); os condromas, tumores comuns e originados a partir da cartilagem hialina (BRAUN;

WEICHHARDT; UHLMANN, 2017); os adenomas hepatocelulares, originados a partir dos hepatócitos e classificados como tumores de desenvolvimento raro (BIOULAC-SAGE; SEMPOUX; BALABAUD, 2017); e os leiomiomas, originados no músculo liso e com maior frequência no miométrio uterino, trato gastrointestinal e pele (LUACES et al., 2007; FLORES; REYES, 2014).

No caso das neoplasias malignas, ou câncer, há manifestação de maior grau de autonomia e seu desenvolvimento inclui vários estágios que são classificados em: transformação, progressão, propagação, invasão de tecidos vizinhos, angiogênese e metástase, podendo ser resistentes ao tratamento e letal para o indivíduo. Os diferentes tipos de câncer são classificados, principalmente, pelos órgãos a partir dos quais são originados (YASMIN et al., 2015; ISRAEL et al., 2016; LIN et al., 2017).

Dentre as neoplasias malignas, encontram-se os sarcomas, originados em tecidos moles a exemplos de cartilagem, tecido adiposo, vasos sanguíneos, tecido muscular liso e estriado, bem como, podem ser originados em tecido ósseo. Correspondem a aproximadamente 1% de todas as neoplasias malignas em adultos (FRICKE et al., 2017). Já os carcinomas são originados dos epitélios de revestimento externo e interno e quando o epitélio é de origem glandular, passam a ser chamados de adenocarcinomas. Os carcinomas são considerados o tipo de câncer mais comum nos seres humanos, podendo surgir em praticamente todos os tecidos do nosso corpo (SÈBE et al., 2016; GAJULAPALLI et al., 2016).

Ainda dentro desse contexto, podem ser citados os gliomas, tumores primários originados de células da glia do sistema nervoso central, caracterizados por infiltração difusa no cérebro e alta taxa de recorrência (SAMPETREAN; SAYA, 2017); as leucemias, originadas a partir de tumores nos órgãos hematopoiéticos, classificadas em agudas e crônicas e ainda, de acordo com a linhagem de células que as originam, podendo ser, mieloide e/ou linfoide (CLEVEN; HOGENDOORN, 2017). E, por fim, os linfomas, que são originados a partir do tecido linfático (linfonodos ou gânglios), e classificados em dois tipos: linfomas de Hodgkin e os linfomas não-Hodgkin (DI FONZO et al., 2017).

O câncer é caracterizado como um importante e crescente problema de saúde pública, sendo considerada, uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo, no qual, a cada sete mortes, uma é contabilizada em decorrência do

câncer (VENTOLA, 2017). Em 2016, foram quantificados 1.685.210 novos casos de câncer e 595.690 mortes estimadas nos Estados Unidos. Em 2030, a carga global é estimada em 22,2 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes em todo o mundo (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016; MANGUEIRA et al., 2017).

Em relação ao Brasil, estima-se para o biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, para cada ano. Exetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil casos novos de câncer. O cálculo global corrigido para o sub-registro aponta a ocorrência de 640 mil casos novos (FERLAY et al., 2018; BRASIL, 2018). Dentre os tipos mais incidentes para o país, encontram-se os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina e cólon e reto, sendo os cânceres de próstata em homens (68 mil) e mama em mulheres (60 mil) os mais frequentes. Entretanto, apresentam ainda altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago (BRASIL, 2018).

Nos Estados Unidos, o câncer é a segunda causa mais comum de morte, sendo a neoplasia de mama a principal entre as mulheres (MOBLEY et al., 2017). Segundo dados recentes, diferenças nas taxas de incidência entre os gêneros demonstram que os homens estão inseridos em um grupo com maior risco de desenvolvimento da maioria dos tipos de cânceres não específicos do gênero (SCELO et al., 2017).

A razão para o desenvolvimento de muitos dos diferentes tipos de neoplasias ainda permanece desconhecida, no entanto, algumas causas são estabelecidas e incluem fatores de risco modificáveis (fatores externos) e não modificáveis (fatores internos). Os fatores de riscos modificáveis se referem, principalmente, ao estilo de vida do indivíduo como o uso de tabaco, consumo de álcool, dieta com alta ingestão de carboidratos refinados e gorduras saturadas e baixa ingestão de ácidos graxos poliinsaturados, fibras e vitaminas (principalmente folato, vitamina D e carotenoides), associados ao sedentarismo (baixa ou nenhuma atividade física), resultando no aumento da gordura corporal (ROMIEU; AMADOU; CHAJES, 2017).

Em relação aos fatores de riscos não modificáveis, encontram-se os hormônios; as condições imunológicas; e a idade, uma vez que, na grande maioria dos casos, o desenvolvimento de neoplasias é precedido por um longo período de latência que pode durar vários anos; e, por fim, as mutações genéticas e alterações epigenéticas. Esses fatores podem atuar simultaneamente ou em sequência para

iniciar e/ou promover a formação dos tumores (YASMIN et al., 2015; ROMIEU; AMADOU; CHAJES, 2017; YANG et al., 2017b).

A carcinogênese, caracterizada pelo processo de formação de tumores, é dividida em diferentes fases, classificadas em: iniciação, promoção e progressão (ERDEM et al., 2014; MUÑOZ-FONTELA, et al., 2016). A fase inicial inclui alterações celulares irreversíveis que exigem múltiplas mutações em *loci* diferentes. Em média, são necessárias de três a sete mutações para a transformação de células normais em células cancerosas. Essas mutações, geralmente, ocorrem nos genes responsáveis pelo controle celular, o que inclui os processos de proliferação, diferenciação e morte celular, e estão relacionadas a inativação de genes supressores de tumores, e/ou aumento da atividade de oncogenes, podendo também, estar associadas ou não, a outros genes que regulam a proliferação celular (IVANOVA et al., 2013; YASMIN et al., 2015; ABU-ZHAYIA et al., 2017; YI et al., 2017). A fase de promoção é a proliferação clonal das células alteradas na fase inicial, e a fase de progressão inclui a etapa agressiva e metastática da doença (SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

Os proto-oncogenes atuam normalmente em diferentes níveis da proliferação celular, e mediante processos mutacionais, originam os oncogenes que são genes relacionados ao surgimento de tumores. Dentre esses podem ser citados o RAS (MALUMBRES; BARBACID, 2003; FALEEL et al., 2016), MET, MYC e ERK (Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares) (SLATTERY et al., 2017).

Da mesma forma, mutações nos genes supressores de tumor que impedem a inibição da progressão do ciclo celular, facilitam o crescimento anormal de células transformadas. Exemplos incluem mutações nos genes que codificam as proteínas p53 (TP53) (TANG et al., 2007; INOUE; FRY; FRAZIER, 2016) e retinoblastoma (Rb) (SLATTERY et al., 2017).

No câncer, essas alterações em oncogenes e genes supressores de tumor conferem as células características peculiares ou marcadores que abrangem, de forma fundamental, sua etiologia e manutenção. Essas características expressam a capacidade biológica e a desregulação das propriedades bioquímicas e biomecânicas, contribuindo para a progressão neoplásica. São essas: evasão da destruição pelo sistema imune, sinalização proliferativa sustentada, não responsividade a sinais supressores de crescimento, ativação de invasão e

metástase, resistência à morte celular programada, imortalidade replicativa, reprogramação do metabolismo energético, indução de angiogênese e instabilidade do genoma e inflamação crônica (Figura 1) (HANAHAN; WEINBERG; 2011; CEKANOVA; RATHORE, 2014; PICKUP, 2014; HANAHAN, 2014).

Figura 1. Características biológicas do câncer



Fonte: Adaptado de HANAHAN, 2014.

2.2 Angiogênese e microambiente tumoral

Várias características são descritas para a progressão do processo neoplásico no câncer, dentre essas, encontra-se a indução de angiogênese e a formação de um microambiente tumoral que confere à interação de fatores intrínsecos e extrínsecos, permitindo o crescimento e o desenvolvimento tumoral, bem como, a sua disseminação metastática (HANAHAN, 2014; TAPIA-VIEYRA; DELGADO-COELLO; MAS-OLIVA, 2017; MANASA; KANNAN, 2017).

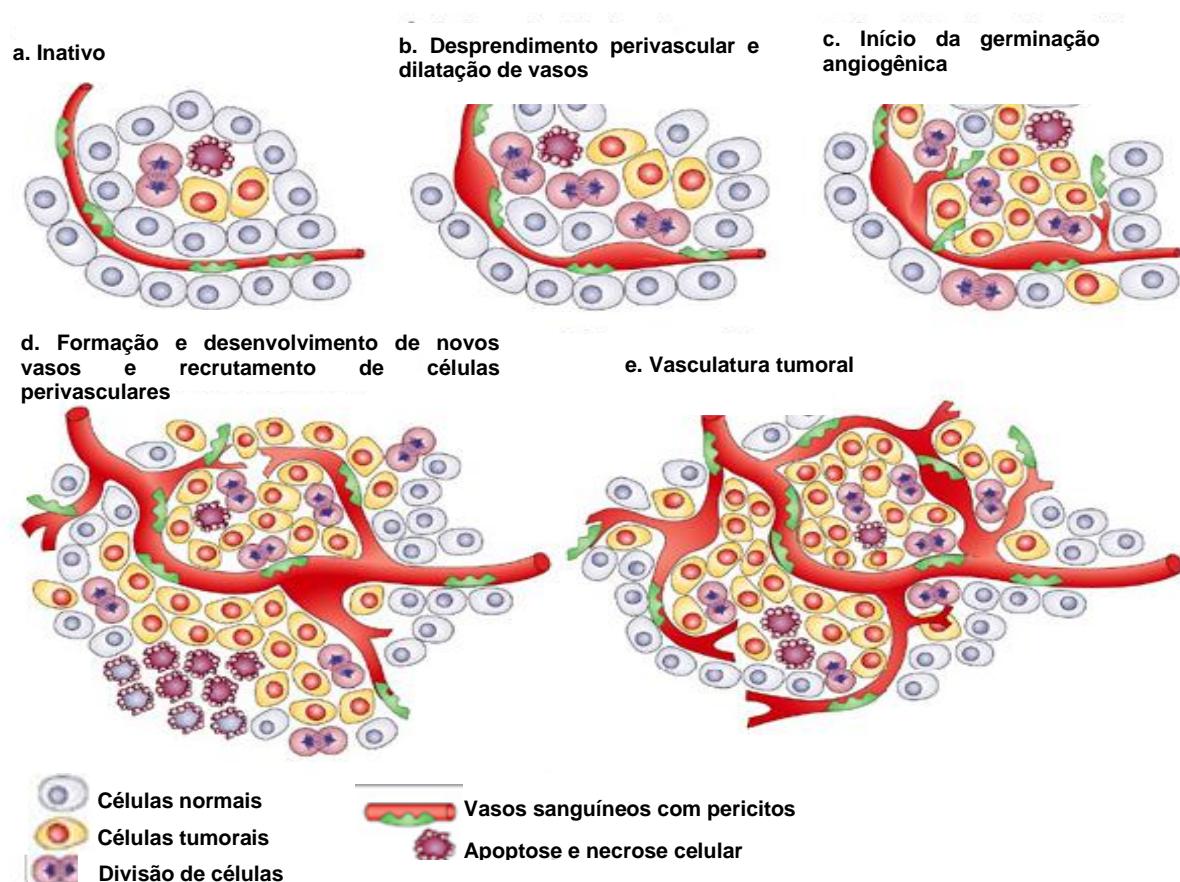
A angiogênese é um processo de múltiplos passos que consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, em condições fisiológicas e patológicas e dessa forma, essencial para o crescimento e progressão

de células neoplásicas de tumores sólidos e hematológicos, por manter o suprimento adequado de nutrientes e oxigênio (LAN et al., 2017; MANGUEIRA et al., 2017).

Em condições fisiológicas, a angiogênese é um processo natural e imprescindível para sobrevivência do indivíduo, uma vez que atua em diversos processos como: cicatrização, construção do revestimento interno do útero após a menstruação mensal em mulheres e ainda, é responsável por formar a placenta durante a gestação e participar da embriogênese (LAGANARO, 2016). Portanto, a angiogênese não é necessariamente maléfica, embora esteja envolvida em diferentes condições patológicas como os exemplos a seguir: degeneração macular relacionada à idade, aterosclerose, diabetes *mellitus* e por constituir uma das principais características responsáveis pelo desenvolvimento do câncer, permitindo seu crescimento em tamanho, além de aumentar seu suprimento sanguíneo inicial e, consequentemente, disponibilizar níveis de oxigênio e nutrientes maiores (JEONG et al., 2017; ALI et al., 2017).

Diante da teoria clássica da angiogênese tumoral, os tumores obtêm nutrientes e oxigênio por difusão no estágio inicial, mas quando o tamanho do tumor se torna maior, a difusão não pode mais atender às exigências do tumor em relação a quantidade de oxigênio e nutrientes; assim, o processo de angiogênese é iniciado. Desta forma, a angiogênese é essencial para o crescimento tumoral, bem como, para o processo de invasão e desenvolvimento de metástases (YANG et al., 2017c).

O início desse processo é conhecido como “Switch” angiogênico, pelo qual, os tumores adquirem a capacidade de crescer e disseminar além de seu local principal. Esse processo pode ser ativado por hipóxia, hipoglicemias, estresse mecânico e inflamação. O “Switch” angiogênico consiste em diferentes etapas que incluem: desprendimento perivascular e dilatação de vasos, germinação angiogênica, formação e desenvolvimento de novos vasos e recrutamento de células perivasculares (Figura 2) (LOIZZI et al., 2017).

Figura 2. “Switch” angiogênico de vasos de células tumorais

Fonte: LOIZZI et al., 2017.

Diferentes da vasculatura normal, os vasos tumorais são primitivos, não apresentam uma camada contínua de músculo liso e, muitas vezes, são constituídos por uma camada endotelial e um tecido conjuntivo, resultando em um sistema vascular com vazamento, que promove a metástase, facilitando o movimento das células tumorais na corrente sanguínea (LI et al., 2017).

Normalmente, a angiogênese é fortemente regulada por um equilíbrio de fatores antiangiogênicos e angiogênicos produzidos por células malignas e não malignas. Dentre alguns fatores antiangiogênicos, estão: interferon, interleucinas e inibidores de metaloproteinases da matriz. Em relação aos principais fatores angiogênicos, podem ser citados: o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), angiopoietina, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que consiste em um dos fatores mais

críticos e específicos para estimulação da angiogênese fisiológica e patológica (KONG et al., 2017).

O VEGF constitui uma grande família de fatores de crescimento que incluem VEGF-A, B, C, D e fator de crescimento placentário (PLGF) que diferem em relação ao seu padrão de expressão, especificidade do receptor e funções biológicas (GOEL; MERCURIO, 2013; LAN et al., 2017).

O VEGF-A, que é referido como VEGF, é o mais estudado dentre os membros desta família e a sua superexpressão, induzida principalmente por fatores de crescimento, oncogenes e hipóxia, está associada à progressão e ao mau prognóstico de vários tumores, incluindo câncer de mama, próstata e carcinoma hepatocelular. O VEGF possui dois receptores principais, VEGFR1 (Flt-1) e VEGFR2 (Flk-1/KDR), ambos estão presentes na superfície da célula endotelial, consistindo no fator predominante para ativação dessas células vasculares. A interação do VEGF com seus receptores inicia uma cascata de sinalização intracelular que resulta em proliferação, migração, permeabilidade e formação de tubos na estrutura das células endoteliais (LAN et al., 2017; ZHANG; DISSANAYAKA, 2017).

Concomitantemente, as metaloproteinases de matriz que degradam a matriz extracelular (ECM), induzem sua remodelação, e então, as células endoteliais migram através da ECM remodelada, mediadas pelo PDGF e quimiocinas. Na sequência, as células endoteliais proliferam, e favorecem o desenvolvimento do tumor (YANG et al., 2017c).

Atualmente, a inibição da angiogênese tornou-se um alvo importante no tratamento do câncer. Os tratamentos antiangiogênicos baseiam-se na inibição da neovascularização por bloqueio da interação entre o VEGF e outros fatores de crescimento envolvidos, com seus receptores específicos. No entanto, cada estágio da angiogênese e os fatores de sinalização relevantes nesse processo podem se tornar potenciais alvos terapêuticos. Atualmente, os inibidores disponíveis incluem: anticorpos anti-VEGF, receptores de VEGF solúveis que objetivam bloquear o VEGF circulante, e os inibidores da tirosina quinase (KAZEMI-LOMEDASHT et al., 2017).

Vários agentes antiangiogênicos foram aprovados pela FDA para o tratamento do câncer, como os inibidores da tirosina quinase: sorafenibe e sunitinibe, visando os receptores de VEGF; o Aflibercepte (VEGF-TrapR1R2) que é um receptor solúvel que bloqueia o VEGF circulante; e o bevacizumabe, um

anticorpo monoclonal anti-VEGF. Esses fármacos podem inibir a proliferação de células endoteliais sem influenciar outras fases da angiogênese (KAZEMI-LOMEDASHT et al., 2017).

Embora o bevacizumabe seja clinicamente eficaz e muito utilizado para o tratamento de pacientes com vários tipos de neoplasias, ele tem complicações frequentes que são relacionadas à inibição da sinalização de VEGF em células endoteliais normais, que expressam altos níveis de seus receptores. Desta forma, o tratamento com este fármaco está associado a efeitos colaterais graves como: sangramento, proteinúria, hipertensão, perfuração gastrointestinal e acidente vascular cerebral (KONG et al., 2017).

Outra problemática relacionada à terapia antiangiogênica, refere-se ao desenvolvimento de resistência que pode ser por diferentes mecanismos e, inclui: ativação de vias alternativas de sinalização pró-angiogênicas, atração de promotores da angiogênese e melhora da integridade vascular pela cobertura aprimorada por pericitos. Desta forma, um avanço no tratamento com antiangiogênicos consiste na administração desses fármacos em combinação com drogas citotóxicas, geralmente, em doses regulares e frequentes, reduzindo acentuadamente o intervalo entre os tratamentos (MANDER; FINNIE, 2018).

Diante do exposto, a identificação de novos alvos terapêuticos antiangiogênicos e o desenvolvimento de novos fármacos como tratamentos alternativos ou combinados com fármacos existentes, bem como, a compreensão das vias moleculares envolvidas na comunicação entre as células tumorais e as células do seu microambiente são fundamentais para a terapia do câncer com foco na melhora da qualidade de vida e sobrevida de indivíduos acometidos com a doença (WROBLEWSKI et al., 2017).

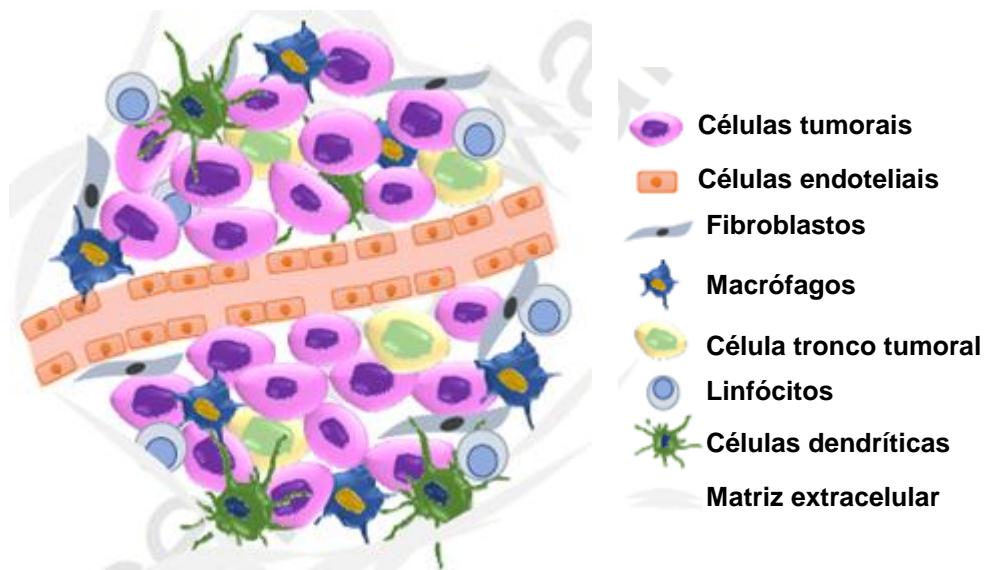
Durante muitos anos, estudos e pesquisas relacionadas ao câncer foram limitados apenas às células tumorais, ignorando o ambiente criado pelo tumor, sendo até então, caracterizado como processo celular autônomo. No entanto, os tumores foram identificados como estruturas heterogêneas, constituídos por um número variado de componentes celulares e não celulares que são cruciais para o processo tumorigênico (NGABIRE; KIM, 2017).

O microambiente tumoral consiste em vários tipos celulares, tais como, células-tronco tumorais, células do estroma que incluem fibroblastos, macrófagos,

linfócitos, neutrófilos, mastócitos, células derivadas da medula óssea, endotélio vascular e linfóide, pericitos, células musculares lisas; bem como componentes não celulares, a exemplo de nervos, enzimas de degradação e remodelação, e proteínas da matriz extracelular (Figura 3) (HANSEN; COLEMAN; SOOD, 2016; LOIZZI et al., 2017; PRALL et al., 2017). Essas células inseridas no microambiente tumoral interagem entre si, e formam redes de comunicações intrínsecas promovendo alterações em suas características que são cruciais para o desenvolvimento do câncer (NAITO et al., 2017).

No entanto, a composição exata do microambiente tumoral é variável de acordo com o tecido. Alguns tipos de células, tais como, fibroblastos e células endoteliais constituem parte do parênquima tecidual antes do início da tumorigênese. E em consequência da resposta imune/inflamatória, várias dessas células são recrutadas de locais distantes, moduladas por fatores humorais, como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (MUNTIMADUGU; KOMMINENI; KHAN, 2017).

Figura 3. Ilustração do microambiente tumoral



Fonte: MUNTIMADUGU; KOMMINENI; KHAN, 2017.

Portanto, a inflamação crônica, que é caracterizada como resposta de defesa do sistema imunológico em um período de tempo prolongado, tem sido frequentemente associada a diferentes condições patológicas, dentre elas, doenças

cardiovasculares, pulmonares, neurológicas, diabetes e câncer. Em alusão ao câncer, aproximadamente 25% dos casos estão relacionados a essa condição, com consequente ativação dos estágios da carcinogênese (NETEA et al., 2017; LEE et al., 2017a).

Nesse contexto, existem três principais perfis de linfócitos T auxiliares (T *helper*, Th) envolvidos, que podem ser classificados de acordo com o tipo de citocinas que secretam e a resposta que induzem, são eles: **Th1**, em sua maioria, citocinas pró-inflamatórias (Interferon - INF- γ , fator de necrose tumoral alfa - TNF- α e algumas interleucinas, incluindo IL-1, IL-2, IL-6, IL-7), **Th2**, compreende as citocinas com caráter anti-inflamatório (IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) e **Th17** (IL-17) (LEE et al., 2017b; PRAJEETH et al., 2017).

Dados atuais relacionados a essas moléculas descrevem um efeito dual de sua ação em resposta a progressão e inibição do tumor que depende da plasticidade das células imunes, do fenótipo no microambiente inflamatório do tumor e de seus fatores secretórios, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas proteolíticas. Desta forma, as IL-1 (IL-1 α e IL-1 β , principais tipos), constituem uma das citocinas mais abundantes e influentes no microambiente tumoral. As IL-1 α produzidas por macrófagos e mastócitos associados ao tumor, por exemplo, exercem seus efeitos antitumorais em decorrência da sua capacidade de ativar e direcionar células imunes inatas e adaptativas que podem inibir a progressão do tumor por estimular, principalmente a fagocitose (SHRIHARI, 2017; MALIK; KANNEGANTI, 2018).

Em relação a IL-1 β , reconhecida por ser uma citocina do perfil Th1, com atividade citotóxica sobre as células tumorais, também apresenta vários efeitos pró-tumorais, uma vez que, está envolvida em todas as fases da tumorigênese, tais como, progressão e invasão tumoral. A atividade pró-tumoral dessa molécula no microambiente do tumor decorre, principalmente, da capacidade de induzir hematopoiese, inflamação e controle da resposta imune. IL-1 β extracelular age direta ou indiretamente induzindo uma cascata de outros genes pró-inflamatórios, tais como, a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), quimiocinas/citocinas, metaloproteinases de matriz e ciclo-oxigenase tipo 2 (COX-2) em diferentes células que contribuem para a invasão tumoral, uma vez que previne a ativação e maturação de células apresentadoras de抗ígenos no tumor, envolvidas na

regulação positiva da carcinogênese, crescimento tumoral, invasão e metástase (APTE; VORONOV, 2017; MANTOVANI; BARAJON; GARLANDA, 2018).

A citocina pró-inflamatória TNF- α , induzida em resposta a vários processos patológicos, incluindo cânceres, infecções e inflamações, é produzida principalmente, por macrófagos, linfócitos, células dendríticas e mastócitos. Em nível molecular, os efeitos do TNF- α dependem da ligação ao receptor específico do TNF- α (TNF-R) I e II e subsequente sinalização intracelular através do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e das vias da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Os três principais tipos de MAPK, a quinase 1/2 (ERK1/2) regulada por sinais extracelulares, a MAPK p38 e quinase N-terminal c-Jun (JNK), regulam a expressão gênica pela fosforilação de quinases (CHEN et al., 2016; KIM et al., 2018).

Esta citocina pró-inflamatória pode inibir a proliferação de tumores promovendo a apoptose, no entanto, também pode ser considerado um agente pró-tumorigênico, uma vez que induz potentes efeitos angiogênicos que estimulam crescimento tumoral e metástase (BARBOSA et al., 2018).

Em relação as quimiocinas, essas podem ser classificadas principalmente em dois grupos de acordo com a posição dos resíduos de cisteína na sequência primária de aminoácidos, –CXC (ou α -quimiocina) e CC (ou β -quimiocina). As quimiocinas são críticas para a resposta inflamatória e são secretadas para recrutar células do sistema imunológico em resposta à infecção viral e distúrbios alérgicos, e ainda, podem estar envolvidas na modulação da migração de células normais. No entanto, também foi observado que as quimiocinas estão relacionadas com a iniciação ou progressão de uma variedade de tumores (WANG et al., 2017a).

O padrão de quimiocinas expressas no local do tumor desempenha um papel vital na orientação e diferenciação de fagócitos de macrófagos, que modulam a adequação do microambiente tumoral para a progressão do câncer. A quimiocina pró-inflamatória CCL2, também conhecida como proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), cuja atividade é mediada pela ligação ao receptor CCR2, recruta diferentes subconjuntos de células mieloides que contribuem para a proliferação de células tumorais, favorecendo o microambiente inflamatório do tumor, uma vez que é uma das quimiocinas mais abundantes nesse microambiente, e contribui ainda, para a evasão da resposta imune, angiogênese e metástase. Desta forma, é importante ressaltar que o bloqueio de CCL2 mostrou um impacto terapêutico eficaz em

modelos de câncer pré-clínico, a exemplo do câncer de próstata, nos quais anticorpos neutralizantes contra CCL2 atenuaram 96% da carga tumoral *in vivo* (LUBOWICKA et al., 2018; CHEN et al., 2018; YU et al., 2018).

Em relação as citocinas anti-inflamatórias, a IL-4 é uma das citocinas mais importantes do sistema imunológico, tendo seus níveis aumentados em vários tipos de cânceres primários e metastáticos, uma vez que exerce importante atividade na progressão tumoral. Evidências clínicas mostram que a ligação de IL-4 ao receptor IL-4 de Tipo II (IL-4R α), encontrado em células não linfóides, inicia uma cascata de sinalização que ativa a via JAK/STAT (particularmente STAT6), bem como MAPK e as funções de sobrevivência celular de Akt, desta forma, a consequência bioquímica da ativação desse receptor é o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas que podem contribuir para aumentar a proliferação celular e a resistência à terapia do câncer (LIU et al., 2017). Diante do exposto, foi evidenciado também, que o bloqueio da sinalização de IL-4 pode retardar significativamente a proliferação de células cancerígenas (ITO et al., 2017).

Por outro lado, a IL-4 também é descrita por sua atividade antitumoral, caracterizando o seu efeito dual, mediante a regulação da resposta imune antitumoral (ALIZADEH et al., 2018). Este efeito está relacionado a infiltração de eosinófilos e macrófagos induzidos por TNF- α e IL-1 β no tumor (MERHEB; ABDEL-MASSIH; KARAM, 2019).

Em relação a IL-10, produzida por todas as células imunes, incluindo monócitos, macrófagos, mastócitos, granulócitos, linfócitos T e B, células dendríticas, queratinócitos e também, por células tumorais, é bem descrito que essa citocina apresenta importante atividade anti-inflamatória e/ou antitumoral mediada pela imunossupressão das células tumorais, decorrente do aumento da proliferação de células B e produção de anticorpos, bem como, pela inibição de NF- κ b, inibição da produção de TNF- α , IL-6 e IL-12, e ainda por inibir a liberação de citocinas Th1. Foi identificado também que a produção de IL-10 a partir de células T reguladoras (Tregs) CD25, regula a infecção crônica e a resposta imune, evitando assim, o câncer induzido por inflamação (SHRIHARI, 2017; LENART et al., 2017).

No entanto, a literatura também discorre sobre a capacidade de IL-10 induzir a progressão tumoral por inibir a apoptose de células tumorais e estimular a proliferação celular, além de aumentar a susceptibilidade a metástases, por meio da

conversão de macrófagos associados ao tumor ao fenótipo M2 que são as células predominantes nos tumores (FOGUER et al., 2016).

As células Th17 produtoras de IL-17 não secretam moléculas citotóxicas, mas recrutam células de defesa específicas, tais como, células T CD4⁺ e T CD8⁺ que são responsáveis pela produção de INF- γ , células NK e células dendríticas (células apresentadoras de抗ígenos) para o microambiente tumoral, induzindo atividade antitumoral. Ao mesmo tempo, estudos recentes mostraram que a IL-17 ao atingir o estroma é capaz de promover a angiogênese tumoral pela produção de VEGF, efeito que pode promover o crescimento do tumor (NAGARSHETH; WICHA; ZOU, 2017). Outra possibilidade do seu envolvimento na progressão tumoral baseia-se na ativação de receptores específicos tipo A (IL-17RA), ativando ERK, p38 MAPK e a sinalização mediada por NF- κ B que promove a proliferação de células epiteliais tumorigênicas (WANG, 2017a).

No microambiente tumoral, os macrófagos possuem dois fenótipos principais, tipo 1 (ACM) que são macrófagos classicamente ativados e o tipo 2 (AAM) que são alternativamente ativados, ambos desempenham importante papel na tumorigênese mediante regulação de várias funções, como adesão celular, apoptose e senescência. Foi observado que os macrófagos ACM agem no processo inicial da tumorigênese, exercendo efeitos antitumorais por meio da liberação de quimiocinas CXCL9 e CXCL10 e recrutamento de linfócitos Th1 que secretam TNF- α , induzindo atividade antitumoral ao aumentar a produção de IL-2 e IL-12 e por diminuir a produção de IL-10. Por outro lado, os macrófagos AAM são células predominantes nos tumores já estabelecidos, sendo estimulados por IL-4 e IL-10 que também são produzidos pelas próprias células tumorais, criando um microambiente imunossupressor que permite a progressão tumoral. Além disso, a diminuição da relação dos macrófagos ACM/AM também pode influenciar a sobrevivência do tumor (MATEU-JIMENEZ et al., 2017; SHRIHARI, 2017).

