

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

TATIANNE MOTA BATISTA

**TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO DERIVADO ACRIDÍNICO
(E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-
9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07)**

João Pessoa – PB

2019

TATIANNE MOTA BATISTA

**TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO DERIVADO ACRIDÍNICO
(E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-
9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento às exigências para obtenção 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

TATIANNE MOTA BATISTA

TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO DERIVADO ACRIDÍNICO
(E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-
9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07)

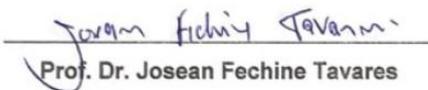
APROVADA EM / /

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Marianna Vieira Sobral

Orientadora



Prof. Dr. Josean Fchine Tavares

Membro interno

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro

Membro interno

Prof. Dr. Hilzeth de Luna Freire Pessoa

Membro externo

Prof. Dr. Teresinha Gonçalves da Silva

Membro externo

B333t

Batista, Tatianne Mota.

Toxicidade e atividade antitumoral do derivado acridínico (*E*)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07) / Tatianne Mota Batista. - João Pessoa : [s.n.], 2019.

125 p. : il.

Orientação: Marianna Vieira Sobral.

Tese (Doutorado) – UFPB/CCS

1. Carcinoma ascítico de Ehrlich. 2. Derivados acridínicos. 3. Efeito antiangiogênico. 4. Atividade imunomoduladora. I. Sobral, Marianna Vieira. II. Título.

UFPB/BC

Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar".

Josué 1:9

**Ao meu avô Francisco Martins e minha mãe
Edneide Mota**

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo dom da vida, por todos os milagres diários que Ele opera em minha vida, por não me deixar desistir e por não desistir de mim.

Aos **meus pais, Edneide Martins Mota e Francisco Martins de Oliveira** (meu pai avô) por todos os esforços feitos para que eu alcançasse a cada dia meus objetivos e trilhasse meus caminhos com dignidade e força para seguir, que mesmo diante de tantas dificuldades sempre disseram que eu iria conseguir.

Aos meus avôs paternos, **Iraci Batista de Lima e Arcelino Batista** (*in memoriam*) pelo amor, carinho e compreensão enquanto estavam presentes fisicamente em minha vida.

A minha avô materna **Jadeide Maria Martins** (*in memoriam*) por ter sido minha mãe, minha avô e minha amiga, por ter me criado junto com vovô e mainha e ajudado a ser quem sou hoje, te amo além da vida.

Aos meus irmãos **Gabriel Mota, Gilson Candeias e João Paulo** por serem compreensivos com a irmã chata, amigos e companheiros, por me fazerem sorrir quando eu mais preciso. Em especial a minha irmã **Mayara Luanne**, que a cada dia me transmite mais amor, amizade e força pra seguir, por ser minha irmã-filha, por vibrar junto comigo em cada vitória.

A minha sobrinha **Júlia** que trouxe tanta alegria para a vida de sua Titi. Você me faz sorrir e me traz paz. Obrigada por me arrancar sorrisos e por ser do jeitinho que você é. Titi ama você.

Aos meus primos **Raphael e José Lucas** pelo apoio e torcida.

A minha orientadora **Marianna Vieira Sobral**, pela paciência, por ser uma orientadora tão presente, por nos ensinar a olhar com outros olhos tudo o que fazemos e por não desistir de cada um de nós, mesmo quando somos filhos científicos teimosos. Obrigada por ter ser amiga, mãe, por me ouvir, por estar presente em tantos momentos felizes e também nos tristes. Foram anos de convivência diária e de muitos ensinamentos científicos e de vida. Nunca esquecerei aquele lápis grafite que tanto me representa.

Ao professor **Ricardo** pelo fornecimento da molécula para ser testada no meu doutorado.

Ao professor **Adriano Alves**, pela colaboração com as análises histopatológicas e paciência em explicar passo a passo do que estava fazendo.

Ao professor **Davi Farias** pelos ensinamentos e paciência durante os experimentos com o peixe zebra.

Aos professores **Márcia Piuvezam, Ricardo Castro, Hilzeth Pessôa, Teresinha Gonçalves** pela gentileza de participar da avaliação deste trabalho.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Profa. Dr. Josean Fechine Tavares, pela atenção e disponibilidade.

Aos meus amigos do doutorado, “**os gases nobres**”: Diego Igor, Rayssa Marques, Priscilla Maciel, Paula Benvindo, Luciano Leite pela descontração, pelas risadas e compartilhamentos diários de nossas lutas e memes.

Aos colegas do **Laboratório de Oncofarmacologia** (OncoFar) Francisco, Camyla, Ana Luiza, Ana Luisa, Sâmia, Daiana e Thaís pela torcida e participação nos experimentos raiz e a Rawni pela disposição de tirar minhas dúvidas sobre a molécula.

Ao meu amigo, soldado fiel, **Rafael Carlos**, por se fazer presente quando mais precisei, por sempre está disponível para tirar minhas dúvidas, me ajudar e por me ouvir nas madrugadas. Você é uma pessoa admirável, sua dedicação e inteligência me encantam. Você vai longe, soldado.

A minha amiga **Renata Abrantes** pela amizade, companheirismo, pelos nossos cafés da tarde, por nossas conversas, por me levar para mais perto de Deus e por não desistir de mim. Obrigada pelo amor, pela lealdade e por ser tão paciente comigo. Ninguém solta à mão de ninguém.

A minha amiga **Paula Benvindo** que me acompanhou durante toda a pós-graduação, me ouvindo, me ensinando, compartilhando momentos de alegria, de tristeza, de desespero, de vitórias e superação. Juntas somos mais fortes! E continuaremos assim, uma ajuda à outra e vamos vencendo. Obrigada por tudo.

A minha amiga, **Tatyanna Kelvia**, por ter dividido comigo todos os momentos de alegria e tristeza, durante o dia e na madrugada, para que chegássemos até aqui com êxito. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados, pelas noites de conversas, pelos dias de experimentos e anos compartilhados juntos no OncoFar. Obrigada pelos conselhos, por me ouvir e por me acalmar. Sentirei muito a sua falta. Você é especial! Obrigada pela amizade e companheirismo.

A minha amiga, **Vivianne Mendes**, por ser companheira, me ouvir, me aguentar e por ser tão paciente comigo. Obrigada por ser minha amiga, por ser

esta pessoa tão maravilhosa, e por estar presente em todos os momentos da minha vida.

A minha amiga **Ana Paula**, pelas risadas compartilhadas, pelas horas de café e conversa boa, pela ajuda diária no laboratório, na vida e por ter me levado para mais perto do Pai. Você é luz por onde passa. Uma pessoa muito especial que levarei por toda a vida.

As minhas amigas de infância **Heloísa Raquel, Laryssa Nunes, Flávia Leal, Maysa Romão e Priscilla Formiga** pelo constante incentivo, pelas risadas, pela amizade, pela paciência e por todo amor. Obrigada, minhas “ladies”.

A minha psicóloga, **Emanuelly**, por ter me ajudado durante parte do doutorado e por continuar me ajudando.

A minha amiga e nutricionista, **Natali Rodrigues**, por sempre me colocar para cima, por cuidar tão bem de minha alimentação, da minha imagem, por acreditar em mim, por me ouvir e por ser essa pessoa tão especial.

A **José Crispim Duarte** pelo constante incentivo e apoio.

A **Fátima de Lourdes Azevedo** pela disponibilidade, torcida e apoio durante os experimentos.

Ao funcionário **Seu Josué** pela alegria contagiante de todas as manhãs e pelos serviços prestados.

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

A **Luis Cordeiro e Adriano Silva**, pela disponibilidade e apoio técnico imprescindível na execução deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida durante o período de doutorado.

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

E a todos que contribuíram para a realização desse sonho, de maneira direta ou indireta. A gratidão é a virtude das almas nobres.

Tatianne Mota

BATISTA, T. M. **TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO DERIVADO ACRIDÍNICO (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07)**. 2019. 125f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Atualmente, é considerado como uma tragédia humana e a sua prevalência está crescendo continuamente. Em 2018, as estatísticas do câncer nos Estados Unidos previram mais de 1,7 milhões de novos casos de câncer e mais de 600.000 mortes relacionadas à doença. Os derivados acridínicos são agentes intercaladores de DNA e inibidores de topoisomerase e, desta forma, a síntese de novos derivados acridínicos tem sido de considerável interesse na química medicinal. O composto (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07) é um derivado acridínico capaz de inibir a topoisomerase II. Todavia, apesar dos dados relacionados a esse mecanismo de ação, não há relatos na literatura que descrevam o potencial antitumoral e o perfil de toxicidade do AMTAC-07. Sendo assim, o presente trabalho objetivou avaliar a toxicidade não clínica e a atividade antitumoral *in vivo* e os possíveis mecanismos de ação antitumorais de AMTAC-07 em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE). No ensaio de toxicidade não clínica aguda em camundongos, a administração de AMTAC-07 (2000 mg/kg), via intraperitoneal (i.p.), não induziu morte dos animais experimentais, sendo a dose letal média (DL₅₀) estimada como maior que 5000 mg/kg. O uso do teste de toxicidade em embriões de peixe (teste FET), indicou que a concentração letal média (CL₅₀) do AMTAC-07 é superior a 88 µM. Para a avaliação da genotoxicidade foi realizado o teste do micronúcleo em sangue periférico de camundongos, sendo observado que AMTAC-07 (2000 mg/kg, i.p.) não induziu aumento no número de eritrócitos micronucleados. Em modelo de CAE, observou-se que AMTAC-07 (12,5, 25 ou 50 mg/kg, i.p., sete dias consecutivos de tratamento) reduziu o volume e massa tumorais, a viabilidade celular e a quantidade total de células tumorais peritoneais. Foi observado que o AMTAC-07 (50 mg/kg) não induziu parada do ciclo celular. Foi determinada a microdensidade dos vasos no peritônio dos animais, sendo observada redução deste parâmetro após tratamento com AMTAC-07 (50 mg/kg) indicando ação antiangiogênica. Observou-se ainda que o AMTAC-07 atua na modulação da resposta imune contra o tumor por induzir aumento nos níveis das citocinas IL-1β, TNF-α, CCL2 e IL-4. A realização de ensaio fluorimétrico utilizando o 2',7'-diacetato diclorofluoresceína (DCFH-DA) permitiu a observação de que o AMTAC-07 não induz alterações no nível de estresse oxidativo, no modelo experimental utilizado. Em relação à toxicidade, após tratamento antitumoral, entre todos os parâmetros avaliados (parâmetros metabólicos, bioquímicos, hematológicos e histológicos), foi observado que AMTAC-07 (50 mg/kg) não induziu alterações significativas. Os dados apresentados, em conjunto, sugerem que AMTAC-07 possui baixa toxicidade não clínica e significativa atividade antitumoral via mecanismos antiangiogênicos e imunomoduladores.

Palavras-chave: Derivados acridínicos, Carcinoma ascítico de Ehrlich, Efeito antiangiogênico, Atividade imunomoduladora.

BATISTA, T. M. **TOXICITY AND ANTITUMORAL ACTIVITY OF THE DERIVED ACRIDINE. (E) -1'-{(4-fluorobenzylidene) amino} -5'-oxo-1,5'-dihydro-10H-spiro [acridine-9,2'-pyrrole] -4'-carbonitrile (AMTAC-07).** 2019. 125f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death in the world. It is now considered a human tragedy and its prevalence is steadily increasing. By 2018, cancer statistics in the United States predicted more than 1.7 million new cancers and more than 600,000 disease-related deaths. Acridine derivatives are DNA intercalators and topoisomerase inhibitors, and thus the synthesis of novel acridine derivatives has been of interest in medicinal chemistry. The compound (E)-1'-{(4-fluorobenzylidene) amino}-5'-oxo-1,5'-dihydro-10H-spiro [acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-07) is an acridine derivative capable of inhibiting a topoisomerase II. However, despite data related to this mechanism of action, there are no reports in the literature describing the antitumor potential and toxicity profile of AMTAC-07. Thus, the present study aimed to evaluate non-clinical toxicity and antitumor activity *in vivo* and the possible antitumor mechanisms of action of AMTAC-07 in model of Ehrlich ascites carcinoma (CAE). In the non-clinical acute toxicity assay in mice, the administration of AMTAC-07 (2000 mg/kg), intraperitoneal (ip), did not cause death of the experimental animals, with the mean lethal dose (LD₅₀) estimated to be greater than 5000 mg/kg. The use of the fish embryo toxicity test (FET test) indicated that the mean lethal concentration (LC₅₀) of AMTAC-07 is greater than 36.8 µg/mL. For the evaluation of genotoxicity, the micronucleus test was performed in mice peripheral blood, and it was observed that AMTAC-07 (2000 mg/kg, i.p.) did not induce an increase in the number of micronucleated erythrocytes. In the CAE model, AMTAC-07 (12.5, 25 or 50 mg/kg, ip, seven consecutive days of treatment) was observed to reduce tumor volume and mass, cell viability, and total number of peritoneal tumor cells. It was observed that AMTAC-07 (50 mg/kg) did not induce cell cycle arrest. Microdensity of the vessels in the peritoneum of the animals was determined, being observed reduction of this parameter after treatment with AMTAC-07 (50 mg/kg) indicating antiangiogenic action. It was further observed that AMTAC-07 acts on the modulation of the tumor immune response by inducing increase in IL-1β, TNF-α, CCL2 and IL-4 cytokine levels. The fluorimetric assay using 2', 7'-diacetate dichlorofluorescein (DCFH-DA) allowed the observation that AMTAC-07 does not induce changes in the level of oxidative stress in the experimental model used. Regarding to toxicity, after antitumor treatment, it was observed that AMTAC-07 (50 mg/kg) did not induce significant changes in all parameters evaluated (metabolic, biochemical, hematological and histological parameters). The data presented, together, suggest that AMTAC-07 has low non-clinical toxicity and significant antitumor activity via antiangiogenic and immunomodulatory mechanisms.

Key words: Acridinal derivatives, Ehrlich's ascitic carcinoma, Antiangiogenic effect, Immunomodulatory activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características biológicas do câncer.....	27
Figura 2. Angiogênese tumoral.....	31
Figura 3. Terapia antiangiogênica.....	33
Figura 4. Delineamento experimental para avaliação do potencial antitumoral de AMTAC-07 em Células de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE) transplantadas em camundongos Swiss fêmeas tratadas por sete dias consecutivos, via intraperitoneal.	62
Figura 5. Embriões e larvas de peixe-zebra expostos ao AMTAC-07, na concentração de 88 μ M, ou aos controles meio E3 e DMSO (dimetilsulfóxido) a 0,5% durante 96 h.....	73
Figura 6. Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07* (50 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) na histologia dos fígados e rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	88

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1. Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral do (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07).....	58
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito do tratamento com AMTAC-07* e 5-FU** em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	76
Gráfico 2. Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07* (50 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg) na distribuição de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas diferentes fases do ciclo celular.	77
Gráfico 3. Efeito do tratamento com AMTAC-07* (50 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.....	78
Gráfico 4. Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07* (50 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg) na concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.	80
Gráfico 5. Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07* (50 mg/kg, i.p.) na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em modelo de tumor de Ehrlich.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estruturas químicas dos derivados acridínicos AMTAC-01*, AMTAC-02**, AMTAC-06*** e AMTAC-07****.	49
Tabela 2. Valores de CI50* do AMTAC-07** em linhagens de células tumorais humanas.....	70
Tabela 3. Efeitos da administração de doses únicas (2000 mg/kg, i.p.) de AMTAC-07* em camundongos..	71
Tabela 4. Efeito da exposição do (AMTAC-07) e do dimetilsulfóxido (DMSO) a embriões/larvas de peixe-zebra..	72
Tabela 5 Efeito da administração de dose única de AMTAC-07* (2000 mg/kg, i.p.) e ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p.) no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após 48 horas do tratamento..	74
Tabela 6. . Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07* (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.	82
Tabela 7. Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07** (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.	83
Tabela 8. Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07* (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..	85
Tabela 9. Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07* (50 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) nos órgãos de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.	86

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Rota sintética do derivado (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07).....	53
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	28
2.1 Aspectos gerais do câncer	28
2.2 Ciclo celular.....	31
2.3 Angiogênese tumoral	34
2.4 Microambiente tumoral.....	38
2.5 Estresse oxidativo e seu papel no câncer	43
2.6 Farmacoterapia do câncer	45
2.7 Estudos da toxicologia/farmacologia de drogas com potencial antitumoral	47
2.8 Derivados acridínicos	50
2.9 Síntese de AMTAC-07.....	54
3 OBJETIVOS.....	57
3.1 Objetivo geral	57
3.2 Objetivos específicos	57
4 MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 Locais da pesquisa	59
4.2 Material	59
4.2.1 Animais e condições experimentais.....	59
4.2.2 Linhagens de células tumorais	60
4.2.3 Equipamentos	61
4.3.1 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i>	63
4.3.2 Avaliação da toxicidade não clínica aguda	63
4.3.3 Avaliação da toxicidade aguda em embriões de <i>Danio rerio</i>	64
4.3.4 Avaliação da genotoxicidade	65
4.3.5 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.....	65
4.3.6 Volume do tumor, viabilidade e total celular	66
4.3.7 Investigação do mecanismo de ação antitumoral <i>in vivo</i>	67
4.4 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich	70
4.4.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração	70
4.4.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos	70
4.4.3 Avaliação dos índices dos órgãos.....	71

4.4.4 Análises histológicas.....	71
4.5 Análise estatística	72
5 RESULTADOS	74
5.1 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i>	74
5.2 Avaliação da toxicidade não clínica aguda	74
5.3 Avaliação da toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra	75
5.4 Avaliação da genotoxicidade	77
5.5 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.....	78
5.5.1 Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade e total celular	78
5.5.2 Investigação do mecanismo de ação antitumoral	81
5.5.3 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma ascítico de Ehrlich	86
6 DISCUSSÃO	94
7 CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS.....	107

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças que representa uma ameaça de mortalidade para todo o mundo, apesar dos avanços significativos na tecnologia médica para seu diagnóstico e tratamento (CEYLAN et al., 2018). As células cancerígenas adquirem capacidades únicas que a maioria das células saudáveis não possui, o que inclui o desenvolvimento de resistência aos sinais inibidores do crescimento, a proliferação sem dependência de fatores estimuladores do crescimento, a evasão da apoptose e a aquisição de propriedades invasivas e angiogênicas (ADAMI et al., 2018).

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Atualmente, é considerado como uma tragédia humana e a sua prevalência está crescendo continuamente. Em 2018, as estatísticas do câncer nos Estados Unidos previram mais de 1,7 milhões de novos casos de câncer e mais de 600.000 mortes relacionadas à doença (GILABERT-ORIOU et al., 2018; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018).

As opções de tratamento mais comuns para o câncer são a quimioterapia, a cirurgia e a radioterapia. Nesse contexto, a quimioterapia citotóxica convencional, método mais usado para o tratamento da doença, exibe uma série de desvantagens, incluindo efeitos colaterais indesejáveis como náuseas, vômitos, queda de cabelo, mielossupressão e resistência a múltiplas drogas (EL-FAR et al., 2018). Portanto, uma das estratégias na busca e desenvolvimento de novos fármacos é descobrir e avaliar novos compostos com baixa toxicidade e com alta especificidade e seletividade para as células malignas e com efeitos colaterais mínimos.

As acridinas são compostos heterocíclicos derivados de antracenos formadas por dois anéis fundidos a um anel de piridina em posição central, também conhecido como dibenzo-piridina, 10-aza-antraceno e 2,3-dibenzoquinolina (KUMAR et al., 2012). Devido a sua estrutura planar heteroaromática, o mecanismo de ligação não covalente destes compostos ocorre por meio de intercalação, isto é, entre os pares de bases de ácidos nucleicos no DNA, afetando algumas funções biológicas e sendo efetivo contra várias doenças (SILVA et al., 2018). Derivados acridínicos possuem atividade fungicida, antiparasitária, antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória e

analgésica (SONDHI et al., 2010). Devido a estas propriedades farmacológicas, a síntese destes compostos tem sido de considerável interesse na química medicinal (SILVA et al., 2018).

Uma nova e promissora classe de derivados acridínicos são as espiro-acridinas. A reatividade do anel de acridina no carbono C-9 permite uma ciclização espontânea por um ataque nucleofílico intramolecular e subsequente formação dos cinco anéis espiro ligado a acridina. Dentre estes derivados, destaca-se o (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07) que é capaz de inibir a topoisomerase II de forma semelhante à amsacrina (GOUVEIA et al., 2018), um agente anticancerígeno usado no tratamento de leucemias e linfomas que age por meio da intercalação ao DNA e inibição da Topoisomerase II. No entanto, o uso da amsacrina torna-se limitado devido a seus efeitos tóxicos (BARROS et al., 2012). Todavia, apesar dos dados relacionados a inibição da topoisomerase II pelo AMTAC-07, não há dados na literatura que descrevam seu potencial antitumoral e sua toxicidade.

Portanto, considerando a necessidade constante de pesquisa na busca por antineoplásicos eficientes e menos tóxicos e ainda considerando o potencial biológico dos derivados acridínicos no contexto do câncer, levantou-se a hipótese de que AMTAC-07 exerce seu efeito antitumoral por interferir em processos como a desregulação do ciclo celular, a indução de angiogênese, o estresse oxidativo, bem como a modulação de um microambiente que sustenta o crescimento do tumor.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer

As células que formam os tecidos do corpo humano são capazes de se multiplicar por meio de mitoses, um processo contínuo natural. Assim, na homeostasia do organismo, a proliferação celular ocorre de forma ordenada respondendo as necessidades específicas do corpo (GUTSCHNER; DIEDERICHS, 2012).

Em contrapartida, a neoplasia é uma proliferação local de clones celulares atípicos, sem causa aparente, de crescimento excessivo, progressivo e ilimitado, incoordenado e autônomo (ainda que se nutra à custa do organismo), irreversível (persistente mesmo após a cessação dos estímulos que determinaram a alteração), e com tendência a perda de diferenciação celular (DIAZ-CANO et al., 2012).

As neoplasias podem ser benignas ou malignas. As neoplasias benignas ou tumores benignos têm seu crescimento lento de forma organizada, expansivo e apresentam limites bem nítidos, além disso, assemelham-se com o tecido de origem. Apesar de não invadirem os tecidos vizinhos, podem comprimir os órgãos e tecidos adjacentes, como exemplos de tumores benignos, temos o lipoma que tem origem no tecido gorduroso, o mioma que tem origem no tecido muscular liso e o adenoma que é tumor benigno das glândulas (KIGNEL, 2013). Já as neoplasias malignas ou câncer caracterizam-se por células que sofrem sucessivas mitoses e são capazes de invadir tecidos vizinhos e provocar metástases, apresentam bordas não delimitadas, são diferentes de seu tecido de origem e podem ser resistentes ao tratamento e causar a morte do indivíduo acometido com a doença (POLO et al., 2017).

Os tumores malignos podem ser classificados de acordo com o seu tecido de origem. Quando as células cancerosas tem início em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, é denominado carcinoma (GAJULAPALLI et al., 2016); quando o epitélio de origem é glandular, passam a ser chamados adenocarcinomas. Já em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem o tumor maligno é chamado de sarcoma, enquanto que as

leucemias são os tumores que surgem nos diversos tecidos que constituem o sangue, caracterizadas pela proliferação anormal de células progenitoras; e os linfomas são tumores da linhagem linfoide que formam agregados sólidos, frequentemente nos gânglios linfáticos (BARBOSA et al., 2014; ONO et al., 2014).

Os tipos de câncer mais incidentes no mundo são pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes são pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências encontradas são câncer mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (INCA, 2016). No Brasil, estima-se para o biênio 2018-2019 a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano (INCA, 2018).

Pode-se observar então que, apesar dos avanços modernos em terapias médicas em todo o mundo, as mortes por câncer têm aumentado principalmente devido ao estilo de vida e mudanças no mundo em desenvolvimento. Essa alta incidência da doença está associada a fatores internos, mas, especialmente, externos. Os fatores internos referem-se principalmente a mutações somáticas que produzem células com características que permitem ignorar os mecanismos regulatórios que controlam o crescimento e a proliferação de células saudáveis (HYNDMAN et al., 2016).

