

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

VIVIANNE MENDES MANGUEIRA

**ESTUDO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO DERIVADO
ACRIDÍNICO N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-
acrilohidrazida EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR ASCÍTICO DE
EHRlich**

João Pessoa – PB

2015

VIVIANNE MENDES MANGUEIRA

**ESTUDO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO DERIVADO
ACRIDÍNICO N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-
acrilohidrazida EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR ASCÍTICO DE
EHRlich**

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

João Pessoa – PB

2015

VIVIANNE MENDES MANGUEIRA

**ESTUDO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO DERIVADO
ACRIDÍNICO N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-
acrilohidrazida EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR ASCÍTICO DE
EHRlich**

APROVADA EM / /2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral
(Orientadora)

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhaes
(Examinador Externo - UFPB)

Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam
(Examinador Interno - UFPB)

Aos meus pais **Izabel Mendes Feitosa Manguiera** e **Vivaldo Manguiera Andriola**, pelos ensinamentos, dignidade, perseverança e amor. Por não medirem esforços para a minha formação profissional e estímulo diário, bem como a minha tia **Maria Helena Manguiera** (in memorian), por toda dedicação e amor.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por estar sempre ao meu lado, iluminar meus passos e me amar incondicionalmente. Quero agradecer por todas as oportunidades a mim concedidas, e, sobretudo pela fé, força e coragem, que me levam a prosseguir, além da proteção constante. Obrigada Senhor!

Aos meus pais, **Izabel Mendes Feitosa Manguiera** e **Vivaldo Manguiera Andriola**, por todo amor, carinho e cuidado que sempre dedicam a mim. Por nunca medirem esforços para me educar (e eu sei que foram muitos), além das inúmeras renúncias que fizeram e fazem por mim até hoje e, que me permitiram chegar até aqui. Vocês são o meu bem mais precioso! Que estas palavras sejam a expressão da minha gratidão por tudo que lhes devo. Amo muito vocês. Muito Obrigada!

Ao meu irmão **Wagner Mendes Manguiera** pelo companheirismo, incentivo, carinho, apoio e presença nos momentos mais difíceis, além da torcida nessa longa caminhada. Por me fazer sentir protegida sempre. Te amo Neginho!

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

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

Aos meus tios, tias, primos e primas por serem minha família, pelo incentivo, torcida e apoio sempre. Obrigada pela força! Em especial a minha tia **Margarida Manguiera**, por ser presença constante em minha vida e dedicar tanta confiança, amor e carinho a mim. Obrigada Tia Margarida!

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

À **Maria do Socorro Sousa**, amiga e muitas vezes mãe. Por estar sempre ao meu lado. Agradeço por todo amor, carinho, acolhida e todas as palavras de incentivo e apoio, além da grande torcida, sempre demonstrada, pelo meu sucesso. Agradeço também a **Sara Maria** e **Ana Carolina** por serem além de amigas, irmãs! Agradeço ainda a **Tia Mazé**, pelo acolhimento, amor, carinho, torcida e inco

todos os momentos! Sem nenhuma dúvida, vocês também são a minha família! Amo vocês!

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

Aos meus queridos amigos **Ana Edite Lopes, Luciano Leite e Wendel Pereira** por tornarem meus dias melhores com amor e alegria que contagiam! Tornaram-se cada vez mais especiais, estando presentes em todos os momentos. Amigos de todas as horas.

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

Aos amigos de pós-graduação do Laboratório de Oncofarmacologia (Oncofar), **Heloísa Mara, Déborah Pessoa, Monalisa Brito, Daiene Lunguinho, Ana Paula Gomes, Aline Xavier e João Carlos Pita** pela ajuda, incentivo e torcida durante toda essa caminhada, pelo apoio e pela agradabilíssima convivência e em especial, as amigas **Tatianne Mota** e **Tatyanna Kelvia** que estiveram ao meu lado durante toda essa jornada. Agradeço também a **Renata Abrantes, Ryldene Marques, Fernando Neto e Jamilly Oliveira** pela torcida e disponibilidade em ajudar, por estarem presentes, independente do horário e dia da semana, sempre com alegria e boa vontade.