Desta forma, o equilíbrio entre sinais pró e anti-inflamatórios fornecidos por diferentes populações de células T são essenciais para a manutenção da fisiologia normal, bem como para a supressão do desenvolvimento do câncer. As células tumorais raramente encontram um ambiente uniforme, na maioria das vezes, eles têm que lidar com um microambiente químico emaranhado onde a quimiotaxia é

guiada por gradientes de concentração de quimiocinas e fatores de crescimento (AHN et al., 2017).

As células do estroma e o microambiente tumoral modulam a sensibilidade do tumor, afetando a sinalização das células tumorais, a proliferação e a resistência aos medicamentos, uma vez que o crescimento tumoral está associado à alteração mecânica no microambiente incluindo aumento da rigidez da matriz e do fluxo de fluido intersticial. Desta forma, o microambiente tumoral limita a capacidade das drogas para permear o tecido tumoral e alcançar as células tumorais em concentração letal. Baseado na heterogeneidade do microambiente, gradientes de concentração de drogas e a proliferação celular, influenciam a sensibilidade das células tumorais à droga usada no tratamento, sendo considerada uma das causas de resistência às drogas anticancerígenas (MUNTIMADUGU; KOMMINENI; KHAN, 2017).

Em contraste com o tecido normal, o microambiente tumoral é caracterizado por anormalidades vasculares, hipóxia, má perfusão vascular, baixo pH e estados metabólicos alterados. Modulando essas propriedades do microambiente, os pesquisadores podem projetar sistemas eficientes para entrada dos fármacos no microambiente e células tumorais (MUNTIMADUGU; KOMMINENI; KHAN, 2017; AHN et al., 2017).

Diante do exposto, fica claro que a elucidação das interações celulares complexas dentro do microambiente tumoral continua a ser um dos principais desafios no tratamento do câncer. Tornou-se cada vez mais reconhecido que o estudo do câncer não pode ser simplificado para coleções homogêneas de células neoplásicas, mas deve ser estudado como sistemas multicelulares complexos para refletir adequadamente as interações entre células malignas e não malignas (PRALL et al., 2017).

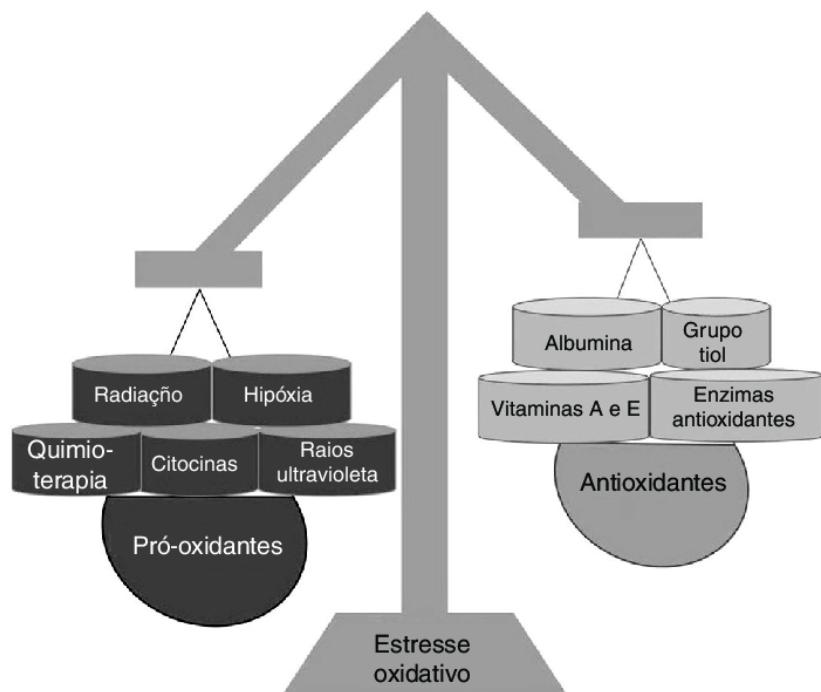
2.3 Estresse oxidativo e o papel do óxido nítrico no contexto do câncer

O estresse oxidativo é uma condição metabólica bem caracterizada, correlacionada com o desenvolvimento de enfermidades crônicas e/ou

degenerativas, a exemplo das doenças inflamatórias, cardiovasculares, endócrinas e oncológicas (SILVA; JASILIONIS, 2014; CAMPOS; LEME, 2017).

Por definição, estresse oxidativo/nitrosativo é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) e as defesas antioxidantes que são produzidas para neutralizar suas ações (Figura 4). Radicais livres, dentre estes, radicais superóxido ($O_2\cdot-$), hidroxila ($HO\cdot$), oxigênio singlet (1O_2), radical peroxila ($LOO\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são moléculas químicas instáveis e altamente reativas que contém um ou mais elétrons não pareados, produzidos a partir de reações não enzimáticas de compostos orgânicos ou reações induzidas por agentes exógenos, como radiações ionizantes. Quando esses radicais livres e demais moléculas surgem em decorrência de reações oxidativas ou nitrosativas nos sistemas biológicos passam a ser denominados de ROS e RNS, podendo dar início a uma cascata de reações fisiológicas e patológicas. Importantes exemplos dessas reações incluem peroxidação lipídica, dano proteico e danos oxidativos em ácidos nucleicos (BETTERIDGE, 2000; HRYCAY, 2015; LUCIO et al., 2018; HARDY et al., 2018).

Figura 4. Representação do estresse oxidativo como desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes (à esquerda) e antioxidantes (à direita).



Fonte: LUCIO et al., 2018.

Originalmente considerado um subproduto simples da respiração mitocondrial e de outras vias metabólicas que incluem peroxissomos, citocromo P450 e monoamino oxidases, é agora bem entendido que as ROS podem ser geradas por várias fontes celulares endógenas de uma forma regulada. As principais entre essas são as NADPH oxidases (NOxes), uma família de complexos enzimáticos (NOX1-5 e DUOX1/2) que geram ROS (O_2 e/ou H_2O_2) como seu principal produto de atividade enzimática (LITTLE et al., 2017).

Embora a elevação transitória de ROS possa ser mediador de diversas doenças por causar danos oxidativos às membranas celulares e macromoléculas, a sua concentração em quantidades baixas é essencial e fisiologicamente benéfica ao organismo, desempenhando importante papel de defesa na sinalização celular e fagocitose (MINGORI et al., 2017). Em condições normais, a produção de espécies reativas durante o metabolismo aeróbico é regulada pelo sistema antioxidante, que age como sequestrador e neutralizador de espécies reativas. O sistema antioxidante é composto por dois tipos de barreiras, uma enzimática, constituída pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase, glutarredoxinas, tiorredoxinas e catalase, e outra não enzimática, constituída, por exemplo, por glutationa reduzida (GSH), vitaminas e polifenois (TÖNNIES; TRUSHINA, 2017).

No contexto do câncer, as células tumorais são tipicamente caracterizadas por quantidades elevadas de ROS em comparação com as células normais, alterando as vias de sinalização e os processos metabólicos, contribuindo, dessa forma, para a progressão do câncer (BRENNEISEN; REICHERT, 2018).

Esse aumento está relacionado com a proliferação sustentada e o metabolismo elevado de células tumorais, permitindo que elas funcionem sob altos níveis de estresse oxidativo, expressando uma grande variedade de genes que respondem a altos níveis de ROS, sendo essencial para manter o crescimento, invasão, metástase, e ainda, conferindo alguma capacidade de resistência destas células ao tratamento quimioterápico (ZHANG et al., 2018).

A contribuição de ROS no câncer é claramente muito complexa, e ocorre em todas fases da carcinogênese. Na fase de iniciação, por exemplo, as ROS podem contribuir para a instabilidade genômica induzindo dano oxidativo direto ao DNA provocando lesões mutagênicas que, se não forem reparadas, induzem a instabilidade genômica a qual favorece o início do desenvolvimento do tumor ou

podem promover a peroxidação lipídica que também pode gerar subprodutos mutagênicos, como malondialdeído ou 4-hidroxinonenal, causando danos ao DNA. ROS também provocam alterações epigenéticas, modificando a expressão gênica, as quais são capazes de ativar ou inativar as vias de sinalização celular que controlam a proliferação, migração, diferenciação ou sobrevivência, induzindo modificações pós-traducionais mediadas por reações redox específicas em alvos sensíveis, tais como, proteínas-cinases ou fosfatases (ROY et al., 2015; LITTLE et al., 2017).

Na fase de promoção, o estresse oxidativo está envolvido na regulação da atividade de fatores transpcionais, tais como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a 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 a via do fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K)/AKT, o que pode resultar na inativação de proteínas pró-apoptóticas e na regulação de genes antiapoptóticos, uma vez que, a AKT fosforilada (p-AKT) desempenha um papel protetor nas células sob condições extremas, incluindo o estresse oxidativo (KATAKWAR; NAIK; MITTAL, 2016; ZHOU et al. 2016; GALADARI et al., 2017; YANG et al., 2017d).

Por fim, na fase de progressão, ROS afetam diferentes vias de sinalização, incluindo fatores de crescimento e vias de mitose, controlando muitos processos celulares, incluindo proliferação e metástase. Ainda, 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, fundamentais para a metastização. Neste contexto, o aumento do estresse oxidativo causado por ROS pode reduzir a defesa antioxidante do organismo contra angiogênese e metástase em células cancerígenas que são os principais processos no desenvolvimento do câncer (NOURAZARIAN; KANGARI; SALMANINEJAD, 2014; KATAKWAR; NAIK; MITTAL, 2016; CALAF et al., 2018).

De forma mais específica, ROS podem mediar a apoptose por meio da regulação da expressão de várias proteínas pró-apoptóticas, tais como caspases, p21 e p53, e por meio da ativação de receptores para morte celular. A ativação da proteína p53 promove a parada do ciclo celular na fase G1, por meio da indução da

transcrição de p21, que é uma inibidora de cinase dependente de ciclina (CIRCU; AW, 2010; AL-SARAN et al., 2016).

O óxido nítrico (\bullet NO) é uma molécula sinalizadora gasosa e lipofílica de radical livre que regula numerosas condições fisiológicas e patológicas. A biologia do NO emergiu de duas importantes linhas de pesquisa, a primeira: através do fator relaxante derivado do endotélio, sendo importante para o processo de vasodilatação de células endoteliais e a segunda, a partir de estudos sobre o papel do NO na resposta imune a infecções e ao câncer (KHAZAN; HDAYATI, 2014; KITANO et al., 2018).

O NO é produzido por uma família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS) a partir da conversão de um dos dois nitrogênios de L-arginina em L-citrulina na presença de O_2 e dos co-fatores enzimáticos requeridos, tais como NADPH (Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina), FAD (Dinucleotídeo de Flavina) e BH4 (4-hidrobiopterina) (FORSTERMANN; SISSA, 2012; RAHAL, 2014). A óxido nítrico sintase (NOS) possui três isoformas: a endotelial (e-NOS ou NOS-3) e a neuronal (n-NOS ou NOS1), que são formas constitutivas e dependentes do íon Ca^{+2} para sua ativação, e a forma induzível iNOS/NOS-2, isoforma independente de Ca^{+2} , cuja expressão e ativação é estimulada em condições adversas na presença de mediadores envolvidos no processo inflamatório (KHAZAN; HDAYATI, 2014; SOMASUNDARAM et al., 2018).

Altos níveis de NO induzem genotoxicidade e modificação de proteínas, e ainda neste contexto, foi identificado que níveis altos de NO também podem resultar em desaminação levando à transição de citosina em timina no DNA. Investigações posteriores mostraram que níveis ainda mais elevados, poderiam inibir sistemas específicos de reparo do DNA, particularmente aqueles que são dependentes de tiol, tais como as alquil transferases (SOMASUNDARAM et al., 2018). Assim, em altas concentrações, o NO induz dano ao DNA, apoptose e morte celular (CHOUDHARI et al., 2013; SINHA et al., 2018).

No entanto, o NO apresenta um efeito dual em relação ao câncer, uma vez que modula diferentes eventos relacionados ao tumor. Esses efeitos dependem da concentração de NO, do microambiente e do ciclo celular no tumor, e ainda, do estado redox e do tempo de exposição (MOCELLIN; BRONTE; NITTI, 2007; BAZAK et al., 2017).

Desta forma, uma série de estudos sugerem ainda, que a exposição contínua a concentrações de NO que variam de moderadas a altas, produzidas pela iNOS, promove a transformação neoplásica e o início do tumor. Eses efeitos estão relacionados a evasão de apoptose, aumento da proliferação celular, aumento da inflamação e resistência imune, resistência quimioterápica e angiogênese (BASUDHAR et al., 2017; DAVILA-GONZALEZ; CHANG; BILLIAR, 2017; WANG et al., 2018b).

Em relação a angiogênese tumoral induzida pelo NO, esse processo ocorre mediante regulação positiva do VEGF, onde a neovascularização induzida por VEGF pode aumentar a capacidade metastática dos tumores. Ainda, o NO aumenta o fluxo sanguíneo do tumor e promove a angiogênese, o que poderia explicar a correlação positiva entre a biossíntese do NO e o grau de malignidade. Embora vários relatos abordem os efeitos pró tumorais do NO, poucos demonstram o papel contrastante do NO na mediação da regressão tumoral. Desta forma, tem sido sugerido que as concentrações de NO encontradas nos tumores são insuficientes para produzir apoptose e outros efeitos tumoricidas e provavelmente favorecem a angiogênese e a disseminação do tumor (MUNDER, 2009; VAHORA et al., 2016; AVTANDILYAN et al., 2018).

2.4 Considerações Gerais sobre a dor

A dor é uma experiência complexa envolvendo componentes sensoriais, cognitivos e motivacionais que, de acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain* – IASP), está associada a lesões teciduais reais ou potenciais, ou descrita nos termos dessa lesão (SANTOS et al., 2015; BASTUJI et al., 2018).

A dor é um dos sintomas mais temidos e onerosos associados ao câncer e seu tratamento. Está diretamente relacionado à má qualidade de vida destes pacientes e é caracterizado pela presença de hiperalgesia (aumento da sensibilidade à dor), alodinia (dor em resposta a estímulos não nocivos) e/ou dor espontânea. Comumente, é a causa mais frequente de incapacidade desses pacientes. Além disso, pacientes afirmam que no câncer a dor aumenta ao longo

dos anos, acompanhando a sobrevida e sendo classificada como dor moderada a grave e muito grave (CALIXTO-CAMPOS et al., 2013; STEPHENSON et al., 2018).

Estimativas meta-analíticas demonstram que a dor é experimentada por 58 - 75% dos pacientes com câncer avançado, metastático ou terminal e pode ser causada por complicações associadas ao tumor ou relacionadas ao próprio tratamento, o que inclui procedimentos invasivos e protocolos antitumorais farmacológicos (VAN et al., 2016; VON et al., 2017; SHEN et al., 2017; STEPHENSON et al., 2018).

Embora a dor refira-se à experiência subjetiva de dano real ou iminente, a nocicepção se refere à codificação neural de dano tissular (isto é, estimulação nociva), a qual o sistema nervoso autônomo (SNA) é notavelmente responsável, demonstrando efeitos generalizados através de modalidades de estímulo (calor, elétrico e pressão) com resultados fisiológicos que incluem reatividade cardiovascular, respiração, condutância da pele e dilatação da pupila. Normalmente, a estimulação nociceptiva conduz à dor, no entanto, pesquisas farmacológicas e de lesões cerebrais mostram que uma pode existir independente da outra (LOESER; TREEDDE, 2008; MISCHKOWSK et al., 2018).

Fisiologicamente, o processamento doloroso ocorre por meio do sistema nociceptivo, a via na qual os estímulos nocivos são enviados ao cérebro, evidenciando mecanismos periféricos e centrais, como a transdução, transmissão, modulação e percepção de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo. Este processamento doloroso ocorre por complexas atividades neuronais dos sistemas nervosos, periférico e central, que são detectados, inicialmente, no sistema somatossensorial. Desta forma, um determinado número de receptores de sinalização recebe a informação externa e compartilham esta informação dolorosa através dos neurônios aferentes primários, sendo este processo denominado de transdução nociceptiva (FERREIRA et al., 2009; BRADESİ et al., 2010; KUAN; SHYU, 2016).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Estudos em Dor (SBED), a dor pode ser classificada de diversas formas ao levar em consideração o tempo em que ela se manifesta. Além disso, ela pode ser caracterizada também pela intensidade e sobrecarga emocional do paciente. Dentre as várias classificações, as mais

importantes dividem a dor em relação ao tempo de permanência, caracterizando-a em dor aguda ou crônica (HENSCHKE; KAMPER; MAHER, 2015).

A dor aguda é aquela que aparece a partir de um trauma ou inflamação de tecidos moles e possui período de duração relativamente curto. A sensação de dor é desencadeada pela ativação de nociceptores presentes no local lesionado, estimulando terminações nervosas de fibras mielinizadas finas ou amielínicas, normalmente sendo de curta duração e limitada à área afetada, desaparecendo com a eliminação do estímulo nocivo. Ocorrem dois fenômenos de sensibilização na dor aguda, um central (excitabilidade sináptica prolongada e aumentada) e outro periférico (ativação de nociceptores à distância e limiar local diminuído). No entanto, em decorrência da ativação de várias vias neuronais de modo prolongado, o caráter da dor pode modificar e a dor aguda torna-se crônica (SALLUM; GARCIA; SANCHES, 2012; GIACOMELL et al., 2018).

A dor é considerada crônica quando sua permanência é superior a três ou seis meses podendo se manifestar por meio de mecanismos externos ou podendo surgir espontaneamente. De acordo com o mecanismo fisiopatológico, a dor persistente ou crônica pode ser classificada em nociceptiva, neuropática e inflamatória (KLAUMANN, 2008; CAMPOS; FERREIRA; DE MORAIS, 2018).

Sendo assim, a dor nociceptiva resulta da ativação fisiológica dos nociceptores (térmico, químico ou mecânico) por lesão tecidual real ou potencial e funciona como alerta, caracterizando um efeito “benéfico” na proteção do organismo, mediante um estímulo externo potencialmente prejudicial e ainda estímulos internos, caracterizando-a como uma dor aguda e momentânea (SANCHEZ; ANDRADE; PARIZOTTO, 2018).

A dor neuropática é causada por lesão ou doença que acomete o sistema somatossensorial. Pode ser classificada de acordo com sua causa intrínseca ou pelo local da lesão nervosa em central ou periférica (BARON et al., 2017). É caracterizada clinicamente como dor contínua, lacerante, de intensidade moderada a intensa, com sensação de agulhadas, presença de formigamento, dormência e queimação. Está localizada preferencialmente nas extremidades, de forma simétrica e bilateral, com alterações de sensibilidade local (TREEDDE et al., 2008; FRANCO et al., 2011; AGUIAR; RAMOS; BICHARA, 2018).

A fisiopatologia da dor neuropática não está completamente esclarecida, no entanto, alterações como sensibilização de receptores periféricos e de células de projeção central, excitação cruzada entre os neurônios decorrente do dano à mielina, bem como atividade anormal das unidades de processamento central da aferência sensitiva, têm sido descritas como mecanismos importantes envolvidos na gênese desse tipo de dor (SANCHEZ; ANDRADE; PARIZOTTO, 2018).

A inflamação é caracterizada como uma resposta biológica natural, produzida pelos tecidos do nosso corpo em reação aos estímulos nocivos, a fim de erradicar as células necróticas e iniciar o processo de reparação tecidual. A inflamação pode levar a três respostas principais: hiperalgesia, alodinia e dor mantida simpática. A dor inflamatória é causada pela ativação e sensibilização dos neurônios aferentes primários e perda duradoura da função. A dor inflamatória aguda é iniciada como uma resposta a estímulos nocivos que são normalmente mediados pelas fibras A δ . No entanto, a dor inflamatória crônica dura além do período esperado de cicatrização e é tipicamente mediada por fibras C (BASBAUM et al., 2009; YOO et al., 2011; YAM et al., 2018).

A dor inflamatória leva ao desenvolvimento de sensibilização central que corresponde a uma modificação no estado funcional dos neurônios em vias nociceptivas por todo o neuroeixo, causada pelo aumento na excitabilidade da membrana, da eficácia sináptica ou pela redução da inibição sobre este sistema (ASHMAWI; FREIRE, 2016; VARDEH; NARANJO, 2017). Durante o processo de inflamação, alguns mediadores inflamatórios químicos que incluem 5-hidroxitriptamina (5-HT), cininas, histamina, fatores de crescimento nervoso, adenosina trifosfato (ATP), prostaglandinas, glutamato, leucotrienos, óxido nítrico, e prótons são produzidos a partir dos tecidos necróticos e interagem para ativar os nociceptores dentro da área inflamada (YAM et al., 2018; COOK et al. 2018).

A dor geralmente é controlada pela utilização de analgésicos, e sabe-se que os benefícios causados pelo tratamento da dor superam os possíveis riscos associados com a administração dessa classe de fármacos. Desta forma, a analgesia pode ser considerada clinicamente como a redução da dor percebida (VALADÃO; DUQUE; FARIAS, 2002; ALEIXO et al., 2017). Dentre as principais classes de fármacos utilizados para controlar a dor, encontram-se: analgésicos periféricos e os de ação central (SANTOS et al., 2017).

Os analgésicos periféricos, também conhecidos por analgésicos não-opioides, são representados pelos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES). O principal mecanismo de ação dos AINES é a redução da biossíntese das prostaglandinas (PGs) pela inibição da atividade das enzimas ciclo-oxigenases (COX) no local de lesão. A produção de prostaglandinas é catalisada por duas isoenzimas COX, comumente referidas como COX-1 e COX-2. A COX-1 é constitutivamente expressa em muitos tecidos e considera-se que seus produtos metabólicos estão envolvidos nas funções celulares. Em contraste com a COX-1, a expressão de COX-2 é altamente indutível por vários mediadores inflamatórios e mitógenos (BERNARDI et al., 2006; STOLFI et al., 2013; SU; O'CONNOR, 2013; MOZOLEWSKI et al., 2018).

Os analgésicos de ação central ou opioides representam uma classe variada de drogas que podem ser naturais e/ou semi-sintéticos, por exemplo, morfina e codeína, opioides sintéticos (oxicodona, hidromorfina) e opioides ilícitos (como a heroína). Esses fármacos apresentam características químicas e estruturais que conferem afinidade de ligação e atividade intrínseca (eficácia) ao receptor opioide mü (μ) que está acoplado à proteína G (PERGOLIZZI JR et al., 2018).

Os analgésicos opioides atuam em três tipos de receptores, sendo estes acoplados a proteína G inibitória, e que estão presentes no sistema nervoso central (SNC), são eles: receptor peptídico opioide mü (μ), subdividido em μ 1, μ 2 e μ 3 e encontrados no tronco cerebral e no tálamo; receptor peptídico opioide delta, encontrado no cérebro; e receptor peptídico opioide kappa, localizado no sistema límbico, tronco cerebral e medula espinhal. O receptor μ opioide é foco nos estudos de dor, pois sua ativação é necessária para a ação da maioria dos analgésicos potentes (FIELDS, 2007; WIFFEN, 2017; BEZERRA et al., 2018).

O uso crônico dos analgésicos opioides para o tratamento da dor moderada e severa de muitas etiologias, e seu uso indiscriminado tem sido uma das principais causas do desenvolvimento de hiperalgesia (LIANG; LI; CLARK, 2013; STREICHER; BILSKY, 2017). Apesar da sua eficácia e potência analgésica, altas e repetidas doses de opioides, podem resultar no aumento de sensibilidade à dor, chamada de hiperalgesia induzida por opioides ou hiperalgesia paradoxal, mediada por diversas vias que possuem ação pró-nociceptiva, além de induzir tolerância, náuseas e vômito, constipação e depressão respiratória (SALPETER; BUCHLEY; BRUERA, 2013; CORDER et al., 2018). A morfina e outros fármacos da classe opioide que

possuem atuação em receptores μ , também podem estar associados a esta síndrome (XU et al., 2018).

A morfina é o fármaco referência dos analgésicos opioides, produz adequada analgesia pela alta afinidade com o receptor μ e é considerado o analgésico de eleição para o tratamento da dor grave. No entanto, diante de tantos efeitos colaterais, a elucidação de mecanismos neurais subjacentes aos efeitos opioides é urgentemente necessária para desenvolver terapias adjuvantes inovadoras que dissociam a analgesia opioide dos efeitos colaterais (MATHEWS et al. 2014; BECKMANN et al., 2018).

2.5 Farmacoterapia do câncer

Diante da caracterização de seus marcadores e compreensão cada vez mais detalhada de alguns dos seus mecanismos moleculares, o desenvolvimento e a pesquisa de novas terapias para o tratamento do câncer tem sido contínuo. A busca por novas terapias é baseada, especialmente, em fármacos que maximizem os efeitos em células neoplásicas com menor toxicidade e redução de efeitos adversos, ou seja, que sejam mais seletivos (ALAPATI et al., 2012; KATT et al., 2016).

O diagnóstico precoce, juntamente com tratamentos eficazes, melhora o prognóstico do paciente, aumentando as possibilidades de cura e sobrevida (JESUS et al., 2016). O tratamento do câncer é focado principalmente em três modalidades, utilizadas isoladamente ou em combinação, que compreendem cirurgia, quimioterapia e radiação. Todavia, eles apresentam muitas desvantagens em relação aos efeitos colaterais deletérios nas células sadias, caracterizado pela falta de especificidade, baixa taxa de sucesso e alto risco de recorrência (SALEM et al., 2016).

Apesar da falta de especificidade e mecanismos de resistência desenvolvidos pelo tumor, a quimioterapia convencional continua sendo a principal abordagem no tratamento antineoplásico. Sua ação ocorre por meio da utilização de compostos químicos, chamados de quimioterápicos e baseia-se na utilização da dose máxima tolerada pelo paciente que é considerada como não específica, podendo provocar danos em tecidos neoplásicos e sadios como, por exemplo, medula óssea e epitélio

intestinal, pois esses fármacos atuam em células de rápida divisão mitótica (BARROS; REPETTI, 2015; GRAPEGIA; LIMA, 2017).

As principais classes de quimioterápicos incluem: agentes alquilantes, antimetabólicos e produtos naturais. Os **agentes alquilantes** constituem a classe mais antiga de fármacos anticancerígenos, e seu mecanismo de ação envolve a destruição das células tumorais por interação química com a molécula de DNA em todas as fases do ciclo celular de forma inespecífica. Dentre alguns exemplos, estão os complexos de coordenação de platina, como a cisplatina, amplamente utilizada e eficaz, no entanto, sua dose é limitada pela indução de efeitos colaterais graves como: neurotoxicidade, mielossupressão e nefrotoxicidade aguda. Ainda, são também agentes alquilantes as mostardas nitrogenadas, como a ciclofosfamida, que é utilizada sozinha ou em combinação com outros fármacos para tratar diversos tipos de tumores (ALI et al., 2017; RAHMAN et al., 2017; LIANG et al., 2017).

Os **agentes antimetabólicos** exercem seus efeitos por inibirem a síntese dos componentes essenciais do DNA e RNA, sendo sua ação restrita à fase S do ciclo celular. Seus principais representantes compreendem: o metotrexato, análogo do ácido fólico, inibidor da enzima dihidrofolato redutase e considerado um dos medicamentos citotóxicos mais utilizados no tratamento de leucemia, linfoma e câncer de mama (BISWAL; VERMA, 2009; KMIECIK et al., 2017); e o 5-fluorouracil (5-FU), análogo da pirimidina, inibidor da enzima timidilato sintase, sendo utilizado no tratamento do câncer de mama, bem como, em câncer de células epiteliais, a exemplo da neoplasia escamosa da superfície ocular (tumor comum da córnea) por meio de uso tópico (PLOTNIK et al., 2012; PARROZZANI et al., 2016).

Dentre os derivados de **produtos naturais**, podem ser citados os alcaloides da vinca (vincristina, vinblastina e vinorelbina) que atuam mediante ligação às β -tubulinas intracelulares, inibindo a divisão celular por bloqueio da mitose e também por inibir a purina durante a síntese de RNA (LEE et al., 2015); e as epipodofilotoxinas (etoposídeo, teniposídeo), usados principalmente no tratamento de tumores hematológicos, cujo mecanismo se dá pela inibição da enzima topoisomerase II e bloqueio das células nas fases S e G2 do ciclo celular (BERRETTA et al., 2016).

Baseadas nesse contexto, as pesquisas demonstram que a análise molecular do câncer permite identificar estratégias clínicas cada vez mais promissoras para a

intervenção terapêutica contra neoplasias, visando reduzir a toxicidade em células não tumorais e maximizar os efeitos farmacológicos em células neoplásicas (SHENG et al., 2015; SALEM et al., 2016; BURSTEIN et al., 2017; DENKERT et al., 2017). O principal objetivo dessas estratégias é direcionar o fármaco para as células alvo (células tumorais), e dentre elas, podem ser citadas a terapia alvo, a imunoterapia e a hormonioterapia.

A **terapia alvo** é caracterizada principalmente por anticorpos monoclonais, fármacos antiangiogênicos (que também são anticorpos monoclonais) e inibidores de tirosina cinase (ITQ). Os anticorpos monoclonais (rituximabe) são imunoglobulinas com alta especificidade contra células neoplásicas a partir da identificação de抗ígenos tumorais (antígeno CD20, específico do rituximabe) e células T reativas ao tumor e consiste, em uma das principais opções para intervenção terapêutica direcionada (BURSTEIN et al., 2017; SALEM et al., 2016; DENKERT et al., 2017; CATALDI et al., 2017).

Os fármacos antiangiogênicos, a exemplo do bevacizumabe, direcionado contra o Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF), atuam inibindo a formação de novos vasos sanguíneos para nutrição do tumor e são utilizados no tratamento de câncer metastático de pulmão, mama, rins e colo-rectal (GIULIANO; PAGÈS, 2013; GRAPEGIA; LIMA, 2017). E em relação aos ITQ, utilizado como uma das principais indicações no tratamento do câncer de pulmão de não pequenas células, incluem fármacos que têm como alvo as mutações do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), a exemplo: afatinibe, gefitinibe, erlotinibe, icotinibe e osimertinibe, entre outros (LIANG et al., 2017).

A **imunoterapia** envolve abordagens que melhoram o sistema imunológico suprimido do paciente, de modo que, o torna eficaz contra as células antitumorais. Exemplos incluem bloqueadores do ponto de controle imune, vacinas e terapias baseadas em células com抗ígenos específicos (VENTOLA, 2017). No entanto, essas abordagens não conseguem atingir a eficiência ideal contra o tumor, isso porque eles exigem a identificação específica de抗ígenos tumorais e células T reativas, que não estão disponíveis ou não foram identificadas em grande parte das neoplasias (SALEM et al., 2016).

E por fim, a **hormonioterapia** caracteriza-se pelo uso de hormônios e seus antagonistas, a exemplo dos antiestrogênios (tamoxifeno) que atuam como

moduladores seletivos dos receptores de estrogénio por bloqueá-los em tecido mamário (reduzindo a proliferação do tumor), ou ativá-los (atuam como agonista parcial) em tecido ósseo (reprimindo a desmineralização óssea comum no pós-menopausa). Portanto, o tamoxifeno constitui um dos principais tratamentos utilizados no câncer de mama em mulheres que não entraram na menopausa (GAJULAPALLI et al., 2016).

Apesar da disponibilidade de inúmeras terapias, ainda há toxicidade elevada, bem como, é comum o desenvolvimento de resistência ao tratamento e dessa forma, torna-se evidente a necessidade de pesquisa contínua por um tratamento cada vez mais seguro e eficaz, uma vez que o desenvolvimento de novos fármacos com toxicidade cada vez mais reduzida para o tratamento das neoplasias é uma busca incessante da indústria farmacêutica e dos cientistas.