Menos de 10% de todos os tipos de câncer são de causa hereditária, sendo os outros 90% causados por mutações somáticas adquiridas e fatores ambientais. Nestes casos, o desenvolvimento de tumores está relacionado a infecção crônica, hábitos de alimentação, envelhecimento da população, obesidade, uso de tabaco, problemas auto-imunes, e, em especial, fatores ambientais como poluentes inalados e a incidência de raios ultra-violeta (UV). Esses fatores atuam isoladamente ou em conjunto para desencadear o desenvolvimento de tumores (ELINAV et al., 2013).

A carcinogênese, ou seja, a formação dos tumores malignos, é um processo complexo, de múltiplos passos, caracterizado por células que sofrem mudanças genéticas e/ou epigenéticas gerando novos fenótipos que permitem o desenvolvimento de capacidades autônomas de escapar da apoptose e

adquirir um potencial replicativo ilimitado (CALDERON et al., 2014; BOHLOLI et al., 2016).

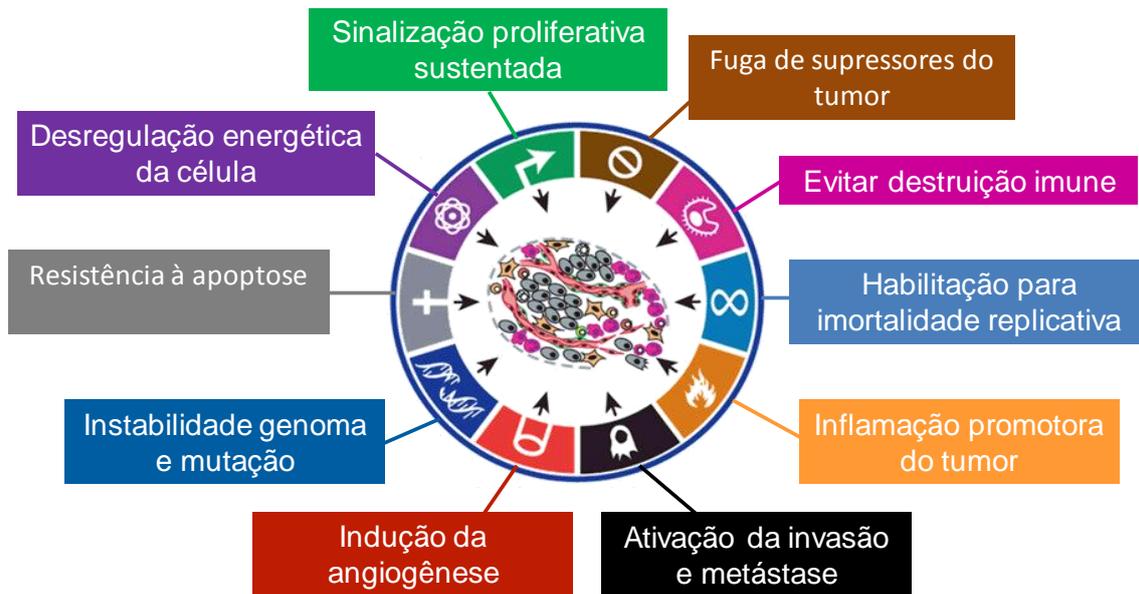
As células que adquirem um número limitado de mutações podem promover tumores benignos. Em contrapartida, as células mutadas que possuem maior capacidade de replicação e sobrevivência são "selecionadas" para sobreviver e formar um tumor maligno. Nesse contexto, o processo de carcinogênese é dividido em três estágios, a saber, iniciação, promoção e progressão (HYNDMAN et al., 2016).

A iniciação pode ocorrer espontaneamente ou ser causada por um agente mutagênico endógeno ou exógeno que geram danos ao DNA e, portanto, podem ativar proto-oncogenes (como KRAS), inativar genes supressores de tumor (TSG), como o TP53. No entanto, a iniciação não dará origem ao câncer sozinha, é necessário um agente promotor. Esse agente promotor induz a proliferação formando diversos clones celulares, o que caracteriza a fase de promoção, conduzida, em grande parte, por ativação das MAPK (Proteína cinase ativada por mitógeno) e de citocinas inflamatórias (HYNDMAN et al., 2016; BUTLER et al., 2017).

No último estágio ocorre a progressão tumoral e metástase que é resultado de modificações genéticas adicionais (HYNDMAN et al., 2016; RUNDHAUG et al., 2010). As duas primeiras etapas da carcinogênese são reversíveis porque a descontinuidade de contato com o oncopromotor pode evitar o desenvolvimento do câncer. Mas a progressão tumoral é irreversível, pois, o câncer já está instalado (GREENSTEIN, 2016).

O termo câncer abrange mais de 200 doenças distintas que são unificadas pelo princípio comum de crescimento celular descontrolado e potencial metastático (KERR; KERR 2016). Nesse contexto, os tumores malignos adquirem uma multiplicidade de características que promovem o crescimento desordenado e descontrolado das células, a imortalidade na replicação celular, a indução de angiogênese, a indução de invasão e metástase, a reprogramação do metabolismo energético, a instabilidade genômica, a inflamação promotora de tumor, a evasão da destruição pelo sistema imune e a resistência à morte celular (Figura 1) (VYAS et al., 2013; BISI et al., 2015; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1: Características biológicas do câncer.



Fonte: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG; 2011.

2.2 Ciclo celular

Em eventos de tumorigênese, em virtude de várias alterações genéticas e epigenéticas, a regulação do ciclo celular é prejudicada, o que representa um dos fatores que contribuem para a malignidade da doença (ZOHREH et al., 2018).

O ciclo celular representa uma série de eventos que ocorrem em uma célula levando à sua divisão e duplicação, sendo esta uma replicação idêntica. Células eucarióticas, como células de organismos mamíferos, têm uma estrutura organizacional especial, onde o núcleo, contendo a informação genética (genoma), pode ser distinguido do citoplasma circundante, que contém diferentes organelas e uma enorme quantidade de proteínas, as executoras das funções da célula. Durante a divisão celular, a célula mãe divide-se em duas novas células filhas de uma maneira organizada (BEHL; ZIEGLER, 2013).

Existem pontos de verificação no ciclo celular que monitoram uma variedade de sinais celulares e funcionam como um “freio”, impedindo a progressão para a próxima fase até que certos critérios sejam atendidos. Esses

pontos de verificação são cruciais para garantir que condições mitogênicas (ponto de restrição), replicação fiel do DNA (ponto de verificação da fase S), preservação da integridade genômica (ponto de verificação de danos no DNA) e segregação cromossômica adequada (ponto de verificação do conjunto do fuso) sejam satisfatoriamente concluídas antes da transição para a próxima fase (ZOHREH et al., 2018).

O ciclo celular consiste em vários estágios: síntese de DNA (fase S) e fase de divisão celular (fase M) intercaladas por duas fases chamadas G1 (entre fase M e fase S) e G2 (entre a fase S e a fase M). Essas fases são controladas por várias proteínas que interagem entre si, especialmente, ciclinas e cinases dependentes de ciclina (CDKs). As CDKs são cinases serina/treonina específicas, que possuem papel na regulação de processos celulares cruciais como ciclo celular e transcrição sendo ativadas por associação a pequenas proteínas cuja expressão é alterada durante o ciclo celular, as ciclinas (ROACH et al., 2018).

As ciclinas ligam-se a CDKs catalíticas para formar complexos ativados. Durante a fase G1, a ciclina D aumenta em resposta ao crescimento/estímulo mitogênico e forma o complexo com CDK4/6. O complexo CDK4/6 fosforila a retinoblastoma (Rb), causando a dissociação do fator de transcrição E2F do Rb. Assim, o E2F ativado induz as células à entrada na fase S mediando a transcrição das ciclinas E e A, e outras proteínas, incluindo redutase ribonucleotídica, timidilato sintase, diidrofolato redutase e DNA polimerases, necessárias para a síntese de DNA (LIN; ZHU; RATNER, 2018).

A ciclina E liga-se a CDK2 para formar o complexo CDK2-ciclina E que inicia a progressão da fase S. Para promover a progressão da fase S, a fosfatase Cdc25A ativa CDK2-ciclina E removendo os fosfatos inibitórios da CDK2. A ciclina A substitui mais tarde a ciclina E para formar o complexo CDK2-ciclina A que é necessário para a passagem através da fase S. Durante a fase G2, CDK1 desloca CDK2 para formar o complexo CDK1-ciclina A. O Cdc25C é responsável pela desfosforilação e ativação da CDK1-ciclina A para facilitar a progressão através da fase G2. Durante a fase M, a ciclina B liga-se a CDK1 para formar o complexo CDK1-ciclina B que promove a mitose (LIN; ZHU; RATNER, 2018).

Os pontos de verificação são responsáveis pela supervisão e proteínas como p53 e retinoblastoma são as principais protagonistas no controle do ciclo celular. Em caso de danos no DNA, programas de reparo são ativados ou, se o processo de reparo falha, a célula é conduzida a morte celular programada. A transferência de erros de DNA da célula-mãe para as células-filhas pode levar a formação de tumores. Então p53 e Rb são proteínas chave no processo de supressão tumoral (ZAVERI; DHAWAN, 2018).

O supressor tumoral p53 é um regulador essencial da estabilidade do genoma. Em caso de danos no DNA, duas grandes cascatas de sinalização impedem que as células prossigam para a próxima fase do ciclo celular. Estas são as cascatas de sinalização ATM-Chk1 e ATR-Chk2 (SMITH et al., 2010) que são ativadas em resposta a quebras de fita dupla de DNA (DSB) e DNA de fita simples (SSD) respectivamente. Tanto o ATR quanto o ATM ativam diretamente o p53 pela fosforilação e indiretamente pela atividade da cinase Chk1 e Chk2. A mudança no estado de fosforilação inibe a exportação nuclear de p53, levando à sua acumulação no núcleo. Ali, a p53 ativa a expressão de p21 que se liga e inibe a atividade da CDK2-ciclina E e Ciclina A/Cdk2, criando um bloqueio de fase G1/S (VISCONTI; MONICA; GRIECO, 2016).

Um regulador chave da fase G1 é a proteína retinoblastoma (Rb) que controla o ponto de restrição, impedindo assim a entrada na fase S. Este controle é obtido pela modificação do *status* de fosforilação da Rb. Quando uma célula entra em G1, Rb está em um estado ativo (não fosforilado) e bloqueia a transcrição dos principais genes da fase G1/S, impedindo a passagem por meio do ponto de restrição. A fosforilação de Rb na fase G1 reduz sua atividade inibitória, permitindo que as células iniciem uma série de reações que lhe permitem superar o ponto de restrição e finalmente entrar na fase S (ZAVERI; DHAWAN, 2018).

Defeitos na regulação do ciclo celular representam um ponto de vulnerabilidade de diversos tipos de cânceres, fazendo dos pontos de regulação um alvo terapêutico. Nesse contexto, os inibidores de CDK ganham importância na terapia do câncer devido ao seu alto potencial de induzir apoptose nas células em proliferação (OZFILIZ-KILBAS et al., 2018). Palbociclib, ribociclib e abemaciclib são inibidores competitivos de CDK4/6, que funcionam precocemente na fase G1 do ciclo celular. Recentemente, os

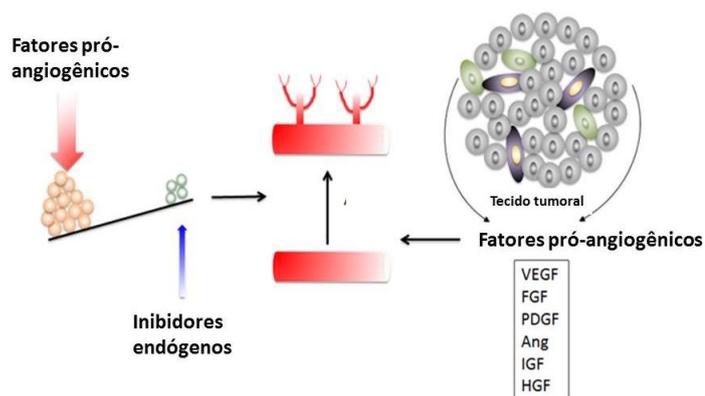
inibidores de CDK4/6 ganharam a aprovação do FDA para tratamento de câncer de mama pós-menopausa ER-positivo/HER2 negativo (Receptor de Estrogênio Positivo/ Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2) e testes em outros tipos de câncer estão em andamento (TEH; APLIN, 2018).

2.3 Angiogênese tumoral

O sistema circulatório é uma rede engenhosa e extensa de vasos sanguíneos e linfáticos que permite o transporte de nutrientes e oxigênio de seu local de captação ou produção para os tecidos periféricos, onde serão metabolizados. Ao mesmo tempo, remove quaisquer resíduos metabólicos desses tecidos. Embora no organismo adulto as células endoteliais raramente proliferem e permaneçam em estado quiescente por períodos prolongados, elas retêm a capacidade de iniciar rapidamente a formação de novos vasos, um processo fortemente coordenado denominado angiogênese (FITZGERALD et al., 2018).

A angiogênese é essencial em muitos processos fisiológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário. Entretanto, quando não regulada, pode causar doenças angiogênicas, como retinopatia diabética, crescimento tumoral e metástase, artrite reumatoide e doenças inflamatórias (HUANG et al., 2018). O crescimento do tumor e sua necessidade de nutrientes e oxigênio requer a indução de novos vasos sanguíneos em um processo regulado (Figura 2) (MOROTTI et al., 2018).

Figura 2: Angiogênese tumoral.



Fonte: Adaptado <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/AngiogenicFactorsID20129.html>

Os vasos sanguíneos tumorais recém-criados são diferentes dos vasos sanguíneos normais, apresentando irregularidades com um endotélio descontínuo. Isso permite que os componentes do sangue sejam facilmente extravasados para o tumor e facilita a transmigração de linfócitos (GILABERT-ORIOL et al., 2018).

Sob condições de hipóxia, o fator indutor de hipóxia 1 (HIF-1) regula a transcrição de numerosos genes relacionados à angiogênese. A hipóxia estimula a secreção de fatores pró-angiogênicos que incluem o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), a angiopoietina-1 (ANG-1), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), a interleucina-8 (IL-8), o fator de crescimento derivado do estroma-1 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Ainda, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), secretado por células endoteliais ativadas, recruta pericitos para vasos em brotamento. Em contrapartida, os fatores antiangiogênicos incluem a angiostatina, a endostatina, os interferons, alguma interleucinas, o fator de necrose tumoral- β (TNF- β) e trombospondinas (MANDER et al., 2018).

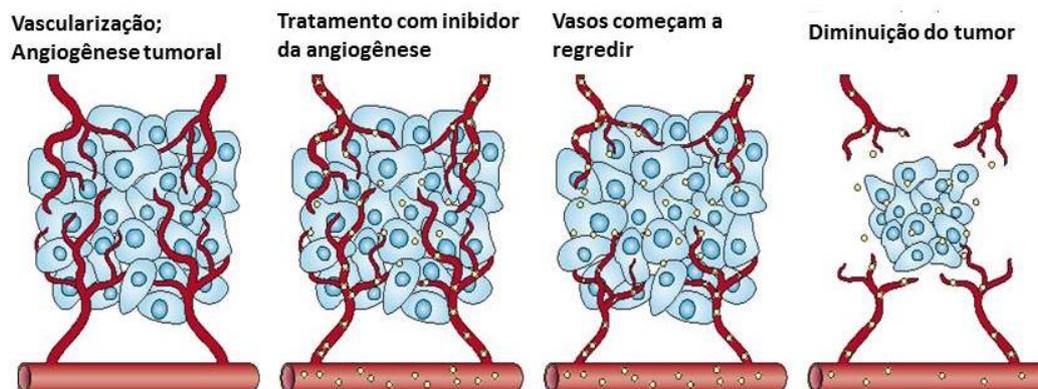
Embora muitos outros fatores de crescimento angiogênicos tenham sido descritos e caracterizados, o VEGF é considerado um regulador chave da angiogênese. Após a liberação por células em hipóxia e carentes de nutrientes, o VEGF se liga ao receptor de VEGF 2 (VEGFR2) que é expresso pelas células endoteliais, e inicia uma cascata de sinalização que promove a migração, proliferação e sobrevivência das células endoteliais (ZENGHUI et al., 2018).

A família VEGF inclui o VEGF-A (comumente referido como VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário. Os principais mediadores da angiogênese tumoral são as isoformas do VEGF-A: VEGF121, que é solúvel, VEGF165, que se liga matriz extracelular. A estimulação de VEGFRs e outros receptores de tirosina quinase determinam a ativação de vias de sinalização nas células endoteliais. Moléculas adaptadoras importantes para sinalização mediada por VEGFR são as proteínas SH2 e células B (Shb) com um domínio (SH2), que pode ativar outras vias que por sua vez podem ativar a via MEK/MAPK, a via PI3K/AKT, ou Ras/via Raf (MOROTTI et al., 2018).

Durante o desenvolvimento dos tumores ocorre a ativação de um "switch angiogênico", que é crucial para o crescimento e a progressão do tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Esse processo é dirigido por diferentes proteínas, tais como, o VEGF e o FGF, que atuam na promoção da proliferação celular, migração e diferenciação das células endoteliais vasculares; o PDGF, que está envolvido na maturação dos vasos e recrutamento de pericitos; e o fator de crescimento epidérmico (EGF), que ativa a via do seu receptor (EGFR) na regulação de fatores pró-angiogênicos, tais como o próprio VEGF, sendo, portanto, visto como regulador indireto da angiogênese (MOROTTI et al., 2018).

Nesse contexto, a terapia antiangiogênica tem sido apresentada como um caminho terapêutico atraente para terapias anticâncer (Figura 3). Embora várias estratégias para inibir VEGF tenham sido desenvolvidas e aprovadas para o tratamento de câncer, eles têm mostrado apenas uma eficácia limitada (JAYSON et al, 2016; FUKUMURA et al, 2018). Isso se deve, em parte, à alta regulação de fatores de crescimento pró-angiogênicos alternativos dentro do tumor para superar o bloqueio de VEGF (BERGER; HANAHAN, 2008; FUKUMURA et al., 2018).

Figura 3: Terapia antiangiogênica.



Fonte: Adaptado de ZETTER, 2008

Isso exigiu o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento que visem não apenas os fatores de crescimento angiogênicos, mas o próprio endotélio. Nos últimos anos, tornou-se claro que as células endoteliais reprogramam seu metabolismo durante a angiogênese, e o direcionamento do metabolismo endotelial fornece um alvo terapêutico alternativo promissor nas estratégias antiangiogênicas (DE BOCK et al., 2013; CANTELMO et al., 2017).

Espera-se que a terapia antiangiogênica vise a vasculatura do tumor em vez de células tumorais, desta forma sendo uma terapia mais específica e potencialmente menos tóxica. No entanto, a resposta à terapia antiangiogênica é variável porque a atividade angiogênica possui múltiplos mecanismos de vascularização e estes diferem entre os tipos de tumores e entre os diferentes locais no mesmo tumor (MANDER et al., 2018).

Existem três categorias principais de drogas antiangiogênicas: os anticorpos monoclonais que se ligam a fatores pró-angiogênicos específicos tais como VEGF (por exemplo, o bevacizumab) ou a seus receptores (por exemplo, ramucirumab) (MANDER et al., 2018); os *Decoy receptors/fusion peptides* que são formas solúveis de receptores de fator pró-angiogênico (por exemplo, Ziv-aflibercept) que competem com o receptor natural, resultando na supressão da sinalização angiogênica (AL-ABD et al., 2017); e os inibidores de receptor tirosinocinase (ITK), que são projetados para bloquear a atividade enzimática tirosinocinase ligado ao domínio intracelular de uma gama de

receptores que estimulam a produção de VEGF e outros fatores pró-angiogênicos. Ainda, a ativação anormal de receptores tirosinocinase específicos, tal como o receptor do próprio VEGF, foi demonstrada em muitas neoplasias, tornando-os alvos moleculares para terapia antineoplásica. Estas drogas antiangiogênicas que atuam como ITK incluem, por exemplo, o sorafenibe e o sunitinibe (VASUDEV et al., 2014).

Sabe-se que drogas antiangiogênicas aumentam a eficácia de drogas citotóxicas pela “normalização” de vasos tumorais estruturalmente e funcionalmente anormais, reduzindo assim a pressão do fluido intersticial e melhorando a penetração do fármaco (STURROCK et al., 2018). No entanto, a relevância clínica desse fenômeno ainda não está clara (VASUDEV et al., 2014).

2.4 Microambiente tumoral

As células tumorais malignas com desregulação da função celular normal não proliferam isoladamente, mas sim compõem, juntamente com o estroma, o que é caracterizado como microambiente tumoral (GILABERT-ORIOLO et al., 2018).

Sendo assim, o microambiente tumoral consiste não apenas de células tumorais, mas também de células estromais como: miofibroblastos, fibroblastos, células neuroendócrinas (NE), células adiposas, células imunoinflamatórias, células endoteliais, pericitos, macrófagos associados ao tumor (TAM), neutrófilos e várias células derivadas da medula óssea (WU; DAI, 2017). O estroma é essencial durante a iniciação e progressão da carcinogênese por meio da secreção de proteínas e do fornecimento de nutrientes essenciais a esses processos. Ainda, células estromais associadas a tumores, como macrófagos, células endoteliais e células T contribuem para a invasão e metástase tumoral (KAWAI et al., 2018).

Durante a carcinogênese, o microambiente ao redor do tumor fornece sinais de supressão tumoral para manter a arquitetura da homeostase tecidual essencialmente controlada. No entanto, uma vez perdida a homeostase tecidual, esse microambiente alterado torna-se um potente promotor tumoral. Então, uma vez formado o tumor, ele inicia respostas inflamatórias e imunes

complexas, nas quais células inflamatórias são recrutadas em resposta a sinais desse microambiente (BISSELL; HINES, 2011; SANTOS et al., 2018).

Macrófagos são as células mais abundantes dentro do estroma do tumor exibindo plasticidade perceptível, o que lhes permite realizar várias funções dentro do microambiente. Macrófagos podem resultar em dois tipos distintos, macrófagos M1 e M2 (MARTINEZ; GORDON, 2014; GUTKIN; SHURIN, 2017). Os macrófagos do tipo M1 são ativados por produtos microbianos ou IFN- γ (interferon γ), produzem citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-12, IL-23, IFN- γ , IL-18 e TNF- α , e atuam na resposta contra patógenos (especialmente parasitas intracelulares) e células tumorais (MANTOVANI et al., 2013).

Os macrófagos associados ao tumor comumente se referem a um fenótipo M2 alternativo, exibindo efeitos anti-inflamatórios e pró-tumorais. As células M2 são células altamente versáteis que influenciam diretamente em várias etapas do desenvolvimento do tumor, incluindo a sobrevivência, proliferação e invasão de células cancerígenas, juntamente com angiogênese e imunossupressão (MARTINEZ; GORDON, 2014; GUTKIN; SHURIN, 2017). Estas células realizam essas funções por meio de interações críticas com células relacionadas à progressão tumoral, incluindo linfócitos Th2 (*T helper*, Th), fibroblastos associados ao tumor, células cancerígenas, células T reguladoras (Tregs) e células supressoras derivadas de mieloides. Os macrófagos do tipo M2, por sua vez, são ativados por citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, possuem receptores de manose e galactose, e produzem VEGF, IL-6, IL-10, PG (prostaglandinas) e iNOS (óxido nítrico sintase induzível) (NAJAFI et al., 2018).

Relacionada à resposta imune anticâncer, os macrófagos M1 são considerados benéficos, enquanto que os M2 provavelmente promovem a progressão tumoral (CARAS et al., 2011). Depleção de macrófagos M2 resulta em diminuição do crescimento tumoral em vários modelos de câncer, redução de volume do tumor e redução da densidade dos vasos sanguíneos, aumento da resposta à quimioterapia, e redução de infiltração de macrófagos com redução de metástase óssea (MALLMANN et al., 2012; MAZALOVA et al., 2018).

Nesse sentido, o desenvolvimento de tumores causa uma desregulação do ambiente fisiológico das citocinas, afetando os efeitos da imunidade celular

e inata, determinando o equilíbrio entre a imunossupressão e a estimulação imunológica o que sustenta a progressão da doença (COLOMBO et al., 2018).

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina imunossupressora anti-inflamatória produzida por vários tipos de células durante a resposta imune (MOLLAZADEH et al., 2017). A sinalização de IL-10 requer a montagem de um receptor de dois complexos constituído por duas cópias de cada um dos IL-10R1 e IL-10R2; a ligação de IL-10 ao receptor ativa o transdutor de sinal JAK e a via STAT. A IL-10 é produzida por células Th2 e monócitos (DENNIS et al., 2013). As células tumorais produzem grandes quantidades de IL-10 que contribuem à progressão tumoral; na maioria dos tipos de câncer, níveis séricos de IL-10 correlacionam-se com a gravidade da doença (FOGUER et al., 2016).