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

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

Aos professores doutores **Hemerson Iury Ferreira Magalhaes** e **Regina Piuvezam** pela gentileza de participar da avaliação deste trabalho.

Ao Professor Dr. **Ricardo Olimpio de Moura**, pela colaboração ... fornecimento do material.

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

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

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

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

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

A todos os **funcionários** do IPeFarM e as secretárias da Pós-graduação **Caroline Medeiros Manguiera** e **Dayana Rosa Brandão** pelos serviços prestados.

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

Ao técnico **Jean** pela disponibilidade em ajudar ao longo de período.

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

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

Ao **CNPq** pela bolsa concedida durante o período de mestrado.

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

Muito obrigada!

Vivianne Mendes Manguiera

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

Pe. Fábio de Melo – Liberdade é Tudo

MANGUEIRA, V. M. **ESTUDO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DO DERIVADO ACRIDÍNICO N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**. 2015. 117f **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – CCS/UFPB, João Pessoa.

RESUMO

O câncer é um importante problema de saúde pública em nível mundial, sendo considerado um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e multiplicação de células modificadas que podem invadir diversos tecidos. Seu tratamento tem se beneficiado das pesquisas que buscam reduzir a toxicidade e aumentar a eficácia de diferentes fármacos antineoplásicos. Os derivados da acridina possuem diversas atividades biológicas comprovadas, sendo a amsacrina, um antineoplásico usado para o tratamento de leucemias e linfomas, o principal representante do grupo. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade e atividade antitumoral do derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (ACS-AZ10). Na avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de camundongos foi possível observar que o ACS-AZ10 em concentração de até 1250 µg/mL não causou dano direto a membrana de eritrócitos de camundongos, sugerindo atividade intracelular em hemácias. Após administração aguda do ACS-AZ10 (2000 mg/kg) em camundongos por via intraperitoneal (i.p.), foram observados efeitos característicos de alterações no Sistema Nervoso Central dentre estes, contorções abdominais e abdução das patas do trem posterior. O valor estimado da DL₅₀ (dose que produz morte de 50% dos animais experimentais) foi em torno de 2500 mg/kg. O ACS-AZ10 (15 ou 30 mg/kg), após nove dias de tratamento (i.p.), mostrou significativa atividade antitumoral *in vivo* em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE), considerando os parâmetros volume, massa, viabilidade e total celular. O tratamento na dose 7,5 mg/kg induziu um aumento do pico sub-G1, com consequente redução da percentagem de células nas fases G0/G1 e S do ciclo celular, o que sugere morte por apoptose. No entanto, o tratamento com a dose de 15 mg/kg induziu parada do ciclo celular na fase G2/M e diminuição da fração G0/G1 e S, o que sugere um bloqueio pré-mitótico. O tratamento com as diferentes doses de ACS-AZ10 diminuiu significativamente a capacidade angiogênica do CAE, desta forma, pode-se inferir que o mecanismo de ação antitumoral do ACS-AZ10 envolve, pelo menos parcialmente, um efeito antiangiogênico. As análises toxicológicas indicaram que, após nove dias de tratamento com ACS-AZ10 foi observada baixa toxicidade hematológica e bioquímica. A análise histopatológica indicou danos hepáticos após o tratamento com ACS-AZ10, entretanto, os danos foram considerados leves e reversíveis. O ACS-AZ10 não induziu aumento na quantidade de eritrócitos micronucleados no ensaio do micronúcleo, o que indica ausência de genotoxicidade, nas condições avaliadas. Portanto, é possível inferir que o ACS-AZ10 apresenta potente atividade antitumoral *in vivo* com baixa toxicidade.

Palavras-chave: Derivado acridínico. Atividade antitumoral. Tumor de Ehrlich. Toxicidade.