2.6 Derivados acridínicos e o n'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide

Derivados acridínicos são moléculas caracterizadas pela presença de um sistema policíclico planar que apresenta dois anéis de benzeno fundidos a um anel de piridina no centro e um ou dois grupos substituintes. Os derivados de acridina são relevantes no campo de desenvolvimento de drogas quimioterápicas por dois motivos. Primeiro, a estrutura aromática tricíclica linear da acridina garante alta intercalação de DNA, interferindo assim, com as funções celulares. Segundo, modificações na estrutura química, como a cadeia lateral no anel da piridina, podem gerar inúmeros compostos com diferentes atividades biológicas (BARROS et al., 2012; LAFAYETTE et al., 2013; FU et al., 2017; SILVA et al., 2018).

De forma mais específica, o átomo de nitrogênio presente no anel central da estrutura tricíclica da acridina caracteriza-se como acceptor/doador de elétrons, fator que possibilita a interação com ácidos nucleicos de DNA e RNA, desempenhando mecanismo de ação farmacológica como intercalador com diversas atividades biológicas comprovadas, dentre essas, ação antibacteriana, antimalária, antiprotozoária, antifúngica, antitripanossômica, leishmanicida, anti-inflamatória,

analgésica e antitumoral (CHEN et al., 2014; MANGUEIRA et al., 2017; ALBINO et al., 2018).

O DNA é um significativo receptor celular, motivo pelo qual, muitos compostos químicos exercem seus efeitos antitumorais. A ligação de drogas ao DNA pode afetar a sua transcrição e a expressão da informação genética nas células, influenciando assim, na inibição do crescimento de células tumorais, que é a base da concepção de fármacos mais eficazes. Essa ação não se refere apenas a interação com o DNA, mas também com proteínas, especialmente algumas enzimas-chaves na proliferação celular, as topoisomerases (LAFAYETTE, 2016).

A citotoxicidade da maioria das drogas à base de acridina é baseada na sua capacidade de suprimir a atividade das topoisomerases, estas são enzimas que desempenham papéis essenciais na replicação do DNA, na segregação dos cromossomos, na recombinação e regulação do superenovelamento do DNA. Existem duas possibilidades para um intercalante influenciar a atividade da topoisomerase e assim, suprimir a proliferação da célula: (a) por intercalação; o local de ligação da topoisomerase é ocupado e a formação do complexo entre a enzima e o DNA é dificultada; (b) ou pela formação de um complexo ternário entre o DNA, a topoisomerase e o intercalador, o qual é significativamente mais estável do que o complexo de DNA-topoisomerase (LIU et al., 2010; JANOVEC et al., 2011; PLSIKOVA et al., 2012; LAFAYETTE et al., 2013; POMMIER, 2013; SANDERSON et al., 2017).

A topoisomerase II (TopII) é essencial para o gerenciamento de eventos no DNA e é classificada em dois subtipos: alfa (TopII α) e beta (TopII β), formando homodímero em condições fisiológicas. Como o TopII β é necessário para a função fisiológica normal, como a transcrição, e sua inibição resulta em efeitos adversos e até mesmo em cânceres secundários, TopII α é o alvo farmacológico preferido e facilmente encontrada nas células cancerígenas de crescimento rápido (HAFFNER et al., 2010; THAKUR, 2011; SADER; WU, 2017).

A amsacrina (m-AMSA), o derivado da acridina mais conhecido, foi o primeiro inibidor da topoisomerase II sintético aprovado para uso clínico. Ele ainda é usado no tratamento da leucemia aguda e Linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin e cânceres de cabeça e pescoço, mas é ineficaz na maioria de tumores sólidos. No entanto, os efeitos colaterais, incluindo o alto risco de cardiototoxicidade, o desenvolvimento de

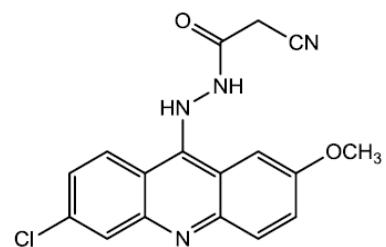
resistência e sua baixa biodisponibilidade e tempo de meia-vida curta, cerca de 20 a 30 minutos, têm limitado seu uso. Esses fatores influenciaram os químicos sintéticos a modificarem estruturalmente este composto e produzirem diferentes derivados que têm mostrado importante atividade antitumoral (KETRON et al., 2012; ALMEIDA et al., 2015b; FANG et al., 2016; FU et al., 2017; MANGUEIRA et al., 2017).

Em triagem preliminar, realizada no Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba (CCS/UFPB), foi observado que o derivado acridínico N’-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (ACS-AZ10) apresentou significante atividade antitumoral *in vivo* em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE). Estudos adicionais mostraram que o ACS-AZ10 apresentou baixa toxicidade no ensaio agudo, com DL50 estimada em 2500 mg/kg i.p., e com mecanismo de ação antitumoral envolvendo parada do ciclo celular, em que ocorreu aumento do pico na sub-G1 na dose 7,5 mg/kg, sugerindo apoptose, e parada do ciclo celular na fase G2/M com redução na porcentagem de células nas fases G0/G1 e S, na dose de 15 mg/kg, sugerindo bloqueio pré-mitótico. Além disso, o ACS-AZ10 apresentou atividade antiangiogênica no mesmo modelo avaliado. Foi observado ainda que o ACS-AZ10 não apresentou potencial genotóxico (MANGUEIRA et al., 2017).

Considerando os dados obtidos e vislumbrando o potencial farmacológico dos derivados da acridina, nosso grupo de pesquisa vêm estudando o potencial antitumoral de novos derivados acridínicos (espiro-acridínicos, N-acilhidrazônicos acridínicos, tiosemicarbamidas acridínicos), e de novos compostos híbridos como os tiofênicos-acridínicos. Nessa perspectiva, esse trabalho baseia-se na continuação dos estudos da atividade antitumoral de novos derivados acridínicos, bem como mecanismos de ação antitumoral envolvidos nesse efeito.

Dentre os novos derivados sintéticos acridínicos foi obtido o composto n’-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide” (ACS-AZ) (Figura 5), que não apresenta nenhum relato na literatura de atividade farmacológica ou toxicidade.

Figura 5. Estrutura do acridínico “n’-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide” (ACS-AZ)



Fonte: SILVA et al., 2018.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade e as atividades antitumoral e antinociceptiva do derivado acridínico n’-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide” (ACS-AZ).

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a toxicidade não clínica aguda em camundongos;
- Avaliar a genotoxicidade em camundongos;
- Estudar a atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE);
- Avaliar o efeito antiangiogênico;
- Determinar a participação de citocinas no mecanismo de ação antitumoral;
- Investigar o efeito antioxidante pela quantificação de espécies reativas de oxigênio e do óxido nítrico;
- Investigar o perfil de toxicidade em animais transplantados com CAE e submetidos a tratamento antitumoral;
- Avaliar os efeitos na atividade motora de camundongos;
- Avaliar a atividade antinociceptiva;
- Estudar mecanismos de ação envolvidos na ação antinociceptiva pela participação do sistema opioide.

Material

4 MATERIAL

4.1 Locais da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Oncofarmacologia (OncoFar) e no Laboratório de Psicofarmacologia (PsiFarM) do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba (CCS/UFPB).

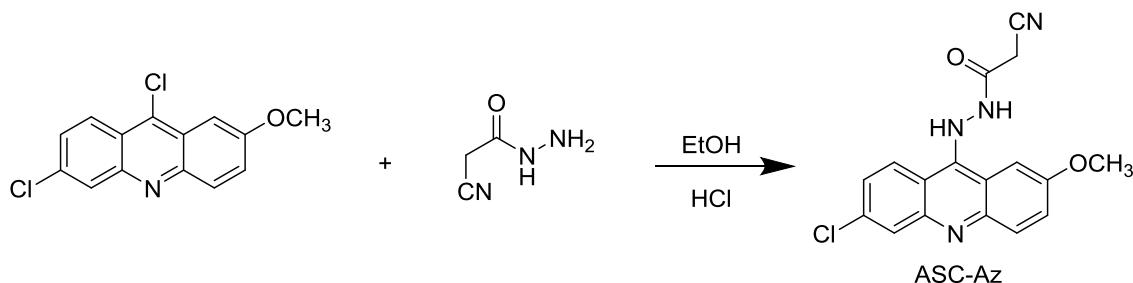
4.2 Reagentes

Foram utilizadas as seguintes substâncias: Cetamina (Ketamin[®]); cloridrato de xilazina (Anasedan[®]); heparina (HEPAMAX-S[®]); coloração panótica (Newprov[®]); Solução fosfato tamponada (PBS); Tween 80 (Sigma-Aldrich[®]); Dimetilsulfóxido (Mallinckrodt CHEMICALS); Triton X-100 (Sigma-Aldrich[®]); Soro bovino fetal (SBF) (Nutricell[®]); Iodeto de Propídeo; Tween 20 (Sigma-Aldrich[®]); 5-Fluorouracil (Sigma-Aldrich[®]); Kit ELISA (eBioscience[®]) para dosagem de citocinas; Cloridrato de morfina (Merck[®]); Cloridrato de naloxona (Cristália[®]); Naloxonazina (Sigma-Aldrich[®]); Formaldeído 37% (Vetec).

4.3 Síntese de ACS-AZ

O ACS-AZ foi obtido por rota sintética linear e simples, gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura, do Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular da Universidade Estadual da Paraíba.

A síntese do ACS-AZ ocorre por meio de uma reação de substituição nucleofílica no anel aromático do tipo adição seguido de eliminação e foram utilizados os compostos 2-cianoacetohidrazida e 6,9-dicloro-3-metoxiacridina em quantidades equimolares em meio etanólico e levemente ácido (Figura 6).

Figura 6. Síntese para obtenção do composto ACS-AZ

Fonte: SILVA et al., 2018.

O composto sintetizado teve suas características físico-químicas descritas por meio do cálculo do Fator de Retenção (RF) e Faixa de Fusão (FF), além disso, foi calculado o rendimento desse composto (Quadro 1).

Quadro 1. Características físico-químicas do ACS-AZ

Código	Fator de Retenção (RF)	Faixa de Fusão (C°)	Rendimento (%)	Peso molecular	Estrutura molecular	Aparência
ACS-AZ	0,40	258-267	99%	340	C ₁₇ H ₁₃ O ₂ N ₄ Cl	Amarelo

Sua estrutura foi elucidada por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN C¹³) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H¹) e espectrometria de Massas e os dados estão descritos no artigo de Silva et al (2018) intitulado *Correlation between DNA/HSA-interactions and antimalarial activity of acridine derivatives: Proposing a possible mechanism of action*. Publicado no **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology** 189 (2018) 165–175.

4.4 Linhagem de células tumorais

Para os ensaios de atividade antitumoral *in vivo* foi usada uma linhagem de adenocarcinoma murino (Carcinoma Ascítico de Ehrlich), gentilmente cedidas 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 (Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos - IPeFarM/UFPB), sendo realizados repiques semanais, nos quais uma alíquota de células (200 μ L de 1×10^6 células/mL) era transferida de um animal para outro, a cada cinco dias.

4.5 Animais e condições experimentais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, pesando entre 30 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 medicamento, tendo livre acesso à comida (tipo *pellets* de ração da marca Purina®) e água potável. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os cuidados foram considerados no sentido de diminuir a dor e o sofrimento dos animais.

Após todos os ensaios *in vivo*, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (100 mg/kg – i.p.) e xilazina (16 mg/kg – i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UFPB sob certidão N° 019/2015.

4.6 Equipamentos

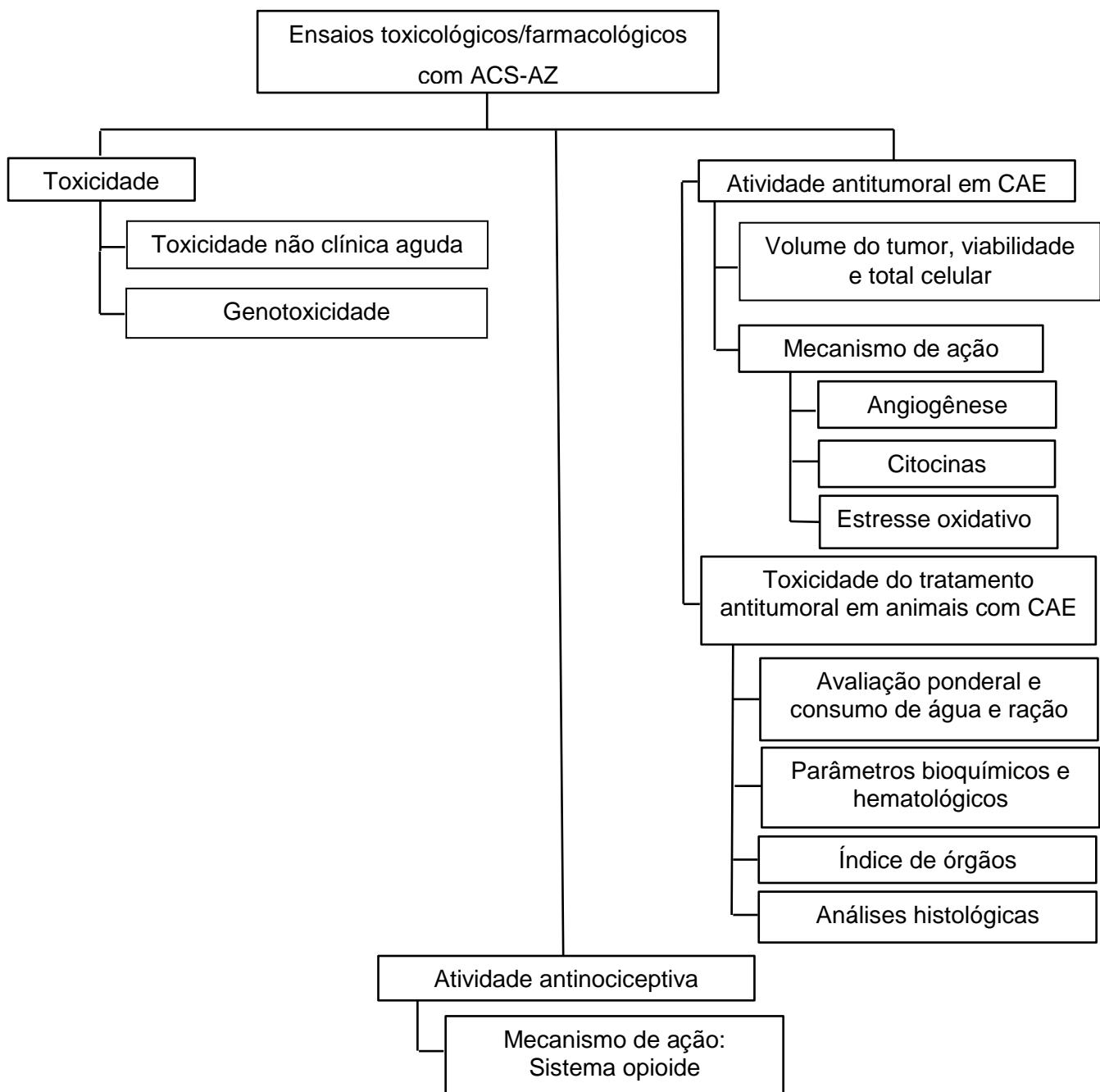
Foram utilizados os seguintes equipamentos: Centrífuga (HETTICH-Zentrifugen® - Rotina 380 R); Microscópio invertido (Olympus®); Microscópio óptico (EVEN®) acoplado a câmara digital (BIOFOCUS®); Balança analítica (GEHAKA® AG 200); Citômetro de fluxo (FacsCanto® II, BD, EUA); Câmera fotográfica (Canon® OverShot A2500); Leitor de placa (Synergy HT, BioTek®); Aparelho de rota-rod (Insight®); Aparelho de placa quente (Insight®); Caixa de observação para o teste da formalina. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se kits específicos para o analisador bioquímico automático Bio 2000® (Bioplus) e o analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter Vet* (Horiba ABX Diagnostics®), respectivamente.

Métodos

5 MÉTODOS

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

Fluxograma 1. Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade, atividade antitumoral e antinociceptiva de ACS-AZ.



5.1 Estudos toxicológicos

5.1.1 Avaliação da toxicidade não clínica aguda

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

Camundongos Swiss, três fêmeas por grupo, foram submetidos a doses únicas de 300 ou 2000 mg/kg de ACS-AZ por via intraperitoneal (i.p.), e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (solução a 12% de Tween 80 em salina).

De acordo com o guia n. 423/2001 da OECD, o nível de dose para ser usada como a dose de partida é selecionado a partir de um dos quatro níveis fixos, 5, 50, 300 ou 2000 mg/kg, sendo os passos seguintes direcionados a partir dos resultados iniciais. Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL50 (dose responsável pela morte de 50% dos animais experimentais), todavia fornece uma estimativa do seu valor, bem como permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” - GHS. Então, durante os 14 dias de observação foi contabilizado o número de animais vivos e mortos para estimativa da DL50.

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 B**) descrito por Almeida et al. (1999) do Laboratório de Psicofarmacologia do PPgPNSB/CCS/UFPB.

5.1.2 Avaliação da genotoxicidade

A genotoxicidade do ACS-AZ 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 150 mg/kg (i.p.) do ACS-AZ. Um grupo controle positivo (ciclofosfamida - 50 mg/kg – i.p.) e um grupo controle negativo (solução salina e tween 80 à 12%) 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 para posterior análise em microscópio óptico. Para cada animal, três extensões sanguíneas foram preparadas e um mínimo de 2000 eritrócitos contados para determinação do número de eritrócitos micronucleados (OECD, 1997).

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

Células de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE) com cinco dias de crescimento foram aspiradas da cavidade peritoneal de camundongos e implantadas por via intraperitoneal (0,5 mL - 4×10^6 células/mL) nos camundongos experimentais (n=8 fêmeas/grupo) (DOLAI et al., 2012). Vinte e quatro horas após o implante, ACS-AZ foi solubilizado em solução salina de Tween 80 (12%) e administrado diariamente (i.p.), nas doses de 12,5; 25 ou 50 mg/kg, por sete dias (MELO, 2014). O grupo controle foi tratado com uma solução salina de Tween 80 (12%) e um quinto grupo de animais foi tratado com 5-Fluorouracil (5-FU), 25 mg/kg (i.p.), como droga padrão.

5.2.1 Volume do tumor, viabilidade e total celular

Para a avaliação do efeito antitumoral de ACS-AZ, 24 horas após a última administração do tratamento descrito no item 5.2, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.p.) 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, excluindo 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).

5.2.2 Investigação do mecanismo de ação antitumoral

Para investigação de todos os mecanismos de ação antitumoral do ACS-AZ foi escolhida a dose de 50 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. Para tal, os animais transplantados com células de CAE foram tratados por sete dias com ACS-AZ e no dia seguinte após a última administração, os animais dos grupos controle, ACS-AZ (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.p.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical.

5.2.2.1 Avaliação do efeito antiangiogênico

O peritônio foi cortado e o revestimento posterior da cavidade peritoneal dos animais de todos os grupos foi examinado e fotografado para a 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 (fórmula abaixo) (AGRAWAL et al., 2011).

$$\text{Microdensidade dos vasos} = \text{área ocupada por vasos sanguíneos/área total selecionada}$$

5.2.2.2 Quantificação das citocinas IL-1 β , TNF- α , CCL-2, IL-4, IL-10 no lavado peritoneal

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-TNF- α , anti-CCL2, anti-IL-4 e anti-IL-10, 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 , TNF- α , CCL2, IL-4 e IL-10, 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 concentração de citocinas foi calculada a partir das curvas-padrão.

5.2.2.3 Investigação do estresse oxidativo

5.2.2.3.1 Ensaio do 2'7 – dicloro dihidrofluoresceína

Foi utilizada metodologia previamente descrita (HASUI et al., 1989 adaptado) que se baseia na oxidação do reagente 2'7 – dicloro dihidrofluoresceína diacetato

(DCFH-DA). O líquido peritoneal foi lavado com PBS a 1000 rpm, 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 incubados em estufa de CO₂ durante 30 minutos a 37 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm, 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.

5.2.2.3.2 Quantificação dos níveis de nitrito

Os níveis de nitrito no líquido peritoneal foram quantificados por espectrofotometria utilizando o reagente de Griess, constituído de 0,1% de N-1-naphthyl-etenodiamina, 1% de sulfanilamida em solução de ácido fosfórico a 2,5%, utilizando NaNO₂ como padrão (GREEN et al., 1982, adaptado). Para isto, 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 ACS-AZ, os animais dos grupos controle, ACS-AZ (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg), descritos no item 5.2, foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados os consumos de água e de ração.

5.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

Os animais transplantados com CAE foram tratados por sete dias com ACS-AZ conforme descrito no item 5.2. No dia seguinte após a última administração, após jejum de quatro horas, os animais dos grupos controle, ACS-AZ (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg i.p.) 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 Bio 2000® (Bioplus) e o analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter Vet* (Horiba ABX Diagnostics®), 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

Para o cálculo dos seus índices, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e os órgãos (timo, baço, fígado, rins e coração) foram

removidos e pesados. 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 5.2.3.3, fígado e rins dos animais dos grupos controle, ACS-AZ (50 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 tricrômio de gomori, este último destinado ao estudo do tecido hepático. Em seguida foram examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As análises histológicas foram realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Karina Carla de Paula Medeiros do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

5.3 Estudos psicofarmacológicos

5.3.1 Teste do *Rota rod*

O teste da barra giratória (*rota rod*) foi proposto por Dunham e Miya (1957). Consiste em colocar roedores sobre uma barra que gira a uma velocidade constante e verificar a capacidade do animal equilibrar-se sobre a mesma. O modelo disponível no Laboratório de Psicofarmacologia é constituído por uma barra giratória, dividida por cinco discos, delimitando-se um total de quatro segmentos, com velocidade regulável em rotações por minutos (r.p.m.). Este aparelho ainda dispõe de um mecanismo automático capaz de contabilizar o tempo de permanência do

animal na barra giratória. Por meio desta metodologia é possível medir o efeito de relaxamento muscular ou incoordenação motora.

Para o ensaio com o ACS-AZ, os camundongos passaram por um treinamento e uma pré-seleção 24 horas antes do teste, sendo para isto submetidos ao aparelho. Foram considerados aptos para realização do teste os animais que permaneciam na barra giratória (7 r.p.m.) por, pelo menos, um minuto em três tentativas.

Para a realização do teste do *rota-rod*, os animais foram divididos em três grupos (n=8 camundongos machos/grupo): controle, ACS-AZ (50 mg/kg) e Diazepam (1 mg/kg). Uma vez transcorridos 30 minutos da administração do ACS-AZ, os animais foram colocados na barra giratória e o tempo de permanência foi registrado, limitando-se as observações ao tempo máximo de três minutos por animal ou três reconduções à barra. Este procedimento foi repetido nos tempos de 60 e 120 minutos após os tratamentos (NÓBREGA, 2012).

5.3.2 Avaliação da atividade antinociceptiva

5.3.2.1 Teste da formalina

No teste da formalina, um padrão de resposta é observado pelos animais tratados que consiste na intensa atividade de lamber a pata que recebe o estímulo nocivo em dois períodos distintos: a primeira fase, com duração de 5 minutos e iniciada logo após a administração da formalina, e uma fase tardia (segunda fase), dos 15 aos 30 minutos após a administração do estímulo químico. Ainda, foi proposto o envolvimento de mecanismos nociceptivos distintos para cada fase, sendo a primeira caracterizada pela ação direta da formalina sobre os nociceptores (resposta neurogênica ou aguda), e a segunda fase envolvia respostas inflamatórias (HUNSKAAR; BERGE; HOLE, 1986; HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Os grupos de camundongos (n=8 machos/grupo) foram tratados com o veículo (salina e tween 80 a 12%), morfina (6 mg/kg) como droga-padrão, e ACS-AZ (50 mg/kg) por via intraperitoneal. Após 30 minutos, 20 µL de solução de formalina 2,5%, que consiste em 0,92% de formaldeído em solução salina, foram injetados na região subplantar da pata posterior direita dos camundongos. Em seguida, esses animais

foram colocados em caixas de observação, sendo, então, registrado o tempo total de lambida da pata que recebeu a formalina durante 5 minutos (1^a fase). Após um período de 10 minutos, novamente foi contabilizado o parâmetro citado por mais 15 minutos (2^a fase).

5.3.2.2 Teste da placa quente

O método foi descrito inicialmente por Woolfe e MacDonald (1944) e modificado por Eddy e Leimback (1953), em que o tempo de reação do animal ao estímulo térmico é quantificado quando é exibido o comportamento de levantar (tentativa de pular) ou lamber uma das patas traseiras, indicativo de nocicepção. Esses dois comportamentos são interpretados como respostas integradas no córtex cerebral, enquanto a agitação das patas posteriores é interpretada como sendo uma resposta apenas de integração medular (ALMEIDA, 2006).

Os animais foram separados em grupos (n=8 camundongos machos/grupo), e antes de iniciar o experimento, foi realizada uma avaliação da resposta inicial dos animais à sensibilização térmica frente ao estímulo doloroso provocado pelo aparelho (foram considerados não aptos a participarem do experimento aqueles animais que não responderam em até 10 segundos).

Os grupos de camundongos foram tratados com o veículo (salina e tween 80 a 12%), morfina (10 mg/kg) como droga-padrão, e ACS-AZ (50 mg/kg) por via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram submetidos à superfície da placa quente (aquecida previamente a 55 ± 1 °C) 30, 60 e 120 minutos após as administrações. O tempo necessário para a resposta inicial ao estímulo doloroso foi contabilizado, sendo esta latência de resposta quantificada num tempo máximo de 30 segundos, para que se evite lesão tecidual (BASTOS et al., 2006).

5.3.2.3 Avaliação dos mecanismos de ação antinociceptiva

5.3.2.3.1 Participação do sistema opioide

Com o objetivo de avaliar a participação do sistema opioide sobre o efeito antinociceptivo de ACS-AZ, foram utilizados grupos (n=8 camundongos machos/grupo), que receberam o tratamento com o antagonista opioide não seletivo, naloxona (5 mg/kg), 15 minutos antes do grupo ser tratado com a substância teste (ACS-AZ) na dose de 50 mg/kg. O grupo controle recebeu o veículo e o grupo padrão recebeu morfina (6 mg/kg). Dessa forma, foi possível verificar se o efeito analgésico corresponde ao bloqueio de receptores opioides e se o grupo padrão, morfina, reconhecidamente tem o seu efeito analgésico reduzido pelo antagonismo da naloxona aos receptores opioides (TJOLSEN et al., 1992).

5.3.2.3.2 Participação dos receptores opioidérgicos seletivos μ 1

Com o objetivo de avaliar de forma mais específica a participação do receptor opioidérgico no efeito antinociceptivo de ACS-AZ, foram utilizados grupos (n=8 camundongos machos/grupo), que receberam o tratamento com o antagonista opioide seletivo μ 1, naloxonazine (10 mg/kg), 15 minutos antes do grupo ser tratado com a substância teste (ACS-AZ) na dose de 50 mg/kg. O grupo controle recebeu o veículo e o grupo padrão recebeu morfina (6 mg/kg). Dessa forma, foi possível verificar se o efeito analgésico do ACS-AZ está relacionado ao bloqueio de receptores opioides μ 1. A morfina foi usada como droga padrão (LING et al., 1986; ZAREI et al., 2018).

5.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados empregando-se o método de Análise de Variância (ANOVA) “one-way” seguido do teste de Dunnett para comparação entre as médias, com pós teste posterior de Tukey, para comparação dos demais grupos entre si. Os dados obtidos foram expressos como média \pm e.p.m (erro padrão da média), sendo os valores considerados significativos, quando apresentassem um nível de significância $p<0,05$. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism Software versão 5.0.

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 Estudos toxicológicos

6.1.1 Avaliação da toxicidade não clínica aguda

No ensaio de toxicidade não clínica aguda foi observado que ACS-AZ não provocou mortes na dose de 300 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 ACS-AZ não induziu morte dos animais. De acordo com o mesmo guia, realizou-se um novo ensaio com uma dose maior (2000 mg/kg) que induziu a morte de todos os animais (Tabela 1). O valor de DL50 foi estimado, segundo o guia OECD 423, em torno de 500 mg/kg e ACS-AZ foi classificado na categoria 4 da *Globally Harmonized Classification System* (GHS).

Entre os efeitos comportamentais avaliados foram evidenciados nos primeiros 30 minutos alguns efeitos característicos de alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) (Tabela 1), como contorções abdominais nas duas doses testadas.

Tabela 1. Efeitos da administração de doses únicas de ACS-AZ* em camundongos

Grupos	M/T**	Efeitos comportamentais
Controle	0/3	Nenhum
300 mg/kg	Experimento 1	0/3
	Experimento 2	0/3
2000 mg/kg	3/3	Contorções abdominais

Fonte: MANGUEIRA, 2018.

*ACS-AZ: N’-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida

**M/T – Morte/Tratado

6.1.2 Avaliação da genotoxicidade

Para avaliar o possível efeito genotóxico *in vivo* de ACS-AZ 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 ($6,0 \pm 0,5$).

O tratamento dos animais com a dose de 150 mg/kg de ACS-AZ não induziu aumento no número de eritrócitos micronucleados ($4,5 \pm 0,5$) em sangue periférico, quando comparado ao grupo controle ($6,0 \pm 0,5$).

Tabela 2. Efeito da administração de dose única de ACS-AZ* (150 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	-	$6,0 \pm 0,6$
Ciclofosfamida	50	$18,4 \pm 0,5^a$
ACS-AZ	150	$4,5 \pm 0,5$

Fonte: MANGUEIRA, 2018.

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

^a $p<0,05$ comparado ao grupo controle.

*ACS-AZ: N’-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

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

6.2.1 Volume do tumor, massa tumoral e viabilidade celular

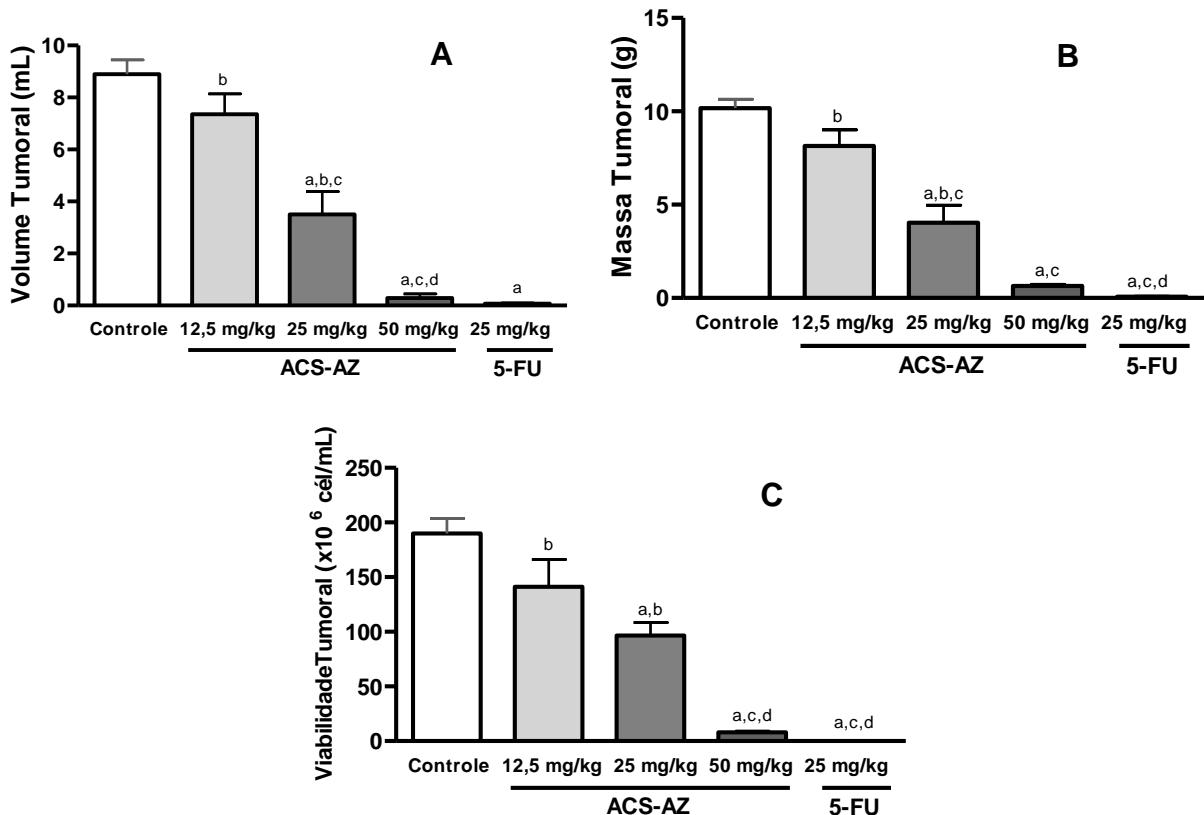
Na avaliação do volume tumoral foi observado redução significante, dependente de dose, nos grupos tratados com as doses de 25 mg/kg ($3,5 \pm 0,8$ mL; $p<0,05$) ou 50 mg/kg de ACS-AZ ($0,3 \pm 0,01$ mL; $p<0,05$), assim como o 5-FU ($0,06 \pm 0,02$ mL; $p<0,05$), quando comparados ao grupo controle ($8,9 \pm 0,5$ mL) (Figura 7A).