A IL-10 liberada no microambiente tumoral exerce sua função imunossupressora de diferentes maneiras: (1) induz desequilíbrio na resposta imune Th1 *versus* Th2 tumor específico; (2) medeia a diferenciação e ativação de células Tr1 (células T reguladoras tipo I) envolvidas na imunossupressão; (3) inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF α por macrófagos e células dendríticas; e (4) impede a diferenciação de células dendríticas em monócitos e sua maturação. Em particular, IL-10 regula negativamente o MHC-II (complexo principal de histocompatibilidade) em células dendríticas e as moléculas co-estimulatórias moléculas CD80 e CD86 em macrófagos (AKDIS; BLASER, 2001); portanto, as células dendríticas exibem uma apresentação de antígeno defeituosa e não conseguem ativar células T citotóxicas (COLOMBO et al., 2018). Coletivamente, esses efeitos promovem a progressão em diferentes tumores, como o carcinoma ovariano, linfoma e melanoma (LAMICHHANE et al., 2017).

Recentemente, uma função imunoestimuladora da IL-10 também foi relatada. De fato, a IL-10 também pode promover a proliferação de células T CD8+, a diferenciação celular no plasma, juntamente com o aumento da sua sobrevivência, a proliferação de células *Natural Killer* (NK) e a produção de IFN- γ por estimulação de IL-18 (EMMERICH et al., 2012). Por outro lado, o aumento nos níveis de IL-10 tem sido associado a um papel antiangiogênico em vários tipos de cânceres (LANDSKRON et al., 2014). É possível que o efeito global da IL-10 dependa do tipo de tumor específico e do microambiente

tumoral, portanto, uma terapia alvo dirigida à IL-10 deve considerar cuidadosamente o possível duplo papel, imunossupressor e imunestimulante, desta citocina (LI et al., 2016).

A IL-4 no microambiente tumoral é produzida por células tumorais, mastócitos, células Th2 ativadas, eosinófilos, basófilos e células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs) (RUIZ-LAFUENTE et al., 2018). A relação entre a progressão do tumor e a produção de IL-4 por linfócitos Th2 infiltrantes de tumores foi encontrada em carcinoma de pulmão de células não pequenas, carcinoma de células renais, câncer de próstata e outros. Além disso, a expressão aumentada do receptor de IL-4 (IL-4R) tem sido relatada em vários tecidos neoplásicos, como glioblastoma, melanoma maligno, câncer de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, câncer de mama, próstata, de ovário e de bexiga (BANKAITIS et al., 2015; UL-HAQ et al., 2016). Então, é sabido que a sinalização da IL-4 apoia a proliferação de células cancerígenas e a sobrevivência. Além disso, IL-4 contribui para suprimir a resposta imune antitumoral, agindo em diferentes níveis de adaptação e sistema imunológico adquirido (SHAMOON et al., 2018).

Em contrapartida, dados recentes mostram um papel controverso da IL-4 na imunologia do tumor, considerando sua atividade antiproliferativa, aliada ao seu efeito inibidor da angiogênese (DEHNE et al., 2014), assim como da progressão tumoral (LEE et al., 2016; ALIZADEH et al., 2018).

IL-1 α e IL-1 β são citocinas pró-inflamatórias, membros da família de interleucina 1, que induzem respostas celulares adaptativas Th1 e Th17. A IL-1 α é secretada principalmente por macrófagos, neutrófilos e células endoteliais na resposta a inflamação aguda onde colabora com o TNF- α para promover inflamação e febre. Notavelmente, tanto a IL-1 α quanto a IL-1 β são cruciais componentes do perfil secretório pró-inflamatório de células cancerígenas. A IL-1 β é predominantemente produzida por macrófagos ativados e adipócitos no microambiente tumoral, embora as células cancerígenas possam contribuir para aumentar seus níveis (MARTINON et al., 2002; SHEN et al., 2017; MANTOVANI et al., 2018). A IL-1 β tem um papel pleiotrópico e controverso no câncer. Isto é um mediador crucial da resposta imune inata, em contrapartida dados mostram seu efeito pró-tumoral na angiogênese e metástase em vários

tumores tipos incluindo câncer de mama, melanoma, carcinoma de pulmão de células não-pequenas e adenocarcinoma colorretal (ELARAJ et al., 2006).

A IL-1 funciona como uma potencializadora de mecanismos de defesa imunológicos contra malignidades e está envolvida no início e na manutenção do sistema imunológico induzindo a eliminação de células tumorais (OELMANN et al., 2015).

IL-12 é uma citocina pró-inflamatória produzida por fagócitos ativados e células dendríticas, tem um papel importante na regulação da transição da imunidade inata e adaptativa. A IL-12 age diretamente nas células *Natural Killer* (NK), *Natural killer T* (NKT) e células T CD8+ para estimular a proliferação e aumentar suas funções citotóxicas. IL-12 impulsiona a diferenciação de células T auxiliares ao longo da via Th1, promovendo a produção de citocinas, notadamente o IFN- γ , que favorece a imunidade celular. A IL-12 também atua diretamente nas células dendríticas para estimular ainda mais a produção de IL-12 e apresentação antigênica (STRAUSS et al., 2018). Neste contexto, IL-12 polariza o sistema imune em resposta à resposta antitumoral do tipo Th1, ao mesmo tempo em que bloqueia a resposta pró-tumorigênica do tipo Th2 (ECKERT et al., 2017), além disso a IL-12 inibe a neoangiogênese por indução do interferon γ (IFN γ) (CICCHELERO et al., 2017). Dados da literatura demonstraram potentes efeitos antitumorais para IL-12 por meio de uma variedade de modelos de tumores animais, estes efeitos estimularam o início de ensaios clínicos para testar a administração sistêmica de IL-12 em pacientes com câncer (LYERLY et al., 2018).

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória e imunomoduladora, membro da superfamília TNF. O TNF- α é um dos ativadores de via NF- κ B (fator nuclear kappa B), ativando assim mecanismos de morte celular (HARADA et al., 2017). O TNF- α pode ser produzido por macrófagos, linfócitos, fibroblastos, e queratinócitos e também por células tumorais, além disso, tem papel essencial na patogênese da resposta inflamatória aguda (SEDGER; McDERMOTT, 2014). O TNF é considerado uma citocina pleiotrópica que provoca necrose e apoptose das células tumorais (CHU, 2013), entretanto, TNF- α pode ser considerado um agente pró ou anti-tumorigênico (CHOPRA et al., 2013), uma vez que esta citocina induz potentes efeitos angiogênicos que estimulam crescimento tumoral e metástase (SHIN et al., 2014). Níveis séricos elevados

de TNF- α têm um mau prognóstico em câncer de ovário, renal, pancreático, próstata, mama e leucemia linfocítica crônica (COLOMBO et al., 2018).

O efeito pró-inflamatório e imunomodulador do TNF- α está na base de sua atividade pró-tumoral, observada em diferentes tipos de câncer como de ovário, de pele, de pâncreas, entre outros (BALKWILL et al., 2010). O TNF- α liberado pelas células tumorais e células do microambiente tumoral agem por meio da ligação ao seu receptor TNF-R1 e reforça ainda mais a expressão de TNF- α e a liberação de CXCL12, CCL2, IL-6, VEGF e fator inibidor de macrófagos (COLOMBO et al., 2018).

O padrão de quimiocinas expressas no local do tumor desempenha um papel vital na orientação de células que modulam a adequação do microambiente tumoral para a progressão do câncer. O ligante 2 da quimiocina (CCL2) é predominantemente produzido por vários tipos de câncer, sendo caracterizada como uma quimiocina de extrema importância na indução de angiogênese e metástase. A CCL2 derivada de tumor recruta diferentes subconjuntos de células mieloides para o microambiente inflamatório do tumor, incluindo, macrófagos associados ao tumor, que contribuem para a proliferação de células cancerosas, a evasão da resposta imune e a angiogênese (CHEN et al., 2018). Apesar de não ser bem descrito na literatura, alguns estudos afirmam que, devido à capacidade da CCL2 induzir atividade citostática contra células tumorais, esta quimiocina exerce atividade antitumoral por meio de estímulo à apoptose (ZACHARIAE et al., 1990; VAKILIAN et al., 2017).

Considerando todos os aspectos abordados no que se refere ao microambiente tumoral, pode-se inferir que o entendimento da composição do microambiente tumoral pode levar ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visam as diferentes partes do microambiente tumoral resultando na inibição do crescimento de células tumorais.

2.5 Estresse oxidativo e seu papel no câncer

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são um grupo de moléculas estáveis contendo oxigênio gerado endogenamente por meio da função celular ou por produtos químicos ou radiação. Endogenamente, o maior produtor de EROS são as mitocôndrias, por meio da cadeia de transporte de

elétrons durante a fosforilação oxidativa normal. Além disso, EROS desempenham um papel importante na indução da apoptose sob condições fisiológicas e patológicas via citocromo c. (MARZVANYAN et al., 2018).

EROS incluem radical aniônico superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila OH^{\cdot} . Essas moléculas reagem com ácidos graxos poliinsaturados nas membranas celulares, iniciando o processo de peroxidação lipídica resultando na modificação de proteínas e alterações no gradiente eletroquímico, que por sua vez ocasionam a perda de sua integridade levando a danos irreversíveis (WINIARSKA-MIECZAN, 2018).

Para combater essas espécies produzidas normalmente as células contam com sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para a manutenção da homeostasia oxidativa. O sistema enzimático conta com a ação de enzimas como a catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e ascorbato peroxidase que removem o $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , atuando como eficientes sistemas antioxidantes que protegem os componentes celulares. Dentre os antioxidantes não enzimáticos pode-se citar o ácido ascórbico, a glutathione, o tocoferol, carotenóides e melatonina, a coenzima Q, a ferritina, o ácido úrico e a bilirrubina (DA SILVA; JASIULIONIS, 2014).

O estresse oxidativo/nitrosativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes (espécies reativas de oxigênio – EROS e de nitrogênio – RNS) e a atuação dos sistemas de defesa antioxidantes (SIES; BERDNT; JONES, 2018).

Apesar de inúmeros estudos, existe uma dicotomia na função que as EROS desempenham na apoptose e progressão do câncer. Níveis aumentados de EROS induzem ativação de apoptose, que pode ser bloqueada via suplementação com antioxidantes. Em contrapartida, as células cancerígenas utilizam níveis de EROS para ativar múltiplos sinais mitogênicos, levando à ruptura de vias de sinalização da morte celular e promoção de angiogênese e transição epitelial mesenquimal, promovendo metástase tumoral através da inibição de proteínas de adesão e da degradação de barreiras teciduais e da matriz extracelular (MARZVANYAN et al., 2018).

Alguns medicamentos atuam aumentando o estresse oxidativo celular, seja diretamente pelo aumento dos níveis de EROS intracelular ou por meio da inibição do sistema enzimático antioxidante. Por exemplo, a droga antitumoral

trióxido de arsênio induz apoptose por meio de múltiplos efeitos nas células tumorais, incluindo a regulação positiva dos níveis de EROS e expressão de Bax e a regulação para baixo do NF-kB e polimerização de microtúbulos (CHEN; XIE, 2018).

2.6 Farmacoterapia do câncer

No que se refere à terapia do câncer, diversas são as abordagens disponíveis, incluindo a quimioterapia citotóxica, cirurgia, uso de radiação, terapia hormonal, imunoterapia e terapia alvo (NISARI et al., 2017).

Os quimioterápicos citotóxicos podem ser divididos em classes: os agentes alquilantes, que causam danos ao DNA, tais como mostardas nitrogenadas, ciclofosfamida e cisplatina; os produtos naturais, tais como os alcaloides da vinca (vimblastina e vincristina) e diterpenos como o taxol; e os agentes antimetabólitos, que atuam bloqueando a síntese de DNA, agindo na fase S do ciclo celular, tais como metotrexato e o 5- fluorouracil (CHEN et al., 2017).

A partir do entendimento dos eventos que transformam uma célula saudável em uma célula cancerosa foram surgindo novas terapias que são desenvolvidas para tratar um gene crítico ou uma via biológica (CALDERON et al., 2014). Os hormônios e seus antagonistas são utilizados principalmente no tratamento de alguns tipos de câncer hormoniossensíveis, o tamoxifeno, utilizado no tratamento do câncer de mama, a flutamida para o câncer de próstata, de endométrio e de tumores iodocaptantes. Esses vão agir por meio da supressão da produção de hormônios, com a finalidade de privar as células malignas dos estímulos necessários para entrar em divisão, ou por meio do bloqueio da ligação dos hormônios com seus receptores com a finalidade de diminuir a velocidade de multiplicação dos tumores (URRUTICOECHEA et al., 2010; HORNE, 2016).

Durante o final da década de 1990, a busca por novos alvos nas células cancerígenas deu lugar ao desenvolvimento dos agentes "dirigidos", principalmente sob a forma de anticorpos monoclonais (mAb), como o bevacizumabe, que liga-se fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) bloqueando a formação de novos vasos; e de inibidores das proteínas

tirosinocinases (TKI), como o imatinibe que interrompe a ativação constitutiva da proteína BCR-ABL em leucemia mielóide crônica, diminuindo a proliferação de células mielocíticas (UNNIKRISHNAN et al., 2017).

Já na imunoterapia são utilizadas as citocinas, como o interferon (IFN- α) e a interleucina-2, bem como anticorpos monoclonais que possuem atividade contra alguns tipos de câncer e são aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Ipilimumabe, pembrolizumabe e nivolumabe são anticorpos monoclonais e seus respectivos alvos são receptores em células T reguladoras. A ligação de anticorpos a estes receptores inibe a sua ativação e evita o desligamento da resposta imune (SHENG et al., 2017).

Portanto, diante do apresentado, pode-se dizer que diversas alternativas terapêuticas podem ser usadas, isoladas ou em combinação. No entanto, vários problemas com as terapias disponíveis limitam o sucesso dos tratamentos, o que inclui o desenvolvimento de resistência aos fármacos (AMIROUCHENE-ANGELOZZ et al., 2017), e a toxicidade inespecífica, de forma que as drogas não produzem citotoxicidade apenas nas células cancerosas, mas também nas células saudáveis, provocando assim efeitos colaterais sérios que podem ser um fator limitante na escolha do tratamento (CHEN et al., 2017).

A maioria dos quimioterápicos citotóxicos, a modalidade de tratamento mais utilizada no mundo inteiro, atua na síntese de DNA ou na mitose, de modo que outros tecidos no corpo são afetados, como células do folículo piloso, medula óssea e trato gastrointestinal. Como consequência, surgem efeitos como alopecia, supressão da medula óssea, constipação, diarreia, náuseas, vômitos, entre outros. Além disso, diversos quimioterápicos também podem apresentar toxicidade hepática, cardíaca, pulmonar, renal, disfunção reprodutiva, alterações metabólicas e toxicidade dermatológica. Ainda, como a maioria dos agentes antineoplásicos são mutagênicos, os efeitos colaterais a longo prazo podem incluir um risco aumentado de desenvolver outros tipos de câncer (SABAA et al., 2017).

Nesse cenário, os esforços no campo das pesquisas científicas têm sido cada vez mais direcionados para o desenvolvimento de fármacos altamente eficazes, a fim de reduzir a toxicidade e o desenvolvimento de resistência ao

tratamento, bem como diminuir a frequência de administração do fármaco (WU; ZHOU, 2015).

2.7 Estudos da toxicologia/farmacologia de drogas com potencial antitumoral

Vários modelos experimentais são utilizados para a avaliação do potencial tóxico de novas substâncias e produtos para que estes possam ser registrados e comercializados com o objetivo de determinar possíveis danos à saúde humana (ANVISA, 2013; CHAPMAN et al., 2010).

Dentre estes testes cita-se a toxicidade não clínica aguda. Este teste pode ser realizado de acordo com o *Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos*, publicado pela ANVISA em 2013. Segundo este guia, estudos para a determinação de DL₅₀ (dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) não são necessários, no entanto, podem ser utilizados métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um menor número de animais, tais como os preconizados nos guias da OECD (ANVISA, 2013).

Nesse contexto, destaca-se o guia n. 423 da OECD que estabelece o uso de três animais de um único gênero por etapa que, dependendo da taxa de sobrevivência podem ser necessários, em média, dois a quatro passos para permitir a estimativa da DL₅₀. Em adição, os resultados permitem que uma substância seja classificada de acordo com o *Sistema Globalmente Harmonizado – GHS* para a classificação de substâncias que causam toxicidade (OECD, 2001).

Os objetivos desse ensaio são (i) estimar a toxicidade intrínseca, fornecer informação sobre os órgãos alvo, e outras manifestações clínicas de toxicidade; (ii) identificar as diferenças de toxicidade entre as espécies (iii) determinar a reversibilidade da resposta tóxica, bem como proporcionar informações que irão auxiliar na seleção da dose para estudos de longo prazo (KLAASSEN, 2008).

Uma abordagem promissora que surgiu para avaliar toxicidade aguda é a exposição de embriões de peixe, tipicamente de peixe-zebra (*Danio rerio*), a

um composto teste logo após a fertilização, na fase embrionária (OECD 2013), até várias horas a dias após a eclosão (GLABERMAN; PADILLA; BARRON, 2016). Podem ser observados defeitos morfológicos, como edema e comprimento/curvatura corporal alterados, frequência cardíaca e locomoção, que são parâmetros toxicológicos comuns para testes de compostos (LANTZ-MCPEAK et al., 2015). Além dos testes de toxicidade, o modelo de peixe zebra também é utilizado em ensaios farmacológicos de alto rendimento devido à facilidade com que as substâncias teste podem ser administradas (TSANG; ANSARI; GERLAI, 2019).

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno peixe tropical pertencente à família Cyprinidae, nativo do sudeste da Ásia, que pode produzir uma grande quantidade de embriões semanalmente. Os embriões se desenvolvem rapidamente, exibindo transparência óptica durante as primeiras horas após a fertilização, permitindo a observação direta usando microscopia de luz (KIMMEL et al., 1995; HUNG et al., 2019). Outra vantagem sobre os modelos de mamíferos é a fertilização externa e desenvolvimento embrionário, que permite a aplicação de técnicas não invasivas, a fim de monitorar estágios de desenvolvimento. Além disso, as suas características biológicas, facilidade de manipulação genética, facilidade de triagem genética e semelhança com humanos são apenas algumas das características que contribuíram para a o surgimento desse modelo animal como uma ferramenta útil e valiosa para o campo da pesquisa (GIARDOGLOU; BEIS, 2019).

Considerando o potencial tóxico de muitos antineoplásicos sobre o material genético das células não tumorais os estudos de toxicidade genética tornam-se imprescindíveis. Dentre os métodos para investigação de toxicidade genética *in vivo*, o teste do micronúcleo, realizado em roedores, tem sido amplamente empregado e aceito pelas agências reguladoras e comunidade científica, como a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), em seu *Guidelines for the testing of chemicals/ section 4: Health Effects – Mammalian Erythrocytes Micronucleus Test: nº 474* e recomendado pelo *Gene - Tox Program, Environmental Protection Agency – EPA/US*". Este guia é recomendado pelos órgãos nacionais que regulamentam os estudos não clínicos de fármacos, por meio do "Guia para condução de estudos não-clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de

medicamentos” da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (OECD et al., 2001; ANVISA, 2013).

O ensaio do micronúcleo é um importante teste de avaliação da genotoxicidade. Este teste pode determinar a segurança de uma substância e classificá-la como agente mutagênico/carcinogênico, sendo a formação de micronúcleos caracterizada como evidência de genotoxicidade. Os micronúcleos são corpos contendo cromatina que representam fragmentos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados em um núcleo de célula filha no final da mitose. O objetivo do ensaio é a detecção de substâncias que podem induzir danos cromossômicos que levaram a formação de micronúcleos (TOBÓLSKA et al., 2018).

Nos estudos farmacológicos/toxicológicos *in vivo*, após exposição às drogas são avaliadas possíveis alterações na função hepática e renal. Na avaliação de danos hepáticos, os parâmetros ALT e AST podem ser indicativos da integridade dos hepatócitos. A ALT é encontrada quase exclusivamente no citoplasma dos hepatócitos. A enzima AST pode ser encontrada no citosol e dentro das mitocôndrias dos hepatócitos. Também pode ser encontrada no músculo esquelético e cardíaco, rins, pâncreas e eritrócitos. Por estas razões, estes parâmetros podem ser usados como marcadores de lesão leves (ALT) ou graves (AST) de hepatócitos, respectivamente (SOARES et al., 2012).

Em relação à função renal, a dosagem sérica de ureia pode ser usada como um indicador da função tubular renal, enquanto que dosagem de creatinina sérica pode ser usada para verificar a função glomerular (SOARES et al., 2012).

O hemograma é um importante aliado dos estudos de toxicidade, pois o sistema hematopoiético é extremamente sensível a atividades de agentes tóxicos, principalmente aqueles com potencial mutagênico ou citotóxico, resultando em alterações qualitativas ou quantitativas, transitórias ou permanentes e que podem limitar a utilização de medicamentos. Alterações hematológicas podem refletir, também, na atividade imunológica (MEDEIROS et al., 2009). As análises hematológicas são realizadas com foco nos eritrócitos (hemácias), leucócitos e trombócitos (plaquetas) (EVANS, 2009).

No contexto da pesquisa por novas substâncias com atividade antitumoral, o carcinoma ascítico de Ehrlich é um dos modelos mais utilizados

mundialmente. É um adenocarcinoma mamário murino, possui crescimento rápido com comportamento muito agressivo e tem a capacidade de se desenvolver em quase todas as espécies de camundongos (CHEN; WATKINS, 1970; SOARES et al., 2012). Este tumor tem características semelhantes aos tumores humanos e é sensível à quimioterapia (GHERMAN et al., 2012). Diferentes estudos indicaram o benefício do uso de carcinoma ascítico de Ehrlich na avaliação da atividade antitumoral, pois logo após a inoculação intraperitoneal de células tumorais de Ehrlich, o volume ascítico e o número de células aumentam drasticamente, sendo assim uma ferramenta valiosa para avaliar o efeito de vários compostos químicos (FASTAIA; DUMONT, 1976; CALIXTO-CAMPOS et al., 2013; CEYLAN et al., 2018).

O quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU), um análogo da pirimidina, agente quimioterápico classificado como antimetabólito, tem sido utilizado como droga padrão em ensaios de avaliação da atividade antitumoral de novos compostos. Esse fármaco, possui um átomo de flúor na posição C-5 da uracila no lugar do hidrogênio e o seu mecanismo de ação envolve a incorporação de fluoronucleotídeos ao RNA e DNA (CLIFFORD et al., 2018) e inibição da síntese de ácidos desoxirribonucleicos pela inibição irreversível da timidina sintetase, responsável pela conversão da uridina em timidina (SHAH et al., 2016; SCHULTZE et al., 2017). Sua atividade antitumoral também está relacionada com a regulação de moléculas, como Bax e Bcl-2, por meio da qual o 5-FU induz a apoptose de células cancerígenas (TONG et al., 2000; THANT et al., 2008; FENG et al., 2018).

2.8 Derivados acridínicos

A família das acridinas inclui uma gama de moléculas tricíclicas com várias atividades biológicas, tais como atividades anticancerígenas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antiparasitárias, antivirais e fungicidas (GENSICKA-KOWALEWSKA et al. 2017; KUKOWSKA, 2017).

As acridinas são formadas por dois anéis de benzeno fundidos a um anel de piridina no centro (BELMONT et al., 2008). Os derivados da acridina são compostos promissores para a terapia do câncer, sua atividade biológica é baseada na ligação ao DNA e inibição de enzimas topoisomerases (SILVA et

al., 2018). A intercalação induz mudanças estruturais locais no DNA, incluindo o desenrolamento da dupla hélice e o alongamento da fita do DNA, o que pode causar danos ao DNA (SONDHI et al., 2010).

Algumas acridinas entraram em ensaios clínicos e foram aprovadas para quimioterapia, destacando-se a Amsacrina, um agente anticancerígeno que apresenta atividade contra leucemias e linfomas por intercalar o DNA, inibir as topoisomerases I e II (topo I e II) e inibir a telomerase, (BARROS et al., 2012; SZAFRAN et al., 2018). No entanto, os efeitos colaterais, o desenvolvimento de resistência e a baixa biodisponibilidade, fazem com que este fármaco possua efetividade terapêutica limitada. Esses fatores encorajaram os químicos a modificar estruturalmente a acridina e produzir diferentes derivados que exibiram atividade antitumoral significativa (CICHOREK et al., 2018).