MANGUEIRA, V. M. **STUDY OF TOXICITY AND ANTITUMOR ACTIVITY OF DERIVED ACRIDINE N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida AGAINST EHRlich ASCITIC TUMOR.** 2015. 117f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – CCS/UFPB, João Pessoa.

ABSTRACT

Cancer is a major public health problem worldwide and is considered a group of diseases characterized by uncontrolled growth and multiplication of abnormal cells that can invade various tissues. Treatment has been benefited from research that seek to reduce toxicity and increase the effectiveness of different anticancer drugs. Acridine derivatives have a number of proven biological activities, and amsacrine, an antineoplastic used for the treatment of leukemias and lymphomas, is the main representative of the group. This study aimed to evaluate the toxicity and antitumor activity of acridine- derived N'-(2-chloro-6-methoxy-acridin-9-yl)-2-cyano-3-(4-dimethylaminophenyl)-acrilohydrazide (ACS-AZ10). In the assessment of cytotoxicity in mouse erythrocytes it was observed that ACS-AZ10 did not cause hemolysis at the concentrations tested (up to 1250 µg / ml), suggesting low toxicity in erythrocytes. After acute administration of ACS-AZ10 (2000 mg / kg) in mice intraperitoneally (ip), characteristic effects of changes in the central nervous system among them, writhing and abduction of the legs of the rear train, were observed. The estimated LD50 (dose that produces death in 50% of experimental animals) was around 2500 mg / kg. The ACS-AZ10 (15 or 30 mg / kg), after a nine days treatment (ip) showed significant antitumor activity *in vivo* in Ehrlich ascites carcinoma model (EAC), considering the volume parameters, mass, viability and total cell count. Treatment at the dose 7.5 mg/kg induced an increase in sub-G1 peak, with a consequent reduction in the percentage of cells in G0/G1 and S phases of cell cycle, suggesting death by apoptosis. However, treatment with 15 mg/kg induced cell cycle arrest in G2/M phase and a reduction of the fraction G0/G1 and S, suggesting a pre-mitotic blockade. The treatment with different doses of ACS-AZ10 significantly reduced the angiogenic capacity of the EAC, thus it can be inferred that the ACS-AZ10's antitumor mechanism of action involves, at least in part, an anti-angiogenic effect. The toxicological analysis indicated that after nine days of treatment with ACS-AZ10, low haematological and biochemical toxicity were observed. Histopathological analysis indicated liver damage following treatment with ACS-AZ10, however, the damage was considered mild and reversible. ACS-AZ10 induced no increase in the quantity of micronucleated erythrocyte in micronucleus test, indicating the absence of genotoxic under the conditions evaluated. Therefore, it is possible to infer that the ACS-AZ10 has potent antitumor activity *in vivo* with low toxicity.

Keywords: Acridine- derived. Antitumor activity. Ehrlich ascites tumor. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)acrilohidrazida.	48
Figura 2 - Efeito do tratamento com o derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida e 5-FU na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com CAE.	66
Figura 3 - Figuras representativas da histopatologia dos rins dos diferentes grupos experimentais.	74
Figura 4 - Figuras representativas da histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais.	75
Figura 5 - Figuras representativas da histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais.	77

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Percentagem de células de CAE nas fases do ciclo celular após tratamento com solução 12% tween 80 (controle) e do derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (7,5 e 15 mg/kg).....65

LISTA DE QUADROS

Quadro1- . Características físico-químicas do ACS-AZ e do derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida	54
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos da administração de doses únicas (i.p.) do derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida em camundongos.....	63
Tabela 2 - Efeitos do tratamento do derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida e 5-FU no volume e massa tumoral, viabilidade celular e total celular em camundongos transplantados com CAE	64
Tabela 3 - Consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução 12% tween 80 (controle), derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (7,5, 15 e 30 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg)..	67
Tabela 4 - Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução 12% tween 80 (controle), derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (7,5, 15 e 30 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg)..	68
Tabela 5 - Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução 12% tween 80 (controle), derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (7,5, 15 e 30 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg)	69
Tabela 6 - Índices dos órgãos de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução 12% tween 80 (controle), derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (7,5, 15 e 30 mg/kg) e 5-FU (25 mg/kg)..	72
Tabela 7 - Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com diferentes doses do derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida e ciclofosfamida (i.p.).	78