A massa tumoral também apresentou significante redução após tratamento com ACS-AZ nas doses de 25 mg/kg ($4,0 \pm 0,9$ g; $p<0,05$) ou 50 mg/kg ($0,7 \pm 0,07$ g; $p<0,05$), bem como após tratamento com o 5-FU ($0,07 \pm 0,03$ g; $p<0,05$), quando comparados ao grupo controle ($10,2 \pm 0,5$ g) (Figura 7B).

O terceiro parâmetro avaliado, a viabilidade celular, também mostrou diminuição significativa nas doses de 25 mg/kg ($96,7 \pm 11,8 \times 10^6$ células/mL; $p<0,05$) ou 50 mg/kg ($8,0 \pm 0,1 \times 10^6$ células/mL; $p<0,05$) de ACS-AZ, assim como o 5-FU ($0,06 \pm 0,02 \times 10^6$ células/mL; $p<0,05$), quando comparados ao grupo controle ($189,9 \pm 13,7 \times 10^6$ células/mL) (Figura 7C).

O tratamento com a dose de 12,5 mg/kg de ACS-AZ não induziu redução significativa nos parâmetros avaliados.

Figura 7. Efeito do tratamento de sete dias (i.p.) com ACS-AZ* (12,5; 25 ou 50 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



Fonte: MANGUEIRA, 2018.

Legenda: Efeito do tratamento com ACS-AZ e 5-FU em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich. A: volume tumoral; B: massa tumoral; C: viabilidade celular. Dados apresentados como média ± erro padrão da média de oito animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU (25 mg/kg). ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo ACS-AZ (12,5 mg/kg). ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo ACS-AZ (25 mg/kg).

*ACS-AZ: N'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

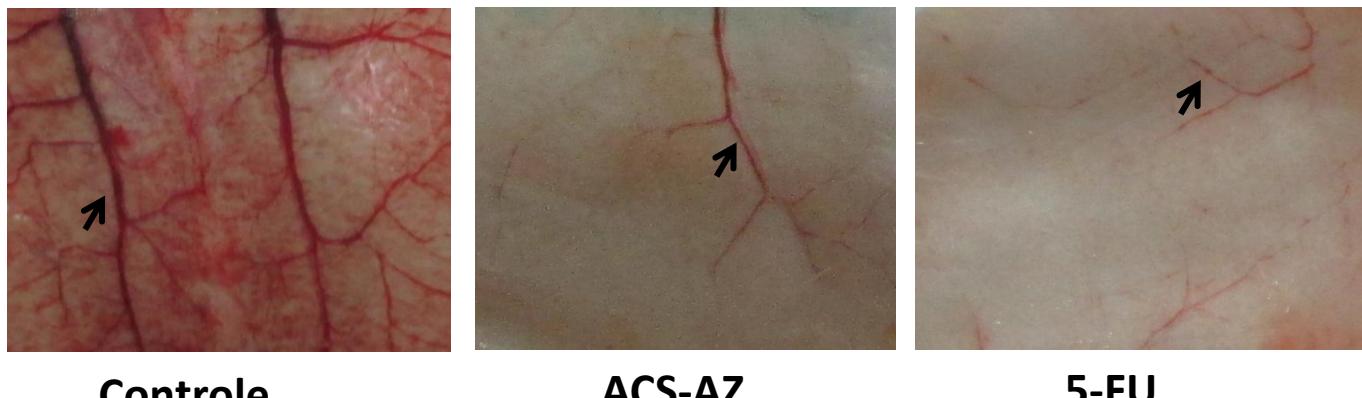
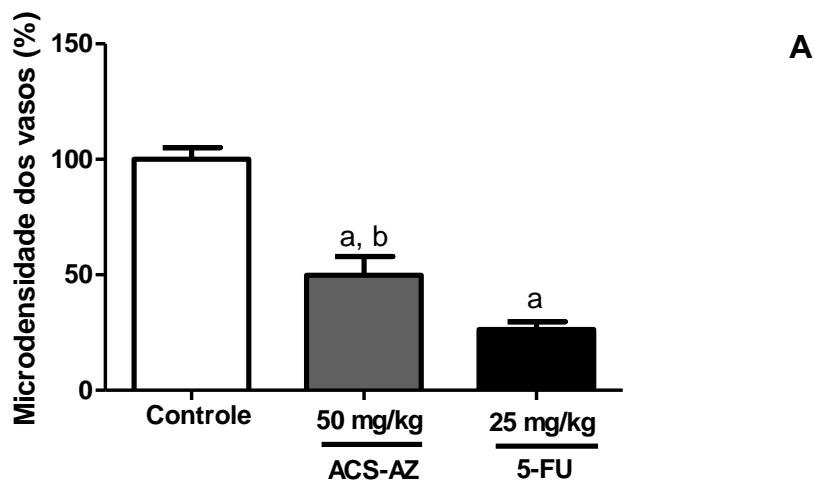
**5-FU: 5-fluorouracila.

6.2.2 Investigação do mecanismo de ação antitumoral

6.2.2.1 Investigação do efeito antiangiogênico

Pode-se observar uma redução significativa na microdensidade dos vasos no grupo tratado com ACS-AZ ($49,8 \pm 8,0\%$; $p<0,05$), assim como no grupo tratado com a droga padrão 5-FU ($26,3 \pm 3,4\%$; $p<0,05$), quando comparados ao grupo controle ($100 \pm 5,1\%$) (Figura 8).

Figura 8. Efeito do tratamento com ACS-AZ* (50 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



Controle

ACS-AZ

5-FU

Fonte: MANGUEIRA, 2018.

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, cortadas em tamanho padrão (1cm x 1cm) e submetidos aos diferentes tratamentos. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de oito animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p<0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p<0,05$ comparado ao grupo 5-FU (25 mg/kg).

*ACS-AZ: N'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

**5-FU: 5-fluorouracila.

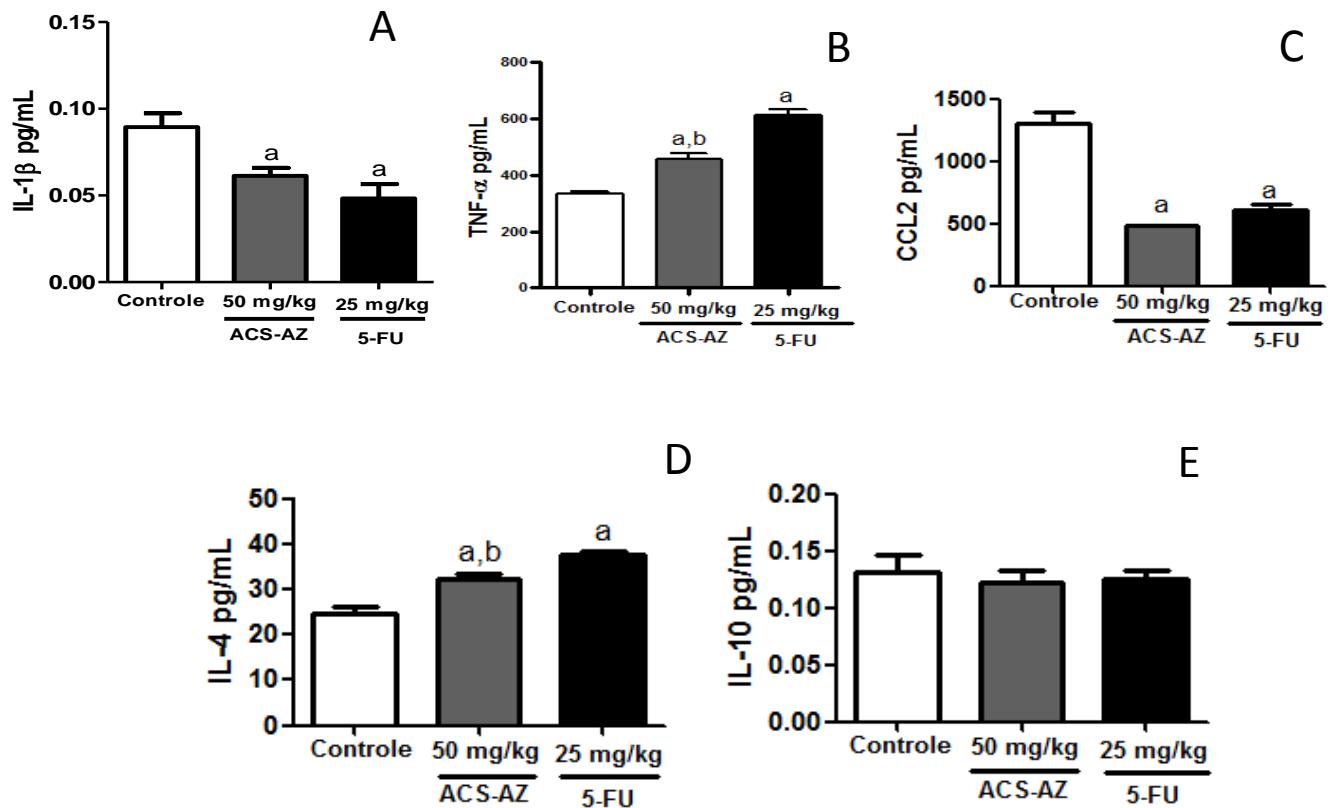
6.2.2.2 Quantificação das citocinas IL-1 β , TNF- α , CCL-2, IL-4, IL-10

Pode-se observar alterações nas concentrações de algumas citocinas pró-inflamatórias, incluindo redução significativa de IL-1 β ($0,06 \pm 0,01$ pg/mL; $p<0,05$), e na quimiocina CCL-2 ($485,4 \pm 2,5$ pg/mL; $p<0,05$) nos animais tratados com ACS-AZ na dose de 50 mg/kg, quando comparadas aos seus respectivos grupos controle (IL-1 β : $0,09 \pm 0,01$ pg/mL e CCL-2: $1313,0 \pm 90,7$ pg/mL). Com relação ao TNF- α , houve aumento da sua concentração após tratamento com ASC-AZ na dose de 50 mg/kg ($472,8 \pm 22,9$ pg/mL; $p<0,05$) e com 5-FU ($629,1 \pm 16,7$ pg/mL; $p<0,05$) quando comparados ao grupo controle ($334,5 \pm 5,9$ pg/mL).

Nos animais tratados com o 5-FU, também foi detectado redução de IL-1 β ($0,05 \pm 0,01$ pg/mL; $p<0,05$) e da quimiocina CCL2 ($614,7 \pm 30,5$ pg/mL, $p<0,05$), em comparação com os respectivos controles (IL-1 β : $0,09 \pm 0,01$ pg/mL e CCL-2: $1313,0 \pm 90,7$ pg/mL).

Com relação as citocinas anti-inflamatórias, houve aumento na concentração de IL-4 dos grupos tratados com ASC-AZ na dose de 50 mg/kg ($32,4 \pm 1,0$ pg/mL; $p<0,05$) e tratado com 5-FU ($37,5 \pm 0,5$ pg/mL; $p<0,05$) quando comparados ao grupo controle ($24,8 \pm 1,3$ pg/mL). Não houve alteração nas concentrações de IL-10 ($0,12 \pm 0,01$ pg/mL; $p<0,05$) nos animais tratados com ACS-AZ ou com 5-FU ($0,13 \pm 0,01$ pg/mL; $p<0,05$) quando comparado ao grupo controle ($0,2 \pm 0,05$ pg/mL) (Figura 9).

Figura 9. Efeito do tratamento com ACS-AZ* (50 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



Fonte: MANGUEIRA, 2018.

LEGENDA: A: IL-1 β . B: IL-12. C: CCL2. D: TNF- α . E: IL-4. F: IL-10. Dados analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU.

*ACS-AZ: N'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

**5-FU: 5-fluorouracila.

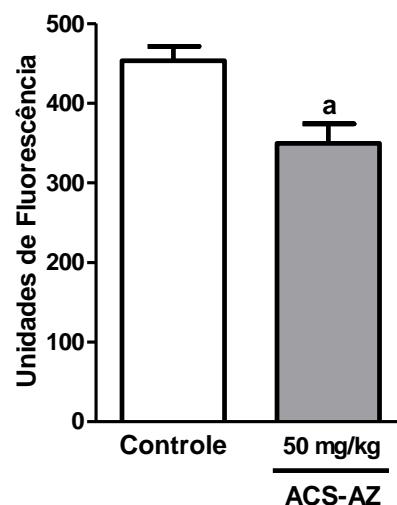
6.2.2.3 Investigação do estresse oxidativo

6.2.2.3.1 Ensaio do 2'7 – dicloro dihidrofluoresceína

A figura 10 representa o efeito do tratamento de sete dias com ACS-AZ (50 mg/kg, i.p.) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em modelo de tumor ascítico de Ehrlich.

O ACS-AZ reduziu a produção de ROS ($349,6 \pm 24,5$ unidades de fluorescência; $p < 0,05$), em relação ao grupo controle ($453,4 \pm 18,0$ unidades de fluorescência).

Figura 10. Efeito do tratamento de sete dias com ACS-AZ* (50 mg/kg, i.p.) na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em modelo de tumor de Ehrlich



Fonte: MANGUEIRA, 2018.

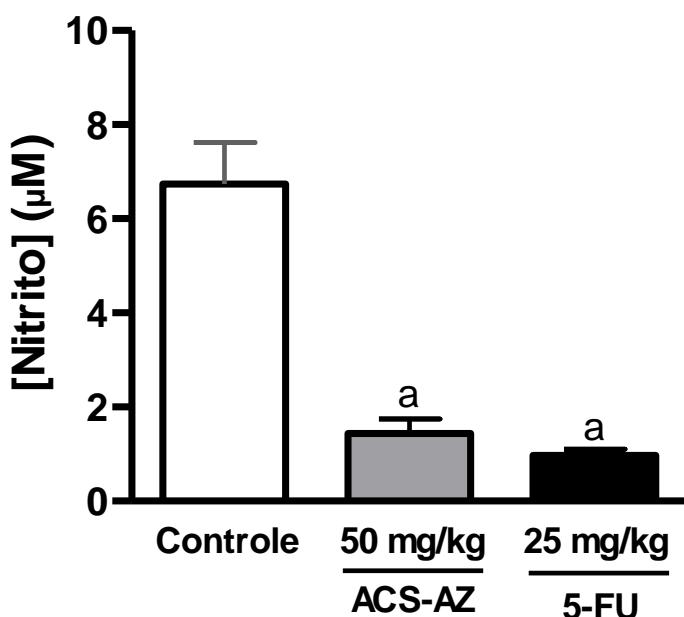
Legenda: Dados apresentados como média ± erro padrão da média de oito animais analisado por *t* student. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

*ACS-AZ: N'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

6.2.2.3.2 Quantificação dos níveis de nitrito

Observou-se significante redução na concentração de nitrito dos animais tratados com ACS-AZ, 50 mg/kg i.p., ($1,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$; $p<0,05$), assim como com o 5-FU, 25 mg/kg, i.p., ($1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$; $p<0,05$), quando comparados com os animais do grupo controle ($6,7 \pm 0,8 \mu\text{M}$) (Figura 11).

Figura 11. Efeito do tratamento de sete dias com ACS-AZ* (50 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) na produção de nitrito no fluido peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico Ehrlich



Fonte: MANGUEIRA, 2018.

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

*ACS-AZ: N'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

** 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 avaliados durante os sete dias de tratamento com o ACS-AZ (50 mg/kg), bem como a evolução ponderal dos animais.

De acordo com os resultados obtidos, não foram observadas alterações significativas no consumo de ração e evolução ponderal dos animais. Todavia, o consumo de água foi significativamente reduzido no grupo tratado com ACS-AZ ($40,8 \pm 1,5$ mL; $p<0,05$), assim como com o 5-FU (25 mg/kg) ($37,8 \pm 2,6$ mL; $p<0,05$), quando comparados ao grupo controle ($56,7 \pm 2,8$ mL).

Tabela 3. Efeito do tratamento de sete dias com ACS-AZ* (50 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	-	$27,8 \pm 3,8$	$56,7 \pm 2,8$	$32,2 \pm 0,3$	$28,1 \pm 0,8$
5-FU	25	$19,7 \pm 0,8$	$37,8 \pm 2,6^a$	$30,7 \pm 0,7$	$28,7 \pm 0,3$
ACS-AZ	50	$21,2 \pm 2,0$	$40,8 \pm 1,5^a$	$30,9 \pm 0,5$	$27,0 \pm 1,1$

Fonte: MANGUEIRA, 2018.

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

^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

*ACS-AZ: N’-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

**5-FU: 5-fluorouracila.

6.2.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

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

Não se observou diferença nos parâmetros avaliados (AST, ALT, ureia e creatinina) após tratamento com ACS-AZ (50 mg/kg) ou 5-FU (25 mg/kg), como pode-se observar na tabela 4.

Tabela 4. Efeito do tratamento de sete dias com ACS-AZ* (50 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)
Valores de Referência***	-	70 – 400	25 – 100	15 – 40	0,2 – 0,6
Controle	-	165,9 ± 12,6	170,1 ± 10,8	35,4 ± 3,0	0,8 ± 0,0
5- FU	25	154,4 ± 8,5	176,6 ± 3,4	35,4 ± 3,1	0,8 ± 0,0
ACS-AZ	50	160,0 ± 8,4	174,3 ± 4,4	35,4 ± 3,0	1,0 ± 0,1

Fonte: MANGUEIRA, 2018.

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

*ACS-AZ: N'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

** 5-FU – 5-fluorouracila.

*** Valores de Referência segundo GAD (2007).

No que diz respeito à avaliação hematológica, não foram evidenciadas alterações significativas em nenhum dos parâmetros do eritrograma e leucograma nos animais tratados com ACS-AZ, quando comparados ao grupo controle (Tabela 5).

Nos animais tratados com a droga padrão 5-FU, em relação ao eritrograma, observou-se redução do número de eritrócitos totais ($5,8 \pm 0,2 \ 10^6/\text{mm}^3$; $p<0,05$), hemoglobina ($12,3 \pm 0,3 \ \text{g/dL}$; $p<0,05$) e hematócrito ($35,0 \pm 1,1\%$; $p<0,05$) em comparação aos seus controles ($9,6 \pm 0,1 \ 10^6/\text{mm}^3$; $14,8 \pm 0,3 \ \text{g/dL}$ e $50,7 \pm 1,2\%$,

respectivamente), além de aumento no HCM ($22,0 \pm 0,4$ pg, $p<0,05$) e CHCM ($36,0 \pm 1,0$ g/dL, $p<0,05$), também quando comparados aos respectivos grupos controles ($14,7 \pm 0,1$ pg; $29,1 \pm 0,2$ g/dL) (Tabela 5).

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

Tabela 5. Efeito do tratamento de sete dias com ACS-AZ* (50 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	Valores de Referência***	Controle	5-FU 25 mg/kg	ACS-AZ 50 mg/kg
Hemárias (10 ⁶ /mm ³)	9,0 – 11,5	9,6 ± 0,1	5,8 ± 0,2 ^a	10,0 ± 0,3 ^b
Hemoglobina (g/dL)	14,5 – 17,5	14,8 ± 0,3	12,3 ± 0,3 ^a	14,5 ± 0,3 ^b
Hematócrito (%)	45,0 – 57,0	50,7 ± 1,2	35,0 ± 1,1 ^a	50,9 ± 1,0 ^b
VCM (fm ³)	45,0 – 55,0	56,6 ± 3,6	63,8 ± 1,7	52,2 ± 1,5 ^b
HCM (pg)	13,0 – 16,0	14,7 ± 0,1	22,0 ± 0,4 ^a	14,2 ± 0,2 ^b
CHCM (g/dL)	29,0 – 34,0	29,1 ± 0,2	36,0 ± 1,0 ^a	28,2 ± 0,3 ^b
Leucócitos totais (10 ³ /mm ³)	1,0 – 12,0	13,3 ± 0,9	3,7 ± 0,3 ^a	15,6 ± 0,9 ^b
Linfócitos (%)	60 – 90	77,0 ± 1,0	88,0 ± 1,1 ^a	73,7 ± 1,4 ^b
Segmentados (%)	10 – 40	19,0 ± 1,1	9,4 ± 0,9 ^a	22,8 ± 1,1 ^b
Monócitos (%)	0 – 6	2,9 ± 0,3	1,0 ± 0,3 ^a	2,8 ± 0,4 ^b
Eosinófilos (%)	0 – 5	1,0 ± 0,3	1,3 ± 0,2	0,6 ± 0,2

Fonte: MANGUEIRA, 2018.

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

^ap < 0,05 dados analisados em comparação com grupo controle. ^bp < 0,05 dados analisados em comparação com grupo 5-FU.

*ACS-AZ: N’-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

** 5-FU: 5-fluorouracila.

*** Valores de Referência segundo GAD (2007).

6.2.3.3 Avaliação dos índices dos órgãos

O tratamento com ACS-AZ não induziu alterações significativas nos índices de coração, timo, fígado e rins. No entanto, foi observado um aumento significativo do índice de baço no grupo tratado com ACS-AZ ($8,9 \pm 0,1$ mg/g; $p<0,05$), quando comparado ao grupo controle ($4,3 \pm 0,2$ mg/g) (Tabela 6).

Tabela 6. Índices dos órgãos de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich após tratamento de sete dias com ACS-AZ* (50 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.)

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de coração (mg/g)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)
Controle	-	$3,8 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,2$	$65,7 \pm 3,2$	$11,1 \pm 0,3$
5-FU	25	$4,1 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,1$	$63,4 \pm 1,3$	$11,1 \pm 0,4$
ACS-AZ	50	$3,9 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,1^{a,b}$	$59,8 \pm 2,4$	$12,0 \pm 0,5$

Fonte: MANGUEIRA, 2018.

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

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

*ACS-AZ: N'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

**5-FU: 5-fluorouracila.

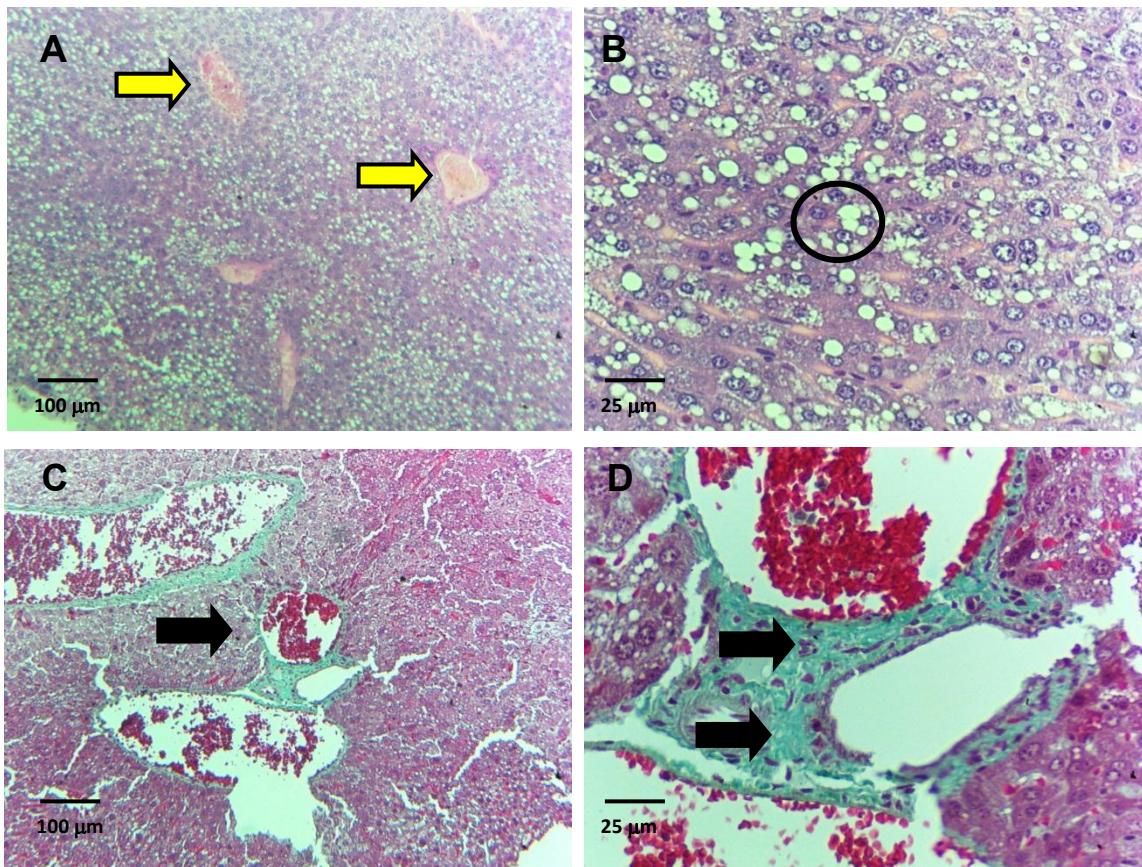
6.2.3.4 Análises histológicas

Para uma avaliação mais detalhada dos possíveis efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos dos animais tratados com ACS-AZ, análises histológicas em HE (hematoxilina e eosina) e tricrômio de gomori foram realizadas.

Ao exame de microscopia de luz, os fígados corados em HE dos animais do grupo controle transplantados apresentaram vasos congestos, visíveis lesões reversíveis, do tipo esteatose micro e macrogoticular caracterizada pelos inúmeros

vacúolos esbranquiçados no citoplasma e núcleo celular periférico (Figura 12A e B). A organização dos cordões hepáticos direcionadas para as veias hepáticas terminais, de paredes finas permaneceram inalteradas. Não foram encontrados necrose de hepatócitos e atipias celulares. Os espaços portais estavam regularmente distribuídos com a presença da tríade vaso-biliar habitual, no entanto a matriz do espaço porta apresentava significativa deposição de colágeno observado nos fígados corados por tricrômio de gomori, caracterizando a fibrose periportal pela típica coloração azulada nesta área (Figura 12C e D).

Figura 12. Efeito do tratamento de sete dias com ACS-AZ* (50 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) na histologia de fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



Fonte: MANGUEIRA, 2018.

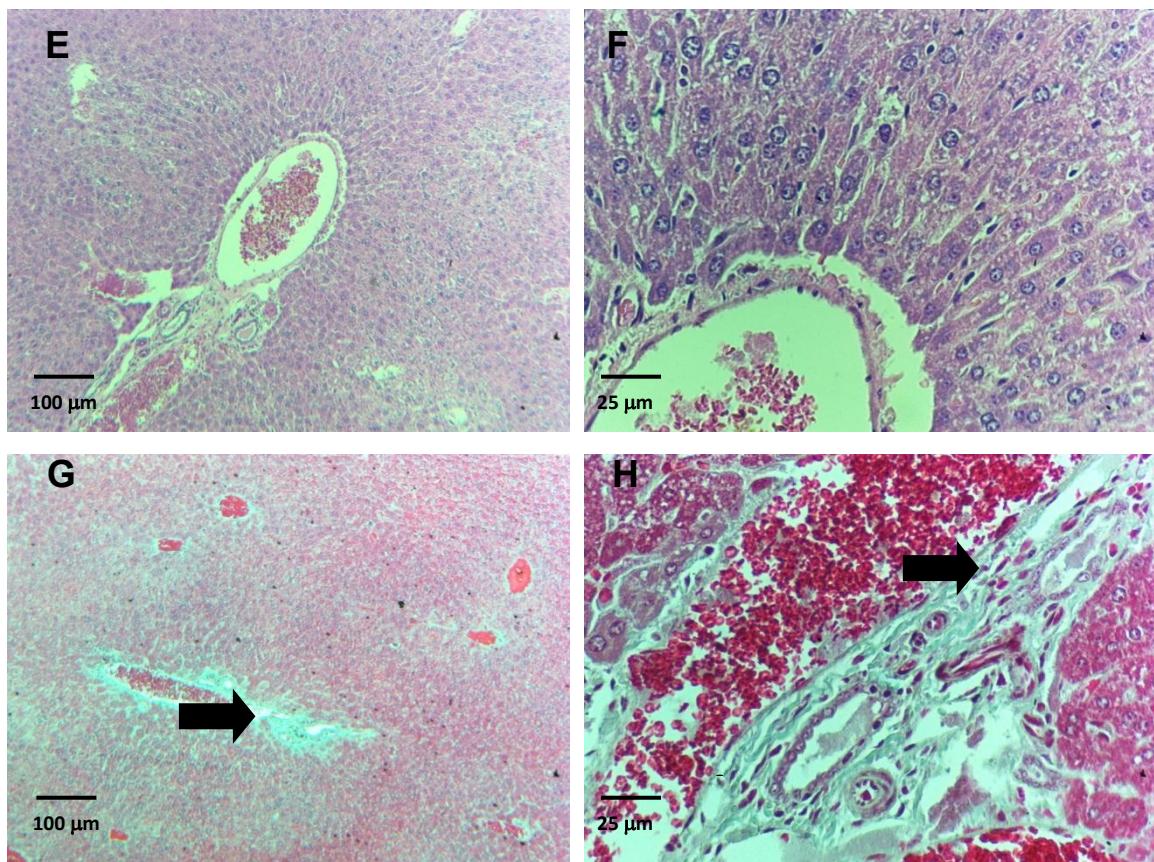
Legenda: Histopatologia do fígado. Controle transplantado (A, B, C e D). Congestão vascular (seta amarela, HE - 100x) (A), esteatose hepática (circulo preto, HE - 400X) (B), discreta fibrose perivascular (seta preta, tricromio de gomori - 100x) (C) e (400x) (D).

*ACS-AZ: N'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

**5-FU: 5-fluorouracila.

Os animais do grupo tratado com o antineoplásico 5-FU (25 mg/kg) apresentaram arquitetura lobular preservada, com células de kupffer e sinusoides hepáticos morfológicamente preservados (Figura 12E e F), hepatócitos poligonais uni ou binucleados com colaração citoplasmática eosinofílica característico da morfologia hepática, no entanto assim como o controle, a matriz do espaço porta apresentava significativa deposição de colágeno em fígado corado por tricromio de gomori (Figura 12G e H).

Figura 12. Efeito do tratamento de sete dias com ACS-AZ* (50 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) na histologia de fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich. (Continuação)



Fonte: MANGUEIRA, 2018.