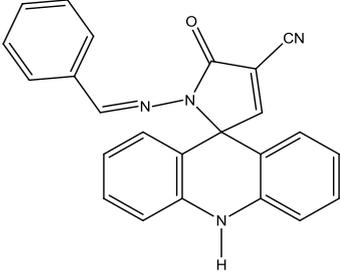
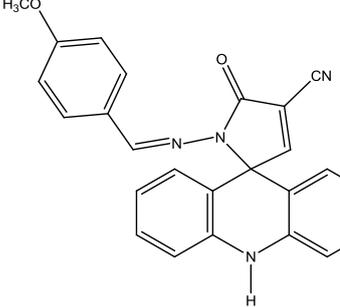
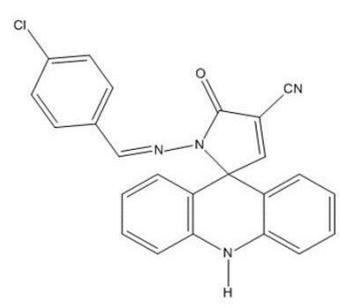
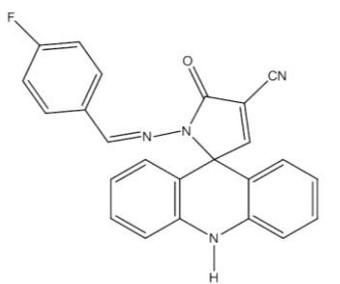
Estudos mostraram que esta atividade biológica é atribuída à planaridade destas estruturas aromáticas que podem se intercalar no DNA de cadeia dupla, interferindo nas suas funções celulares (BELMONT et al., 2007; BARROS et al., 2012).

A modificação química na estrutura dos derivados da acridina, tais como a introdução de substituintes ou anéis heterocíclicos diferentes, pode proporcionar uma melhor relação estrutura-atividade com o receptor molecular desejado, garantindo atividades biológicas distintas como bactericida, antiparasitária, antitumoral e intercaladora de DNA (KALIRAJAN et al., 2012; BARROS et al., 2012; ALMEIDA et al., 2015; GAO et al., 2015).

Novos derivados espiro-acridínicos como o (E)-1'-(benzilideneamino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'- carbonitrila (AMTAC-01), 3-(acridin-9-il)-2-ciano-N-(4-metoxi-benzilideno)-acrilohidrazida (AMTAC-02), 1-(4-clorobenzilideneamino)-5'-oxo-1,5-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'- carbonitrila (AMTAC-06) e (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'-oxo-1,5'-diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07) apresentaram capacidade inibitória sobre a topoisomerase II α semelhantes ao padrão amsacrina (mAMSA) (Tabela 1) (ALMEIDA et al., 2016; GOUVEIA et al., 2018). Dentre esses compostos o AMTAC-07 apresentou melhor inibição da topoisomerase II α comparado ao padrão m-AMSA (GOUVEIA et al., 2018). Além disso, os novos derivados acridínicos AMTAC-01 e AMTAC-02 apresentaram potente atividade antiproliferativa frente diversas linhagens de

células tumorais humanas e não apresentaram atividade inibidora de topoisomerase I, porém, ambos os derivados exibiram inibição da topoisomerase II α (ALMEIDA et al., 2016).

Tabela 1: Estruturas químicas dos derivados acridínicos AMTAC-01*, AMTAC-02**, AMTAC-06*** e AMTAC-07****.

Derivado acridínico	Estrutura química
(E)-1'-(benzilideneamino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'- carbonitrila (AMTAC-01)	
3-(acridin-9-il)-2-ciano-N-(4-metoxi-benzilideno)-acrilohidrazida (AMTAC-02)	
1-(4-clorobenzilideneamino)-5'-oxo-1,5-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4-carbonitrila (AMTAC-06)	
(E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07)	

Dados publicados recentemente por Liu e colaboradores (2014) mostram outros possíveis mecanismos de ação antitumoral para a m-AMSA. Pela primeira vez foi demonstrado que a m-AMSA diminui a invasão celular por induzir aumento de EROS, o que leva a ativação de JNK e p38, e inibição de

ERK. Estes efeitos em conjunto induzem uma diminuição na síntese e expressão de metaloproteínas em linhagens de células de leucemia humana (KLEIN et al., 2004; LIU et al., 2014).

Considerando todos os aspectos relacionados à riqueza química e potencial biológico de derivados acridínicos, a equipe de pesquisa do Laboratório de OncoFarmacologia, do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba – UFPB), iniciou o estudo de diferentes compostos dessa classe em relação a sua toxicidade e atividade antitumoral.

Dados preliminares mostram que o AMTAC-02 apresentou potente atividade antitumoral *in vivo* em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (ABRANTES, 2016; LIMA et al., 2014), assim como o N'-(2-chloro-6-methoxy-acridin-9-yl)-2-cloro-3-(4-dimethylaminophenyl)-acrilohidrazida (ACS-AZ10) que apresentou baixa toxicidade e atividade antitumoral *in vivo* que envolvia parada do ciclo celular e efeito antiangiogênico (MANGUEIRA et al., 2017).

Portanto, com a perspectiva de continuar os estudos com derivados acridínicos, e considerando a escassez de informações sobre o novo composto sintetizado AMTAC-07, o presente trabalho se propôs a contribuir com o conhecimento de potencialidades biológicas, fornecendo dados inéditos sobre efeitos antitumorais e toxicológicos dessa molécula.

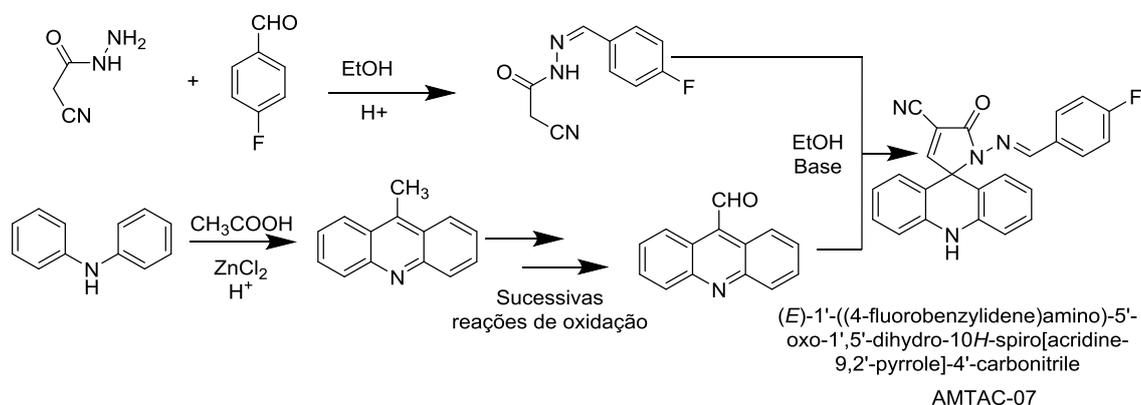
2.9 Síntese de AMTAC-07

O composto espiro-acridínico AMTAC-07, foi sintetizado no Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura, de acordo com esquema 1.

A síntese ocorre de forma paralela e convergente, onde os intermediários *N*-acilidrazônicos foram sintetizados a partir da 2-cianoacetohidrazida que foi condensada com 4-flúor-benzaldeído em meio etanólico e ácido, paralelamente foi construído o núcleo acridínico partindo da difenilamina que sofre uma reação de acilação de Friedel-Crafts, seguida de

ciclização em meio ácido conduzindo ao intermediário metilado que depois sofreu sucessivas oxidações formando o aldeído acridínico. Por fim os intermediários foram condensados em meio etanólico e básico, sofrendo uma ciclização espontânea formando o derivado espiro-acridínico AMTAC-07.

Esquema 1 – Rota sintética do derivado (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07).



Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade e o potencial antitumoral do derivado espiro-acridínico sintético (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (AMTAC-07)

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* de AMTAC-07 em linhagens de células tumorais humanas;
- Avaliar a toxicidade não-clínica aguda de AMTAC-07 em camundongos;
- Avaliar a toxicidade aguda do DE-07 em embriões/larvas de peixe-zebra;
- Avaliar a genotoxicidade de AMTAC-07 em camundongos;
- Estudar a atividade antitumoral *in vivo* de AMTAC-07 em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE) e os mecanismos envolvidos na ação antitumoral, tais como alterações no perfil do ciclo celular, efeito antiangiogênico, participação de citocinas e o seu efeito antioxidante.
- Avaliar o perfil de toxicidade de AMTAC-07 após tratamento antitumoral em modelo de CAE;

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de OncoFarmacologia (OncoFar), no biotério Prof. Thomas George, ambos do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB/Centro de Ciências da Saúde - CCS) e no Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias (LabRisco) localizado no Departamento de Biologia Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), em colaboração com o Prof. Dr. Davi Felipe Farias, todos pertencentes a Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Material

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

4.2.1 Animais e condições experimentais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, pesando entre 28 e 32 g obtidos da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/UFPB). Os animais

foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob temperatura de 21 ± 1 °C, sem uso de qualquer medicamento, tendo livre acesso à alimentação (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 xilazina (16 mg/kg – i.p.) e cetamina (100 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° 111/2017.

4.2.2 Linhagens de células tumorais

Para os ensaios de atividade antitumoral *in vitro* foram utilizadas as linhagens celulares MOLT-4 (células T de leucemia), HL-60 (leucemia promiilocítica humana) e HCT-116 (carcinoma de cólon humano) originárias de neoplasias humanas e cedidas gentilmente pelo Children's Mercy Hospital e pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (75 cm², volume de 250 mL) em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10 – 20% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (para uma concentração final de 100 U/ml penicilina e 100 µg/mL estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, tendo sido observado o crescimento celular com ajuda do microscópio de inversão a cada 24 horas. Todos os procedimentos *in vitro* foram realizados sob condições estéreis (Fluxo Laminar Veco®, Classe IIB2).

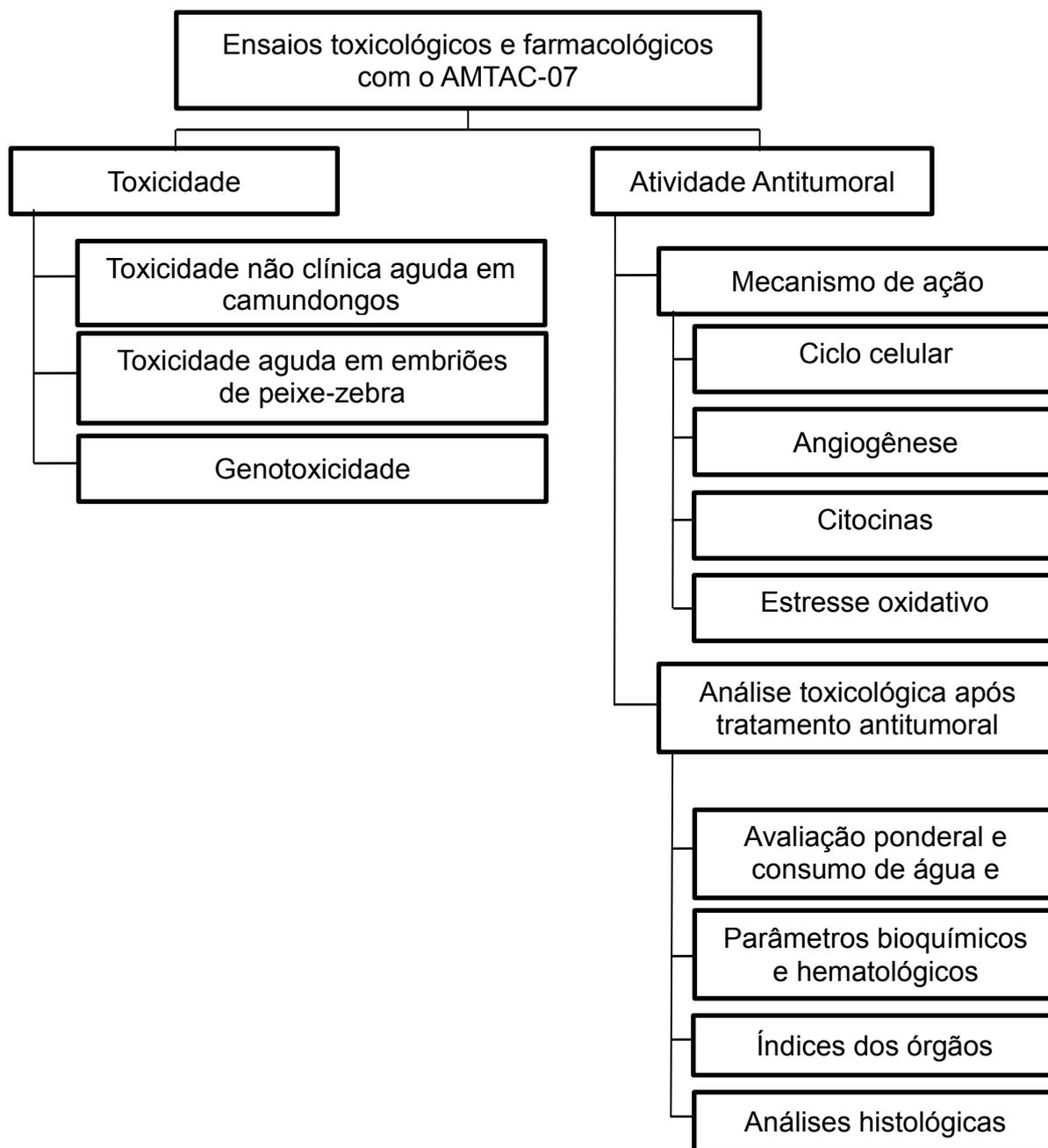
Para os ensaios de atividade antitumoral *in vivo* foi usada uma linhagem de adenocarcinoma murino (Carcinoma Ascítico de Ehrlich), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA/Unicamp). As células foram mantidas na forma ascítica na cavidade peritoneal de camundongos Swiss (*Mus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

4.2.3 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: Centrífuga (HETTICH-Zentrifugen- Rotina 380 R); Microscópio invertido (Olympus); Balança analítica (GEHAKA® AG 200); Citômetro de fluxo (FacsCanto II, BD, EUA); Câmera fotográfica (Canon OverShot A2500); Leitor de placa (Synergy HT, BioTek). Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se kits específicos para o analisador bioquímico automático BIO 2000® (BIOPLUS) e o analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter Vet* (Horiba ABX Diagnostics), respectivamente.

4.3 Métodos

Fluxograma 1. Representação esquemática dos métodos utilizados no estudo da toxicidade e atividade antitumoral de (E)-1'-((4-flúorbenzilideno)-amino)-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila (**AMTAC-07**)



4.3.1 Avaliação da atividade antitumoral *in vitro*

A avaliação da atividade antitumoral *in vitro* de AMTAC-07 frente células tumorais foi realizada por meio do método colorimétrico do MTT (MOSMANN, 1983). O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) é um corante amarelo, que é reduzido por enzimas mitocondriais e citoplasmáticas a um composto azul denominado formazan, insolúvel em solução aquosa. A redução do sal tetrazólio MTT (amarelo), principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SLATER et al., 1963) de células viáveis, permite a quantificação do produto formazan (azul), que, uma vez solubilizado, pode ser determinado espectrofotometricamente (MOSMANN, 1983; DENIZOT, LANG, 1986).

As células (MOLT-4, HL-60 e HCT-116) foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL. AMTAC-07 (dissolvido em DMSO 0,05%) foram incubados durante 72 horas juntamente com a suspensão de células com concentrações variando de 0,04 a 21,92 μM . A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo em concentrações variando de 0,007 a 9,19 μM .

Após o período de incubação (72 horas), a placa foi centrifugada (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada poço recebeu 200 μL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e a placa reincubada durante três horas, em estufa a 37°C, 5% de CO₂. Após esse período, a placa foi novamente centrifugada (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensão em 150 μL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células metabolicamente viáveis, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 550 nm.

4.3.2 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, incluindo o controle, foram submetidos a doses únicas de 2000 mg/kg de AMTAC-07 por via intraperitoneal, e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (solução a 12% de Tween 80 em salina). Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL50 (apesar de fornecer uma estimativa do seu valor), entretanto permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” – GHS.

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

4.3.3 Avaliação da toxicidade aguda em embriões de *Danio rerio*

A avaliação da embriotoxicidade aguda do AMTAC-07 foi avaliada em peixe-zebra de acordo com o teste FET, protocolo nº 236 da OECD (2013), com algumas modificações. Vinte poços de uma placa de 24 poços foram preenchidos com 2,0 mL/poço da amostra teste na concentração de µg/mL, sendo os quatro poços restantes preenchidos com o mesmo volume de meio embrionário E3 (controle interno da placa). Essa concentração foi adotada neste estudo como teste limite, pois é 10 vezes superior ao melhor resultado de Cl_{50} encontrado no teste de citotoxicidade contra linhagens de células tumorais humanas. Nessa abordagem propomos que a realização de um teste de embriotoxicidade em concentrações superiores a essa estaria muito distante de um cenário realístico de aplicação clínica do AMTAC 07. Foram preparadas outras duas placas com as soluções controle, uma contendo apenas meio E3 (controle negativo) e a outra DMSO 0,5% (controle do solvente). Em cada poço

das três placas foi adicionado um embrião com até 3 horas pós-fertilização (hpf). Diariamente e até 96 horas após a exposição à substância teste, foram verificados os seguintes pontos de letalidade: (i) coagulação do ovo; (ii) ausência de formação dos somitos; (iii) não deslocamento da base da cauda; e (iv) ausência de batimentos cardíacos. Na presença de qualquer um desses pontos de letalidade o embrião/larva foi considerado morto. O número de mortos foi utilizado para cálculo da mortalidade de embriões/larvas expostas ao teste e aos controles. A exposição foi realizada em condição estática (i.e. sem renovação da substância teste ou de meio E3). As observações foram feitas utilizando um estereomicroscópio (Televal 31, Zeiss[®]), num aumento de 50x, e fotografadas. Ao final do experimento, as larvas sobreviventes foram rapidamente congeladas e conduzidas para incineração.

4.3.4 Avaliação da genotoxicidade

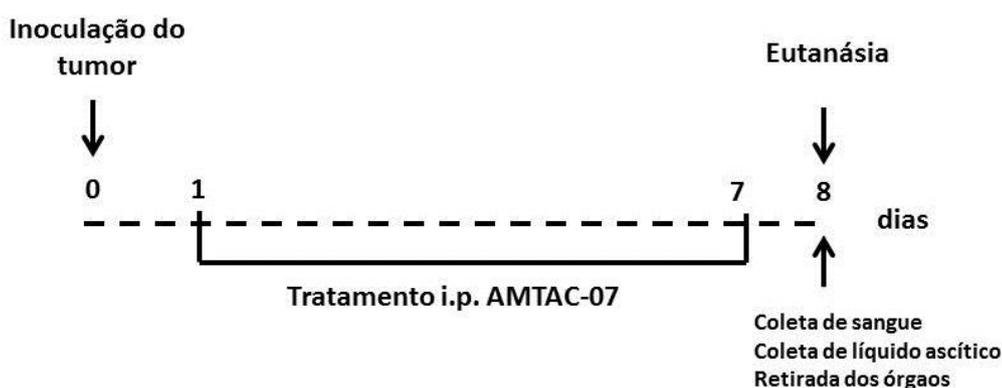
A genotoxicidade de AMTAC-07 foi avaliada por meio do ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos. Para realização deste ensaio, camundongos fêmeas (n=6/grupo) foram tratados com dose única de 2000 mg/kg (i.p.) do composto em estudo. Um grupo controle positivo (ciclofosfamida - 50 mg/kg – 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 (Newprov[®]) para posterior análise em microscópio óptico. Para cada animal, três extensões sanguíneas foram preparadas e um mínimo de 2000 eritrócitos contados para determinação do número de eritrócitos micronucleados (OECD, 1997).

4.3.5 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, AMTAC-07 foi solubilizado em Tween 80 (12%) e administrado diariamente por via intraperitoneal (i.p.), nas doses de 12,5; 25 ou 50 mg/kg, por sete dias (MELO, 2014 adaptado). O grupo controle foi tratado com uma solução de 12% de Tween 80 e um quinto grupo de animais foi tratado com 5-Fluorouracil (5-FU), 25 mg/kg, como droga padrão (Figura 4).

Figura 4: Delineamento experimental para avaliação do potencial antitumoral de AMTAC-07 em Células de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE) transplantadas em camundongos Swiss fêmeas tratadas por sete dias consecutivos, via intraperitoneal.



4.3.6 Volume do tumor, viabilidade e total celular

Para a avaliação do efeito antitumoral de AMTAC-07, 24 horas após a última administração do tratamento descrito no item 4.3.5, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical. O líquido ascítico foi coletado da cavidade peritoneal e o volume foi medido e expresso em mL. Uma alíquota foi retirada para a determinação da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão do azul de tripan. Volumes semelhantes de

líquido ascítico e de uma solução de 0,4% do corante foram incubados e em seguida foi realizada a análise das células em câmara de Neubauer.

O ensaio de azul de tripan avalia a habilidade de células viáveis, com membrana plasmática intacta, excluírem o corante azul de tripan, permitindo assim, a quantificação dessas células (RENZI; VALTOLINA; FORSTER, 1993).

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

A quantidade total de células viáveis no peritônio dos animais foi expressa como total celular (1×10^7 células), que foi obtido como o produto do volume do tumor, expresso em mL, pela viabilidade celular, expressa como a quantidade de células $\times 10^6$ /mL.

4.3.7 Investigação do mecanismo de ação antitumoral *in vivo*

Considera-se que, em geral, se a DL_{50} da substância de ensaio é três vezes maior do que a dose mínima eficaz, a substância é considerada como um bom candidato para estudos posteriores (UWAKWE; MONAGO, 2012; AMELO; NAGPAL; MAKONNEN, 2014). Sendo assim, foi escolhida a dose de 50 mg/kg para investigação dos mecanismos de ação antitumoral.

Para todos os experimentos de investigação do mecanismo de ação antitumoral os animais transplantados com células de CAE foram tratados por sete dias com AMTAC-07 conforme descrito no item 4.3.5. Um dia após a última administração, os animais dos grupos controle, AMTAC-07 (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.) e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical.

4.3.7.1 Análise do ciclo celular

A concentração de células foi ajustada a fim de se obter uma concentração final de 1×10^6 células/mL. As células coletadas da cavidade peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos foram ressuspensas em solução de HBSS (Solução Balanceada de Hank's) e

centrifugadas a 230 g, por sete minutos, o sobrenadante foi então desprezado. Foram adicionados 500 µL da solução fluorocrômica de ciclo celular contendo RNase (0,5 mg/mL), Triton-X (0,25%) e iodeto de propídio (PI) (0,25 mg/mL) e então incubadas por 90 minutos. Em seguida, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FacsCanto II, BD, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Os dados foram obtidos com o programa *Flowing Software* 2.5.1 e tratados no programa *GraphPad Prism* 5.0 (POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004; MANGUEIRA et. al., 2017). Foi determinado o percentual de células nas fases do ciclo celular (G0/G1, S, G2/M), considerando o aumento da marcação com o marcador de DNA, iodeto de propídio.

4.3.7.2 Avaliação do efeito antiangiogênico

Os animais transplantados com células de CAE foram tratados por sete dias com AMTAC-07 conforme descrito no item 4.3.5. O peritônio foi cortado e o revestimento interior da cavidade peritoneal dos animais de todos os grupos foi examinado e fotografado para investigação da microdensidade vascular peritumoral, com o auxílio de um programa computacional (AVSOFT®). A microdensidade dos vasos foi determinada pela área ocupada por vasos sanguíneos dividido pela área total selecionada (AGRAWAL et al., 2011).

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

Para a quantificação de citocinas, os animais foram divididos em grupos (n=8/grupo) para implante das células de CAE, e tratados conforme descrito no item 4.3.5. 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-1β, anti-IL-4, anti-IL-10, anti-IL-12, anti-CCL2 e anti- TNF-α,

solubilizados em tampão fosfato, e incubadas *overnight* a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de soro fetal bovino), por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e foram adicionadas tanto as amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações das citocinas recombinantes IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-12, CCL2 e TNF- α 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 biotinizado foi adicionado às placas que foram incubadas por uma hora. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e então foi adicionado o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP). As placas foram incubadas por mais meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1N e a leitura realizada em leitor de placa a 450 nm. A quantidade de citocinas foi calculada a partir das curvas-padrão.