Legenda: Histopatologia do fígado. 5-FU (25 mg/kg) (E, F, G, H). Arquitetura preservada dos cordões hepáticos (circulo preto, HE - 100x) (E), (HE - 400X) (F), fibrose perivasicular (seta preta, tricromio de gomori - 100x) (G) e (400x) (H).

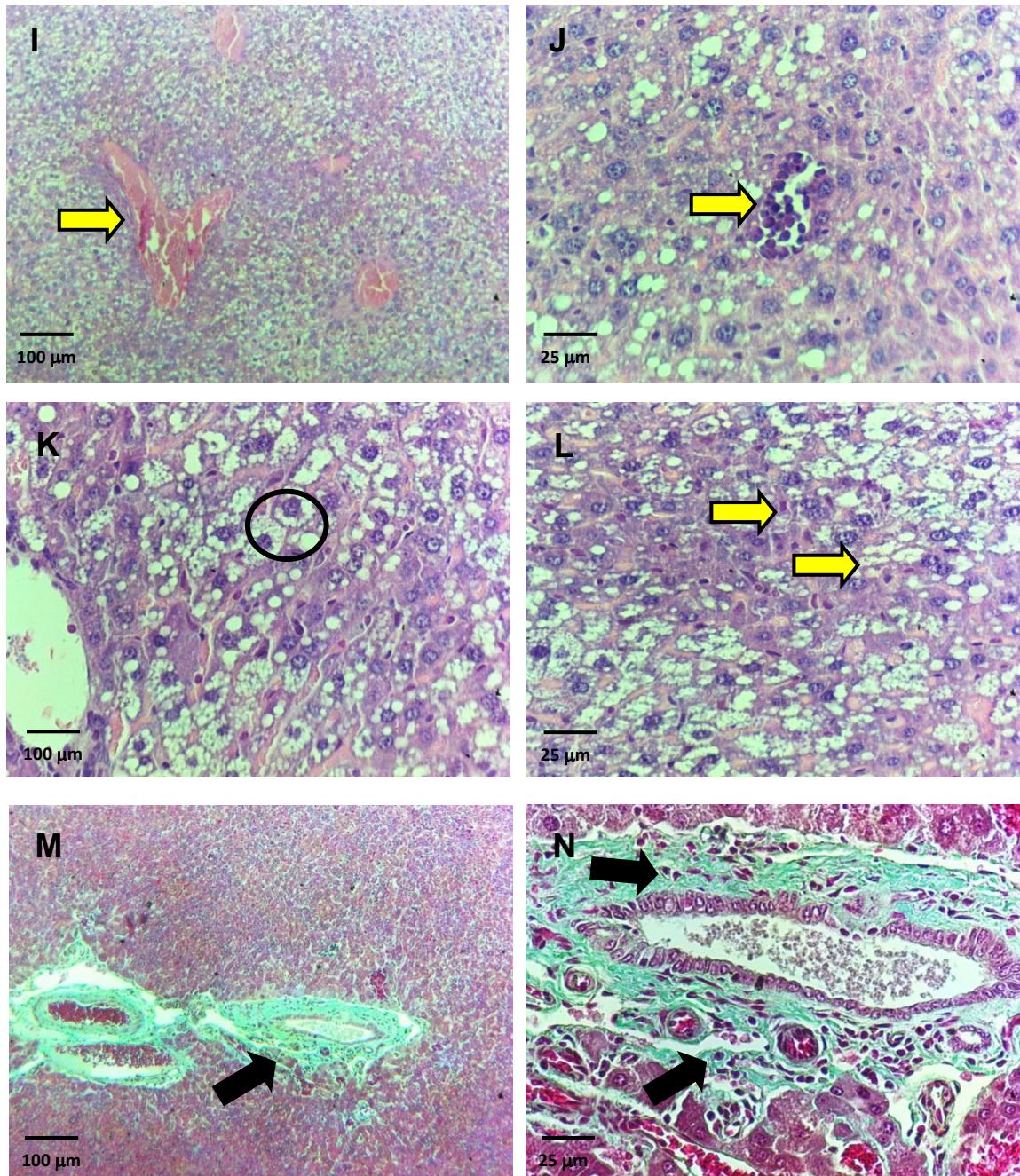
*ACS-AZ: N'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

**5-FU: 5-fluorouracila.

Os animais do grupo tratado com ACS-AZ (50 mg/kg) apresentaram fígados com a presença de algumas alterações histológicas não vistas no controle e outras semelhantes ao controle. No menor aumento (100x) pode-se observar a redução da eosinofilia citoplasmática caracterizada pelo acúmulo de lipídeos citoplasmático (Figura 12I) e, formando as clássicas gotículas micro e macrogoticular vista no aumento de 400x (Figura 12K) característico da esteatose hepática grau leve. Além de processos degenerativos, também foram observados alguns hepatócitos necrosados (Figura 12L) com núcleo picnótico, discreto infiltrado linfoplasmocitário (Figura 12J) e considerável fibrose periportal vista com tricromia de gomori (Figura 12M e N), no entanto a presença dos sinusoides hepáticos e células de Kupffer permaneceram inalteradas.

Na área cortical dos rins foram observados glomérulos preservados, envolvidos por fina cápsula de Bowman e tufo capilar sustentado por delicado mesângio, túbulos contorcidos proximais numerosos e preservados com epitélio simples cúbico e abundante citoplasma e túbulos distais com citoplasma escasso característico de sua morfologia (Figura 13A e B e F). Na medula renal os túbulos coletores foram encontrados sustentados por escasso tecido fibroconjuntivo e revestidos por epitélio com altura variável, de colunar a plano, típico (Figura 13 C,D e E)

Figura 12. Efeito do tratamento de sete dias com ACS-AZ* (50 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) na histologia de fígado de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich. (Continuação)



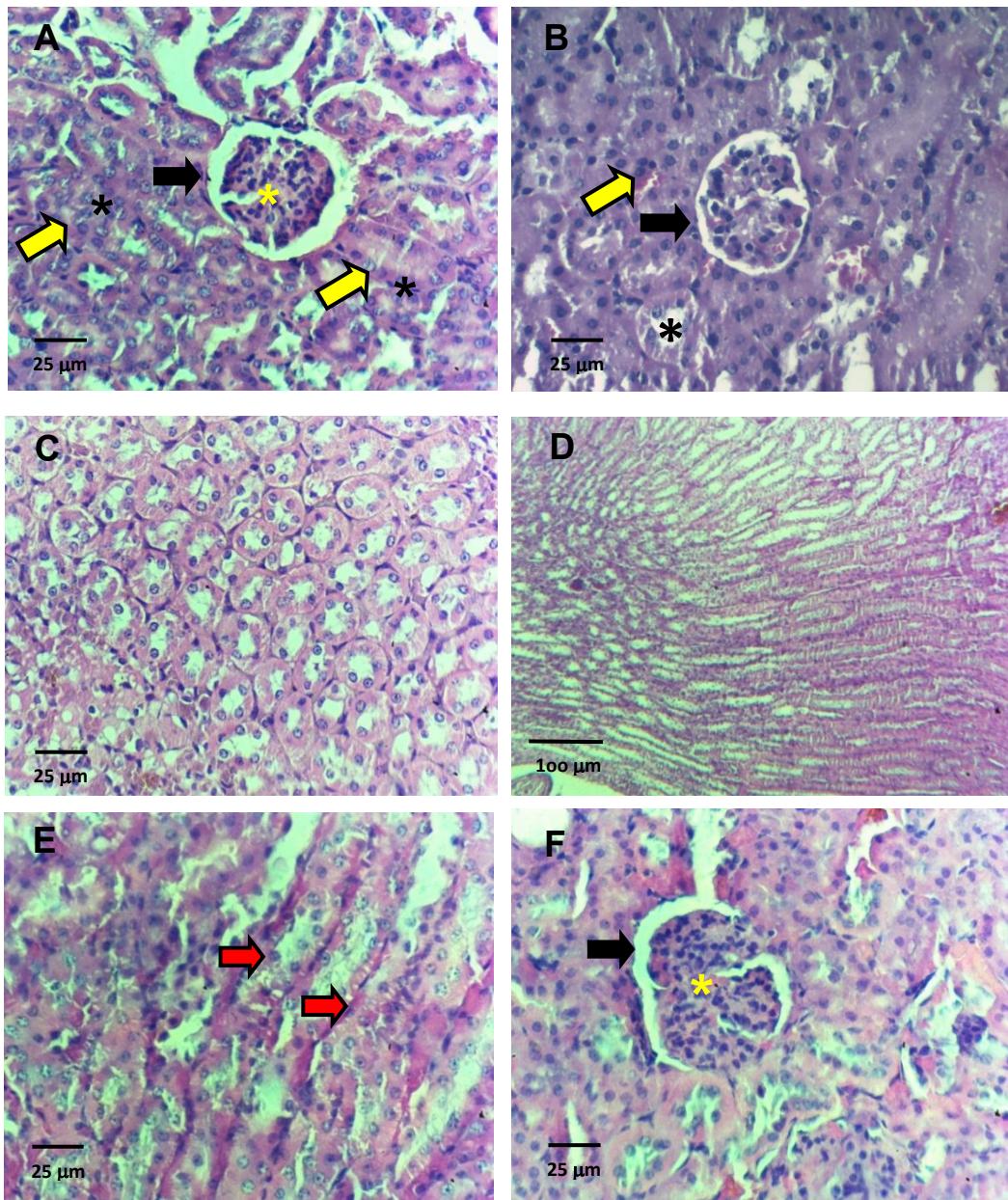
Fonte: MANGUEIRA, 2018.

Legenda: Histopatologia do fígado. Tratados com ACS-AZ (50 mg/kg) (I, J, K, L, M, N), congestão vascular (seta amarela, HE - 100x) (I), discreto infiltrado linfoplasmocitário (seta amarela, HE - 400x) (J), esteatose hepática (circulo preto, HE - 400x) (K), necrose hepática (seta amarela, HE - 400x) (L), fibrose perivasicular (seta preta, tricromio de gomori -100x) (M) e (400x) (N).

*ACS-AZ: N'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

**5-FU: 5-fluorouracila.

Figura 13. Efeito do tratamento de sete dias com ACS-AZ* (50 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) na histologia de rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich



Fonte: MANGUEIRA, 2018.

Legenda: Histopatologia dos rins. Controle transplantado (A, C e D). CórTEX renal com glomérulo preservado circundado por cápsula de Bowman (seta preta) com tufo capilar interno (asterisco amarelo), e túbulos proximais (seta amarela) e distais (asterisco preto) (HE- 400x) (A); medula renal com túbulos coletores preservados e luz visível (HE- 400x) (C) e (HE- 100x) (D). 5-FU (B). Glomérulo preservado (seta preta) e túbulos proximais (seta amarela) e distais (asterisco preto) (HE- 400x) (B). Tratado com ACS-AZ (50 mg/kg) (E e F). Epitélio tubular preservado (seta vermelha) (HE- 100x) (E); glomérulo preservado circundado por cápsula de Bowman (seta preta) com tufo de capilar interno, e túbulos proximais e distais preservados (asterisco amarelo) (HE- 400x) (F).

6.2.4 Estudos psicofarmacológicos

6.2.4.1 Teste do *Rota rod*

Não foram observadas alterações significativas no tempo de permanência dos animais na barra giratória do aparelho de *rota-rod*, após tratamento com ACS-AZ (50 mg/kg, i.p.), quando comparado ao grupo controle. No entanto, como esperado, o tratamento com o diazepam reduziu o tempo de permanência dos animais na referida barra, nos tempos de 30 e 60 min, quando comparados ao grupo controle (Tabela 7).

Tabela 7. Tempo de permanência na barra giratória (*rota-rod*) de camundongos submetidos ao tratamento com ACS-AZ* (50 mg/kg, i.p.) e Diazepam (1 mg/kg, i.p.)

Grupos	Dose (mg/kg)	Tempo de permanência na barra giratória (s)		
		30 min	60 min	120 min
Controle	-	175,8 ± 2,3	176,5 ± 1,5	177,4 ± 0,8
ACS-AZ	50	175,6 ± 2,0 ^b	178,0 ± 0,7 ^b	175,5 ± 1,6
Diazepam	1	56,7 ± 0,9 ^a	98,9 ± 0,6 ^a	172,2 ± 2,0

Fonte: MANGUEIRA, 2018.

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

^a*p* < 0,05 dados analisados em comparação com grupo controle. ^b*p* < 0,05 dados analisados em comparação com grupo Diazepam.

*ACS-AZ: N'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

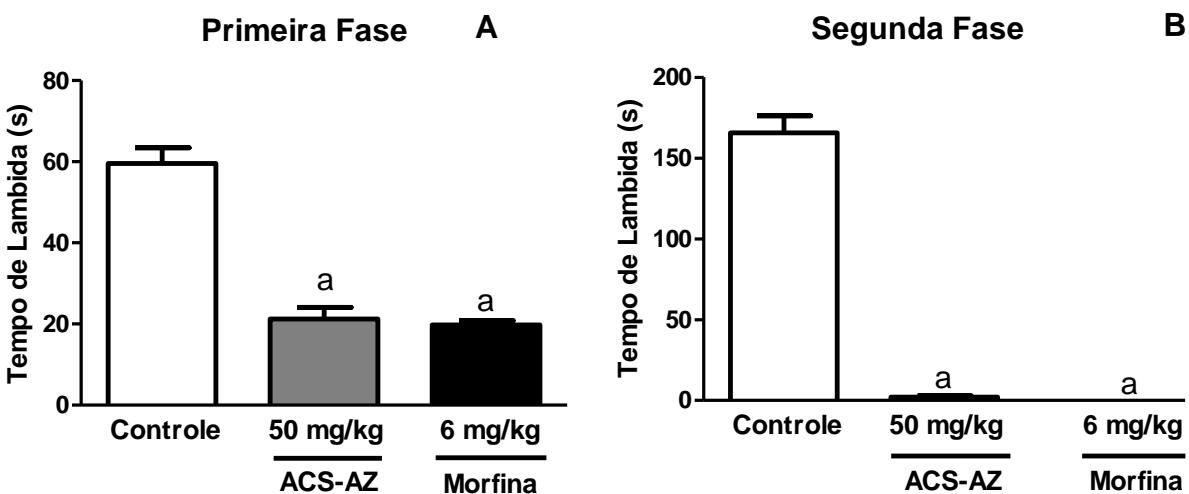
6.2.4.2 Avaliação da atividade antinociceptiva

6.2.4.2.1 Teste da Formalina

Os resultados expostos na Figura 14 evidenciam uma redução significativa do tempo de lambida da pata dos animais tratados com o ACS-AZ (50 mg/kg, i.p.) ($21,2 \pm 2,9$ s; $p<0,05$) e com a droga padrão, morfina (6 mg/kg, i.p.) ($19,8 \pm 1,0$ s; $p<0,05$), quando comparados ao grupo controle ($59,6 \pm 3,9$ s), na primeira fase do teste da formalina.

Conforme a figura 14, o ACS-AZ (50 mg/kg, i.p.) também diminuiu significativamente o tempo de lambida da pata na segunda fase do teste da formalina ($2,0 \pm 0,08$ s; $p<0,05$), assim como a droga padrão, morfina (6 mg/kg, i.p.) ($0,07 \pm 0,01$ s; $p<0,05$), quando comparados ao controle ($165,7 \pm 10,4$ s).

Figura 14. Efeito da administração de dose única de ACS-AZ* (50 mg/kg, i.p.) e morfina (6 mg/kg, i.p.) na primeira (A) e segunda fase (B) do teste da formalina em camundongos.



Fonte: MANGUEIRA, 2018.

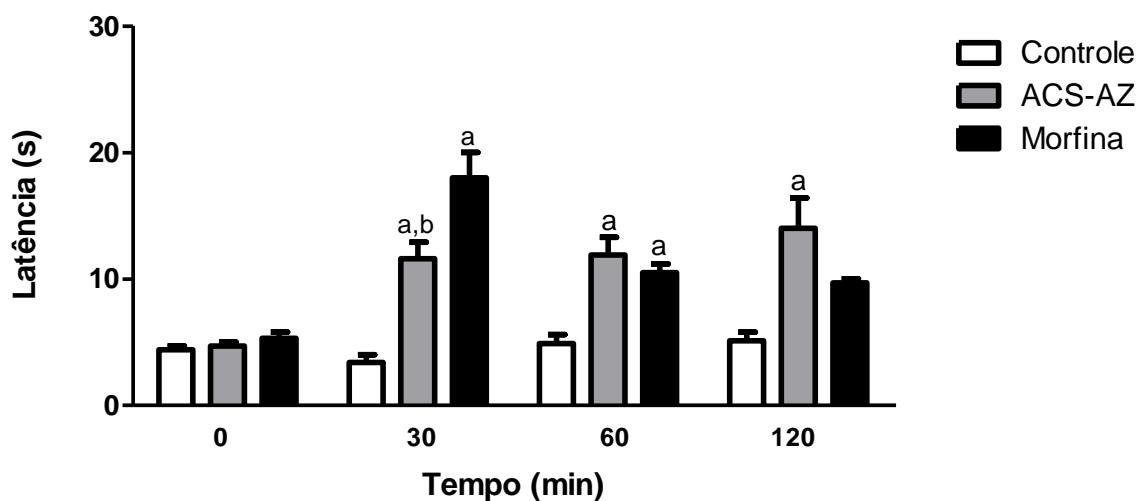
Legenda: Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de oito animais analisados. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de Tukey $^a p<0,05$ comparado ao grupo controle.

*ACS-AZ: N'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

6.2.4.2.2 Teste da placa quente

De acordo com a figura 15, é possível observar que o ACS-AZ (50 mg/kg, i.p.) aumentou significativamente o tempo de latência (em segundos) dos animais no estímulo térmico da placa quente após 30 ($11,6 \pm 1,3$ s; $p<0,05$), 60 ($11,9 \pm 1,4$ s; $p<0,05$) e 120 ($14,0 \pm 2,4$ s; $p<0,05$) minutos de sua administração, quando comparado aos grupos controles, respectivamente ($3,4 \pm 0,6$ s; $4,9 \pm 0,7$ s; $5,1 \pm 0,7$ s). A droga padrão, morfina (10 mg/kg, i.p.), também aumentou o tempo de permanência dos animais no aparelho nos tempos de 30 ($18,0 \pm 2,0$ s; $p<0,05$) e 60 ($10,5 \pm 0,7$ s; $p<0,05$), quando comparados aos grupos controles.

Figura 15. Efeito da administração de dose única de ACS-AZ* (50 mg/kg, i.p.) e morfina (10 mg/kg, i.p.) no teste da placa quente em camundongos



Fonte: MANGUEIRA, 2018.

Legenda: Dados apresentados como média ± erro padrão da média de oito animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p<0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p<0,05$ comparado ao grupo Morfina.

*ACS-AZ: N'-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

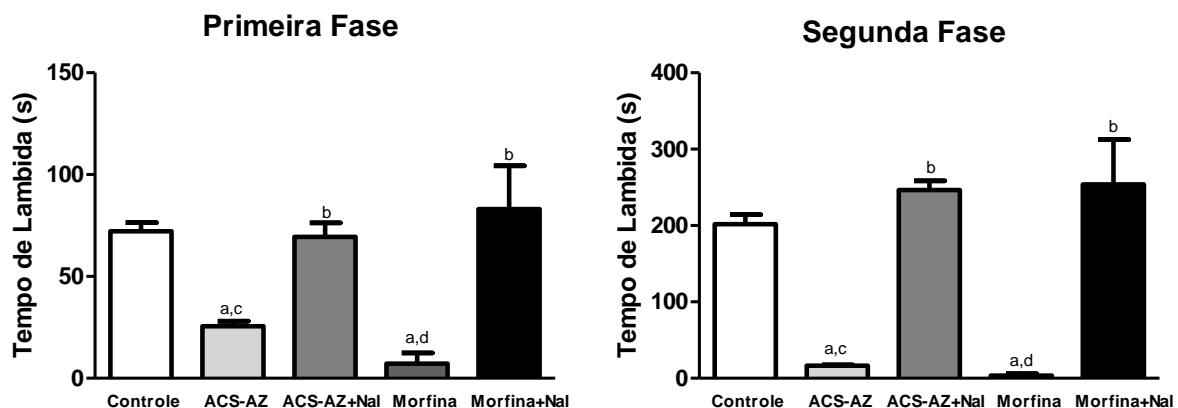
6.2.4.2.3 Avaliação dos mecanismos de ação antinociceptiva

6.2.4.2.3.1 Participação do sistema opioide

A figura 16 mostra o efeito do ACS-AZ sobre a via opioide no teste da formalina. Tanto o ACS-AZ (50 mg/kg, i.p.) (1^a fase: $25,5 \pm 2,6$ s; $p<0,05$ e 2^a fase: $16,5 \pm 1,1$ s; $p<0,05$) quanto a morfina (6 mg/kg, i.p.) (1^a fase: $7,1 \pm 1,9$ s; $p<0,05$ e 2^a fase: $3,4 \pm 0,7$ s; $p<0,05$), reduziram significativamente o tempo de lambida da pata no teste da formalina, quando comparados ao grupo controle (1^a fase: $72,1 \pm 4,3$ s e 2^a fase: $201,0 \pm 12,0$ s).

O pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, i.p.) bloqueou o efeito antinociceptivo observado nos animais tratados com o ACS-AZ (50 mg/kg, i.p.) (1^a fase: $69,5 \pm 6,9$ s; $p<0,05$ e 2^a fase: $246,6 \pm 11,9$ s; $p<0,05$), quando comparados ao grupo que recebeu apenas o ACS-AZ (50 mg/kg, i.p.) (1^a fase: $25,5 \pm 2,6$ s; $p<0,05$ e 2^a fase: $16,5 \pm 1,1$ s; $p<0,05$), aumentando significativamente o tempo de lambida da pata desses animais. A morfina (6 mg/kg, i.p.) também apresentou aumento no tempo de lambida da pata, tendo seu efeito revertido pela naloxona (grupo naloxona + morfina: 1^a fase: $83,0 \pm 8,1$ s e 2^a fase: $246,6 \pm 22,4$ s), comparado ao grupo que recebeu apenas a morfina.

Figura 16. Efeito da nal* (5 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do ACS-AZ** (50 mg/kg, i.p) e morfina (6 mg/kg, i.p.), na primeira e segunda fase do teste da formalina em camundongos



Fonte: MANGUEIRA, 2018.

Legenda: Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de oito animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p<0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p<0,05$ comparado ao grupo Morfina. ^c $p<0,05$ comparado ao grupo ACS-AZ+Nal. ^d $p<0,05$ comparado ao grupo Morfina+Nal.

*Nal: Naloxona.

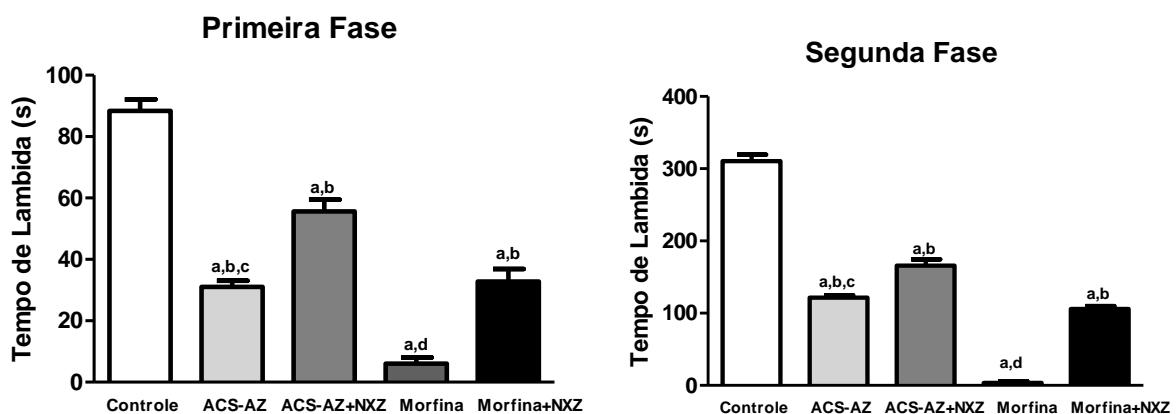
**ACS-AZ: N’-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

6.2.4.2.3.1 Participação dos receptores opioidérgicos seletivos μ 1

A figura 17 mostra o efeito do ACS-AZ sobre os receptores opioidérgicos seletivos μ 1, no teste da formalina. Tanto o ACS-AZ (50 mg/kg, i.p.) (1^a fase: $31,0 \pm 2,0$ s; $p<0,05$ e 2^a fase: $121,6 \pm 3,4$ s; $p<0,05$) quanto a morfina (6 mg/kg, i.p.) (1^a fase: $6,0 \pm 0,7$ s; $p<0,05$ e 2^a fase: $3,4 \pm 0,7$ s; $p<0,05$), reduziram significativamente o tempo de lambida da pata no teste da formalina, quando comparados ao grupo controle (1^a fase: $88,4 \pm 3,8$ s e 2^a fase: $310,0 \pm 9,0$ s).

O pré-tratamento com naloxonazine (10 mg/kg, i.p.) bloqueou parcialmente o efeito antinociceptivo observado nos animais tratados com o ACS-AZ (50 mg/kg, i.p.) (1^a fase: $55,6 \pm 3,9$ s; $p<0,05$ e 2^a fase: $165,8 \pm 8,7$ s; $p<0,05$), quando comparados ao grupo que recebeu apenas o ACS-AZ (50 mg/kg, i.p.) (1^a fase: $31,0 \pm 2,0$ s; $p<0,05$ e 2^a fase: $121,6 \pm 3,4$ s; $p<0,05$), aumentando significativamente o tempo de lambida da pata desses animais. A morfina (6 mg/kg, i.p.) também apresentou aumento no tempo de lambida da pata, tendo seu efeito parcialmente revertido pela naloxonazine (grupo naloxonazine + morfina: 1^a fase: $32,7 \pm 1,5$ s e 2^a fase: $105,8 \pm 1,4$ s), comparado ao grupo que recebeu apenas a morfina.

Figura 17. Efeito da NXZ * (10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antinociceptiva do ACS-AZ** (50 mg/kg, i.p) e morfina (6 mg/kg, i.p.), na primeira e segunda fase do teste da formalina em camundongos



Fonte: MANGUEIRA, 2018.

Legenda: Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de oito animais analisados por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p<0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p<0,05$ comparado ao grupo Morfina. ^c $p<0,05$ comparado ao grupo ACS-AZ+NXZ. ^d $p<0,05$ comparado ao grupo Morfina+NXZ.

*NXZ: Naloxonazina. **ACS-AZ: N'-(6-cloro-2-metoxicridin-9-yl)-2-cianoacetohidrazida.

Discussão

7 DISCUSSÃO

Considerando a riqueza química e o potencial biológico de derivados acridínicos, especialmente no que se refere a sua capacidade de intercalar o DNA e inibir a função das topoisomerases (LAFAYETTE et al., 2013; FU et al., 2017; SILVA et al., 2018), diferentes derivados acridínicos vem sendo estudados em relação ao seu potencial farmacológico.

No presente trabalho, o derivado acridínico sintético inédito n’-(6-cloro-2-metoxiacridin-9-il)-2-cianoacetohidrazide (ACS-AZ), foi testado em relação à toxicidade e atividades antitumoral e antinociceptiva.

Inicialmente, foi realizado o ensaio de toxicidade não clínica aguda com o ACS-AZ em camundongos, com o objetivo de determinar doses seguras a serem utilizadas nos ensaios farmacológicos. Além disso, uma triagem psicofarmacológica também foi realizada com o objetivo de detectar qualitativamente alguns efeitos importantes sobre o sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso autônomo (SNA) (ALMEIDA, 2006; SANTOS et al., 2018).

Com base nos resultados obtidos, ACS-AZ pode ser considerada uma substância de baixa toxicidade nas condições experimentais avaliadas, uma vez que a DL50 foi estimada em torno de 500 mg/kg, tendo sido classificada na categoria 4 da *Globally Harmonized Classification System* (GHS), segundo o guia 423 da OECD. Entre todos os parâmetros comportamentais avaliados, foram observadas apenas contorções abdominais como efeito de alteração no SNC, considerado sem importância clínica, pois desapareceu em até 30 minutos após a administração.

Em relação a toxicidade aguda de derivados acridínicos, a literatura descreve que esses compostos podem apresentar diferentes perfis de atividade, representado por alguns derivados caracterizados com baixa toxicidade aguda (MANGUEIRA et al., 2017) e outros derivados caracterizados com alta toxicidade aguda (PAN et al., 2007).

Estudos de toxicidade não clínica aguda constituem um dos primeiros testes a serem realizados em avaliação toxicológica não clínica de um produto para uso humano, caracterizando potenciais efeitos adversos e fornecendo estimativas iniciais de margens de segurança (RODEIRO; REMIREZ; FLORES, 2018).

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; SANTOS et al., 2018).

Além do ensaio de toxicidade aguda, testes de genotoxicidade são necessários para avaliar o perfil de toxicidade de um composto sobre o DNA. Entre os ensaios de genotoxicidade amplamente recomendados por agências regulatórias nacionais e internacionais, pode-se citar o ensaio do micronúcleo (BRASIL, 2013; OECD, 2014). O ensaio do micronúcleo em sangue periférico de roedores, utilizado para avaliar a indução de aberrações cromossômicas, é considerado o primeiro ensaio a ser realizado para avaliar o potencial mutagênico *in vivo*, uma vez que, a demonstração de ausência de atividade mutagênica e efeito não genotóxico em sangue periférico constitui uma propriedade importante em estudos não clínicos para novos e/ou potenciais agentes anticancerígenos (RECIO et al., 2010; MELLO-ANDRADE et al., 2018).

Desta forma, o ensaio do micronúcleo é utilizado para detectar genotoxicidade de uma substância mediante seu potencial clastogênico, que se refere à quebra de cromossomos, e/ou aneugênico, que avalia a aneuploidia ou segregação cromossômica anormal em consequência de disfunções no aparato mitótico (HAYASHI, 2016; PARDINI et al., 2017; MATSUYAMA; KITAMOTO; TOMIGAHARA, 2018).

Para a avaliação do efeito genotóxico de ACS-AZ foi selecionada a dose de 150 mg/kg, sendo esta dose menor que 1/3 da DL₅₀ de ACS-AZ (500 mg/kg), podendo ser utilizada em outros estudos farmacológicos (ODEGHE; UWAKWE; MONAGO, 2012; AMELO; NAGPAL; MAKONNEN, 2014; SANTOS et al., 2018). Uma vez que não foi observado aumento no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico, pode-se sugerir que o ACS-AZ não possui efeito genotóxico *in vivo*, nas condições experimentais avaliadas. Esse resultado corrobora dados da literatura que demonstram que a amsacrina, principal representante da classe dos derivados acridínicos, e o ACS-AZ10 não induzem genotoxicidade no ensaio do micronúcleo (LYNCH et al., 2008; MANGUEIRA et al., 2017).

Para a avaliação da atividade antitumoral *in vivo*, utilizou-se a linhagem de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE) que corresponde ao adenocarcinoma mamário

de camundongo fêmea. Este é um modelo tumoral referido como um carcinoma indiferenciado, originalmente hiperdiploide, com alta capacidade transplantável, não regressivo, de rápida proliferação, 100% de malignidade e que não possui antígeno de transplante tumor específico (BELCAVELLO et al., 2012; ROLIM et al., 2017).

Como tratamento antitumoral padrão foi utilizado o antimetabolito 5-fluorouracil (5-FU), um dos fármacos mais prescritos no tratamento de tumores sólidos. É uma droga que atua especificamente nas fases G1 e S do ciclo celular, interferindo no metabolismo dos nucleosídeos, causando supressão do RNA e da replicação do DNA (LORIOT et al., 2018). O principal mecanismo de ação do 5-FU consiste na inibição da enzima timidilato sintase, por meio do metabólito ativo, monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), que forma um complexo ternário inativo com a timidilato sintase e o 5-10-metilenotetrahidrofolato (MTHF) (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; BORRO et al., 2017).