4.3.7.4 Avaliação da atividade antioxidante

A produção de espécies reativas de oxigênio foi avaliada utilizando o fluoróforo 2',7'-diacetato diclorofluoresceína (DCFH-DA), que penetra nas células vivas e é clivado por esterases intracelulares e oxidado por diferentes espécies reativas de oxigênio, sendo convertido em DCF (2',7'-diclorofluoresceína), o qual é uma molécula altamente fluorescente. Portanto, o número de células que emitirão fluorescência, detectadas por citometria de fluxo, é diretamente proporcional aos níveis de estresse oxidativo.

Os animais transplantados com células de CAE foram tratados por sete dias com AMTAC-07 conforme descrito no item 4.3.5. O líquido peritoneal foi lavado com PBS e centrifugado a 1000 r.p.m., 4 °C, durante 5 minutos. Após este processo, as células de CAE foram coletadas (2×10^6 cél/mL), marcadas com DCFH-DA (concentração final 10 μ M) e incubadas em estufa de CO₂, no escuro, durante 30 minutos, a 37°C. Uma alíquota dessas amostras foi incubada com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) utilizado como o controle positivo

na concentração final de 400 μM , para garantir que diante da presença de EROS o DCF está sendo reduzido e o experimento reproduzindo. Após o período de incubação, os tubos foram colocados em gelo triturado para suspender a reação de marcação do DCF (HASUI et al., 1989 adaptado).

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FacsCanto II (BD, EUA) em 530 nm de fluorescência e 485 nm de comprimento de excitação. A quantificação do *burst* ou espécies reativas de oxigênio (EROS) foi estimada pela intensidade média de fluorescência.

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

4.4.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos pelo tratamento com AMTAC-07, os animais dos grupos controle, AMTAC-07 (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg), descritos no item 4.3.5, foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados os consumos de água e de ração.

4.4.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

Os animais transplantados com CAE foram tratados por sete dias com AMTAC-07 conforme descrito no item 4.3.5. No dia seguinte após a última administração, após jejum de quatro horas, os animais dos grupos controle, AMTAC-07 (50 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg) foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg i.m.) e cloridrato de xilazina (16 mg/kg i.p.), e amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada.

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

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se *kits* específicos para o analisador hematológico celular automático Hematoclin 2.8 Vet (Bioclin) e BIO2000 (bioplus), 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).

4.4.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Após a coleta de sangue descrita no item 4.4.2, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e os órgãos (timo, baço, fígado, rins e coração) foram removidos e pesados para o cálculo dos seus índices. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

4.4.4 Análises histológicas

Após a pesagem dos órgãos, descrita no item 4.4.3, fígado e rins dos animais dos grupos controle, AMTAC-07 (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 xilol, 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. Em seguida foram examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As análises histológicas foram realizadas com a colaboração da Prof. Dr. Adriano Francisco Alves do Departamento de Morfologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.5 Análise estatística

Os resultados do antitumoral *in vitro* foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. A concentração inibitória capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI₅₀) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism Software versão 5.0.

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. Para o ensaio de DCF foi utilizado Teste *t*. Os dados obtidos foram expressos como média ± e.p.m (erro padrão da média), sendo os valores considerados significativos, quando apresentassem um nível de significância (p) menor que 0,05. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism Software versão 5.0.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade antitumoral *in vitro*

Na tabela 2 podem-se observar os valores de CI_{50} obtidos nas diferentes linhagens celulares tumorais após tratamento de 72 horas com AMTAC-07. Observa-se que AMTAC-07 foi citotóxico nas linhagens MOLT-4 (células T de leucemia), HL-60 (leucemia promioclítica humana) e HCT-116 (carcinoma de cólon humano).

Tabela 2. Valores de CI_{50}^* do AMTAC-07** em linhagens de células tumorais humanas.

Linhagem de célula tumoral	$CI_{50}^*(\mu M)$
HL-60	4,95
MOLT-4	9,34
HCT-116	8,80

Fonte: BATISTA, 2019.

Dados foram obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata e apresentados em valores de CI_{50} obtidos por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%.

* CI_{50} (Concentração que produz 50 % de inibição no crescimento celular)

**AMTAC-07: (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila

5.2 Avaliação da toxicidade não clínica aguda

No ensaio de toxicidade não clínica aguda foi observado que AMTAC-07 não provocou mortes na dose de 2000 mg/kg (i.p.). De acordo com o guia n. 423/2001 da OECD, após a realização do primeiro ensaio com a dose de 2000 mg/kg, e havendo morte de apenas um ou nenhum animal, realiza-se outro ensaio com a mesma dose. Repetiu-se o ensaio com a mesma dose e o mesmo número de animais, e, novamente, observou-se que não houve

nenhuma morte (Tabela 3). O valor de DL50 foi estimado, segundo o guia OECD 423, em torno de 5000 mg/kg e AMTAC-07 foi classificado na categoria 5 da *Globally Harmonized Classification System* (GHS).

Não se observou nenhuma alteração no comportamento dos animais nas primeiras quatro horas e nem durante os 14 dias de observação.

Tabela 3. Efeitos da administração de doses únicas (2000 mg/kg, i.p.) de AMTAC-07* em camundongos.

Grupo		Morte/Tratado	Efeitos comportamentais
Controle		0/3	Nenhum
2000 mg/kg	Experimento 1	0/3	Nenhum
	Experimento 2	0/3	Nenhum

Fonte: BATISTA, 2019.

*AMTAC-07: (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila

5.3 Avaliação da toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra

Como observado na tabela 4, o AMTAC-07 (88 µM) causou a morte de 8 embriões/larva de peixe-zebra, o que correspondeu a uma taxa de mortalidade de 40%. A maioria das mortes (8) foi observada após 24 h de exposição. O ponto de letalidade observado foi: coagulação do ovo (8 após 24 h). Os embriões de peixe-zebra expostos somente aos controles (meio E3 e DMSO 0,5%) não apresentaram, durante as 96 h de observação, nenhuma alteração morfológica e de desenvolvimento.

Tabela 4. Número de embriões e larvas de embriões mortos e taxa de mortalidade de larvas de peixe-zebra após exposição ao **AMTAC-07*** por 96 h.

Grupo	Número de mortos [†] /Número total de embriões				Mortalidade (%)
	24 h	48 h	72 h	96 h	
Controle meio E3	0/20	0/20	0/20	0/20	0
AMTAC-07 (88 µM)	8/20	0/20	0/20	0/20	40
Controle DMSO (0,5%)	0/20	0/20	0/20	0/20	0

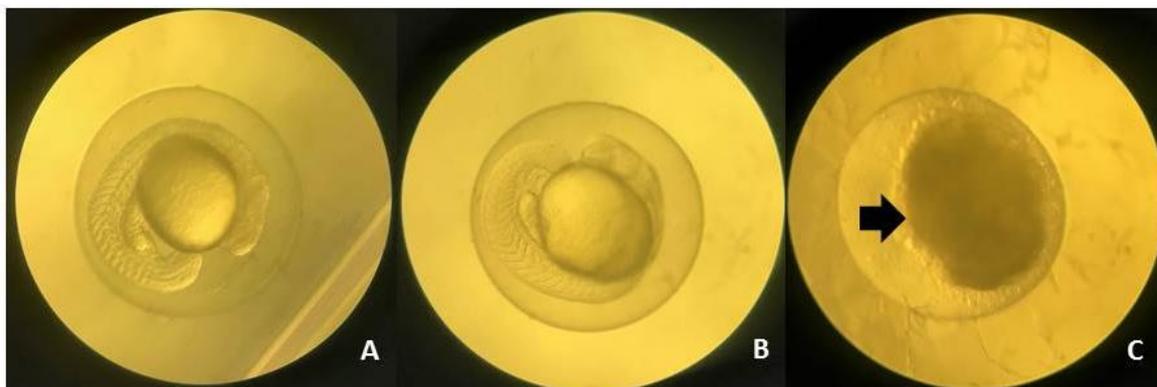
Fonte: BATISTA, 2019.

*AMTAC-07: (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila

[†]O embrião/larva foi considerado morto a partir da verificação dos seguintes pontos de letalidade: (i) coagulação do ovo; (ii) ausência de formação do somito; (iii) não deslocamento da base da cauda; e (iv) falta de batimentos cardíacos, de acordo com as recomendações do teste FET nº 236 (OECD, 2013).

Na Figura 5, são mostrados os pontos de letalidade observados em embriões e larvas de peixe-zebra tratados com o AMTAC-07 em comparação com aqueles expostos somente aos controles meio E3 e DMSO 0,5%. Dado o exposto, é possível afirmar que a CL₅₀ para 96 h de exposição de embriões/larvas de peixe-zebra ao AMTAC-07 é maior que 88 µM.

Figura 5. Embriões e larvas de peixe-zebra expostos ao AMTAC-07, na concentração de 88 μM , ou aos controles meio E3 e DMSO (dimetilsulfóxido) a 0,5% durante 96 h.



Fonte: BATISTA, 2019.

LEGENDA: Imagens representativas dos embriões de peixe-zebra após exposição ao AMTAC-07 ou DMSO 0,5%. Após 24 horas de exposição (A–C): **(A)** meio E3; **(B)** DMSO a 0,5% em meio E3; **(C)** concentração de 88 μM de AMTAC0-07.

5.4 Avaliação da genotoxicidade

Para avaliar o possível efeito genotóxico *in vivo* de AMTAC-07 foi realizado o ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos, cujo resultado está apresentado na Tabela 5.

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

O tratamento dos animais com a dose de 2000 mg/kg de AMTAC-07 não induziu aumento no número de eritrócitos micronucleados ($4,50 \pm 0,42$) em sangue periférico, quando comparado ao grupo controle ($6,00 \pm 0,57$).

Tabela 5. Efeito da administração de dose única de AMTAC-07 (2000 mg/kg, i.p.) e ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p.) no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos após 48 horas do tratamento.

Grupos	Dose (mg/kg)	Número de eritrócitos micronucleados
Controle	-	6,00 ± 0,57
Ciclofosfamida	50	18,40 ± 0,52 ^a
AMTAC-07	2000	4,50 ± 0,42

Fonte: BATISTA, 2019

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (12% Tween 80) analisado por ANOVA seguido de Dunnett e Tukey.

*AMTAC-07: (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila

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

5.5.1 Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade e total celular

Foi observado redução significativa no volume tumoral do grupo tratado com a dose de 25 mg/kg de AMTAC-07 ($6,10 \pm 0,40$ mL; $p < 0,05$) e 50 mg/kg de AMTAC-07 ($2,40 \pm 0,60$ mL; $p < 0,05$) e quando comparado ao grupo controle ($8,90 \pm 0,50$ mL). Já na dose de 12,5 mg/kg, AMTAC-07 não induziu alteração neste parâmetro (Gráfico 1A).

Após tratamento de sete dias com AMTAC-07 em animais transplantados com tumor ascítico de Ehrlich foi observada significativa redução na massa tumoral dos animais tratados com as doses de 12,5 mg/kg ($6,20 \pm 0,60$ g; $p < 0,05$), 25 mg/kg ($5,30 \pm 0,60$ g; $p < 0,05$) e 50 mg/kg ($2,30 \pm 0,50$ g; $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle ($9,31 \pm 0,40$ g) (Gráfico 1B).

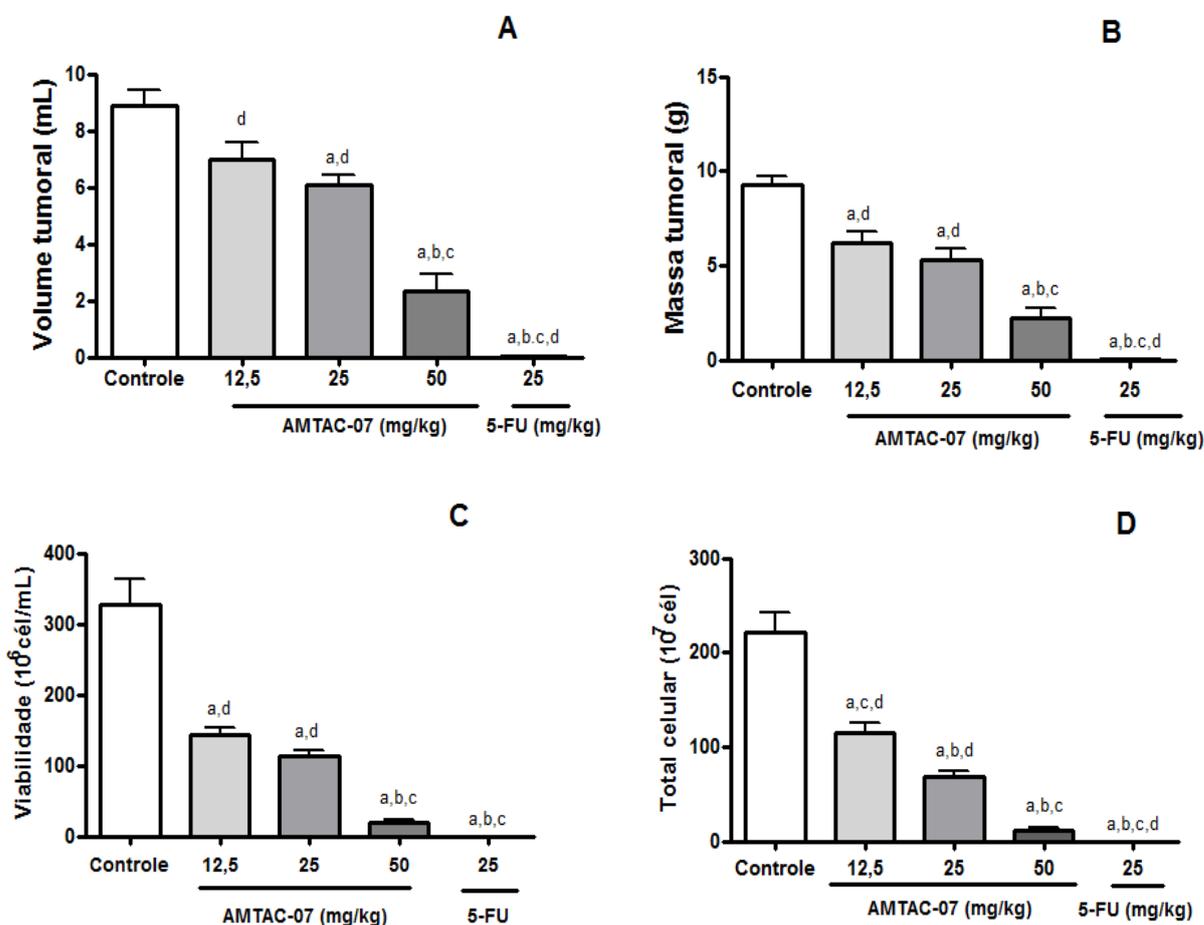
Em relação à viabilidade celular, observou-se que AMTAC-07 induziu redução significativa nas doses de 12,5 mg/kg ($143,70 \pm 9,30 \times 10^6$ células/mL; $p < 0,05$), 25 mg/kg ($113,30 \pm 7,70 \times 10^6$ células/mL; $p < 0,05$) e 50 mg/kg ($19,54$

$\pm 4,70 \times 10^6$ células/mL; $p < 0,05$), e quando comparados ao grupo controle ($370,3 \pm 33,40 \times 10^6$ células/mL) (Gráfico 1C).

Para o parâmetro total celular, pode-se observar que AMTAC-07 induziu redução significativa nas doses 12,5 mg/kg ($114,50 \pm 10,71 \times 10^7$ células; $p < 0,05$), 25 mg/kg ($68,20 \pm 9,30 \times 10^7$ células; $p < 0,05$) e 50 mg/kg ($11,90 \pm 2,60 \times 10^7$ células; $p < 0,05$) em comparação ao grupo controle ($221,12 \pm 20,5 \times 10^7$ células) (Gráfico 1D).

Os animais tratados com 5-FU apresentaram redução significativa em todos os parâmetros avaliados (massa tumoral $0,01 \pm 0,02$ g; volume tumoral: $0,01 \pm 0,03$ mL; viabilidade celular: $0,01 \pm 0,04 \times 10^6$ células/mL; total celular: $0,01 \pm 0,02 \times 10^7$ células) (Gráfico 1).

Gráfico 1. Efeito do tratamento com AMTAC-07* e 5-FU** em camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.



Fonte: BATISTA, 2019

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

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de oito animais analisado por ANOVA seguido de Dunnet e Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com AMTAC-07 (12,5 mg/kg); ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com AMTAC-07 (25 mg/kg); ^d $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com AMTAC-07 (50 mg/kg);

*AMTAC-07: (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila

** 5-FU – 5-fluorouracila

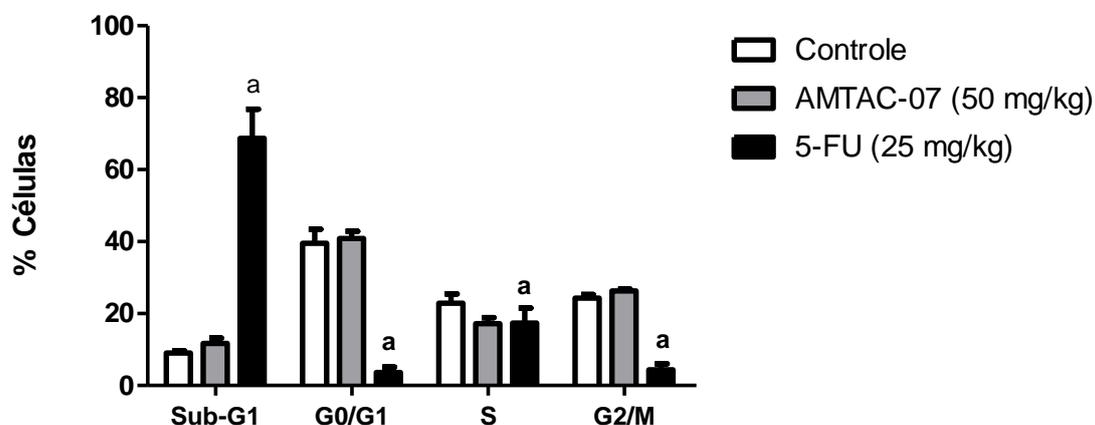
5.5.2 Investigação do mecanismo de ação antitumoral

5.5.2.1 Análise do ciclo celular

O tratamento de sete dias com AMTAC-07 não induziu alterações significativas na distribuição das células tumorais nas diferentes fases do ciclo celular quando comparado ao grupo controle (Gráfico 2).

O tratamento com a droga padrão 5-FU induziu aumento significativo do pico sub-G1 (68,7% ± 8,0; $p < 0,05$), ao passo que reduziu a porcentagem de células nas fases G0/G1 (2,3% ± 0,7, $p < 0,05$), S (25,9% ± 7,1, $p < 0,05$) e G2/M (2,8% ± 0,5 $p < 0,001$), em comparação com seus respectivos controles (9% ± 0,6; 39,5% ± 3,8; 22,8% ± 2,6 e 24,3% ± 0,9, respectivamente).

Gráfico 2. Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07 (50 mg/kg, i.p.) e 5-FU (25 mg/kg) na distribuição de células de carcinoma ascítico de Ehrlich nas diferentes fases do ciclo celular.



Fonte: BATISTA, 2019

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de oito animais analisado por ANOVA seguido de Dunnet e Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle;

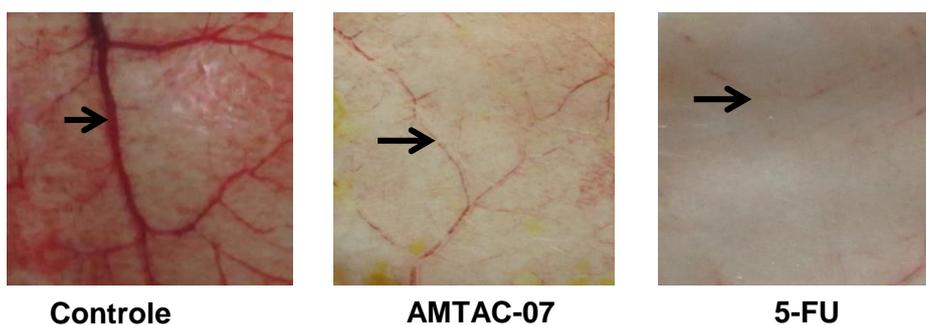
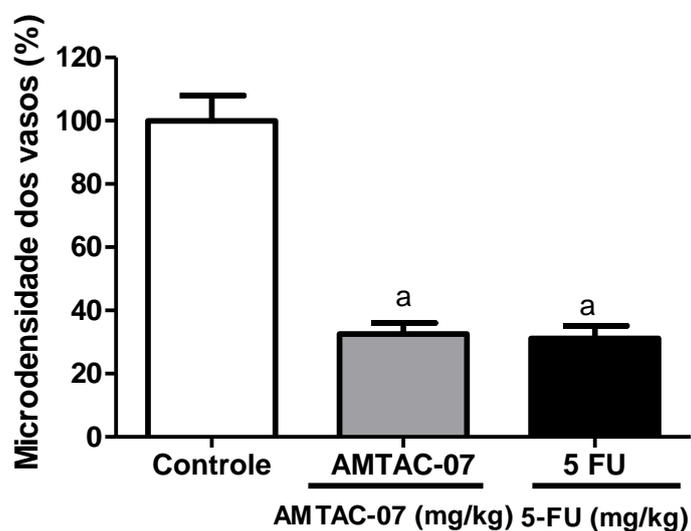
*AMTAC-07: (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila;

** 5-FU – 5-fluorouracila

5.5.2.2 Investigação do efeito antiangiogênico

Pode-se observar uma redução significativa na microdensidade dos vasos no grupo tratado com AMTAC-07 ($32,5 \pm 1,4\%$; $p < 0,05$), assim como no grupo tratado com a droga padrão 5-FU ($31,0 \pm 1,6\%$; $p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle ($100,0 \pm 3,2\%$) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Efeito do tratamento com AMTAC-07* (50 mg/kg) e 5-FU** (25 mg/kg) na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.