Apesar de muitas pesquisas relatarem a eficácia do 5-FU no tratamento clínico, as taxas de resposta são modestas devido à alta citotoxicidade e menor eficácia terapêutica no tratamento da doença avançada (LORIOT et al., 2018). No presente estudo, 5-FU induziu potente atividade antitumoral por reduzir todos os parâmetros avaliados (volume, massa tumoral e viabilidade celular), o que justifica a escolha deste fármaco como droga padrão em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE).

Considerando que o tratamento de sete dias com ACS-AZ em animais transplantados com CAE reduziu significativamente os parâmetros de volume e massa tumorais e viabilidade celular, e ainda que não houve diferença significante entre o efeito produzido pelo ACS-AZ (50 mg/kg) e pela droga padrão utilizada (5-FU, 25 mg/kg), pode-se inferir que ACS-AZ apresenta atividade antitumoral *in vivo*.

Esses resultados corroboram dados da literatura que descrevem significativa atividade antitumoral de derivados acridínicos, incluindo a amsacrina, que tem sido usada no tratamento de leucemia aguda, linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin e cânceres de cabeça e pescoço (FANG et al., 2016; FU et al., 2017). Ainda, vários outros derivados acridínicos, a exemplo do 1-nitro-9-alquilamino-acridina, do 1-nitro-9-(hidroxi-alquilamino)-acridina (CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA; KOŁODZIEJCZYK, 2011), da 9-Anilinoacridina (ALBINO et al, 2018) e do ACS-AZ10 (MANGUEIRA et

al., 2017) têm sido descritos na literatura em relação ao seu potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo*.

Para a seleção da dose a ser utilizada na investigação dos possíveis efeitos antitumorais e toxicológicos de ACS-AZ, foi considerado que houve diferença significativa entre o efeito produzido pelo ACS-AZ nas doses de 25 mg/kg e 50 mg/kg, sendo, portanto, 50 mg/kg a dose que produziu o efeito máximo e a dose selecionada para a continuação dos estudos.

A vascularização tumoral é um passo fundamental no crescimento e metástase do tumor. Os tumores sólidos são, de fato, incapazes de crescer mais do que 1-2 mm³ na ausência de um suprimento vascular de oxigênio e nutrientes (YANG, et al., 2014; LOPATINA et al., 2018). Nesse sentido, a terapia antiangiogênica é a estratégia que visa impedir o crescimento de novos vasos, e, consequentemente, o crescimento do tumor (KAZEMI-LOMEDASHT et al., 2017).

Diante desta premissa, e considerando que o ACS-AZ diminuiu significativamente a capacidade angiogênica de CAE, pode-se inferir que o mecanismo de ação antitumoral deste derivado acridínico envolve um efeito antiangiogênico. Todavia, o potencial antiangiogênico de derivados acridínicos não é bem descrito na literatura, sendo o único relato encontrado referente ao efeito antiangiogênico do ACS-AZ10 (MANGUEIRA et al., 2017).

O microambiente tumoral mantém a neovascularização associada ao tumor quase sempre ativa, uma vez que fornece suporte à matriz basal para formação de novos vasos durante a progressão do tumor, isso ocorre mediante o fornecimento de uma quantidade excessiva de fatores pró-angiogênicos, incluindo interleucinas e quimiocinas (YIN et al., 2017).

Ainda, dentre os fatores que favorecem a proliferação do tumor, encontram-se as ROS, caracterizadas como produtos da fosforilação oxidativa excessiva nas mitocôndrias, bem como, produtos da β-oxidação mediada por peroxissomas de ácidos graxos ramificados e de cadeia longa, que regulam uma variedade de importantes vias de sinalização para sobrevivência e proliferação celular, tais como MAPK, NF-κB, TNF-α e TGF-β (GU et al., 2018).

Desta forma, foram realizadas as quantificações de citocinas, quimiocinas, ROS e de nitrito, para verificar as alterações que o ACS-AZ promove no estado inflamatório e na modulação do sistema imune.

A inflamação é um componente importante do microambiente tumoral. Neste contexto, a IL-1 β é uma citocina inflamatória que desempenha um papel fundamental na carcinogênese e na progressão tumoral, atuando em diferentes níveis que incluem a angiogênese tumoral, a ativação da via da IL-17, a indução de células supressoras derivadas de mieloides e o recrutamento de macrófagos, e a indução de invasão e metástase (MANTOVANI; BARAJON; GARLANDA, 2018).

Assim, ressaltando o efeito dual de diferentes citocinas, a IL-1 β que demonstra ter um papel essencial na indução de respostas imunes adaptativas antitumorais, também está relacionada com a proliferação de células tumorais, se mostrando essencial para a conversão de fibrócitos em fibroblastos associados ao câncer, ativação da via do NF- κ B e ainda, indução de angiogênese mediante a expressão de VEGF e de seus receptores nas células endoteliais (GUO et al., 2016; HAJEK et al., 2018).

Considerando a redução na concentração de IL-1 β observada após tratamento com ACS-AZ, é possível inferir que este composto reduz a resposta inflamatória, o que pode explicar o efeito antiangiogênico do ACS-AZ a partir de um possível bloqueio da ação de VEGF e de seus receptores nas células endoteliais. Ainda, a redução de IL-1 β pode estar diretamente relacionada com a redução de ROS, também induzida pelo tratamento com ACS-AZ, uma vez que as ROS podem alterar diretamente o microambiente tumoral pela liberação de citocinas inflamatórias, dentre elas a IL-1 β (GU et al., 2018).

Relatos da literatura com relação à influência de derivados acridínicos na quantificação de citocinas são, de forma geral, escassos. No entanto, dados da literatura mostram que a velnacrina (tacrin-1-ol), um derivado acridínico com ação colinérgica central, não produziu alterações no nível plasmático de IL-1 β , porém, esse efeito foi observado em modelo de inflamação da microcirculação e não em modelo relacionado a estudos de atividade antitumoral da droga (SILVA et al., 2007).

Ainda relacionado com a redução da microdensidade vascular peritumoral observada após tratamento com o ACS-AZ, é possível inferir que o mecanismo desse efeito também esteja diretamente envolvido com a redução de CCL2, descrita como uma quimiocina reconhecidamente pró-angiogênica e, consequentemente, pró-antitumoral (IZHAK et al., 2012; LIU et al., 2018). Dados da literatura mostram que a inibição de CCL2 diminui o volume do tumor subcutâneo em camundongos,

corroborando assim, seu efeito-prótumoral (ABANGAN et al., 2010; WANG et al., 2018).

Ainda, é relatado na literatura que um aumento nos níveis de ROS resulta no aumento da expressão de CCL2, e altos níveis de CCL2 gera mais produção de ROS (LI et al., 2014). Desta forma, é possível inferir que ACS-AZ reduz os níveis de CCL2, reduzindo também ROS.

A citocina pró-inflamatória TNF- α produzida por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e mastócitos com capacidade de ativar a fagocitose (NETEA et al., 2010; CHEN et al., 2016; KIM et al., 2018), desempenha importante papel na inflamação, promovendo a inibição da proliferação de células tumorais, mecanismos de citotoxicidade tumoral mediada por macrófagos (MERHEB; ABDEL-MASSIH; KARAM, 2018) e indução de apoptose (SHIN et al., 2014; BARBOSA et al., 2018).

Desta forma, considerando a regulação positiva nos níveis de TNF- α observada após tratamento com ACS-AZ, é possível inferir que este composto modula a resposta inflamatória mediante a expressão desta citocina, que estaria induzindo citotoxicidade.

Não há dados na literatura que descrevam os efeitos de derivados acridínicos na imunomodulação do TNF- α em modelos tumorais. Todavia, alguns dados da literatura mostram que derivados acridínicos (9-aminobutilacridina, 9-etylaminoacridina, 9-imino-10-butilacridina e 9-imino-10-etylacridina, dentre outros) promovem a supressão da síntese de TNF- α induzida pela endotoxina produzida por *Staphylococcus aureus* em leucócitos humanos (MANDI et al., 1994).

Além disso, ACS-AZ também regula positivamente os níveis de IL-4, uma interleucina com características antitumorais pela infiltração de eosinófilos e macrófagos produzidas por TNF- α e IL-1 β no tumor, o que corrobora o nível aumentado de TNF- α pelo ACS-AZ (MERHEB; ABDEL-MASSIH; KARAM, 2019).

Considerando que ACS-AZ não induziu alteração nos níveis de IL-10, uma citocina caracterizada pela atividade anti-inflamatória e/ou antitumoral mediada pela imunossupressão das células tumorais, decorrente do aumento da proliferação de células B e produção de anticorpos (SHRIHARI, 2017; LENART et al., 2017), a modulação dos níveis dessa citocina.

Foram encontrados dados na literatura relacionados aos efeitos de derivados acridínicos nos níveis de IL-4 e IL-10 apenas em modelos de inflamação. A

mepacrina, um derivado acridínico com ação antimicrobiana, empregada principalmente em tratamento antiparasitário, foi capaz de induzir aumento da concentração de IL-4 e IL-10 em modelo de inflamação de vias aéreas (AHMAD et al., 2011).

Em relação a ROS, sabe-se que as células tumorais tem sido caracterizadas por quantidades elevadas quando comparadas às células normais, e ainda, que ROS estão envolvidas em todas as fases da carcinogênese, o que inclui os processos de iniciação, promoção e progressão da doença, induzindo danos ao DNA, e proteínas, bem como alterando diferentes vias de sinalização e processos metabólicos necessários para a manutenção do tumor, uma vez que estimulam a proliferação celular, angiogênese e metástase, além de inibir vias pró-apoptóticas (KATAKWAR; NAIK; MITTAL, 2016; BRENNEISEN; REICHERT, 2018).

Portanto, a avaliação da modulação do estresse oxidativo é essencial para a caracterização do efeito antitumoral. Considerando que o tratamento com ACS-AZ reduziu os níveis de ROS em modelo de CAE, pode-se inferir que parte do seu mecanismo de ação antitumoral envolve o seu potencial antioxidante.

Sendo assim, ACS-AZ atua reduzindo níveis celulares de ROS e combatendo seus efeitos pró-tumorais relacionados ao estímulo de diversas vias de sinalização envolvidas com a proliferação e a sobrevida. Além disso, considerando os efeitos pró-angiogênicos de ROS (MOURA, 2017), pode-se sugerir que ACS-AZ induz seus efeitos antiangiogênicos (ou parte dele), por modular o estresse oxidativo celular.

Estes resultados diferem de dados da literatura que mostram que alguns derivados acridínicos, a exemplo do N-((1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)-2-butilacridina-9-amina, induzem estresse oxidativo como mecanismos de citotoxicidade *in vitro* contra linhagem tumoral de cólon humano (HCT116), associado a apoptose intrínseca e extrínseca, por meio da ativação da via JNK1 ativada por ROS (CHEN et al., 2015).

No contexto que relaciona óxido nítrico e câncer, é possível descrever que, apesar do efeito dual do NO, apresentando múltiplos papéis na carcinogênese, sua concentração encontra-se elevada na maioria das células tumorais (CHEN et al., 2018). Ainda, considerando que ROS e NO estão envolvidos na regulação de diferentes eventos relacionados ao câncer, incluindo a angiogênese, e tendo o ACS-AZ reduzido esses mediadores (ROS e NO) no microambiente tumoral em modelo

de CAE, pode-se sugerir que os efeitos antiangiogênicos de ACS-AZ estão associados ao seu efeito antioxidante, via modulação de ROS e NO. Em contrapartida, não existem relatos na literatura sobre a interferência de derivados acridínicos na modulação de NO em células tumorais.

Considerando a presença de inúmeros relatos na literatura de efeitos adversos produzidos a partir da utilização de drogas antineoplásicas (BARROS; REPETTI, 2015; GRAPEGIA; LIMA, 2017), a utilização de ensaios de toxicidade que avaliem possíveis alterações da homeostasia do organismo exposto à quimioterapia é imprescindível. O tratamento dos animais experimentais com doses repetidas de ACS-AZ por sete dias difere do ensaio de toxicidade não clínica, pois permite avaliar os efeitos produzidos pelo acúmulo da substância em doses terapêuticas no organismo.

Diante disto, para a avaliação do perfil de toxicidade de ACS-AZ nos animais experimentais em modelo de CAE, alguns parâmetros como consumo de água e de alimentos e a evolução ponderal foram analisados.

Praticamente todas as drogas antineoplásicas causam alterações gastrointestinais, dentre estas, náuseas, vômitos, diarreia, mucosite, constipação e anorexia, que estão diretamente associadas à desnutrição e à perda de peso (SILVA et al., 2018). Considerando que o tratamento com ACS-AZ não alterou os parâmetros de consumo de ração e evolução ponderal, pode-se inferir que este derivado acridínico não induz esse efeito indesejável tão comum a maioria dos tratamentos antineoplásicos. Dado da literatura mostra que o derivado acridínico ACS-AZ10 também não induz alterações gastrointestinais (MANGUEIRA et al., 2017).

O fígado é o maior orgão do corpo, sendo responsável por inúmeras funções que são realizadas por três tipos celulares: o hepatócito, as células de Kupffer e as células estreladas hepáticas, e incluem: produção da bile, ácidos biliares, armazenamento de vitaminas e minerais, síntese de fatores de coagulação e metabolização de medicamentos, protegendo o organismo contra substâncias tóxicas (XAVIER; CALDEZ; KALDIS, 2014; PRADOC, 2018; DE AGUIAR JÚNIOR et al., 2018).

Para realização de um diagnóstico fidedigno relacionado ao fígado, faz-se necessária a realização de exames como análises bioquímicas, que incluem a

determinação da atividade sérica das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e glutamato desidrogenase (GLDH), bem como, exames de imagem e histopatológico, e ainda a mensuração da concentração sérica de substâncias que são normalmente produzidas ou removidas do sangue pelo fígado, como amônia e bilirrubina (PRADOC, 2018).

ALT é uma enzima encontrada no plasma de tecidos corpóreos, e quando alterada, esta associada a lesões hepáticas. Esta enzima é liberada em alta quantidade no sangue quando ocorre dano na membrana do hepatócito e, como consequência, um aumento da permeabilidade. AST não é uma enzima específica do fígado, quando órgãos são lesados (necrose do tecido), há liberação da AST para o soro. Assim, o aumento das aminotransferases tem grande significado no diagnóstico das hepatopatias agudas (GALLIERI et al., 2006; DE AGUIAR JÚNIOR et al., 2018).

A administração do ACS-AZ em doses farmacológicas não foi capaz de alterar a concentração das enzimas hepáticas AST e ALT e nem índice de fígado, o que sugere que o ACS-AZ induziu moderada toxicidade hepática nas condições avaliadas, uma vez que, a análise histológica do fígado apresentou acumulo de lipídeos citoplasmáticos característico de esteatose hepática e processos degenerativos, o que é bem descrito para algumas drogas antineoplásicas, a exemplo do tamoxifeno (LEAL et al., 2018), e da cisplatina que apresenta importantes efeitos adversos, incluindo nefrotoxicidade (LI et al., 2018).

Em relação à concentração de ALT, que em todos os grupos experimentais apresentou valores aumentados em relação aos parâmetros de normalidade, sugere ser uma reação do próprio tumor, conforme dados da literatura (DOLAI et al., 2012; MARAPPAN et al., 2012; XAVIER et al., 2015).

O derivado acridínico ACS-AZ10, na dose de 15 mg/kg, induziu alteração nos níveis de ALT (MANGUEIRA et al., 2017), o que caracteriza dano hepatocelular agudo. Relatos da literatura relacionados a derivados acridínicos, a exemplo do Bis(7)-tacrina, também demonstram hepatotoxicidade (PAN et al., 2007).

Os rins são órgãos essenciais para o funcionamento do organismo humano, possuindo mecanismos de excreção de subprodutos metabólicos, composição do líquido extracelular e regulação do volume, manutenção do equilíbrio ácido-básico e da pressão sanguínea e estímulo para a produção de hemárias. A avaliação da

função renal pode ser realizada por meio da determinação das concentrações sanguíneas de ureia e creatinina, uma vez que, quando ocorre falha renal, produtos de degradação do metabolismo, que seriam eliminados pelos rins, a exemplo da ureia e creatinina, se acumulam levando a um aumento dos seus níveis sanguíneos (DE SOUSA NEVES et al., 2018).

A ureia é o principal composto do grupo funcional orgânico das amidas em que o nitrogênio é convertido em ureia a partir da degradação de proteínas pelo organismo, forma pelo qual, o organismo elimina o nitrogênio dessas moléculas, e sua eliminação se dá principalmente através dos rins. Em relação a creatinina, que é derivada de aminoácidos, sua presença no organismo é devido à reação não enzimática da creatina em creatinina no tecido muscular, logo, sua produção está relacionada à quantidade de músculo. Essa substância não é utilizada pelo organismo, sendo totalmente inativa e também excretada pelos rins (HENRY, 2008; DE SOUSA NEVES et al., 2018).

Considerando que ACS-AZ não induziu alterações nos níveis plasmáticos de ureia e creatinina, pode-se inferir que este derivado acridínico possui baixa toxicidade renal, resultado este que foi confirmado pela ausência de quaisquer alterações na avaliação histológica dos rins. Esses dados corroboram resultados relatados na literatura de derivados acridínicos, a exemplo da amsacrina que possui baixa toxicidade renal (MICETICH et a., 1982). Esses dados apresentam grande importância clínica, já que vários antineoplásicos são capazes de causar lesões nefrotóxicas, a exemplo da cisplatina (MAPUSKAR et al., 2019).

Diferentemente da maioria dos agentes antineoplásicos, ACS-AZ não provocou alteração nos parâmetros hematológicos dos animais tratados, efeito este, presente na maioria dos quimioterápicos por promover uma ação não seletiva, ou seja, agindo em células saudáveis e tumorais ao mesmo tempo, culminado com a mielossupressão (SILVA et al., 2018).

O sangue é um tecido fundamental para a manutenção do organismo. É composto pelo plasma sanguíneo, por células e plaquetas, sendo assim, o equilíbrio e a manutenção da produção dos elementos sanguíneos são essenciais para a manutenção da homeostase do organismo. A hematopoiese é um processo de alta atividade mitótica e rápida proliferação celular, característica que faz com que a medula óssea seja altamente susceptível aos efeitos de quimioterápicos citotóxicos.

Estudos mostram que os quimioterápicos são mielossupressores ou mielotóxicos, uma vez que torna a medula óssea incapaz de repor os elementos celulares do tecido sanguíneo, provocando assim, anemia, leucopenia e trombocitopenia. Estes efeitos aumentam significativamente os riscos de mortalidade, o que limita a dose e a frequência do tratamento (BONASSA; GATO, 2012; ANDRADE et al., 2018).

Corroborando os dados para o ACS-AZ, dados descritos para outros derivados acridínicos também não demonstram efeitos mielotóxicos (MANGUEIRA et al., 2017). Portanto, os dados da administração repetida de ACS-AZ (sete dias) mostram que este derivado acridínico, diferentemente de outros antineoplásicos com potencial farmacológico (a exemplo, gencitabina, carboplatina, cisplatina, entre outros) (CHISAKI; TERADA; YANO, 2016), apresenta baixa toxicidade na dose utilizada (50 mg/kg), avaliando-se parâmetros bioquímicos e hematológicos.

Com relação a avaliação do índice dos órgãos dos animais, a observação de aumento no baço, um órgão linfoide de grande relevância na defesa do organismo (SILVA et al., 2018b), dá indícios de uma imunoestimulação, todavia, esse valor isoladamente não permite que se chegue a conclusões, uma vez que não houve alteração nos parâmetros hematológicos.

Dentre os principais problemas e incômodos relacionados ao indivíduo com câncer encontra-se a dor, que é caracterizada como um dos sintomas mais comuns. Além disso, em cerca de metade dos indivíduos, o tratamento não é adequado, representando desta forma, a causa mais frequente de incapacidade destes pacientes (HABBERSTAD et al., 2018).

O fator que motivou as pesquisas para investigação da atividade antinociceptiva do ACS-AZ consistiu no fato de que derivados acridínicos apresentam diversas atividades biológicas, dentre estas, atividade analgésica em modelos experimentais (SONDHI et al., 2004). Então, considerando que a dor tumoral é um grande desafio na melhora da qualidade de vida dos indivíduos com câncer, foi investigado se o ACS-AZ teria, além de potente atividade antitumoral, também atividade antinociceptiva.

Inicialmente, para descartar a possibilidade de efeitos relaxantes ou neurotóxicos que afetassem a coordenação motora dos animais, o que caracteriza resultados falso-positivos nos testes de nociceção, realizou-se o teste do *rota rod*.

O teste do *rota-rod* é utilizado para avaliação da coordenação motora, intoxicação, sedação e força, uma vez que avalia a integridade do sistema motor, permitindo detectar enfraquecimento neurológico, incluindo ataxia e relaxamento muscular, efeitos característicos da neurotoxicidade (AFOLAYAN; OLUBUNMI; KAZEEM, 2013; FAJEMIROYE et al., 2018).

De acordo com os resultados obtidos, é possível inferir que ACS-AZ não interfere na coordenação motora dos camundongos, uma vez que os animais submetidos ao teste supracitado, não apresentaram alteração no tempo de permanência na barra giratória nas observações procedidas, descartando, assim, a possibilidade de um efeito miorrelaxante ou neurotóxico, e permitindo, desta forma, a realização de testes específicos para avaliação da antinociceção.

O uso de vários modelos, incluindo estímulos químicos e/ou térmicos, é imprescindível para a detecção da atividade antinociceptiva de uma droga, uma vez que diferentes estímulos mimetizam diferentes tipos de dor e revelam a natureza antinociceptiva de uma droga teste (BERGEROT et al., 2006; BATISTA et al., 2018).

Assim, a atividade antinociceptiva de ACS-AZ foi avaliada por modelos de nociceção químico (teste da formalina) e térmico (teste da placa quente). Além disso, foi investigado o possível mecanismo de ação envolvido no efeito antinociceptivo de ACS-AZ.

O teste da formalina utiliza um estímulo químico e é utilizado para medir a eficácia de agentes antinociceptivos com diferentes mecanismos de ação. Na primeira fase (fase neurogênica), iniciando imediatamente após a administração da formalina e com duração de 3 a 5 minutos, a nociceção é atribuída a um mecanismo neural periférico e relacionada à estimulação química direta de fibras aferentes do nociceptor tipo C e, em parte, de fibras do tipo A δ e, está associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P. Na segunda fase (dor inflamatória), que começa de 15 a 20 minutos após a administração da formalina, a dor é atribuída a atividade inflamatória e/ou alteração central (FERREIRA et al., 2006; MCNAMARA, et al., 2007; MONIRUZZAMAN et al., 2015; DE SOUZA et al., 2018).

A redução do tempo de lambida da pata do animal tanto na primeira quanto na segunda fase é característica de drogas de ação central, como os analgésicos opioides, enquanto que drogas de ação periférica, como os anti-inflamatórios não-

esteroidais e glicocorticoides, causam inibição apenas da segunda fase (FARSAM et al., 2000; ADEYEMI; OKPO; OKPAKA, 2004; MANSOURI et al., 2014).

Considerando que o ACS-AZ foi capaz de diminuir significativamente o tempo de lambida da pata dos animais nas duas fases do teste, pode-se inferir que o composto pode atuar tanto na dor neurogênica quanto em processos inflamatórios. Tais resultados assemelharam-se aos obtidos para a morfina, opioide de ação central utilizada como padrão.

A morfina é o analgésico opioide caracterizado como protótipo do grupo. Geralmente, os opiáceos atuam em três receptores opioides (δ , κ e μ) que pertencem à família dos receptores acoplados à proteína Gi/Go, promovendo a abertura de um tipo específico de canais de potássio (K^+), os canais de K^+ acoplados à proteína G (GIRK's), e desta forma, inibem a abertura dos canais de cálcio controlados por voltagem (VGCC's), levando à redução na excitabilidade neuronal no sistema nervoso central para aliviar a dor. Embora a morfina tenha sido considerada um agente pioneiro de alívio da dor durante séculos, este fármaco induz sérios efeitos indesejáveis como tolerância, depressão respiratória e dependência física e psicológica (YAMANAKA, 2013; ESFANDYARI et al., 2018).

Diante disto, a indústria farmacêutica se empenha na descoberta de novas drogas com atividade terapêutica semelhante à morfina, mas com efeitos colaterais diminuídos, uma vez que esses efeitos são considerados fatores limitantes ao seu uso (HESS et al., 2010; VILLELA, 2018).

Então, para confirmar se mecanismos centrais estão envolvidos no efeito antinociceptivo do ACS-AZ, foi utilizado o teste da placa quente, uma metodologia sensível e específica que utiliza um estímulo térmico que é associado à neurotransmissão central para a detecção de substâncias antinociceptivas de efeito central. Nesse teste, o estímulo térmico ativa os nociceptores (fibras C não mielinizadas) que transmitem a informação a regiões específicas no SNC produzindo uma resposta nociceptiva organizada (SULAIMAN et al., 2009; MEKONNEN et al., 2009; BATISTA et al., 2018).

O derivado acridínico ACS-AZ foi capaz de aumentar a latência para percepção do estímulo térmico em todos os tempos avaliados, confirmando o envolvimento de componentes centrais na antinociceção. Este efeito é observado para drogas que modulam a nociceção supraespinhal, a exemplo dos analgésicos

opioides (WONG et al., 1994; DASH et al., 2015). Até o momento, não existem relatos na literatura sobre a ação de derivados acridínicos nos modelos avaliados.

Então, tendo sido confirmado que o ACS-AZ apresentou atividade antinociceptiva de ação central, partiu-se para a investigação de um possível mecanismo de ação envolvendo o clássico sistema opioide. Esse sistema de neurotransmissão participa tanto da modulação quanto da percepção da sensação dolorosa (VILLELA, 2018).

Para tanto, os animais foram novamente submetidos ao teste da formalina, onde alguns grupos receberam o pré-tratamento com o antagonista opioide não-seletivo naloxona. A naloxona é uma das drogas antagonistas do sistema opioide, inibindo os efeitos de drogas analgésicas, como a morfina, e a indução de analgesia por ser antagonista competitivo para receptores μ e para os receptores δ , sendo menos acentuado em comparação com os receptores μ (ESFANDYARI et al., 2018).

Em relação a tal metodologia, verificou-se que, em ambas as fases do teste da formalina, o efeito antinociceptivo do ACS-AZ foi revertido pelo bloqueio prévio dos receptores opioides com o uso de naloxona, o que indica participação da via opioide nesta resposta.

Desta forma, para determinar se o ACS-AZ atua via receptor específico $\mu 1$, foi utilizada a naloxonazina, um antagonista específico do receptor opioide $\mu 1$ (TAMADDONFARD; ERFANPARAST, 2017). Foi observada a reversão parcial do efeito antinociceptivo em ambas as fases do teste da formalina, o que sugere envolvimento, pelo menos em parte, dos receptores $\mu 1$ neste mecanismo.

Esse trabalho apresenta, em conjunto, o potencial farmacológico do derivado acridínico ACS-AZ, relacionado à sua potente atividade antitumoral via mecanismos antiangiogênicos e antioxidantes, bem como, potente efeito antinociceptivo mediado pela via opioide, com envolvimento de receptores $\mu 1$ neste mecanismo, além da caracterização de possíveis efeitos tóxicos decorrentes de sua administração, o que subsidiaram a realização de testes pré-clínicos adicionais na perspectiva de contribuir com o estudo de novos candidatos a fármacos antitumorais e paralelamente, analgésicos.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

De acordo com os estudos realizados, pode concluir que o derivado acridínico ACS-AZ:

- Apresentou moderada toxicidade aguda, quando administrado por via intraperitoneal em camundongos;
- Não apresentou genotoxicidade *in vivo*;
- Apresentou potente atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich;
- Exerceu seu efeito antitumoral por mecanismos antiangiogênicos, imunomoduladores e antioxidantes;
- Apresentou baixa toxicidade *in vivo*, em animais com CAE submetidos ao tratamento farmacológico de doses repetidas (sete dias);
- Apresentou potente atividade antinociceptiva;
- Exerceu seu efeito antinociceptivo mediado pela via opioide, com envolvimento de receptores $\mu 1$.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABANGAN JR, Romeo S. et al. MCP1 directs trafficking of hematopoietic cellderived fibroblast precursors in solid tumor. *The American journal of pathology*, v. 176, n. 4, p. 1914-1926, 2010.
- ABU-ZHAYIA, E. R., Khoury-Haddad, H., Guttmann-Raviv, N., Serruya, R., Jarrous, N., & Ayoub, N. A role of human RNase P subunits, Rpp29 and Rpp21, in homology directed-repair of double-strand breaks. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.
- ADEYEMI, O. O.; OKPO, S. O.; OKPAKA, O. The analgesic effect of the methanolic extract of Acanthus montanus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 45-48, 2004.
- AFOLAYAN, Anthony Jide; SHARAIBI, Olubunmi Josephine; KAZEEM, Mutiu Idowu. Phytochemical analysis and in vitro antioxidant activity of Nymphaea lotus L. **Int J Pharmacol**, v. 9, n. 5, p. 297-304, 2013.
- AGRAWAL, S. S.; SARASWATI, S.; MATHUR, R. et al. Cytotoxic and antitumor effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. **Life Sciences**, v. 89, p. 147-158, 2011.
- AGUIAR, Francisca Lidiane Ximenes da Silva; RAMOS, Luciana Fernandes Pastana; BICHARA, Cléa Nazaré Carneiro. Detection of pain with neuropathic characteristics in patients with diabetes mellitus assisted in primary care units. **BrJP**, v. 1, n. 1, p. 15-20, 2018.
- AHMAD, Tanveer et al. Mepacrine treatment attenuates allergic airway remodeling segregated from airway inflammation in mice. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 1, p. 74-78, 2011.
- AHN, J., Sei, Y. J., Jeon, N. L., & Kim, Y. Tumor Microenvironment on a Chip: The Progress and Future Perspective. **Bioengineering**, v. 4, n. 3, p. 64, 2017.
- ALAPATI, V., NOOLVI, M. N., MANJULA, S. N., PALLAVI, K. J., PATEL, H. M., TIPPESWAMY, B. S., SATYANARAYANA, S. V. In vivo anti-tumour activity of novel Quinazoline derivatives. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 16, n. 13, p. 1753-1764, 2012.
- ALBINO, Sonaly Lima et al. Derivados Acridínicos como Potenciais Agentes Quimioterápicos com Ação Antileishmania. 2018.
- ALEIXO, Grazielle Anahy Sousa et al. Tratamento da dor em pequenos animais: classificação, indicações e vias de administração dos analgésicos (revisão de literatura: parte II). **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 11, n. 1, p. 29-40, 2017.
- ALI, Imran et al. Platinum compounds: a hope for future cancer chemotherapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 13, n. 2, p. 296-306, 2013.

ALI, M., Mali, V., Haddox, S., AbdelGhany, S. M., El-deek, S. E., Abulfadl, A. & Belmadani, S.. Essential Role of Interleukin-12 in Angiogenesis in Type 2 Diabetes. **The American journal of pathology**, 2017.

ALIZADEH, Mohamad Naderi et al. Antitumor Effects of Umbelliprenin in a Mouse Model of Colorectal Cancer. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 17, n. 3, p. 976, 2018.

AL-MAMUN, M. Abdulla et al. Assessment of antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of two vegetable species of Amaranthus in Bangladesh. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 157, 2016.