Fonte: BATISTA, 2019

LEGENDA: **A:** Microdensidade dos vasos. Determinado pela área ocupada por vasos sanguíneos divididos pela área total selecionada. **B:** Imagens representativas de membrana peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos. Seta: vasos sanguíneos. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Dunnet e Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

*AMTAC-07: 1-(4-fluorobenzilideneamino)-5'-oxo-1,5-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2-pirrol]-4-carbonitrila;

** 5-FU – 5-fluorouracila

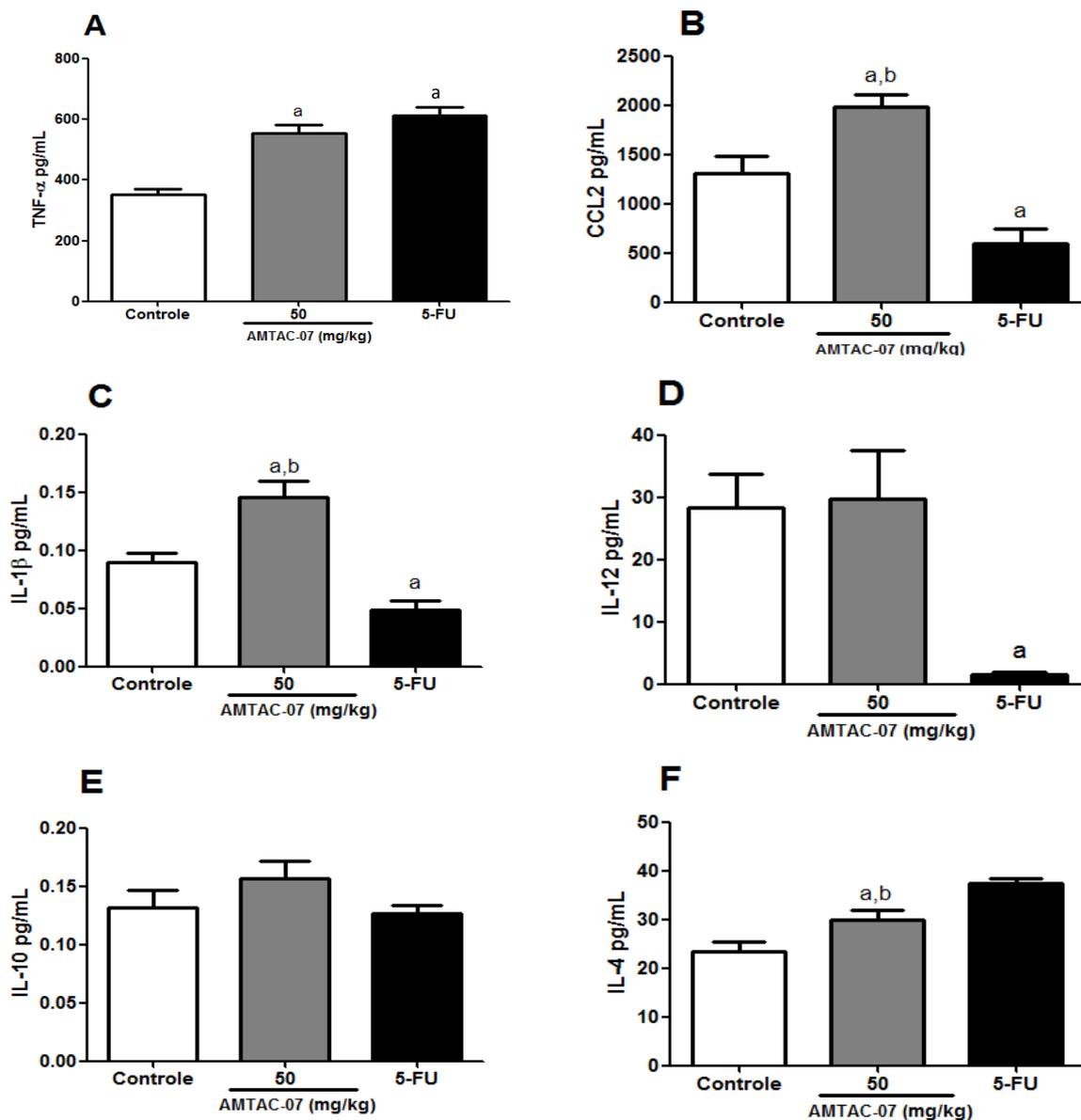
5.5.2.3 Quantificação das citocinas IL-1, IL-4, IL-10, IL, 12, TNF- α e CCL-2

AMTAC-07 (50 mg/kg) não induziu alteração nos níveis das citocinas IL-10, IL-12 no lavado peritoneal dos animais experimentais, quando comparados aos seus respectivos controles.

Pode-se observar que AMTAC-07 induziu um aumento de TNF- α ($556,0 \pm 26,12$ pg/mL; $p < 0,05$), CCL-2 ($1986,0 \pm 121,0$ pg/mL; $p < 0,05$), IL-1 β ($0,2 \pm 0,01$ pg/mL; $p < 0,05$), IL-4 ($29,23 \pm 1,9$ pg/mL; $p < 0,05$) quando comparado aos seus respectivos controles TNF- α ($351,40 \pm 18,32$ pg/mL; $p < 0,05$), CCL-2 ($1313,0 \pm 173,70$ pg/mL; $p < 0,05$), IL-1 β ($0,1 \pm 0,01$ pg/mL; $p < 0,05$), IL-4 ($23,36 \pm 2,1$ pg/mL; $p < 0,05$) (Gráfico 4).

Nos animais tratados com o 5-FU foi detectada diminuição de CCL-2 ($590,0 \pm 155,2$ pg/mL; $p < 0,05$), IL-12 ($1,6 \pm 0,4$ pg/mL; $p < 0,05$) e aumento de IL-4 ($37,5 \pm 0,8$ pg/mL; $p < 0,05$) em comparação com os respectivos controles (CCL-2 $1313,0 \pm 173,70$ pg/mL; IL-12 $28,39 \pm 5,40$ pg/mL; IL-4: $23,36 \pm 2,1$ pg/mL) (Gráfico 4). O 5-FU não induziu alterações significativas nos níveis de TNF- α , IL-1, IL-10 quando comparados aos seus respectivos controles.

Gráfico 4. Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07* (50 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg) na concentração de citocinas no lavado peritoneal de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.



Fonte: BATISTA, 2019

LEGENDA: A: TNF- α , B: CCL-2, C: IL-1; D: IL-12, E: IL-10, F: IL-4. Dados analisados ANOVA seguido de Dunnet e Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo 5-FU.

*AMTAC-07: (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila;

** 5-FU – 5-fluorouracila

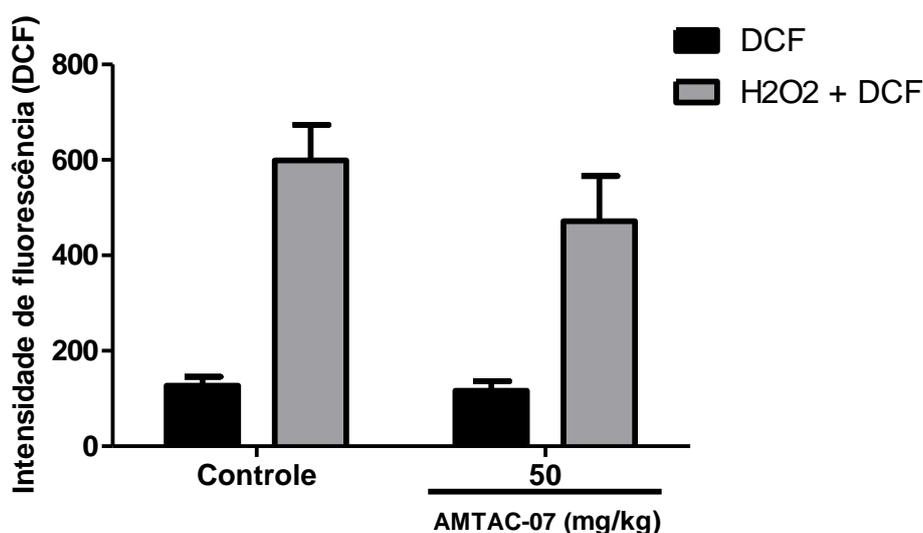
5.5.2.4 Ensaio do DCFH

O gráfico 5 representa o efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07 (50 mg/kg, i.p.) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em modelo de tumor ascítico de Ehrlich utilizando-se o ensaio do DCFH (2',7'-diclorodihidrofluoresceína).

O DCFH é um metabólito não fluorescente, por sua vez, quando em contato com EROS, transforma-se em diclorofluoresceína (DCF), que é altamente fluorescente. Logo, quanto maior a fluorescência emitida, maior a presença de compostos oxidantes (KUNST et al., 2014).

O tratamento com AMTAC-07 não alterou a produção de EROS em relação ao grupo controle.

Gráfico 5. Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07 (50 mg/kg, i.p.) na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em modelo de tumor de Ehrlich.



Fonte: BATISTA, 2019

LEGENDA: Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisado por teste de Mann Whitney.

*AMTAC-07: (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila;

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

5.5.3.1 Avaliação ponderal e consumo de água e ração

Na tabela 6 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração, bem como a evolução ponderal dos animais. De acordo com os resultados obtidos, não foram observadas alterações significativas do consumo de água e ração por parte dos animais tratados com AMTAC-07 (50 mg/kg).

Em relação ao peso corporal, ao serem avaliados os animais após a retirada/ drenagem do volume de tumor ascítico residual, foi observado que, nem 5-FU nem AMTAC-07 alteraram este parâmetro.

Tabela 6. Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07* (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.

Grupo	Dose (mg/kg)	Consumo de ração (g)	Consumo de água (mL)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	-	30,5 ± 2,1	32,6 ± 3,4	32,6 ± 0,8	29,0 ± 0,8
5-FU	25	26,0 ± 2,4	36,8 ± 2,3	30,6 ± 0,6	27,5 ± 1,7
AMTAC-07	50	28,3 ± 2,6	35,3 ± 1,7	30,8 ± 0,6	28,5 ± 0,3

Fonte: BATISTA, 2019

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

*AMTAC-07: (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila;

** 5-FU – 5-fluorouracila

5.5.3.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

A investigação dos efeitos toxicológicos de AMTAC-07 (50 mg/kg) por meio das análises bioquímicas revelou uma diminuição significativa na

atividade enzimática de AST ($72,8 \pm 0,7$ U/L; $p < 0,05$) e ALT ($25,3 \pm 1,2$ U/L; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($166,7 \pm 14,5$ U/L) (Tabela 7).

Não se observou diferença nos parâmetros ureia e creatinina após tratamento com AMTAC-07 (50 mg/kg).

Tabela 7. Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07* (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.

Grupo	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 tumor	-	$166,7 \pm 14,5$	$158,2 \pm 13,9$	$41,8 \pm 7,2$	$0,9 \pm 0,1$
5- FU	25	$152,6 \pm 14,0$	$168,6 \pm 15,4$	$35,6 \pm 5,1$	$0,8 \pm 0,1$
AMTAC-07	50	$72,8 \pm 0,7^{a,b}$	$25,3 \pm 1,2^{a,b}$	$70,8 \pm 16,5$	$1,5 \pm 0,2$

Fonte: BATISTA, 2019.

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média

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

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

*AMTAC-07: (E)-1'-((4-flúorbenzilideno)-amino)-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila

** 5-FU – 5-fluorouracila

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

No que diz respeito à avaliação dos parâmetros hematológicos e hematimétricos foi observado que AMTAC-07 induziu um aumento significativo dos glóbulos vermelhos ($10,1 \pm 0,6 \cdot 10^6/\text{mm}^3$; $p < 0,05$), e do hematócrito ($59,5 \pm 4\%$; $p < 0,05$) em relação aos respectivos grupos controles ($5,4 \pm 0,6 \cdot 10^6/\text{mm}^3$; $29,3 \pm 2,0\%$) (Tabela 9).

Pode-se observar uma redução do HCM no grupo tratado com AMTAC-7 ($13,8 \pm 0,5$ pg; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($22,7 \pm 1,0$ pg), assim como uma redução significativa de CHCM ($23,4 \pm 0,8$ g/dL; $p < 0,05$), quando comparado com o controle ($29,1 \pm 0,2$ g/dL).

No que se refere a contagem diferencial de leucócitos não foram observadas alterações significativas no grupo tratado com AMTAC-07 em relação ao grupo controle.

Em relação ao hemograma e leucograma é possível observar que 5-FU induziu redução de leucócitos totais ($3,6 \pm 0,3 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; $p < 0,05$), dos segmentados ($9,4 \pm 0,9\%$), dos monócitos ($1,0 \pm 0,3\%$; $p < 0,05$) quando comparado aos seus respectivos controle ($14,32 \pm 1,7 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; $19,4 \pm 2,1\%$; $5,5 \pm 0,6\%$) (Tabela 8).

Tabela 8. Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07* (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)	AMTAC-07 (50 mg/kg)
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	9,0 – 11,5	5,4 ± 0,6	5,8 ± 0,6	10,1 ± 0,6 ^a
Hemoglobina (g/dL)	14,5 – 17,5	11,8 ± 0,9	12,6 ± 0,4	13,8 ± 0,7
Hematócrito (%)	45,0 – 57,0	29,3 ± 2,0	36,6 ± 4,0	59,5 ± 4,0 ^{a,b}
VCM (fm^3)	45,0 – 55,0	56,6 ± 3,6	63,7 ± 2,5	59,3 ± 0,8
HCM (pg)	13,0 – 16,0	22,7 ± 1,0	22,0 ± 0,4	13,8 ± 0,5 ^{a,b}
CHCM (g/dL)	29,0 – 34,0	29,1 ± 0,2	39,1 ± 2,5	23,4 ± 0,8 ^a
Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	1,0 – 12,0	14,3 ± 1,7	3,6 ± 0,3 ^a	21,9 ± 3,5 ^b
Linfócitos (%)	60 – 90	73,0 ± 2,3	88,0 ± 1,1 ^a	64,0 ± 5,4 ^b
Segmentados (%)	10 – 40	19,4 ± 2,1	9,4 ± 0,9 ^a	31,6 ± 5,6 ^b
Monócitos (%)	0 – 6	5,5 ± 0,6	1,0 ± 0,3 ^a	3,6 ± 0,4 ^b
Eosinófilos (%)	0 – 5	2,0 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,2

Fonte: BATISTA, 2019

Dados apresentados como média ± desvio padrão.

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

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

*AMTAC-07: (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila;

** 5-FU – 5-fluorouracila

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

5.4.3.3 Avaliação do índice dos órgãos

O tratamento com AMTAC-07 não induziu alterações significativas nos índices de coração, baço, timo, fígado e rins (Tabela 9).

Tabela 9. Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07* (50 mg/kg, i.p.) e 5-FU** (25 mg/kg, i.p.) nos órgãos de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de coração (mg/g)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)
Controle	-	3,3 ± 0,2	2,4 ± 0,4	4,4 ± 0,6	54,0 ± 1,4	9,4 ± 0,3
5-FU	25	4,3 ± 0,3	2,3 ± 0,2	4,0 ± 0,1	63,9 ± 1,3	11,2 ± 0,4
AMTAC-07	50	2,8 ± 0,2	2,0 ± 0,2	4,3 ± 0,6	54,7 ± 3,7	9,0 ± 0,3

Fonte: BATISTA, 2019.

Dados apresentados como média ± desvio padrão.

*AMTAC-07: (E)-1'-((4-flúorbenzilideno)-amino)-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila;

** 5-FU – 5-fluorouracila

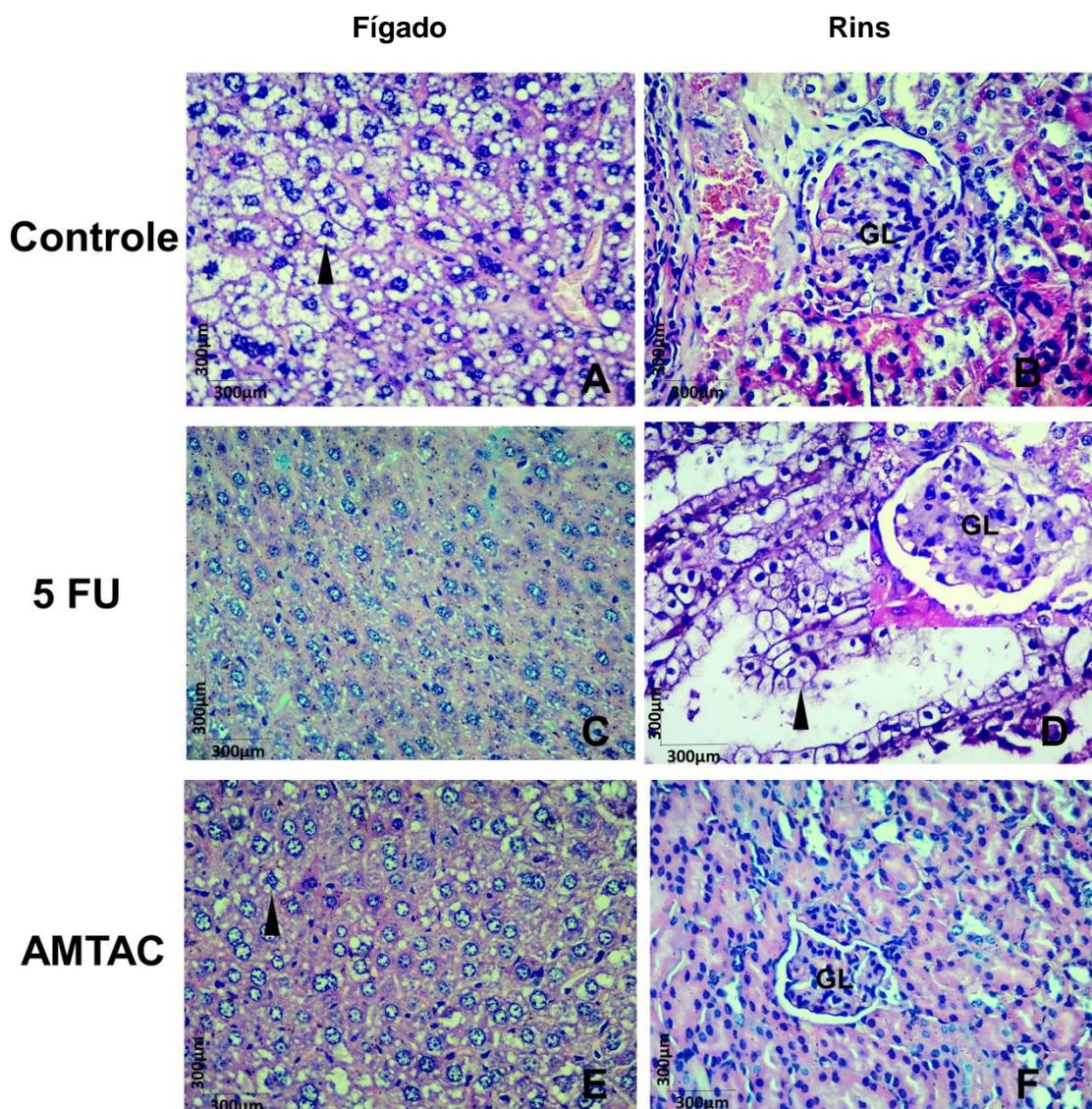
5.4.3.4 Análises histológicas

Os cortes histológicos do fígado e dos rins dos grupos controle transplantado, ou tratados com 5-FU (25 mg/kg) ou AMTAC-07 (50 mg/kg) apresentaram-se dentro dos limites de normalidade histológica.

No parênquima hepático dos animais controle foi observada intensa e difusa esteatose hepática, como mostrada na cabeça da seta negra (Figura 6A). Nos animais tratados com AMTAC-07 também foi observado essa mesma lesão, no entanto, de forma discreta e focal, como mostrada na cabeça da seta negra (Figura 6E). Já nos animais tratados com o 5-FU não foi achada essa lesão no parênquima hepático desses animais (Figura 6C). Em relação ao rins, foi observado alteração apenas nos animais tratados com o 5-FU (Figura 6D), onde observa-se intenso e multifocal processo degenerativo tubular (seta

negra) com lesão glomerular (GL). Nas demais condições experimentais, os animais mantem a integridade glomerular e túbulo-intersticial.

Figura 6. Efeito do tratamento de sete dias com AMTAC-07 (50 mg/kg, i.p.) e 5-FU (25 mg/kg, i.p.) na histologia dos fígados e rins de camundongos transplantados com carcinoma ascítico de Ehrlich.



Fonte: BATISTA, 2019.

LEGENDA: Controle, 5-FU 25 mg/kg e AMTAC-07. **(A)** Controle transplantado, fígado **(B)** Controle transplantado, rins **(C)** Grupo 5-FU, fígado. **(D)** Grupo 5-FU, rins. **(E)** Grupo AMTAC-07, fígado. **(F)** Grupo AMTAC-07, rins. **A, B, C, D e E** – HE, A.T. x400.

*AMTAC-07: (E)-1'-{(4-flúorbenzilideno)-amino}-5'oxo-1,5'diidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'carbonitrila;

** 5-FU – 5-fluorouracila

Díscussão

6 DISCUSSÃO

Iniciou-se o estudo com o AMTAC-07 investigando sua atividade antitumoral *in vitro* frente linhagens de células tumorais humanas, utilizando a metodologia do MTT (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazólio) (VAN MEERLOO et al., 2011).

AMTAC-07 apresentou atividade antitumoral *in vitro* nas linhagens células T de leucemia (MOLT-4), leucemia promielocítica humana (HL-60) e carcinoma de cólon humano (HCT-116). Resultado semelhante foi encontrado por Serafim, 2014 com os derivados espiro-acridínicos AMTAC-01, que inibiu a viabilidade de células HL-60, adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) e adenocarcinoma de cólon (HT-29); e AMTAC-02, que inibiu a proliferação de células HL-60 e HT-29 utilizando o método do MTT. Ainda, Almeida et al. (2016) utilizando o método de sulforrodamina B (SRB) mostraram que AMTAC-01 e AMTAC-02 apresentam atividade antiproliferativa contra células tumorais UACC-62 (melanoma) e PC-3 (próstata), respectivamente.

Então, considerando que os dados *in vitro* para o AMTAC-07 mostraram-se promissores, e ainda que, segundo Gouveia et al. (2018), a substituição *para* no anel aromático da molécula aumentou sua atividade inibitória da topoisomerase II α , foi dado continuidade aos estudos com este composto.

Os agentes quimioterápicos disponíveis na clínica apresentam significativa toxicidade e levam ao aparecimento de diversos efeitos colaterais (NISARI et al., 2017). Essas limitações associadas aos agentes existentes aumentam a necessidade de desenvolver drogas anticâncer mais eficazes e menos tóxicas para melhorar o arsenal terapêutico disponível (DE MELO et al., 2018). Sendo assim, torna-se imprescindível a realização de ensaios toxicológicos na busca por novos fármacos.

O estudo toxicológico com o AMTAC-07 foi iniciado pelo teste de toxicidade aguda não clínica em camundongos. Além da letalidade, outros parâmetros devem ser considerados e investigados em estudos de toxicidade aguda, como a identificação de sinais de toxicidade ou potenciais órgãos alvo (MELLO-ANDRADE et al., 2018), após administração de dose única. Ainda, os testes de toxicidade aguda podem proporcionar informações que irão auxiliar na seleção da dose para estudos farmacológicos (TROMBETA et al., 2014).

Considerando que o AMTAC-02 apresentou DL50 em torno de 5000 mg/kg em camundongos por via intraperitoneal (ABRANTES, 2016) iniciou-se os testes com o AMTAC-07 na dose de 2000 mg/kg.

Com base nos resultados obtidos, a DL50 do AMTAC-07 foi estimada em torno de 5000 mg/kg, sendo classificado na categoria 5 – GHS. Além da estimativa da DL₅₀ foi realizada uma avaliação comportamental, analisando a ocorrência de alterações no sistema nervoso central e sistema nervoso autônomo, no entanto, não houve nenhuma alteração comportamental. Uma vez que a DL50 foi estimada em torno de 5000 mg/kg, AMTAC-07 pode ser considerado uma substância de baixa toxicidade aguda (DE MELO et al., 2018).

Considera-se que, em geral, se a DL50 da substância de ensaio é três vezes maior do que a dose mínima eficaz, a substância é considerada como um bom candidato para estudos posteriores (UWAKWE; MONAGO, 2012; AMELO; NAGPAL; MAKONNEN, 2014).

Esses dados corroboram os resultados encontrados por Manguiera et al. (2017) para o derivado espiro-acridínico ACS-AZ10 que também apresentou baixa toxicidade, uma vez que a DL₅₀ foi estimada em um valor acima de 2000 mg/kg. Por outro lado, dados da literatura mostram que alguns derivados de acridina têm alta toxicidade aguda (PAN et al., 2007).

Diferenças na DL₅₀ em espécies distintas podem fornecer indícios para variações na absorção, metabolismo e mecanismos de toxicidade de uma substância (ADAMSON, 2016).

Sendo assim, realizou-se o teste de toxicidade em embriões de peixe (teste FET) utilizando o modelo de peixe-zebra (*Danio rerio*) de acordo com o guia nº 236 da OECD (2013) que se destina a determinar a toxicidade aguda ou letal de produtos químicos em estágios embrionários dessa espécie (OECD, 2013).

Considerando que a CL₅₀ para 96 h de exposição de embriões/larvas de peixe-zebra ao AMTAC-07 é maior que 88 µM pode-se inferir que AMTAC-07 apresenta baixa toxicidade no modelo avaliado, uma vez que o valor da CL₅₀ é 10x maior que o valor da CL₅₀ em células tumorais. Dessa forma, o AMTAC-07 mostrou-se ser seletivamente mais tóxico às células tumorais do que aos embriões de peixe-zebra. O uso do peixe-zebra para avaliação de toxicidade

de fármacos é muito útil, pois os resultados obtidos nesse organismo modelo podem ser muitas vezes ser extrapolados com segurança para outros vertebrados (FALCÃO et al., 2018).

No que diz respeito ao estudo de novas drogas, as autoridades reguladoras de produtos farmacêuticos exigem uma avaliação extensiva do seu potencial genotóxico. Além disso, o uso de drogas antineoplásicas podem causar efeitos colaterais que incluem indução de genotoxicidade em células não tumorais, sendo o acúmulo destes danos associados ao desenvolvimento de uma segunda neoplasia consequência do tratamento inicial (DE MELO et al., 2018).

Dessa forma, com a finalidade de se investigar o potencial genotóxico *in vivo* de AMTAC-07 foi realizado o ensaio do micronúcleo em sangue periférico de camundongos.

Considerando que o tratamento com o AMTAC-07 não provocou aumento significativo no número de eritrócitos micronucleados em sangue periférico dos animais tratados, pode-se inferir que este composto não possui efeito genotóxico no sistema eritroide. O resultado corrobora o dado encontrado para o composto ACS-AZ10, que não apresentou potencial genotóxico em sangue periférico de camundongos. No entanto, o AMTAC-02 provocou aumento significativo no número de eritrócitos micronucleados no mesmo modelo experimental (ABRANTES, 2016). Esse resultado sugere que a substituição *para* no anel aromático da molécula AMTAC-07 reduziu sua toxicidade quando comparada ao AMTAC-02. Mesmo sendo um potente agente antitumoral, a amsacrina também se demonstrou potencialmente mutagênica e genotóxica para células saudáveis (DENNY, 2002).

A melhor atividade e menor toxicidade de AMTAC-07 também podem ser justificadas pelo Diagrama de Craig (1971) o qual é utilizado no planejamento de séries e estudos de relação estrutura-atividade. Este Diagrama apresenta descritores estruturais de hidrofobicidade (π) e efeitos eletrônicos (σ) nos compostos com para-substituição aromática. AMTAC-07 possui efeitos hidrofóbico e eletrônico positivo (GOUVEIA et al., 2018), enquanto o AMTAC-02 não possui efeito hidrofóbico e o efeito eletrônico é negativo.

Sabendo-se que o AMTAC-07 apresentou atividade antitumoral *in vitro*, baixa toxicidade aguda em camundongos e não apresentou potencial genotóxico, o passo seguinte foi avaliar a atividade antitumoral *in vivo* no modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

Diferentes estudos indicaram o benefício do uso de carcinoma ascítico de Ehrlich na avaliação da atividade antitumoral, pois logo após a inoculação intraperitoneal de células tumorais de Ehrlich, o volume ascítico e o número de células aumentam drasticamente, sendo assim uma ferramenta valiosa para avaliar o efeito de vários compostos químicos (FASTAIA; DUMONT, 1976; CALIXTO-CAMPOS et al., 2013; CEYLAN et al., 2018).

A droga antitumoral padrão utilizada foi o 5-fluorouracil (5-FU), que, nesse estudo, induziu potente atividade antitumoral reduzindo todos os parâmetros avaliados (volume e massa tumoral, e viabilidade e total celular), o que justifica a escolha deste fármaco como droga padrão em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

O tratamento com AMTAC-07 reduziu a massa tumoral, a viabilidade celular e o total celular nas três doses avaliadas, no entanto, a dose de 50 mg/kg teve uma redução dos parâmetros viabilidade celular e total celular semelhantes ao 5-FU. Sendo assim, a dose de 50 mg/kg foi selecionada para a investigação do mecanismo de ação antitumoral e da toxicidade de AMTAC-07.

O ciclo celular é um fenômeno importante para o crescimento e proliferação celular (KHWAJA et al., 2018). A indução da parada do ciclo celular em células cancerígenas por meio de vários mecanismos é uma estratégia para controlar a proliferação destas células. Nesse contexto, derivados acridínicos como a tetrahydroacridina possuem como parte de seu mecanismo de ação antitumoral a indução de parada do ciclo celular na fase G0/G1 (SZYMAŃSKI et al., 2018). Os derivados nitroacridínicos também apresentaram atividade antineoplásica via indução de parada do ciclo celular na fase G0/G1 e indução de apoptose em células de câncer de mama humano (ZHOU et al., 2018). Já o derivado espiroacridínico ACS-AZ10 induziu a parada do ciclo celular na fase G2/M e redução na porcentagem de células nas fases G0/G1 e S em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich (MANGUEIRA et al., 2017).

O tratamento com o AMTAC-07 não induziu alteração na distribuição das células tumorais nas fases do ciclo celular indicando que a interferência com o ciclo celular não é parte do mecanismo responsável por sua ação antitumoral *in vivo*. Resultados semelhantes foram encontrados para o novo derivado acridina-retrotuftsina que possui atividade antitumoral *in vitro* em diferentes linhagens celulares, no entanto, não induz parada do ciclo celular em nenhuma das fases (CICHOREK et al., 2018).

Além do ciclo celular, outros mecanismos podem estar envolvidos no efeito antitumoral de drogas citotóxicas, dentre estes, pode-se citar a atividade antiangiogênica.

Os vasos sanguíneos tumorais são um alvo importante para o tratamento do câncer, acreditando-se ser a inibição da angiogênese uma das estratégias mais promissoras para deter o crescimento tumoral e a metástase (BALTRUNAITE et al., 2017). Isto levou ao desenvolvimento de agentes farmacológicos com ação antiangiogênica para romper o suprimento vascular e diminuir o suprimento de nutrientes e oxigênio para o tumor, principalmente por meio do bloqueio da sinalização VEGF/VEGFR. (RAMJIWAN et al., 2017). Nesse estudo, AMTAC-07 reduziu a microdensidade dos vasos peritumorais, desta forma, pode-se inferir que seus efeitos antitumorais envolvem, pelo menos parcialmente, uma ação antiangiogênica. Esses dados corroboram o resultado encontrado por Manguieira e colaboradores (2017) para o derivado espiroacridínico ACS-AZ10 que também induziu uma diminuição da microdensidade dos vasos peritumorais no mesmo modelo experimental.

O tratamento antiangiogênico pode levar a uma normalização da vasculatura do tumor, reduzindo a permeabilidade vascular e a pressão do fluido intersticial, e melhorando o fluxo sanguíneo e a perfusão do tumor. Além disso, a perfusão anormal do tumor também reduz a difusão de quimioterápicos e eficiência da radioterapia (ALLARD; LARRIVÉE, 2017). Então, a vasculatura tumoral normalizada pode reduzir a hipóxia tecidual, aumentar a liberação de agentes citotóxicos e de oxigênio, mas também a imunidade antitumoral (HUANG et al. 2013; JAIN et al., 2013).

Estudos não-clínicos e clínicos apoiaram a hipótese de que a terapia antiangiogênica pode normalizar a vasculatura do tumor, pelo menos transitoriamente. Além disso, a normalização vascular foi associada à melhora

da sobrevida em pacientes com câncer de cérebro, mama, colorretal e pulmão tratados agentes citotóxicos (RAMJAWAN et al., 2017). Os fármacos antiangiogênicos são utilizados em combinação com terapia citotóxica, O ramucirumabe um anticorpo monoclonal totalmente humanizado direcionado ao VEGFR-2 foi aprovado pela FDA como agente único ou em combinação com agente quimioterápico contendo fluoropirimidina ou platina para o tratamento de pacientes com câncer gástrico avançado ou metastático (BAI et al., 2018).

O microambiente tumoral serve como um ponto de convergência para uma população heterogênea de células do sistema imune, resultando em interações tumor – células - estroma. Nesse contexto, diversas citocinas regulam vários aspectos do crescimento do tumor, incluindo a modulação da angiogênese (MITTAL et al., 2014).

A IL-4 é uma citocina com efeitos duais no câncer, sendo seu efeito antitumoral caracterizado especialmente por sua ação antiangiogênica e inibição do crescimento tumoral (DEHNE et al., 2014). Considerando o aumento de IL-4 promovido por AMTAC-07 em modelo de tumor de Ehrlich, pode-se sugerir que este efeito está associado à ação antiangiogênica desse composto.

TNF- α é um componente essencial da defesa do hospedeiro (NETEA et al., 2010). Além disso, TNF- α também apresenta atividade antiangiogênica e o efeito citotóxico dessa citocina ao induzir necrose tumoral ocasionada pela destruição dos vasos sanguíneos associados ao tumor de sarcoma SA1 (HAVELL et al., 1988). IL-1 β está envolvida na eliminação de diferentes tipos de células tumorais(OELMANN et al., 2015). Dados da literatura relatam também a atividade antiangiogênica da IL-1 β ao mostrar sua atuação de inibição de crescimento endotelial *in vitro* e *in vivo* por indução da diminuição da expressão dos sítios de ligação do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) de alta afinidade no endotélio (COZZOLINO et al., 1990). Já a quimiocina CCL-2 por estimular a apoptose de células tumorais exerce atividade antitumoral (VAKILIAN et al., 2017).

Considerando que AMTAC-07 induziu o aumento de IL-1 β , TNF- α e CCL-2 pode-se inferir que este composto modula a resposta inflamatória por meio da liberação destes mediadores, o que pode explicar em parte o seu efeito antitumoral. A partir das premissas apresentadas pode-se inferir que o

efeito antiangiogênico de AMTAC-07 pode estar relacionado ao aumento de IL-4, TNF- α e IL-1 β .

Dados relacionados à imunomodulação induzida por compostos acridínicos são escassos na literatura. Todavia, estudos recentes mostram que o derivado acridínico quinacrina modula a ação do TNF- α , sensibilizando células tumorais de adenocarcinoma de pulmão (A549) à ação desta citocina (HARADA et al., 2017).

O estresse oxidativo é um importante fator de risco na patogênese de inúmeras doenças crônicas. Especificamente no câncer, o aumento de espécies reativas de oxigênio pode participar de todas as etapas da carcinogênese, desde a fase de iniciação até a progressão da doença, estimulando a transformação celular bem como a manutenção do tumor (ABED et al., 2018). Por outro lado, o estresse oxidativo induzido por drogas é citotóxico para células tumorais, o que está envolvido com o mecanismo de ação de alguns antineoplásicos conhecidos, como por exemplo, a doxorrubicina (KHAN et al., 2018).

Nesse estudo foi analisado a produção de EROs pelo AMTAC-07 utilizando o método do DCFH-DA, no entanto, AMTAC-07 não induziu alterações significativas nesse parâmetro, inferindo que a modulação do estresse oxidativo não está envolvida no mecanismo de ação antitumoral deste composto. Em contrapartida, dados da literatura mostram que a m-AMSA diminui a invasão celular por induzir aumento de EROs, o que leva a ativação de JNK e p38, e inibição de ERK. Estes efeitos em conjunto induzem uma diminuição na síntese e expressão de metaloproteinases em linhagens de células de leucemia humana, desta forma diminuindo a progressão tumoral (KLEIN et al., 2004; LIU et al., 2014). Ainda, estudos anteriores que avaliaram a produção EROs *in vitro* pelo método do DCFH-DA mostraram que o derivado acridínico quinacrina induz o aumento de geração de EROs, que estaria sendo responsável pela indução de apoptose em células de linfoma histiocítico difuso (U937) (CHANGCHIEN et al., 2015; DAS et al., 2017; HUANG et al. 2017).

Após a investigação dos possíveis mecanismos de ação de AMTAC-07 prosseguiu-se os estudos com a avaliação de sua toxicidade. Drogas anticâncer exibem uma série de desvantagens, incluindo efeitos colaterais indesejáveis como toxicidade para tecidos saudáveis (EL-FAR et al., 2018).

Sendo assim, a avaliação da toxicidade de AMTAC-07 torna-se imprescindível. Foi realizada a avaliação toxicológica de AMTAC-07 no experimento de avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de tumor de Ehrlich, após o tratamento de sete dias.

Os primeiros parâmetros analisados foram o consumo de água, de ração e a evolução ponderal, sendo estes parâmetros utilizados para fornecer indícios de toxicidade sistêmica. O AMTAC-07 não induziu alterações nesses parâmetros, sugerindo que este composto possui baixa toxicidade sistêmica, o que se contrapõe aos efeitos de vários antineoplásicos utilizados na clínica que provocam toxicidade em células do trato gastrointestinal e, como consequência, induz perda de peso corporal (CUSTODIA-SANTOS et al., 2018). Resultados semelhantes foram encontrados para o ACS-AZ10 que não induziu alterações nesses parâmetros (MANGUEIRA et al., 2017).

O tratamento com AMTAC-07 induziu uma diminuição significativa nos níveis séricos de AST e ALT quando comparados ao grupo controle levando esses valores à normalidade (GAD, 2007). Esses resultados diferem dos encontrados para ACS-AZ que induziu aumento significativo nos níveis de ALT (MANGUEIRA et al., 2017) e dos relatos de hepatotoxicidade para derivados acridínicos (PAN et al., 2007). Os dados encontrados para o AMTAC-07 corroboram os dados da análise histopatológica que não apresentou alterações significativas no fígado dos animais tratados com AMTAC-07.

Em relação à função renal, a dosagem sérica de ureia pode ser usada como um indicador da função tubular renal, enquanto que dosagem de creatinina sérica pode ser usada para verificar a função glomerular (SOARES et al., 2012). Considerando que não houve alteração nos níveis desses parâmetros após tratamento com o AMTAC-07 pode-se inferir que as funções glomerular e tubular dos animais tratados não foram alteradas, resultado este que foi confirmado pela ausência de quaisquer alterações na avaliação histológica dos rins. Estes dados confirmam os dados reportados na literatura para a m-AMSA (MICETICH et al., 1982) e para o ACS-AZ10 (MANGUEIRA et al., 2017), os quais não induziram modificações nos níveis séricos de ureia e creatinina. Esses dados possuem uma grande importância clínica, uma vez que muitos antineoplásicos, como por exemplo, a cisplatina podem ser altamente nefrotóxicos (FUKASAWA et al., 2014).

A análise do índice dos órgãos dos camundongos implantados com o tumor submetidos ao tratamento com AMTAC-07 não evidenciou alterações significativas nesse parâmetro. Também não foram evidenciadas alterações significativas na histopatologia do fígado e rins desses animais, demonstrando uma baixa toxicidade em nível tecidual.

Os animais controle implantados com o tumor apresentaram número de hemácias, níveis de hemoglobina e hematócrito abaixo dos níveis considerados como parâmetros normais para a espécie (GAD, 2007), parâmetros estes que são alterados pela própria presença o tumor (FERNANDES et al., 2015). As enzimas séricas têm sido estudadas tanto como possíveis indicadores de neoplasia e contribuem para progressão e regressão da doença. Em certas circunstâncias elas podem ser cancerígenas e podem causar hepatotoxicidade (KATHIRIYA et al., 2010). Níveis séricos de ALT são observados em animais com tumor ascítico de Ehrlich, ou seja, uma reação hepática sistêmica pela presença do tumor (MELO et al., 2012). Desta forma, justificando o valor aumentado de ALT para o grupo controle transplantado.

Diferentemente da maioria dos agentes antineoplásicos AMTAC-07 não provocou alterações na maioria dos parâmetros hematológicos dos animais tratados. Os animais tratados com o AMTAC-07 apresentaram um aumento de glóbulos vermelhos seguido de um aumento de hematócrito, no entanto esses valores estão dentro dos valores de normalidade para esta espécie.

O AMTAC-07 induziu uma diminuição de HCM (quantidade de hemoglobina em termos de peso que cada um dos eritrócitos carrega) e CHCM (média, em porcentagem, de quanto o eritrócito está preenchido pela hemoglobina) em relação ao grupo controle, entretanto os valores de HCM permaneceram dentro dos parâmetros normais, assim, não havendo significância clínica. Uma vez que não houve redução da hemoglobina, a diminuição de HCM e CHCM não tem significância clínica.

Em relação ao leucograma, os dados sugerem que AMTAC-07 não induz imunossupressão, considerando que os valores de leucócitos totais não alteraram. Dessa maneira, esses dados corroboram dados da literatura para o ACS-AZ10 que não mostrou alterações no número de leucócitos totais (MANGUEIRA et al., 2017).

A maioria dos antineoplásicos apresentam mielotoxicidade ou mielossupressão (NETTERBERG et al., 2017). Esses efeitos colaterais são freqüentemente muito graves, dificultando a administração programada dos medicamentos, limitando a dose e o tempo de tratamento (WONG et al., 2017).

AMTAC-07 não apresentou toxicidade hematológica após tratamento de sete dias em modelo de tumor de Ehrlich, resultado que difere da maioria dos antineoplásicos.

Considerando todos os dados apresentados, é possível inferir que AMTAC-07 possui baixa toxicidade e significativa atividade antitumoral via mecanismos antiangiogênicos e imunomoduladores. Esses resultados despertam o interesse para realização de testes não-clínicos adicionais na perspectiva de contribuir com o estudo de novos candidatos a fármacos antitumorais da classe dos derivados acridínicos.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os estudos realizados com AMTAC-07 pode-se concluir que:

- AMTAC-07 apresentou atividade antitumoral *in vitro* nas linhagens MOLT-4 (células T de leucemia), HL-60 (leucemia promioclítica humana) e HCT-116 (carcinoma de cólon humano);
- AMTAC-07 apresentou baixa toxicidade aguda, quando administrado por via intraperitoneal em camundongos;
- AMTAC-07 apresentou baixa genotoxicidade *in vivo*;
- AMTAC-07 apresentou atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich, que está associada a ação antiangiogênica e imunomoduladora;
- AMTAC-07 apresentou baixa toxicidade renal e hematológica.

Referências

REFERÊNCIAS

ABRANTES, R. A. Toxicidade de um novo derivado acridínico com potencial antitumoral. 40 fls. Monografia. UFPB. João Pessoa-PB. 2016.

ADAMI, E. R. et al. Antineoplastic effect of pectic polysaccharides from green sweet pepper (*Capsicum annuum*) on mammary tumor cells *in vivo* and *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, p. 280-292, 2018.

ADAMSON, R. H. The acute lethal dose 50 (LD₅₀) of caffeine in albino rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 274-276, 2016.

AGRAWAL, S. S. et al. Cytotoxic and antitumor effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. **Life Sciences**, v. 89, n. 5-6, p. 147-158, 2011.

AKDIS, C. A.; BLASER, Kurt. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. **Immunology**, v. 103, n. 2, p. 131-136, 2001.

AL-ABD, A. M. et al. Anti-angiogenic agents for the treatment of solid tumors: potential pathways, therapy and current strategies—a review. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 6, p. 591-605, 2017.

ALLARD, C.; LARRIVÉE, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. **Angiogenesis**, v. 20, n. 4, p. 409-426, 2017.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ALMEIDA, S. M. et al. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International journal of biological macromolecules**, v. 92, p. 467-475, 2016.

ALMEIDA, S. M. V.; LAFAYETTE, E. A.; SILVA, L. P. B. G.; AMORIM, C. A. C.; OLIVEIRA, T. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E. C.; MOURA, R. O.; BELTRÃO, E. I. C.; LIMA, M. C. A.; Júnior; L. B. C. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. **Int. Journal of Molecular Sciences** 16, 13023-13042, 2015.

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.

AMIROUCHENE-ANGELOZZI, N.; SWANTON, C.; BARDELLI, A.. Tumor evolution as a therapeutic target. **Cancer Discovery**, v. 7, n. 8, p. 805-817, 2017.

AMIROUCHENE-ANGELOZZI, N.; SWANTON, C.; BARDELLI, A. Tumor evolution as a therapeutic target. **Cancer Discovery**, v. 7, n. 8, p. 805-817, 2017.

ANVISA. **Guia para condução de estudos não-clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília: Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, 2013.

BAI, Z. G; ZHANG, Z. T. A systematic review and meta-analysis on the effect of angiogenesis blockade for the treatment of gastric cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 11, p. 7077, 2018.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, n. 4, p. 401-406, 2010.

BARBOSA, J.; RIBEIRO, J.; AFONSO, L.; FERNANDES, J.; MONTEIRO, E. Head and neck sarcoma: analysis of 29 cases. **European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases**, v. 131, n. 2, p. 83-86, 2014.

BALTRUNAITE, K. et al. ETS transcription factors Etv2 and Fli1b are required for tumor angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 20, n. 3, p. 307-323, 2017.

BANKAITIS, Katherine Venmar; FINGLETON, Barbara. Targeting IL4/IL4R for the treatment of epithelial cancer metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 32, n. 8, p. 847-856, 2015.

BARROS, F. et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3533-3539, 2012.

BEHL, C.; ZIEGLER, C. Cell aging: molecular mechanisms and implications for disease. **Springer Science & Business Media**, 2013.

BELMONT, P.; DORANGE, I. Acridine/acridone: a simple scaffold with a wide range of application in oncology. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 18, n. 11, p. 1211-1224, 2008.

BERGERS, G.; HANAHAN, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 8, p. 592, 2008.

BISHOP, J. M. The molecular genetics of cancer. **Science**, v. 235, n. 4786, p. 305-311, 1987.

BISI, A. et al. Design, synthesis and biological profile of new inhibitors of multidrug resistance associated proteins carrying a polycyclic scaffold. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 471-480, 2015.

BISSELL, M. J.; HINES, W. C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. **Nature Medicine**, v. 17, n. 3, p. 320, 2011.

BOHLOLI, M. et al. Investigating effects of acidic pH on proliferation, invasion and drug-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia. **Cancer Microenvironment**, v. 9, n. 2-3, p. 119-126, 2016.

CALDERON, L. A. et al. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

CALIXTO-CAMPOS, C. 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.

CANTELMO, A. R. et al. Vessel pruning or healing: endothelial metabolism as a novel target?. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 21, n. 3, p. 239-247, 2017.

CARAS, I. et al. Influence of tumor cell culture supernatants on macrophage functional polarization: *in vitro* models of macrophage-tumor environment interaction. **Tumori Journal**, v. 97, n. 5, p. 647-654, 2011.

CEYLAN, D. et al. The effects of gilaburu (*Viburnum opulus*) juice on experimentally induced Ehrlich ascites tumor in mice. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 14, n. 2, p. 314, 2018.

CHANGCHIEN, J. J. et al. Quinacrine induces apoptosis in human leukemia K562 cells via p38 MAPK-elicited BCL2 down-regulation and suppression of ERK/c-Jun-mediated BCL2L1 expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 284, n. 1, p. 33-41, 2015.

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

CHEN, H. et al. Tubulin inhibitor-based antibody-drug conjugates for cancer therapy. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1281, 2017.

CHEN, L.; WATKINS, J. F. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumour cells. **Nature**, v. 225, n. 5234, p. 734-735, 1970.

CHEN, M.; XIE, S. Therapeutic targeting of cellular stress responses in cancer. **Thoracic Cancer**, 2018.

CHOPRA, M. et al. Tumor necrosis factor receptor 2-dependent homeostasis of regulatory T cells as a player in TNF-induced experimental metastasis. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 6, p. 1296-1303, 2013.

CHU, W. M. Tumor necrosis factor. **Cancer Letters**, v 328, p 222-225, 2013.
CICCHELERO, Laetitia et al. Immunological, anti-angiogenic and clinical effects of intratumoral interleukin 12 electrogene therapy combined with metronomic cyclophosphamide in dogs with spontaneous cancer: A pilot study. **Cancer Letters**, v. 400, p. 205-218, 2017.

CICHOREK, M. et al. Novel therapeutic compound acridine–retrotuftsina action on biological forms of melanoma and neuroblastoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, p. 1-15, 2018.

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

CLIFFORD, R. et al. Systematic review of treatment intensification using novel agents for chemoradiotherapy in rectal cancer. **British Journal of Surgery**, v. 105, n. 12, p. 1553-1572, 2018.

COLOMBO, M. et al. Cancer Cells Exploit Notch Signaling To Redefine A Tumor Supportive Cytokine Milieu. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1823, 2018.

CRAIG, P. N.; **Journal of Medicinal Chemistry**. v 14, p 680. 1971.
DA SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 38–42, 2014.

DAS, S. et al. Quinacrine induces apoptosis in cancer cells by forming a functional bridge between TRAIL-DR5 complex and modulating the mitochondrial intrinsic cascade. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 248, 2017.

DE ALMEIDA, S. M.V.et al. New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 467-475, 2016.

DE ALMEIDA, S. M. V. 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, 2015.

DE BOCK, K. et al. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. **Cell**, v. 154, n. 3, p. 651-663, 2013.

DE MELO, R. et al. Synthesis and Anticancer Evaluation of Thiazacridine Derivatives Reveals New Selective Molecules to Hematopoietic Neoplastic Cells. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 20, n. 8, p. 713-718, 2017.

DEHNE, N. et al. IL-4 reduces the proangiogenic capacity of macrophages by down-regulating HIF-1 α translation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 95, n. 1, p. 129-137, 2014.

DENIZOT, F.; LANG, R.. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DENNIS, K. L. et al. Current status of IL-10 and regulatory T-cells in cancer. **Current Opinion in Oncology**, v. 25, n. 6, p. 637, 2013.

DENNY, W. A. Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 18, p. 1655-1665, 2002.