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.;

AMELO, W.; NAGPAL, P.; MAKONNEN, E .Antiplasmodial activity of solvent fractions of methanolic root extract of Dodonaea angustifolia in Plasmodium berghei infected mice. **BMC complementary and alternative medicine**, 2014.

ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia: fundamentos práticos, **Guanabara Koogan**, v. 1. p. 179-188, 2006.

ALMEIDA, M. R. et al. p27Kip1 expression as a prognostic marker for squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oncology letters**, v. 10, n. 5, p. 2675-2682, 2015a.

ALMEIDA, Sinara Mônica Vitalino et al. Synthesis, DNA binding, and antiproliferative activity of novel acridine-thiosemicarbazone derivatives. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 6, p. 13023-13042, 2015b.

AL-SARAN, N.; SUBASH-BABU, P.; AL-NOURI, D. M.; ALFAWAZ, H. A.; ALSHATWI, A. A. Zinc enhances CDKN2A,pRb1 expression and regulates functional apoptosis via upregulation of p53 and p21 expression in humanbreast cancer MCF-7 cell. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 47, p.19–27, 2016.

APTE, Ron N.; VORONOV, Elena. Immunotherapeutic approaches of IL-1 neutralization in the tumor microenvironment. **Journal of Leukocyte Biology**, p. jlb. 3MR1216-523R, 2017.

ASHMAWI, Hazem Adel; FREIRE, George Miguel Góes. Peripheral and central sensitization. **Revista Dor**, v. 17, p. 31-34, 2016.

AVTANDILYAN, Nikolay et al. The Involvement of Arginase and Nitric Oxide Synthase in Breast Cancer Development: Arginase and NO Synthase as Therapeutic Targets in Cancer. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

BARBOSA, Paulo Henrique et al. Via de sinalização do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), síntese e liberação no exercício físico. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, v. 7, n. 3, 2018.

BARON, Ralf et al. Peripheral neuropathic pain: a mechanism-related organizing principle based on sensory profiles. **Pain**, v. 158, n. 2, p. 261, 2017.

BARROS, F. W. A.; SILVA, T. G.; PITTA, M. G. R.; BEZERRA, D. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; MOURA, M. A. F. B.; ABREU, F. C.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; IDA, R. P.; GOULART, M. O. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives.

Bioorganic & medicinal chemistry, Vol. 20, pp. 3533–3539, 2012.

BARROS, V. T. M. & REPETTI, C. S. F. Quimioterapia metronômica em cães: revisão de literatura Metronomic chemotherapy in dogs: a review. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinárias**, 110, 593-594. 2015.

BASBAUM, Allan I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BASTOS, G. N. T.; SANTOS, A. R. S.; FERREIRA, V. M. M.; COSTA, A. M. R.; BISPO, C. I.; SILVEIRA, A. J. A.; DO NASCIMENTO, J. L. M. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 241-245, 2006.

BASTUJI, Hélène et al. Convergence of sensory and limbic noxious input into the anterior insula and the emergence of pain from nociception. **Scientific reports**, v. 8, 2018.

BASUDHAR, Debashree et al. Coexpression of NOS2 and COX2 accelerates tumor growth and reduces survival in estrogen receptor-negative breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 49, p. 13030-13035, 2017.

BAZAK, Jerzy et al. Bystander effects of nitric oxide in anti-tumor photodynamic therapy. **Cancer cell & microenvironment**, v. 4, n. 1, 2017.

BECKMANN, Diego V. et al. Efeitos adversos da morfina, metadona e tramadol no pós-operatório de cães submetidos à cirurgia da coluna. **Pesq. Vet. Bras**, v. 38, n. 7, p. 1431-1437, 2018.

BELCAVELLO, Luciano et al. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.

BENEDICTO, Aitor; ROMAYOR, Irene; ARTETA, Beatriz. Role of liver ICAM-1 in metastasis. **Oncology letters**, v. 14, n. 4, p. 3883-3892, 2017.

BERNARDI, Andressa et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of C6 and U138-MG glioma cell lines. **European journal of pharmacology**, v. 532,

n. 3, p. 214-222, 2006.

BERRETTA, M., Caraglia, M., Martellotta, F., Zappavigna, S., Lombardi, A., Fierro, C., ... & Tirelli, U.. Drug–Drug Interactions Based on Pharmacogenetic Profile between Highly Active Antiretroviral Therapy and Antiblastic Chemotherapy in Cancer Patients with HIV Infection. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, 2016.

BERGEROT, A.; HOLLAND, P.R.; AKERMAN, S.; BARTSCH, T.; AHN, A.H. VAN DEN BRINK, A. M. Animal models of migraine: looking at the component parts of a complex disorder. **European Journal of Neuroscience**, v.24, n.6, p.1517-1534, 2006.

BETTERIDGE, D. John. What is oxidative stress?. **Metabolism**, v. 49, n. 2, p. 3-8, 2000.

BEZERRA, K. G. D., da Silva Barreto, F. D., de Carvalho, J., Lopes, F., Leite, J. M. D. S., & de Sousa Oliveira, F. Hiperalgesia Induzida por Opioides: Uma Revisão. 2018.

BIOULAC-SAGE, Paulette; SEMPOUX, Christine; BALABAUD, Charles. Hepatocellular Adenomas: Morphology and Genomics. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 46, n. 2, p. 253-272, 2017.

BISWAL, Bijesh Kumar; VERMA, Rama Shanker. Differential usage of the transport systems for folic acid and methotrexate in normal human T-lymphocytes and leukemic cells. **Journal of biochemistry**, v. 146, n. 5, p. 693-703, 2009.

BRADESI, Sylvie. Role of spinal cord glia in the central processing of peripheral pain perception. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 22, n. 5, p. 499-511, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos, Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018-2019: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2018.

BRAUN, Stefanie; WEICHHARDT, Henner; UHLMANN, Dirk. Chondroma of the Sternum Growing in a Pregnant Patient: A Case Report. **Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, p. cr. 17-00009, 2017.

BRENNEISEN, Peter; REICHERT, Andreas S. Nanotherapy and Reactive Oxygen Species (ROS) in Cancer: A Novel Perspective. **Antioxidants**, v. 7, n. 2, p. 31, 2018.

BONASSA, E. M. A. et al. Administração dos agentes antineoplásicos. **Bonassa EMA, Gato MIR. Terapêutica Oncológica para Enfermeiros e Farmacêuticos. 4^a ed. São Paulo: Atheneu**, p. 251-89, 2012.

BORRO, Marina et al. Pre-treatment assay of 5-fluorouracil degradation rate (5-FUDR) to improve prediction of 5-fluorouracil toxicity in gastro-esophageal cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 8, p. 14050, 2017.

BURSTEIN, H. J., Krilov, L., Aragon-Ching, J. B., Baxter, N. N., Chiorean, E. G., Chow, W. A., & Epstein, A. S. Clinical Cancer Advances 2017: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 12, p. 1341-1367, 2017.

CALAF, Gloria M. et al. Oxidative stress in female cancers. **Oncotarget**, v. 9, n. 34, p. 23824, 2018.

CALIXTO-CAMPOS, Cassia et al. The Ehrlich tumor induces pain-like behavior in mice: a novel model of cancer pain for pathophysiological studies and pharmacological screening. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

CAMPOS, Johnat Ribeiro; FERREIRA, Juliana Barros; DE MORAIS, Karla Cavalcante Silva. A Kinesio Taping® no tratamento da dor em mulheres com lombalgia crônica. **Revista InterScientia**, v. 6, n. 1, p. 42-54, 2018.

CAMPOS, M. T. G.; LEME, F. O P. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial. **PUBVET**, v. 12, p. 139, 2017.

CARTWRIGHT, Ian M. et al. Essential roles of Caspase-3 in facilitating Myc-induced genetic instability and carcinogenesis. **Elife**, v. 6, p. e26371, 2017.

CATALDI, M., Vigliotti, C., Mosca, T., Cammarota, M., & Capone, D. Emerging Role of the Spleen in the Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies, Nanoparticles and Exosomes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1249, 2017.

CEKANOVA M.; RATHORE K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. 2014.

CHANG, Andrew K. et al. Effect of a single dose of oral opioid and nonopioid analgesics on acute extremity pain in the emergency department: a randomized clinical trial. **Jama**, v. 318, n. 17, p. 1661-1667, 2017.

CHEN, X.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, J.; CHEN, J.; LI, M.; CAO, W.; CHEN, J. Synthesis and Characterization of Oxadisilole-Fused 9-Aminoacridines and 12-Aminobenzo[b]acridines. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 4170-4178, 2014.

CHEN, Kang et al. New benzimidazole acridine derivative induces human colon cancer cell apoptosis in vitro via the ROS-JNK signaling pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 9, p. 1074, 2015.

CHEN, N., WEI, F., WANG, L., CUI, S., WAN, Y., LIU, S. Tumor Necrosis Factor Alpha Induces Neural Stem Cell Apoptosis Through Activating p38 MAPK Pathway. **Neurochem Res**, 2016.

CHEN, Changhao et al. LNMAT1 promotes lymphatic metastasis of bladder cancer via CCL2 dependent macrophage recruitment. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 3826, 2018.

CHISAKI, Yugo; TERADA, Tomohiro; YANO, Yoshitaka. Population Pharmacodynamic Model for Bayesian Prediction of Myelosuppression Profiles Based on Routine Clinical Data after Gemcitabine and Carboplatin Treatment. **Pharmacology**, v. 98, n. 5-6, p. 284-293, 2016.

CHOLEWIŃSKI, G., Dzierzbicka, K., Kołodziejczyk, A. M. Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. **Pharmacological Reports**, Vol. 63, no.2, pp. 305-336, 2011.

CHOUDHARI, Sheetal Korde et al. Nitric oxide and cancer: a review. **World journal of surgical oncology**, v. 11, n. 1, p. 118, 2013.

CICCIA, Alberto; ELLEDGE, Stephen J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Molecular cell**, v. 40, n. 2, p. 179-204, 2010.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749–762, 2010.

CLEVEN, Arjen HG; HOGENDOORN, Pancras CW. Hematopoietic Tumors Primarily Presenting in Bone. **Surgical Pathology Clinics**, 2017.

COOK, Andrew D. et al. Immune Cytokines and Their Receptors in Inflammatory Pain. **Trends in immunology**, 2018.

CORDER, Gregory et al. Endogenous and exogenous opioids in pain. **Annual review of neuroscience**, n. 0, 2018.

COSTA, D. C. S., Ribeiro, R. C. B., Cardoso, M. F. C., Forezi, L. S., Pinto, A. C., Ferreira, V. F., & da Silva, F. D. C. Inibidores de Tirosina Kinase: A mais Moderna e Eficiente Ferramenta contra o Câncer. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, 2017.

DARLING, S., Fielding, A. B., Sabat-Pośpiech, D., Prior, I. A., & Coulson, J. M. Regulation of the cell cycle and centrosome biology by deubiquitylases. **Biochemical Society Transactions**, p. BST20170087, 2017.

DASH, Pritesh Ranjan et al. Study of Antinociceptive Activity of Kaempferia galanga from Bangladesh in Swiss albino Mice. **American Journal of Food and Nutrition**, v. 3, n. 3, p. 64-68, 2015.

DAVILA-GONZALEZ, Daniel; CHANG, Jenny C.; BILLIAR, Timothy R. NO and COX2: Dual targeting for aggressive cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201717440, 2017.

DE AGUIAR JÚNIOR, Verlúcio Alves et al. Análise do comportamento frente ao

consumo de bebidas alcoólicas e seu efeito sobre a função hepática entre universitários de um centro universitário da Zona da Mata mineira. **REVISTA CIENTÍFICA DA FAMINAS**, v. 13, n. 1, 2018.

DE ANDRADE, Fernanda Miguel et al. **PERFIL HEMATOLÓGICO E QUALIDADE DE VIDA DE CRIANÇAS SUBMETIDAS A QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA** HEMATOLOGIC PROFILE AND QUALITY OF LIFE FROM CHILDREN UNDERGOING ANTINEOPLASTIC CHEMOTHERAPY. 2018.

DE SOUSA, Marcelo Victor Pires et al. Pain management using photobiomodulation: Mechanisms, location, and repeatability quantified by pain threshold and neural biomarkers in mice. **Journal of biophotonics**, p. e201700370, 2018.

DE SOUSA NEVES, Tayana et al. Function renal evaluation through biomarkers and cockcroft-gault/Avaliação da função renal através de biomarcadores e equação de cockcroft-gault/Evaluación de la función renal a través de biomarcadores y equación.. **Revista de Enfermagem da UFPI**, v. 6, n. 4, p. 4-8, 2018.

DENKERT, C., Liedtke, C., Tutt, A., & von Minckwitz, G. Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. **The Lancet**, v. 389, n. 10087, p. 2430-2442, 2017.

DI FONZO, H.; Contardo, D., Carrozza, D., Finocchietto, P., Crisson, A. R., Cabral, C., & de los Angeles Juarez, M. Intravascular Large B Cell Lymphoma Presenting as Fever of Unknown Origin and Diagnosed by Random Skin Biopsies: A Case Report and Literature Review. **The American journal of case reports**, v. 18, p. 482, 2017.

DISSANAYAKA, W. L; ZHANG, C. The role of vasculature engineering in dental pulp regeneration. In: **Joint Scientific Symposium: Current and Future Challenges in Dentistry**. 2017.

DOLAI, Narayan et al. Evaluation of antitumor activity and in vivo antioxidant status of Anthocephalus cadamba on Ehrlich ascites carcinoma treated mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 865-870, 2012.

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.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, p. 207-208, 1957.

EDDY, N. B.; LEIMBACK, D. J. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and diethienylbutylamines. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107, p. 385-393, 1953.

ERDEM, B., KÜÇÜKYILDİRİM, S., SAĞLAR, E., POLAT, Z., & MERGEN, H. Promoter hypermethylation of p16 and APC in gastrointestinal cancer patients. **The Turkish journal of gastroenterology: the official journal of Turkish Society of Gastroenterology**, v. 25, n. 5, p. 512-517, 2014.

ESFANDYARI, Zahra et al. Antinociceptive activity of Ricinus communis seed's hydroethanolic extract on male Balb/C mice. **Ciência Rural**, v. 48, n. 6, 2018.

FAJEMIROYE, James Oluwagbamigbe et al. Evaluation of Anxiolytic and Antidepressant-like Activity of Aqueous Leaf Extract of Nymphaea Lotus Linn. in Mice. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 17, n. 2, p. 613, 2018.

FALEEL, Fathima Dhilhani Mohamed et al. Modified mismatch polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism detected mutations in codon 12 and 13 of exon 2 of K-ras gene in colorectal cancer patients and its association with liver metastases: Data from a South Asian country. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 12, n. 4, p. 1272, 2016.

FANG, Yi-Ping et al. Amsacrine analog-loaded solid lipid nanoparticle to resolve insolubility for injection delivery: characterization and pharmacokinetics. **Drug design, development and therapy**, v. 10, p. 1019, 2016.

FARSAM, H.; AMANLOU, M.; DEHPOUR, A. R.; JAHANIANI, F. Antiinflammatory and analgesic activity of Biebersteinia multifida DC. root extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 443-447, 2000.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, 2018.

FERREIRA, A. A.; AMARAL, F. A.; DUARTE, I. D. G.; OLIVEIRA, P. M.; ALVES, R. B.; SILVEIRA, D.; AZEVEDO, A. O.; RASLAN, D. S.; CASTRO, M. S. A. Antinociceptive effect from Ipomoea cairica extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 105, p. 148-153, 2006.

FERREIRA, S.H. et al. Dor Inflamatória. In Dor - Princípio e prática. São Paulo: Artmed, 2009.

FIELDS, W. L. Understanding how opioids contribute to reward and analgesia. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 32, n. 3, p. 242-246, 2007.

FLORES-ESTRADA, José Javier; RODRÍGUEZ-REYES, Abelardo Antonio. mesectodermal leiomyoma. unusual tumor of the ciliary body. **Cirugía y Cirujanos**, v. 82, n. 1, p. 63-67, 2014.

FOGUER, Karen et al. Endostatin gene therapy inhibits intratumoral macrophage M2 polarization. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 79, p. 102-111, 2016.

FÖRSTERMANN, Ulrich; SESSA, William C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2012.

FRANCO, L. C. et al. Terapias não farmacológicas no alívio da dor neuropática diabética: uma revisão bibliográfica. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 24, n. 2, 2011.

FRICKE, A.; Ullrich, P. V., Cimniak, A. F. V., Becherer, C., Follo, M., Heinz, J., ... & Stark, G. B. Levels of activated platelet-derived microvesicles in patients with soft tissue sarcoma correlate with an increased risk of venous thromboembolism. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 527, 2017.

FU, Wan et al. A novel acridine derivative, LS-1-10 inhibits autophagic degradation and triggers apoptosis in colon cancer cells. **Cell death & disease**, v. 8, n. 10, p. e3086, 2017.

GAJULAPALLI, V. N. R., Malisetty, V. L., Chitta, S. K., & Manavathi, B. Oestrogen receptor negativity in breast cancer: a cause or consequence?. **Bioscience reports**, v. 36, n. 6, p. e00432, 2016.

GALADARI, Sehamuddin et al. Reactive oxygen species and cancer paradox: to promote or to suppress?. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, p. 144-164, 2017.

GALLIERI, Ana Paula Avelar et al. Análise de parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos tratados com lidocaína. **Estudos de Biologia**, v. 28, n. 62, 2006.

GIACOMELL, Carolina Marquezin et al. Dor crônica: manejo baseado nos mecanismos. **Acta méd.**, v. 39, n. 1, p. 13-21, 2018.

GIULIANO, S.; PAGÈS, G. Mechanisms of resistance to anti-angiogenesis therapies. **Biochimie**, pp. 1-10, 2013.

GOEL, Hira Lal; MERCURIO, Arthur M. VEGF targets the tumour cell. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 12, p. 871, 2013.

GOUVEIA, Rawny Galdino et al. Synthesis, DNA and protein interactions and human topoisomerase inhibition of novel Spiro-acridine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2018.

GRAPEGIA, F. Z; LIMA, B R. Metronomic chemotherapy for treatment of tumor of transition carcinomatosis cells in the region of vesical trigon in cat: Case report. **PUBVET**, v. 11, p. 744-839, 2017.

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

GU, Huifeng et al. Reactive Oxygen Species-Mediated Tumor Microenvironment Transformation: The Mechanism of Radioresistant Gastric Cancer. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

GUO, Beichu et al. Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. **Scientific reports**, v. 6, p. 36107, 2016.

HABBERSTAD, Ragnhild et al. The Palliative Radiotherapy and Inflammation Study (PRAIS)-protocol for a longitudinal observational multicenter study on patients with cancer induced bone pain. **BMC Palliative Care**, v. 17, n. 1, p. 110, 2018.

HAFFNER, Michael C. et al. Androgen-induced TOP2B-mediated double-strand breaks and prostate cancer gene rearrangements. **Nature genetics**, v. 42, n. 8, p. 668, 2010.

HAJEK, Eva et al. Braf inhibitors stimulate inflammasome activation and interleukin 1 beta production in dendritic cells. **Oncotarget**, v. 9, n. 47, p. 28294, 2018.

HANAHAN, Douglas. Rethinking the war on cancer. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 558-563, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation, **Cell**, Vol. 144, pp. 646-674, 2011.

HANSEN, Jean M.; COLEMAN, Robert L.; SOOD, Anil K. Targeting the tumour microenvironment in ovarian cancer. **European Journal of Cancer**, v. 56, p. 131-143, 2016.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n. 1, p. 53-58, 1989.

HARDY, Micael et al. Detection and characterization of reactive oxygen and nitrogen species in biological systems by monitoring species-specific products. **Antioxidants & redox signaling**, v. 28, n. 15, p. 1416-1432, 2018.

HAYASHI, Makoto. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test. **Genes and Environment**, v. 38, n. 1, p. 18, 2016.

HENRY, J. B. Diagnóstico clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. Barueri: Manole, 2008.

HENSCHKE, N.; KAMPER, S. J.; MAHER, C. G. The epidemiology and economic consequences of pain. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 1, p. 139–147, 2015.

HESS, S.; PADOANI, C.; SCORTEGANHA, L. C.; HOLZMANN, I.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D.; SOUZA, M. M. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by myrsinoic acid B. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 209-215, 2010.

HRYCAY, Eugene G.; BANDIERA, Stelvio M. Involvement of cytochrome P450 in reactive oxygen species formation and cancer. In: **Advances in Pharmacology**. Academic Press, 2015. p. 35-84.

HUNSKAAR S.; BERGE O. G.; HOLE K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain**, v. 25, p. 125-132, 1986.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 25, p. 103-114, 1987.

HUSSAIN, A., VERMA, C. K., & CHOUHAN, U. Identification of novel inhibitors against Cyclin Dependent Kinase 9/Cyclin T1 complex as: Anti cancer agent. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 6, p. 1229-1242, 2017.

INOUE, Kazushi; FRY, Elizabeth A.; FRAZIER, Donna P. Transcription factors that interact with p53 and M dm2. **International journal of cancer**, v. 138, n. 7, p. 1577-1585, 2016.

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.

ITO, S. E., Shirota, H., Kasahara, Y., Saijo, K., & Ishioka, C. IL-4 blockade alters the tumor microenvironment and augments the response to cancer immunotherapy in a mouse model. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, p. 1-12, 2017.

IVANOVA, D., BAKALOVA, R., LAZAROVA, D., GADJEVA, V., & ZHELEV, Z. The impact of reactive oxygen species on anticancer therapeutic strategies. **Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University**, v. 22, n. 6, p. 899-908, 2013.

IZHAK, L.; WILDBAUM, G.; JUNG, S.; STEIN, A.; SHAKED, Y.; KARIN, N. Dissecting the Autocrine and Paracrine Roles of the CCR2-CCL2 Axis in Tumor Survival and Angiogenesis. **Plos One**, v 7, 2012.

JANOVEC, L.; KOZURKOVA, M.; SABOLOVA, D.; UNGVARSKY, J.; PAULIKOVA, H.; PLSIKOVA, J.; VANTOSA, Z.; IMRICH, J. Cytotoxic 3,6 bis((imidazolidinone)imino)acridines: Synthesis, DNA binding and molecular modeling. **Bioorganic & medicinal chemistry**, Vol. 19, pp.1790–1801, 2011.

JEONG, Hyun-Woo et al. Transcriptional regulation of endothelial cell behavior during sprouting angiogenesis. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 726, 2017.

JESUS, L. G., CICCHELLI, M., MARTINS, G. B., PEREIRA, M. C. C., LIMA, H. C., MEDRADO, A. R. A. P. Repercussões orais de drogas antineoplásicos: uma revisão de literatura. **RFO**, v 21, p 130-135, 2016.

JIN, Mingwei; AN, Qi; WANG, Lei. Importance of tuberin in carcinogenesis. **Oncology Letters**, v. 14, n. 3, p. 2598-2602, 2017.

KATAKWAR, Payal et al. Oxidative stress marker in oral cancer: a review. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 438, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KATT, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S., & Searson, P. C. In vitro tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 4, 2016.

KAZEMI-LOMEDASHT, F., Pooshang-Bagheri, K., Habibi-Anbouhi, M., Hajizadeh-Safar, E., Shahbazzadeh, D., Mirzahosseini, H., & Behdani, M. In vivo immunotherapy of lung cancer using cross-species reactive vascular endothelial growth factor nanobodies. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 20, n. 5, p. 489, 2017.

KETRON, Adam C. et al. Amsacrine as a topoisomerase II poison: importance of drug–DNA interactions. **Biochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1730-1739, 2012.

KHAZAN M.; HDAYATI M. The role of nitric oxide in health and diseases. **Scimetr**, v. 3, n. 1, 2014.

KIM, Miri et al. TNF- α induces human neural progenitor cell survival after oxygen–glucose deprivation by activating the NF- κ B pathway. **Experimental & molecular medicine**, v. 50, n. 4, p. 14, 2018.

KITANO, Yuki et al. Nrf2 promotes oesophageal cancer cell proliferation via metabolic reprogramming and detoxification of reactive oxygen species. **The Journal of pathology**, v. 244, n. 3, p. 346-357, 2018.

KLAUMANN, Paulo Roberto; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, Thiago. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, 2008.

KMIECIK, S. W., Krzyścik, M. A., Filip-Psurska, B., Wietrzyk, J., Boratyński, J., Marek, T. Methotrexate and epirubicin conjugates as potential antitumor drugs. **Postepy Hig Med Dosw (online)**, v. 71, p. 618-623, 2017.

KOGURE, K. Yamazaki, M., Tamaki, T., Node, Y., & Morita, A. Neck and Occipital Pain Caused by Deep Cervical Intramuscular Lipoma: A Surgical Case. **Journal of Nippon Medical School**, v. 84, n. 2, p. 96-99, 2017.

KONG, D. H., Kim, M. R., Jang, J. H., Na, H. J., & Lee, S. A Review of Anti-Angiogenic Targets for Monoclonal Antibody Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, 2017.

KUAN, Yung-Hui; SHYU, Bai-Chuang. Nociceptive transmission and modulation via P2X receptors in central pain syndrome. **Molecular brain**, v. 9, n. 1, p. 58, 2016.

LAFAYETTE, E. A.; ALMEIDA, S. M. V.; PITTA, M. G. R.; BELTRÃO, E. I. C.;

SILVA, T. G.; MOURA, R. O.; PITTA, I. R.; CARVALHO JÚNIOR, L. B.; LIMA, M. C. A. Synthesis, DNA Binding and Topoisomerase I Inhibition Activity of Thiazacridine and Imidazacridine Derivatives. **Molecules**. Vol. 18, pp.15035-15050, 2013.

LAFAYETTE, Elizabeth Almeida et al. Síntese de derivados indólicos/acridínicos e avaliação da interação com dna através de técnicas de espectroscopia utilizando brometo de etídio como sonda fluorescente. 2016.

LAGANARO, Luis FeLipe ArrudA. DESAFIANDO A MORTE: ANTIANGIOGÊNESE PARA TRATAMENTO DE CÂNCER. **Revista Resgates**, p. 169. 2016.

LAN, J., Li, H., Luo, X., Hu, J., & Wang, G. BRG1 promotes VEGF-A expression and angiogenesis in human colorectal cancer cells. **Experimental Cell Research**, 2017.

LEAL, Sandra et al. Evaluation of progressive hepatic histopathology in long-term tamoxifen therapy. **Pathology-Research and Practice**, 2018.

LEE, C. T., Huang, Y. W., Yang, C. H., & Huang, K. S. Drug delivery systems and combination therapy by using vinca alkaloids. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 15, n. 15, p. 1491-1500, 2015.

LEE, M. J., Park, S. Y., Ko, J. H., Lee, H. J., Ryu, J. S., Park, J. W., ... & Oh, J. Y. Mesenchymal stromal cells promote B-cell lymphoma in lacrimal glands by inducing immunosuppressive microenvironment. **Oncotarget**, v. 8, n. 39, p. 66281, 2017a.

LEE, Y. K., Landuyt, A. E., Lobionda, S., Sittipo, P., Zhao, Q.; Maynard, C. L. . TCR-independent functions of Th17 cells mediated by the synergistic actions of cytokines of the IL-12 and IL-1 families. **PloS one**, v. 12, n. 10, 2017b.

LENART, M., Rutkowska-Zapala, M., Baj-Krzyworzeka, M., Szatanek, R., Węglarczyk, K., Smallie, T.; Siedlar, M. Hyaluronan carried by tumor-derived microvesicles induces IL-10 production in classical (CD14++ CD16-) monocytes via PI3K/Akt/mTOR-dependent signalling pathway. **Immunobiology**, v. 222, n. 1, p. 1-10, 2017.

LEYSEN L, ADRIAENSSENS N, NIJS J, PAS R, BILTERYS T, VERMEIR S, LAHOUSSE A, BECKWÉE D. Chronic pain in breast cancer survivors: nociceptive, neuropathic or central sensitization pain? **Pain Pract**. 2018.

Li, X., Xu, Q., Wu, Y., Li, J., Tang, D., Han, L., & Fan, Q. A CCL2/ROS autoregulation loop is critical for cancer-associated fibroblasts-enhanced tumor growth of oral squamous cell carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 6, p. 1362-1370, 2014.

LI, W. W., Wang, H. Y., Nie, X., Liu, Y. B., Han, M., & Li, B. H. Human colorectal cancer cells induce vascular smooth muscle cell apoptosis in an exocrine manner. **Oncotarget**, 2017.

LI, Fan et al. Xanthohumol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity through

inhibiting NF-κB and activating Nrf2 signaling pathways. *International immunopharmacology*, v. 61, p. 277-282, 2018.

LIANG, De-Yong; LI, XiangQi; CLARK, J. David. Epigenetic regulation of opioid-induced hyperalgesia, dependence, and tolerance in mice. **The Journal of Pain**, v. 14, n. 1, p. 36-47, 2013.

LIANG, Liang, G. C., Zheng, H. F., Chen, Y. X., Li, T. C., Liu, W.; Fang, Y. Q. Light of DNA-alkylating agents in castration-resistant prostate cancer cells: a novel mixed EGFR/DNA targeting combi-molecule. *American Journal of Translational Research*, v. 9, n. 7, p. 3245, 2017.

LIN, E.W. Karakasheva, T. A., Lee, D. J., Lee, J. S., Long, Q., Bass, A. J., ... & Rustgi, A. K. Comparative transcriptomes of adenocarcinomas and squamous cell carcinomas reveal molecular similarities that span classical anatomic boundaries. **PLoS genetics**, v. 13, n. 8, p. e1006938, 2017.

LING, Geoffrey SF et al. Naloxonazine actions in vivo. **European journal of pharmacology**, v. 129, n. 1-2, p. 33-38, 1986.

LITTLE, Andrew C. et al. Paradoxical roles of dual oxidases in cancer biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 110, p. 117-132, 2017.

LIU, Q.; ZHANG, J.; WANG, M.; ZHANG, D.; LU, Q.; HUANG, Y.; LIN, H.; YU, X. Synthesis, DNA binding and cleavage activity of macrocyclic polyamines bearing mono- or bis-acridine moieties. **European journal of medicinal chemistry**, Vol. 45, pp. 5302–5308, 2010.

LIU, H., Antony, S., Roy, K., Juhasz, A., Wu, Y., Lu, J., Doroshow, J. H. Interleukin-4 and interleukin-13 increase NADPH oxidase 1-related proliferation of human colon cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 24, p. 38113, 2017.

LIU, Sai et al. PA28γ acts as a dual regulator of IL-6 and CCL2 and contributes to tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Letters**, v. 428, p. 192-200, 2018.

LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v.137, p.473-477, 2008.

LOIZZI, V., Del Vecchio, V., Gargano, G., De Liso, M., Kardashi, A., Naglieri, E., ... & Cormio, G. Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1967, 2017.

LONGLEY, Daniel B.; HARKIN, D. Paul; JOHNSTON, Patrick G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature reviews cancer**, v. 3, n. 5, p. 330, 2003.

LOPATINA, Tatiana et al. Extracellular vesicles from human liver stem cells inhibit tumor angiogenesis. **International journal of cancer**, 2018.

LORIOT, Marie-Anne et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency screening and securing of fluoropyrimidine-based chemotherapies: Update and recommendations of the French GPCO-Unicancer and RNPGx networks. **Bulletin du cancer**, 2018.

LUACES, R.; R., Lorenzo Franco, F., Gómez Oliveira, G., Patiño Seijas, B., Gutián, D., & López-Cedrún Cembranos, J. L. Oral leiomyoma in retromolar trigone: A case report. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)**, v. 12, n. 1, p. 53-55, 2007.

LUBOWICKA, Emilia et al. Plasma Chemokine CCL2 and Its Receptor CCR2 Concentrations as Diagnostic Biomarkers for Breast Cancer Patients. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

LUCIO, Lorena MC et al. Riscos ocupacionais, danos no material genético e estresse oxidativo frente à exposição aos resíduos de gases anestésicos. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 68, n. 1, p. 33-41, 2018.

LYNCE, Filipa; SHAJAHAN-HAQ, Ayesha N.; SWAIN, Sandra M. CDK4/6 inhibitors in breast cancer therapy: Current practice and future opportunities. **Pharmacology & therapeutics**, 2018.

LYNCH, A. M, MAHABIR, A. G., BRADFORD, A., BROCKHURST, K., VAN BENTHEM, J., VAN STEEG, H., REES, R. W. Is Mutamouse insensitive to clastogens? **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Vol. 30, no. 2, pp. 145-150, 2008.

MALIK, Ankit; KANNEGANTI, Thirumala-Devi. Function and regulation of IL-1 α in inflammatory diseases and cancer. **Immunological reviews**, v. 281, n. 1, p. 124-137, 2018.

MALUMBRES M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. **Nat Rev Cancer**. Jun; 3(6):459-65, 2003.

MANASA, V. G., KANNAN, S. Impact of microRNA dynamics on cancer hallmarks: An oral cancer scenario.p1–14 - **Tumor Biology**, 2017.

MANDER, K. A.; FINNIE, J. W. Tumour angiogenesis, anti-angiogenic therapy and chemotherapeutic resistance. **Australian veterinary journal**, v. 96, n. 10, p. 371-378, 2018.

MANDI, Y. et al. Effects of amino and imino acridines on tumor necrosis factor production by human leukocytes. **Anticancer research**, v. 14, n. 6B, p. 2633-2636, 1994.

MANGUEIRA, Vivianne Mendes et al. A new acridine derivative induces cell cycle arrest and antiangiogenic effect on Ehrlich ascites carcinoma model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 90, p. 253-261, 2017.

MANSOURI, Mohammad Taghi; NAGHIZADEH, Bahareh; GHORBANZADEH, Behnam. Involvement of opioid receptors in the systemic and peripheral antinociceptive actions of ellagic acid in the rat formalin test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 120, p. 43-49, 2014

MANTOVANI, Alberto; BARAJON, Isabella; GARLANDA, Cecilia. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. **Immunological reviews**, v. 281, n. 1, p. 57-61, 2018.

MAPUSKAR, Kranti A. et al. Persistent increase in mitochondrial superoxide mediates cisplatin-induced chronic kidney disease. **Redox biology**, v. 20, p. 98-106, 2019.

MARAPPAN, Saroja; SUBRAMANIYAN, Annapoorani. Antitumor activity of methanolic extract of Cynodon dactylon leaves against Ehrlich ascites induced carcinoma in mice. **J Adv Scient Res**, v. 3, p. 105-8, 2012.

MATEU-JIMENEZ, M., Curull, V., Pijuan, L., Sánchez-Font, A., Rivera-Ramos, H., Rodríguez-Fuster, A.; Barreiro, E. Systemic and Tumor Th1 and Th2 Inflammatory Profile and Macrophages in Lung Cancer: Influence of Underlying Chronic Respiratory Disease. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 12, n. 2, p. 235-248, 2017.

MATHEWS, Karol et al. Guidelines for recognition, assessment and treatment of pain: WSAVA Global Pain Council members and co-authors of this document. **Journal of Small Animal Practice**, v. 55, n. 6, p. E10-E68, 2014.

MATSUYAMA, Ryoko; KITAMOTO, Sachiko; TOMIGAHARA, Yoshitaka. Lack of genotoxic potential of permethrin in mice evaluated by the comet assay and micronucleus test. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 92-102, 2018.

MCNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K. L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N. J.; CHONG, J. A.; JULIUS, D.; MORAN, M. M.; FANGER, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 33, p. 13525-13530, 2007.

MEKONNEN, Teshale; URGA, Kelbesa; ENGIDAWORK, Ephrem. Evaluation of the diuretic and analgesic activities of the rhizomes of Rumex abyssinicus Jacq in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 433-439, 2010.

MELLO, Francyelli Mariana dos Santos et al. Estudo da atividade citotóxica, antitumoral e determinação do perfil tóxico de complexos de rutênio (II)/aminoácidos em células do tumor de Ehrlich in vitro e in vivo. 2014.

MELLO-ANDRADE, Francyelli et al. Acute toxic effects of ruthenium (II)/amino acid/diphosphine complexes on Swiss mice and zebrafish embryos. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 1082-1092, 2018.

MERHEB, Rihab; ABDEL-MASSIH, Roula M.; KARAM, Marc C. Immunomodulatory effect of natural and modified Citrus pectin on cytokine levels in the spleen of BALB/c mice. **International journal of biological macromolecules**, v. 121, p. 1-5, 2019.

MICETICH, K. C. et al. Phase I-II study of m-AMSA administered as a continuous infusion. **Cancer treatment reports**, v. 66, n. 10, p. 1813-1817, 1982.

MINGORI, Moara Rodrigues et al. Effect of paullinia cupana mart. commercial extract during the aging of middle age wistar rats: differential effects on the hippocampus and striatum. **Neurochemical research**, v. 42, n. 8, p. 2257-2273, 2017.

MISCHKOWSKI, Dominik et al. Pain or nociception? Subjective experience mediates the effects of acute noxious heat on autonomic responses. **Pain**, v. 159, n. 4, p. 699-711, 2018.

MOBLEY, L. R., Kuo, T. M., Scott, L., Rutherford, Y., & Bose, S. Modeling Geospatial Patterns of Late-Stage Diagnosis of Breast Cancer in the US. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 5, p. 484, 2017.

MOCELLIN, Simone; BRONTE, Vincenzo; NITTI, Donato. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. **Medicinal research reviews**, v. 27, n. 3, p. 317-352, 2007.

MONIRUZZAMAN, Md et al. In vitro antioxidant and cholinesterase inhibitory activities of methanolic fruit extract of Phyllanthus acidus. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 403, 2015.

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

MOZOLEWSKI, Paweł et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are safe with respect to the transcriptome of human dermal fibroblasts. **European journal of pharmacology**, v. 818, p. 206-210, 2018.

MUNDER, Markus. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. **British journal of pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 638-651, 2009.

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.

MUNTIMADUGU, E., KOMMINENI, N., & KHAN, W. Exploring the Potential of Nanotherapeutics in Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. **Pharmacological Research**, 2017.

NAGARSHETH, Nisha; WICHA, Max S.; ZOU, Weiping. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, 2017.

NAITO, Yutaka et al. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 4, p. 697-713, 2017.

NETEA, Mihai G. Netea, M. G., Balkwill, F., Chonchol, M., Cominelli, F., Donath, M. Y., Giamarellos-Bourboulis, E. J; Hotchkiss, R. A guiding map for inflammation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p. 826-831, 2017.

NGABIRE, Daniel; KIM, Gun-Do. Autophagy and Inflammatory Response in the Tumor Microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 2016, 2017.

NIK-ZAINAL, Serena; MORGANELLA, Sandro. Mutational signatures in breast cancer: the problem at the DNA level. 2017.

NÓBREGA, F. F. F. Monoterpeno 4-terpineol – uma molécula com atividade anticonvulsivante: estudos comportamentais e eletrofisiológicos. **Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba**, 2012.

NOURAZARIAN, Ali Reza; KANGARI, Parisa; SALMANINEJAD, Arash. Roles of oxidative stress in the development and progression of breast cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 12, p. 4745-51, 2014.

ODEGHE, O.; UWAKWE, A.; MONAGO, C. Antiplasmodial activity of methanolic stem bark extract of Anthocleista grandiflora in mice. **International Journal of Applied**, Vol. 2 no.4, pp. 142-148, 2012.

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.

PAJUELO-LOZANO, Natalia et al. XPA, XPC and XPD modulate sensitivity in gastric cisplatin resistance cancer cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1197,

2018.

PAN, S. Y.; Yu, Z. L., Dong, H., Lee, N. T., Wang, H., Fong, W. F., Han, Y. F., Ko, K. M. Evaluation of acute bis(7)-tacrine treatment on behavioral functions in 17-day-old and 30-day-old mice, with attention to drug toxicity. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Vol. 86, no. 4, pp. 778-783, 2007.

PARDINI, Barbara et al. Increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of bladder cancer. **British journal of cancer**, v. 116, n. 2, p. 202, 2017.

PARROZZANI, R., Frizziero, L., Trainiti, S., Testi, I., Miglionico, G., Pilotto, E., Stella B., Ambrogio, F., Midena, E. Topical 1% 5-fluorouracil as a sole treatment of corneoconjunctival ocular surface squamous neoplasia: long-term study. **British Journal of Ophthalmology**, p. bjophthalmol-2016-309219, 2016.

PERGOLIZZI JR, Joseph V. et al. Designing safer analgesics: a focus on μ -opioid receptor pathways. **Expert opinion on drug discovery**, p. 1-8, 2018.

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.

PLOTNIK, D. A., McLaughlin, L. J., Krohn, K. A., & Schwartz, J. L. The effects of 5-fluorouracil treatment on 3'-fluoro-3'-deoxythymidine (FLT) transport and metabolism in proliferating and non-proliferating cultures of human tumor cells. **Nuclear medicine and biology**, v. 39, n. 7, p. 970-976, 2012.

PLSIKOVA, J.; JANOVEC, L.; KOVAL, J.; UNGVARSKY, J.; MIKES, J.; JENDZELOVSKY, R.; FEDOROCKO, P.; IMRICH, J.; KRISTIAN, P.; KASPARKOVA, J.; et al. 3,6-Bis(3-alkyl-guanidino)acridines as DNAintercalating antitumor agents. **European journal of medicinal chemistry**, Vol. 57, pp. 283–295, 2012.

PRADOC, Luan Gavião et al. Fibrose hepática medicamentosa: relato de caso. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 15, p. 279-280, 2018.

PRAJEETH, C. K., Kronisch, J., Khorooshi, R., Knier, B., Toft-Hansen, H., Gudi, V.; Stangel, M. Effectors of Th1 and Th17 cells act on astrocytes and augment their neuroinflammatory properties. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 204, 2017.

PRALL, Friedrich et al. Colorectal carcinoma tumour budding and podia formation in the xenograft microenvironment. **PLoS one**, v. 12, n. 10, p. e0186271, 2017.

POMMIER, Y. Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges. **ACS chemical biology**, Vol. 8, pp. 82–95, 2013.

RAHAL, A. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **Bio Med Res Intern.** v. 2014, p. 19. 2014.

RAHMAN, M. S. U., Zhang, L., Wu, L., Xie, Y., Li, C., & Cao, J. Sensitization of gastric cancer cells to alkylating agents by glaucocalyxin B via cell cycle arrest and enhanced cell death. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 2431, 2017.

RECIO, Leslie et al. Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol. **The Journal of toxicological sciences**, v. 35, n. 2, p. 149-162, 2010.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FOSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **ATLA**, v. 21, p. 89-96, 1993.

RICHEBE, Philippe; RIVAT, Cyrip. Opioid-Induced Hyperalgesia After Surgery: Clinical Relevance. In: **Total Intravenous Anesthesia and Target Controlled Infusions**. Springer, Cham, 2017. p. 763-773.

RODEIRO, Idania; REMIREZ, Diadelis; FLORES, Diana. Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) powder: acute toxicity, 90 days oral toxicity study and micronucleus assay in rodents. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 6, n. 1, p. 17-26, 2018.

ROLIM, Thaís Leite et al. Toxicity and antitumor potential of *Mesosphaerum sidifolium* (Lamiaceae) oil and fenchone, its major component. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 347, 2017.

ROMIEU, I. I.; AMADOU, A.; CHAJES, V. The Role of Diet, Physical Activity, Body Fatness, and Breastfeeding in Breast Cancer in Young Women: Epidemiological Evidence. **Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion**, v. 69, n. 4, p. 193, 2017.

ROOS, Wynand P.; THOMAS, Adam D.; KAINA, Bernd. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 1, p. 20, 2016.

ROY, K.; WU, Y.; MEITZLER, J. L.; JUHASZ, A.; LIU, H.; JIANG, G.; LU, J.; ANTONY, S.; JAMES, H. Doroshow, NADPH oxidases and cancer. **Clinical Science**, v. 128, n. 12, p. 863-875, 2015.

SADER, Safaa; WU, Chun. Computational analysis of Amsacrine resistance in human topoisomerase II alpha mutants (R487K and E571K) using homology modeling, docking and all-atom molecular dynamics simulation in explicit solvent. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 72, p. 209-219, 2017.

SAFARZADEH, E., SANDOGHCHIAN, S. S., BARADARAN, B. Herbal medicine as

inducers of apoptosis in cancer treatment, **Advanced pharmaceutical bulletin**, Vol 4, pp. 421-427. 2014.

SALEM, Mohamed L.; ATTIA, Zeinab I.; GALAL, Sohaila M. Acute inflammation induces immunomodulatory effects on myeloid cells associated with anti-tumor responses in a tumor mouse model. **Journal of advanced research**, v. 7, n. 2, p. 243-253, 2016.

SALLUM, Ana Maria C; GARCIA, Dayse Maioli; SANCHES, Mariana. Dor aguda e crônica: revisão narrativa da literatura. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 25, n. 1, 2012.

SALPETER, Shelley R.; BUCKLEY, Jacob S.; BRUERA, Eduardo. The use of very-low-dose methadone for palliative pain control and the prevention of opioid hyperalgesia. **Journal of palliative medicine**, v. 16, n. 6, p. 616-622, 2013.

SAMPETREAN, Oltea; SAYA, Hideyuki. Modeling phenotypes of malignant gliomas. **Cancer Science**, 2017.

SANCHEZ, Ariane Dutra; ANDRADE, Ana Laura Martins de; PARIZOTTO, Nivaldo Antonio. Eficácia da terapia a laser de baixa intensidade no controle da dor neuropática em camundongos. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 25, n. 1, p. 20-27, 2018.

SANDERSON, Mark R. et al. Studies of prokaryotic Type II topoisomerase drug inhibition. **Foundations of Crystallography**, v. 70, p. C633, 2017.

SANTOS, Sônia Maria Josino dos et al. Acute Pain in Myocardial Infarction: Analysis of Concept. **Revista gaucha de enfermagem**, v. 36, n. 3, p. 102-108, 2015.

SANTOS, Mayres Ferreira et al. Analgesia preemptiva para cirurgia oral menor. **Revista da AcBO-ISSN 2316-7262**, v. 6, n. 2, 2017.

SANTOS, Jephesson et al. Th1-Biased Immunomodulation and *In Vivo* Antitumor Effect of a Novel Piperine Analogue. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 2594, 2018.

SCELO, G., Li, P., Chanudet, E., & Muller, D. C.. Variability of Sex Disparities in Cancer Incidence over 30 Years: The Striking Case of Kidney Cancer. **European Urology Focus**, 2017.

SÈBE, P. Ferretti, L., Savoie, P. H., Morel-Journel, N., Fléchon, A., Murez, T., ... & Durand, X. Recommandations en onco-urologie 2016-2018 du CCAFU: Tumeurs malignes du pénis. **Progrès en Urologie**, v. 27, p. S167-S179, 2016.

SHEN, Wen-Chi et al. Impact of undertreatment of cancer pain with analgesic drugs on patient outcomes: a nationwide survey of outpatient cancer patient care in Taiwan. **Journal of pain and symptom management**, v. 54, n. 1, p. 55-65. e1, 2017.

SHENG, J., Yang, Y., Ma, Y., Yang, B., Zhang, Y., Kang, S., ... & Fang, W. The efficacy of combining antiangiogenic agents with chemotherapy for patients with advanced non-small cell lung cancer who failed first-line chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0127306, 2015.

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.

SHRIHARI, T. G. Dual role of inflammatory mediators in cancer. **ecancermedicalscience**, v. 11, 2017.

SIEGEL, R. L. et al. CA: a cancer journal for clinicians. **Cancer Stat**, v. 66, p. 7-30, 2016.

SILVA, A. S.; SALDANHA, C.; MARTINS E SILVA, J. Effects of velnacrine maleate in the leukocyte-endothelial cell interactions in rat cremaster microcirculatory network. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 36, n. 3, p. 235-246, 2007.

SILVA, Camila Tainah da; JASIULIONIS, Miriam Galvonas. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38-42, 2014.

SILVA, Marina de M. et al. Correlation between DNA/HSA-interactions and antimalarial activity of acridine derivatives: Proposing a possible mechanism of action. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2018.

SIMÕES, R. Girão, J. H. R. C., da Silva Sasso, G. R., da Silva, R. F., Alonso, L. G., & Marques, S. R. Etimologia de termos Morfológicos. **São Paulo**, 2014.

SINHA, Birandra K. et al. Nitric oxide reverses drug resistance by inhibiting ATPASE activity of p-glycoprotein in human multi-drug resistant cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, 2018.

SLATTERY, M. L., Herrick, J. S., Mullany, L. E., Samowitz, W. S., Stevens, J., Sakoda, L., & Wolff, R. K. The co-regulatory networks of tumor suppressor genes, oncogenes, and miRNAs in colorectal cancer. **Genes, Chromosomes and Cancer**, 2017.

SOMASUNDARAM, Veena et al. Molecular Mechanisms of Nitric Oxide in Cancer Progression, Signal Transduction, and Metabolism. **Antioxidants & redox signaling**, 2018.

SONDHI, S. M.; BHATTACHARJEE, G.; JAMEEL, R. K.; SHUKLA, R.; RAGHUBIR, R.; LOZACH,O.; MEIJER, L. **Central European Journal of Chemistry**, 2004.

STEPHENSON, Ellen et al. Outpatient Pain Medication Use: An Electronic Daily Diary Study in Metastatic Breast Cancer. **Journal of pain and symptom management**, v. 55, n. 4, p. 1131-1137, 2018.

STOLFI, C.; DE SIMONE, V.; PALLONE, F.; MONTELEONE, G. Mechanisms of Action of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and Mesalazine in the Chemoprevention of Colorectal Cancer. **Int J Mol Sci**, v.14, p.17972–17985, 2013.

STREICHER, John M.; BILSKY, Edward J. Peripherally Acting μ -Opioid Receptor Antagonists for the Treatment of Opioid-Related Side Effects: Mechanism of Action and Clinical Implications. **Journal of pharmacy practice**, p. 0897190017732263, 2017.

SU, Bailey; O'CONNOR, J. Patrick. NSAID therapy effects on healing of bone, tendon, and the enthesis. **Journal of applied physiology**, v. 115, n. 6, p. 892-899, 2013.

SULAIMAN, M. R.; PERIMAL, E. K.; ZAKARIA, Z. A.; MOKHTAR, F.; AKHTAR, M. N.; LAJIS, N. H.; ISRAF, D. A. Preliminary analysis of the antinociceptive activity of zerumbone. **Fitoterapia**, 2009.

TAMADDONFARD, Esmaeal; ERFANPARAST, Amir. Role of μ -opioid receptor in parafascicular nucleus of thalamus on morphine-induced antinociception in a rat model of acute trigeminal pain. In: **Veterinary Research Forum**. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, 2017. p. 29.

TANG X, Zhu Y, Han L, Kim AL, Kopelovich L, Bickers DR, Athar M. CP-31398 restores mutant p53 tumor suppressor function and inhibits UVB-induced skin carcinogenesis in mice. **J Clin Invest**. Dec;117(12):3753-64, 2007.

TAPIA-VIEYRA, Juana Virginia; DELGADO-COELLO, Blanca; MAS-OLIVA, Jaime. Atherosclerosis and cancer; a resemblance with far-reaching implications. **Archives of medical research**, v. 48, n. 1, p. 12-26, 2017.

THAKUR, D.S. Topoisomerase II inhibitors in cancer treatment. **international journal of pharamceutical sciences and nanotechnology**. V 3, 1173, 2011.

TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

TÖNNIES, Eric; TRUSHINA, Eugenia. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 57, n. 4, p. 1105-1121, 2017.

TORRES-COLLADO, Antoni X.; NAZARIAN, Ramin; JAZIREHI, Ali R. Rescue of cell cycle progression in BRAFV600E inhibitor-resistant human melanoma by a chromatin modifier. **Tumor Biology**, v. 39, n. 9, p. 1010428317721620, 2017.

TREED, R.-D. et al. Neuropathic pain redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, v. 70, n. 18, p. 1630-1635, 2008.

VALADÃO, Carlos Augusto Araújo; DUQUE, Juan Carlos; FARIAS, Anderson.

Administração epidural de opióides em cães. **Ciência Rural**, p. 347-355, 2002.

VAHORA, Huzefa et al. The potential role of nitric oxide in halting cancer progression through chemoprevention. **Journal of cancer prevention**, v. 21, n. 1, p. 1, 2016.

VAN DEN BEUKEN-VAN, Marieke HJ et al. Update on prevalence of pain in patients with cancer: systematic review and meta-analysis. **Journal of pain and symptom management**, v. 51, n. 6, p. 1070-1090. e9, 2016.

VARDEH, Daniel; NARANJO, Julian F. Peripheral and central sensitization. In: **Pain Medicine**. Springer, Cham, p. 15-17, 2017.

VENTOLA, C. Lee. Cancer Immunotherapy, Part 1: Current Strategies and Agents. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 42, n. 6, p. 375, 2017.

VILELLA, Renato Carvalho. Pain treatment and recovery of functionality in a former athlete diagnosed with myofascial pain syndrome in the course of syringomyelia. Case report. **BrJP.**, v. 1, n. 1, p. 87-89, 2018.

VON MOOS, Roger et al. Improving quality of life in patients with advanced cancer: targeting metastatic bone pain. **European journal of cancer**, v. 71, p. 80-94, 2017.

WANG, Kepeng. Targeting IL-17 for cancer-associated inflammation and immunity. 2017 a.

WANG, Ronghua et al. iNOS promotes CD24+ CD133+ liver cancer stem cell phenotype through a TACE/ADAM17-dependent Notch signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 43, p. E10127-E10136, 2018b.

WANG, Weiwei et al. MiR-1-3p inhibits the proliferation and invasion of bladder cancer cells by suppressing CCL2 expression. **Tumor Biology**, v. 39, n. 6, p. 1010428317698383, 2017c.

WANG, Ting et al. CCL2 influences the sensitivity of lung cancer A549 cells to docetaxel. **Oncology Letters**, v. 16, n. 1, p. 1267-1274, 2018.

WHITTAKER, S. R., Mallinger, A., Workman, P., & Clarke, P. A. Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. **Pharmacology & therapeutics**, 2017.

WIFFEN, P. J.; WEE, B.; DERRY, S.; BELL, R. F.; MORE, R. A. Opioids for cancer pain - an overview of Cochrane reviews (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 1, n. 7, p. 1-23, 2017.

WONG, Chung H. et al. Nifedipine-induced analgesia after epidural injection in rats. **Anesthesia & Analgesia**, v. 79, n. 2, p. 303-305, 1994.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental**

Therapeutics, v. 80, p. 300-307, 1944.

WROBLEWSKI, M., Bauer, R., Córdova, M. C., Udonta, F., Ben-Batalla, I., Legler, K., ... & Schulze, C. Mast cells decrease efficacy of anti-angiogenic therapy by secreting matrix-degrading granzyme B. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

XAVIER, Aline L. et al. Chemical composition, antitumor activity, and toxicity of essential oil from the leaves of Lippia Microphylla. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 70, n. 5-6, p. 129-137, 2015.

XAVIER, B., CALDEZ, M. J., KALDIS, P. The Complex Relationship between Liver Cancer and the Cell Cycle: A Story of Multiple Regulations. **Cancers**. Vol. 6, pp. 79-111, 2014.

XU, J.; LU, Z.; NARAYAN, A.; ROUZIC V. P. L.; XU, M.; HUNKELE, A.; BROWN, T. G.; HOEFER, W. F.; ROSSI, G. C.; RICE, R. C.; MARTÍNEZ-RIVERA, A.; RAJADHYAKSHA, A. M.; CARTEGNI, L.; BASSONI, D. L.; PASTERNAK, G. W.; PAN, Y. Alternatively spliced mu opioid receptor C termini impact the diverse actions of morphine. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 4, p. 1561- 1573, 2018.

YAM, Mun et al. General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 8, p. 2164, 2018.

YAMANAKA, Travis; SADIKOT, Ruxana T. Opioid effect on lungs. **Respirology**, v. 18, n. 2, p. 255-262, 2013.

YANG, J-H.; HU, J.; WAN, L.; CHEN, L-J. Barbigerone Inhibits Tumor Angiogenesis, Growth and Metastasis in Melanoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, p. 167-174, 2014.

YANG, H. W., Chung, M., Kudo, T., & Meyer, T. Competing memories of mitogen and p53 signalling control cell-cycle entry. **Nature**, 2017a.

YANG, Y. C., Johnson, M. P., Schorpp, K. M., Boen, C. E., & Harris, K. M. Young adult risk factors for cancer: obesity, inflammation, and sociobehavioral mechanisms. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 53, n. 3, p. S21-S29, 2017b.

YANG, M. H., Chang, K. J., Zheng, J. C., Huang, H., Sun, G. Y., Zhao, X. W., ... & Xiu, Q. Y. Anti-angiogenic effect of arsenic trioxide in lung cancer via inhibition of endothelial cell migration, proliferation and tube formation. **Oncology Letters**, v. 14, n. 3, p. 3103-3109, 2017c.

YANG, Xinguang et al. Crocin inhibits oxidative stress and pro-inflammatory response of microglial cells associated with diabetic retinopathy through the activation of PI3K/Akt signaling pathway. **Journal of Molecular Neuroscience**, v.

61, n. 4, p. 581-589, 2017d.

YASMIN, Rehana et al. Epigenetic regulation of inflammatory cytokines and associated genes in human malignancies. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.

YI, H. S; Chang JY, Kim KS, Shong M. Oncogenes, mitochondrial metabolism, and quality control in differentiated thyroid cancer. **Korean J Intern Med.** 2017.

YIN, Jie; MARKERT, James M.; LEAVENWORTH, Jianmei W. Modulation of the Intratumoral Immune Landscape by Oncolytic Herpes Simplex Virus Virotherapy. **Frontiers in Oncology**, v. 7, p. 136, 2017.

YOO, Sa Kan et al. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. **Nature**, v. 480, n. 7375, p. 109, 2011.

YU, Chan-Wei et al. Pro-inflammatory cytokines IL-6 and CCL2 suppress expression of circadian gene Period2 in mammary epithelial cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, 2018.

YUDOYONO, F. Sidabutar, R., Dahlan, R. H., Gill, A. S. Surgical management of giant skull osteomas. **Asian Journal of Neurosurgery**, v. 12, n. 3, p. 408, 2017.

ZAREI, Mohammad; MOHAMMADI, Saeed; KOMAKI, Alireza. Antinociceptive activity of Inula britannica L. and patuletin: In vivo and possible mechanisms studies. **Journal of ethnopharmacology**, v. 219, p. 351-358, 2018.

ZHANG, C.; DISSANAYAKA, W. L. The role of vasculature engineering in dental pulp regeneration. In: **Joint Scientific Symposium: Current and Future Challenges in Dentistry**. 2017.

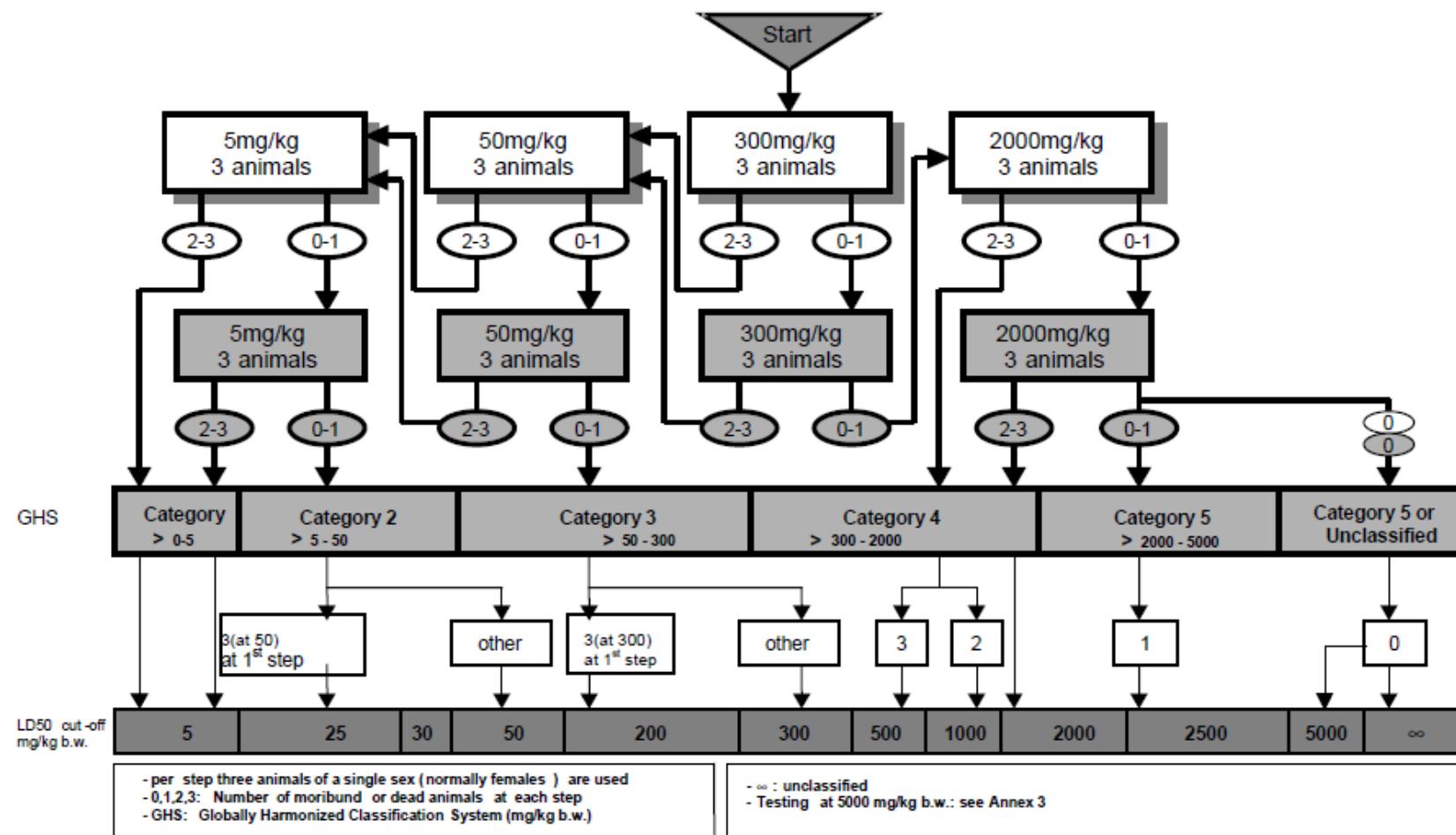
ZHANG, Junmin et al. A Redox-Dependent Copper Carrier Promotes Cellular Copper Uptake and Oxidative Stress-Mediated Apoptosis of Cancer Cells. **ACS applied materials & interfaces**, 2018.

ZHAO, Zhizheng et al. Fufang Kushen injection inhibits sarcoma growth and tumor-induced hyperalgesia via TRPV1 signaling pathways. **Cancer letters**, v. 355, n. 2, p. 232-241, 2014.

ZHOU, Jiaojie et al. Thioredoxin binding protein-2 regulates autophagy of human lens epithelial cells under oxidative stress via inhibition of Akt phosphorylation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

Anexos

ANEXO A – Fluxograma de realização do teste de toxicidade aguda com uma dose inicial de 300 mg/kg



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

ANEXO B- Triagem Farmacológica Comportamental

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	0 min	15 min	30 min	60 min	4 h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
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					

Fonte: ALMEIDA et al. (1999).