DIAZ-CANO, S. J. Tumor heterogeneity: mechanisms and bases for a reliable application of molecular marker design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 2, p. 1951-2011, 2012.

DOLAI, N. 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.

ECKERT, F. et al. Tumor-targeted IL-12 combined with local irradiation leads to systemic tumor control via abscopal effects *in vivo*. **Oncoimmunology**, v. 6, n. 6, p. e1323161, 2017.

EL ABED, H. et al. Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antitumoral Effects of Aqueous Ethanol Extract from *Phoenix dactylifera* L. Parthenocarpic Dates. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

ELARAJ, D. M. et al. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 1088-1096, 2006.

EL-FAR, M. et al. Silymarin nanoformulation as potential anticancer agent in experimental Ehrlich ascites carcinoma-bearing animals. **Nanomedicine**, v. 13, n. 15, p. 1865-1858, 2018.

ELINAV, E. et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 11, p. 759, 2013.

EMMERICH, J. et al. IL-10 directly activates and expands tumor resident CD8+ T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. **Cancer Research**, p. canres. 0721.2012, 2012.

EVANS, G. O. **Animal hematotoxicology: a practical guide for toxicologists and biomedical researchers**. 1 ed. Flórida: CRC Press, 2009.

FALCÃO, M. A.P. et al. Zebrafish as an alternative method for determining the embryo toxicity of plant products: a systematic review. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-12, 2018.

FASTAIA, J.; DUMONT, A. E. Pathogenesis of ascites in mice with peritoneal carcinomatosis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, n. 3, p. 547-550, 1976.

FECCHIO, D. et al. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, v. 14, n. 1, p. 125-132, 1990.

FENG, Y. et al. Autophagy Inhibitor (LY294002) and 5-fluorouracil (5-FU) Combination-Based Nanoliposome for Enhanced Efficacy Against Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Nanoscale Research Letters**, v. 13, n. 1, p. 325, 2018.

FERNANDES, P.D. et al. Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor development. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 71, p. 83-89, 2015.

FITZGERALD, G.; SORO-ARNAIZ, I.; DE BOCK, K.. The Warburg Effect in Endothelial Cells and its Potential as an Anti-angiogenic Target in Cancer. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, 2018.

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

FUKASAWA, H.; FURUYA, R.; YASUDA, H.; TAMAMOTO, T.; HISHIDA, A.; KITAGAWA, M. Anti-cancer Agent-Induced Nephrotoxicity. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v 14, p 921-927, 2014.

FUKUMURA, D. et al. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. **Nature Reviews Clinical Oncology**, 2018.

GAD, S. C. **Animal Models in Toxicology**. 2 ed. Flórida: CRC Press, 2007.
GAJULAPALLI, Vijaya Narasihma Reddy et al. Oestrogen receptor negativity in breast cancer: a cause or consequence?. **Bioscience Reports**, v. 36, n. 6, p. e00432, 2016.

GAO, C. et al. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole acridine derivatives as potential DNA-binding and apoptosis-inducing agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 1800-1807, 2015.

GAO, Y. et al. Cerium oxide nanoparticles in cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 7, p. 835, 2014.

GENSICKA-KOWALEWSKA, M. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Acridine/Acridone Analogs as Potential Anticancer Agents. **Medicinal Chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))**, 2018.

GHERMAN, C. et al. *In vitro* studies for evaluation the antitumoral and immunomodulator effect of EGCG on Ehrlich Ascites. **Archiva Zootechnica**, v. 15, n. 2, p. 79, 2012.

GIARDOGLOU, P.; BEIS, D.. On Zebrafish Disease Models and Matters of the Heart. **Biomedicines**, v. 7, n. 1, p. 15, 2019.

GILABERT-ORIOL, R. et al. Liposomal Formulations to Modulate the Tumour Microenvironment and Antitumour Immune Response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 2922, 2018.

GLABERMAN, S.; PADILLA, S.; BARRON, M. G. Evaluating the zebrafish embryo toxicity test for pesticide hazard screening. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 36, n. 5, p. 1221-1226, 2017.

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

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

GUTKIN, D.W.; SHURIN, M.R. Tumor-infiltrating immune cells of myeloid origin. In: Butterfield, L.H.; KAUFMAN, H.L.; MARINCOLA, F.M. **Cancer Immunotherapy Principles and Practice**. 1. ed. New York, 2017.

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

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

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

HARADA, M. et al. Quinacrine Inhibits ICAM-1 Transcription by Blocking DNA Binding of the NF- κ B Subunit p65 and Sensitizes Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells to TNF- α and the Fas Ligand. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2603, 2017.

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.

HINDLEY, C.; PHILPOTT, A. The cell cycle and pluripotency. **Biochemical Journal**, v. 451, n. 2, p. 135-143, 2013.

HUANG, C.H. et al. Quinacrine induces the apoptosis of human leukemia U937 cells through FOXP3/miR-183/ β -TrCP/SP1 axis-mediated BAX upregulation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 334, p. 35-46, 2017.

HUANG, Y. et al. Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy. **Cancer Research**, 2013.

HUNG, G.Y. et al. Cisplatin exposure impairs ionocytes and hair cells in the skin of zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, 2019.

HYNDMAN, I. J. The Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. **Cancer Microenvironment**, v. 9, n. 1, p. 63-69, 2016.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Rio de Janeiro: INCA, 2018. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. ISLER, Derya et al. Antitumoral effect of a selective Rho-kinase inhibitor Y-27632 against Ehrlich ascites carcinoma in mice. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 1, p. 114-120, 2014.

JAIN, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. **Science**, v. 307, n. 5706, p. 58-62, 2005.

JAIN, R.K. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 17, p. 2205, 2013.

JAIN, R. K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. **Nature Medicine**, v. 7, n. 9, p. 987, 2001.

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

KALIRAJAN, R.; RAFICK, M. H. M.; SANKAR, S.; JUBIE, S. Docking Studies, Synthesis, Characterization and Evaluation of Their Antioxidant and Cytotoxic Activities of Some Novel Isoxazole-Substituted 9-Anilinoacridine Derivatives. **The ScientificWorld Journal**. Volume 2012.

KATHIRIYA, A. et al. Evaluation of antitumor and antioxidant activity of *Oxalis corniculata* Linn. against ehrlich ascites carcinoma on mice. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, v. 3, n. 4, p. 157-165, 2010.

KAWAI, H. et al. Characterization and potential roles of bone marrow-derived stromal cells in cancer development and metastasis. **International journal of medical sciences**, v. 15, n. 12, p. 1406, 2018.

KELLUM, J.A.; CHAWLA, L. S. Cell-cycle arrest and acute kidney injury: the light and the dark sides. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 31, n. 1, p. 16-22, 2015.

KERR, S.t; KERR, D. How to prioritize cancer care for countries in transition. In: **Cancer Care in Countries and Societies in Transition**. Springer, Cham, p. 13-23. 2016.

KHAN, T. H.et al. Naringenin prevents doxorubicin-induced toxicity in kidney tissues by regulating the oxidative and inflammatory insult in Wistar rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, p. 1-8, 2018.

KHWAJA, S. et al. Antiproliferative efficacy of curcumin mimics through microtubule destabilization. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 51-61, 2018.

KIGNEL, S. **Estomalogia Bases do diagnóstico para o clínico geral**. 2. ed. São Paulo: Editora Santos, 2013.

KLAASSEN,C.D. (editor) Casarett and Doull's toxicology the basic science of poisons.7^a edição. USA: **The McGraw-Hill Companies**, 2008.

KLEIN, G. et al. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, eg acute leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 50, n. 2, p. 87-100, 2004.

KUKOWSKA, M. Amino acid or peptide conjugates of acridine/acridone and quinoline/quinolone-containing drugs. A critical examination of their clinical effectiveness within a twenty-year timeframe in antitumor chemotherapy and treatment of infectious diseases. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, p. 587-615, 2017.

KUMAR, R.; KAUR, M.; KUMARI, M. Acridine: A versatile heterocyclic nucleus. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 69, n. 1, p. 3-9, 2012.

LAMICHHANE, P. et al. IL-10 release upon PD-1 blockade sustains immunosuppression in ovarian cancer. **Cancer Research**, p. canres. 0740.2017, 2017.

LANDSKRON, G. et al. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, 2014.

LANTZ-MCPEAK, S. et al. Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 3, p. 261-272, 2015.

LEE, H. L. et al. Tumor growth suppressive effect of IL-4 through p21-mediated activation of STAT6 in IL-4R α overexpressed melanoma models. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 23425, 2016.

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

LI, Zenghui et al. Oldhamianoside inhibits the growth of ovarian cancer both in vitro and in vivo via adjusting inflammation and angiogenesis signals. **OncoTargets and Therapy**, v. 11, p. 6031, 2018.

LIMA, M.C.A, MOURA, R.O, MENDONÇA JUNIOR, F.J.B., CARVALHO JUNIOR, L. B., CARVALHO, J. E., RUIZ, A. L. T. G., ALMEIDA, S. M. V., SILVA, R. M. F., SOBRAL, M. V., SILVA, A. L., BATISTA, T. M., SERIFIM, V. L., **BATISTA, T. M.** "SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS 3-(ACRIDIN-9-IL)-N-BENZILIDENO-2-CIANOACRILÓHIDRAZIDAS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER. 2014.

LIN, Z. P; ZHU, Y. L.; RATNER, E. Targeting Cyclin-Dependent Kinases for Treatment of Gynecologic Cancers. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 303, 2018.

LIU, W. H. et al. Amsacrine suppresses matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)/MMP-9 expression in human leukemia cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 5, p. 588-598, 2014.

LYERLY, H. K.; OSADA, T.; HARTMAN, Z. C. Right time and place for IL-12: targeted delivery stimulates immune therapy. **Clinical Cancer Research**, p. clincanres. 2819.2018, 2018.

MALLMANN, M. R.; SCHMIDT, S. V.; SCHULTZE, J. L. Macrophages in human cancer: Current and future aspects. **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**, 2012.

MALLMANN, M.I R.; SCHMIDT, S.V.; SCHULTZE, J. L. Macrophages in human cancer: **Current and Future Aspects**. 2012.

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.

MANGUEIRA, V. M. 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.

MANTOVANI, A.; BARAJON, I.; GARLANDA, C. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 57-61, 2018.

MARTINON, F.; BURNS, K. ; TSCHOPP, Jürg. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . **Molecular Cell**, v. 10, n. 2, p. 417-426, 2002.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000prime Reports**, v. 6, 2014.

MARZVANYAN, A. et al. Herbal Medicine in the Mitigation of Reactive Oxygen Species, Autophagy, and Cancer: A Review. **Critical Reviews™ in Oncogenesis**, v. 23, n. 5-6, 2018.

MAZALOVA, L. et al. Effect of prostate cancer cell line supernatant on functional polarization in macrophages. **Bratislavské Lekárske Listy**, v. 119, n. 8, p. 516-521, 2018.

MEDEIROS, J.S. et al. Ensaios toxicológicos clínicos da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*), como alimento com propriedade de saúde. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19 n.2, Apr./June, 2009.

MELLO, Franciyelli Mariana dos Santos. **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. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

MELLO-ANDRADE, F. 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.

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.

MITTAL, K.; EBOS, J.; RINI, B.. Angiogenesis and the tumor microenvironment: vascular endothelial growth factor and beyond. In: **Seminars in oncology**. WB Saunders, p. 235-251, 2014.

MOLLAZADEH, H.; CICERO, A. F. G.; BLESSO, C. N.; PIRRO, M.; MAJEED, M.; SAHEBKAR, A. Immune modulation by curcumin: The role of interleukin-10. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-13, 2017.

MOROTTI, M. et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic markers for anti-angiogenic cancer therapy: implications for dosing and selection of patients. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, p. 1-17, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURA, Ana Paula Gomes et al. Essential oil from fruit of *Xylopiá langsdorffiana*: antitumour activity and toxicity. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3093-3102, 2016.

MUKHERJEE, A. et al. Evaluation of fluoren-NU as a novel antitumor agent. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 17, n. 9, p. 387-396, 2009.

NAJAFI, M. et al. Macrophage polarity in cancer: A review. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2018.

NETEA, M. G.; SIMON, A.; VEERDONK, F. V.; KULBERG, B. J.; MEER, V. D.; JOOSTEN, L. A. B. IL-1 β Processing in Host Defense¹; Beyond the inflammasomes. **Plos Pathogens**, v 6, 2010.

NETTERBERG, I. et al. Model-based prediction of myelosuppression and recovery based on frequent neutrophil monitoring. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 80, n. 2, p. 343-353, 2017.

NISARI, M. et al. The detection of curcumins' antitumoral effects via argyrophilic nucleolar organizing region-associated protein synthesis in mice with ehrlich's ascitic carcinoma. **Bratislavske Lekarske Listy**, v. 118, n. 1, p. 61-65, 2017.

OECD. **Acute oral toxicity – acute toxic class method**. OECD Guideline for testing of chemicals n. 423, 2001.

OECD. **Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals n. 236. Paris: OECD Publishing, 2013.

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

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

OZFILIZ-KILBAS, P. et al. Cyclin-dependent kinase inhibitors, roscovitine and purvalanol, induce apoptosis and autophagy related to unfolded protein response in HeLa cervical cancer cells. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 5, p. 815-828, 2018.

PAN, S. Y. et al. 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**, v. 86, n. 4, p. 778-783, 2007.

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

POZAROWSKI, P. & DARZYNKIEWICZ, Z. Analyses of Cell Cycle by Flow Cytometry. **Methods in Molecular Biology**, v 281, p 301-313, 2004.

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

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

ROACH, B. L. et al. Identification and characterization of a novel phosphoregulatory site on cyclin-dependent kinase 5. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 504, n. 4, p. 753-758, 2018.

RUIZ-LAFUENTE, N. et al. The transcriptional response of mouse spleen B cells to IL-4: Comparison to the response of human peripheral blood B cells. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 16, p. 56-61, 2018.

RUNDHAUG, J.E.; FISCHER, S.M. Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion. **Cancers**, v. 2, n. 2, p. 436-482, 2010.

SABAA, M. et al. Anticancer activity of salicin and fenofibrate. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 390, n. 10, p. 1061-1071, 2017.

SANTOS, J. 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.

SCHULTZE, E. et al. Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules overcome the triple-negative breast cancer cell resistance to tretinoin and show synergistic effect on cytotoxicity induced by doxorubicin and 5-fluorouracil. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 404-409, 2017.

SEDDER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants—past, present and future. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 453-472, 2014.

SERAFIM, Vanessa de Lima. **Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica de potenciais fármacos antitumorais e antimaláricos de derivados acilidrazônicos-acridínicos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2014.

SHAH, V. V. et al. 5-Fluorouracil in the treatment of keloids and hypertrophic scars: a comprehensive review of the literature. **Dermatology and Therapy**, v. 6, n. 2, p. 169-183, 2016.

SHAMOUN, L et al. Association study on IL-4, IL-4R α and IL-13 genetic polymorphisms in Swedish patients with colorectal cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 487, p. 101-106, 2018.

SHEN, Q. et al. Notch shapes the innate immunophenotype in breast cancer. **Cancer Discovery**, p. CD-17-0037, 2017.

- SHENG, J. et al. Clinical pharmacology considerations for the development of immune checkpoint inhibitors. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, p. S26-S42, 2017.
- 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.
- SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, p. 7–30, 2018.
- SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2017.
- 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.
- SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRÄULI, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 77, p. 383-393, 1963.
- SOARES, D. C. F. et al. Antitumoral activity and toxicity of PEG-coated and PEG-folate-coated pH-sensitive liposomes containing ^{159}Gd -DTPA-BMA in Ehrlich tumor bearing mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1-2, p. 58-64, 2012.
- SONDHI, S. M. et al. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 555-563, 2010.
- STRAUSS, J. et al. First-in-human phase I trial of a tumor-targeted cytokine (NHS-IL12) in subjects with metastatic solid tumors. **Clinical Cancer Research**, p. clincanres. 1512.2018, 2018.
- STURROCK, M. et al. Anti-angiogenic drug scheduling optimisation with application to colorectal cancer. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11182, 2018.
- SZAFRAN, M. J. et al. Amsacrine derivatives selectively inhibit mycobacterial topoisomerase I (TopA), impair *M. smegmatis* growth and disturb chromosome replication. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.
- SZYMAŃSKI, P. et al. Novel tetrahydroacridine and cyclopentaquinoline derivatives with fluorobenzoic acid moiety induce cell cycle arrest and apoptosis in lung cancer cells by activation of DNA damage signaling. **Tumor Biology**, v. 39, n. 3, p. 1010428317695011, 2017.

TEH, J. LF; APLIN, A. E. Arrested developments: CDK4/6 inhibitor resistance and alterations in the tumor immune microenvironment. **Clinical Cancer Research**, p. clincanres. 1967.2018, 2018.

THANT, A. A. et al. Role of caspases in 5-FU and selenium-induced growth inhibition of colorectal cancer cells. **Anticancer Research**, v. 28, n. 6A, p. 3579-3592, 2008.

TOBÓLSKA, S. et al. Genotoxicity and mutagenicity of inosine pranobex. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 2, p. 207-213, 2018.

TONG, D. et al. 5-Fluorouracil-induced apoptosis in cultured oral cancer cells. **Oral Oncology**, v. 36, n. 2, p. 236-241, 2000.

TROMBETA, D. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda oral do extrato hidroalcoólico das folhas de pequi (*Caryocar brasiliense*) em camundongos. **Veterinária em Foco**, v. 11, n. 2, 2014.

UL-HAQ, Z.; NAZ, S.; MESAİK, M. Ahmed. Interleukin-4 receptor signaling and its binding mechanism: a therapeutic insight from inhibitors tool box. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 32, p. 3-15, 2016.

UNNIKRISHNAN, R.; VEERAIHAH, S.; GANESAN,. Symptom burden and quality of life issues among patients of chronic myeloid leukemia on long-term imatinib therapy. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology: Official Journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology**, v. 38, n. 2, p. 165, 2017.

URRUTICOECHEA, A.; ALEMANY, R.; BALART, J.; VILLANUEVA, A.; VIÑALS, F.; CAPELLÁ, G. Recent advances in cancer therapy: an overview. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, p. 3-10. 2010.

UWAKWE, A.; MONAGO, C. C. Antiplasmodial activity of methanolic stem bark extract of *Anthocleista grandiflora* in mice. **International Journal of Applied**, v. 2, n. 4, 2012.

VAKILIAN, A. et al. CCL2/CCR2 signaling pathway in glioblastoma multiforme. **Neurochemistry International**, v. 103, p. 1-7, 2017.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G.J.L; CLOOS, Jacqueline. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In: **Cancer Cell Culture**. Humana Press, 2011. p. 237-245.

VASUDEV, N. S.; REYNOLDS, A. R. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. **Angiogenesis**, v. 17, n. 3, p. 471-494, 2014.

VIEIRA, P. M. et al. Assessment of the genotoxic, antigenotoxic, and cytotoxic activities of the ethanolic fruit extract of *Solanum lycocarpum* A. St.

Hill.(Solanaceae) by micronucleus test in mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 6, p. 1409-1414, 2010.

VISCONTI, R.; DELLA; M., R. GRIECO, Domenico. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 153, 2016.

VYAS, V.K. et al. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 2, p. 156, 2013.

WAKWE, A.; CC, A. Monago. Antiplasmodial activity of methanolic stem bark extract of *Anthocleista grandiflora* in mice. **International Journal of Applied**, v. 2, n. 4, 2012.

WINIARSKA-MIECZAN, A. Protective effect of tea against lead and cadmium-induced oxidative stress—a review. **BioMetals**, p. 1-18, 2018.

WONG, C.N.; WONG, C.N.; LIU, F.S. Continuous oral cyclophosphamide as salvage or maintenance therapy in ovarian, primary peritoneal, and fallopian tube cancers: A retrospective, single institute study. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, n. 3, p. 302-305, 2017.

WU, T. T.; ZHOU, S. H. Nanoparticle-based targeted therapeutics in head-and-neck cancer. **International Journal of Medical Sciences**, v. 12, n. 2, p. 187, 2015.

WU, T.; DAI, Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. **Cancer Letters**, v. 387, p. 61-68, 2017.

ZACHARIAE, C. O. C. et al. Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) purified from a human fibrosarcoma cell line. **Journal of Experimental Medicine**, v. 171, n. 6, p. 2177-2182, 1990.

ZAVERI, L.; DHAWAN, J.. Cycling to meet fate: connecting pluripotency to the cell cycle. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, 2018.

ZETTER, B. R. The scientific contributions of M. Judah Folkman to cancer research. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 8, p. 647, 2008.

ZHAO, S. et al. Serum IL-10 predicts worse outcome in cancer patients: a meta-analysis. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0139598, 2015.

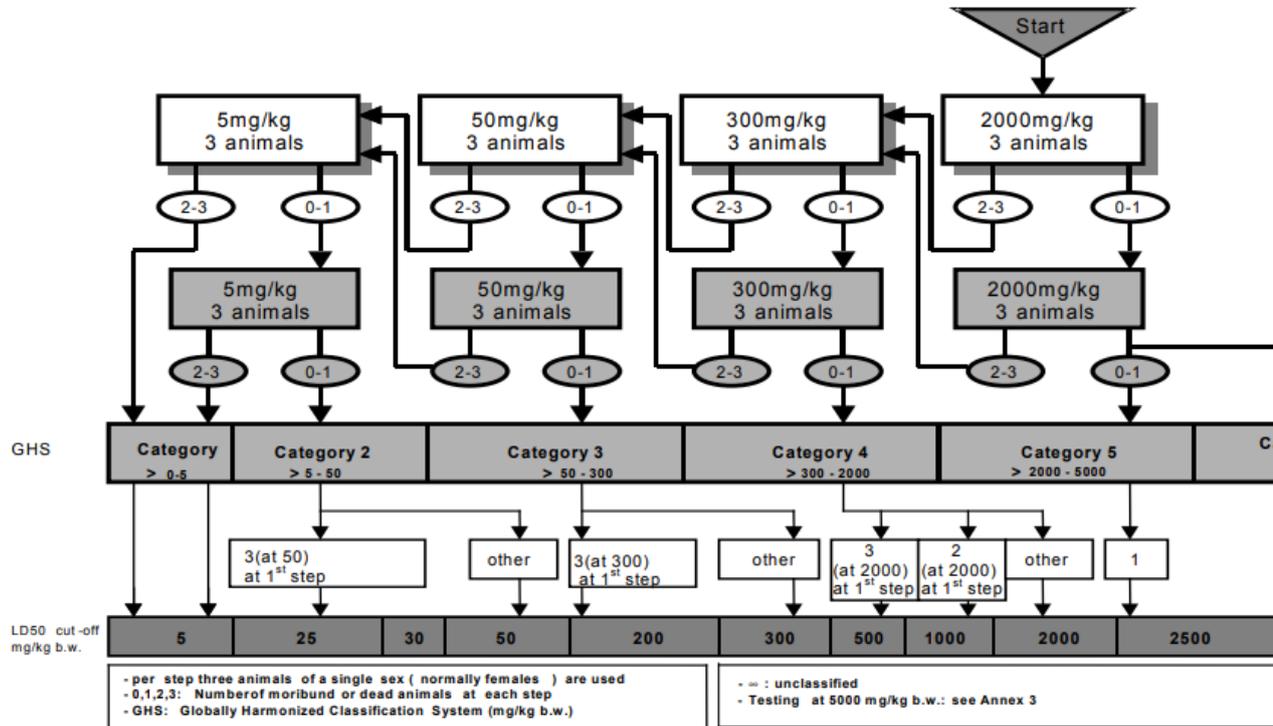
ZHOU, Q. et al. 3-nitroacridine derivatives arrest cell cycle at G0/g1 phase and induce apoptosis in human breast cancer cells may act as Dna-target anticancer agents. **Life Sciences**, v. 206, p. 1-9, 2018.

ZOHREH, J. et al. Silibinin to improve cancer therapeutics, as an apoptotic inducer, autophagy modulator, cell cycle inhibitor, and microRNAs regulator. **Life Sciences**, 2018.

Anexos[†]

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

ANNEX 2d: TEST PROCEDURE WITH A STARTING DOSE OF 2000 MG/KG BODY WEIGHT



ANEXO B – Triagem farmacológica comportamental

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito aumentado, (++) efeito intenso				
	até 30'	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose palpebral					
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					
Estereotípia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação					
Respiração forçada					
Lacrimajamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