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1 - Representação esquemática dos métodos utilizados para a avaliação da toxicidade e atividade antitumoral <i>in vivo</i> do derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida.	52
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU - 5-fluorouracil

ACS-AZ10- N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida

ALT - Alanina aminotransferase

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APC- Polipose Coli Adenomatosa

AST - Aspartato aminotransferase

CAE- Carcinoma Ascítico de Ehrlich

CDK- Cinases Dependentes de Ciclina

CEUA – Comissão de Ética em Uso de Animais

CH50 - Concentração que produz hemólise

CHCM - Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média

DLL4-Notch- *Delta-like 4-Notch*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EGFR- Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

ERK- Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares

FDA- *Food and Drug Administration*

FITC - Isotiocianato de Fluoresceína

FHIT- Tríade de Histidina Frágil

HCM - Hemoglobina Corpuscular Média

HE - Hematoxilina-eosina

IARC- Agência Internacional para Pesquisa em Câncer

INCA - Instituto Nacional do Câncer

IP – Iodeto de propídeo

m-AMSA- Ansacrina

MDR- Resistência à Múltiplas Drogas

MHC- *Major Histocompatibility Complex*

MM- Mieloma Múltiplo

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio

MoAbs- Anticorpos Monoclonais

NCI- Instituto Nacional do Câncer

OECD- Guidelines for Testing of Chemicals

OMS - Organização Mundial de Saúde

Oncofar- Laboratório de Oncofarmacologia

PBS - Solução Tampão Fosfato

PDGF- Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

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

Rb- Retinoblastoma

SBF - Soro Bovino Fetal

SNA - Sistema Nervoso Autônomo

SNC - Sistema Nervoso Central

SDS - Docecil Sulfato de Sódio

TGF- β - Fator de Crescimento Tumoral- β

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

VCM - Volume Corpuscular Médio

VEGF- Fator de Crescimento de Endotélio Vascular

VHT - Veia Hepática Terminal

VP - Veia Porta

v/v - volume/volume

M/T – morte/tratado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1 O Câncer	24
2.1.1 Etiologia, epidemiologia e tratamento.....	24
2.1.2 O controle do ciclo celular e apoptose	33
2.1.3 Angiogênese tumoral.....	37
2.1.4 Toxicidade de antineoplásicos	41
2.2 Estudo da farmacologia/toxicologia de fármacos com potencial anticâncer	42
2.3 Derivados acridínicos e o N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida	47
3 OBJETIVOS.....	49
3.1 Objetivo geral	50
3.2 Objetivos específicos	50
4 MATERIAL E MÉTODOS.	51
4.1 Local da pesquisa	53
4.2 Material.....	53
4.2.1 Obtenção do ACS-AZ10.....	53
4.2.2 Linhagem celular	54
4.2.3 Animais.....	54
4.3 Métodos.....	55
4.3.1 Citotoxicidade frente eritrócitos	55
4.3.2 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda	55
4.3.3 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE).....	56
4.3.3.1 Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade e total celular.....	57
4.3.3.2 Análise do ciclo celular	57
4.3.3.3 Avaliação do efeito antiangiogênico	58
4.3.3.4 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de CAE	58
4.3.3.4.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração.....	58
4.3.3.4.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	58
4.3.3.4.3 Avaliação dos índices dos órgãos	59

4.3.3.4.4 Análises anatomopatológicas	59
4.3.4 Avaliação da genotoxicidade	60
4.4 Análise estatística	60
5 RESULTADOS	61
5.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de camundongos	62
5.2 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda	62
5.3 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> em modelo de CAE	63
5.3.1 Volume do tumor, massa tumoral, viabilidade e total celular	63
5.3.2 Análise do ciclo celular	64
5.3.3 Angiogênese peritoneal	65
5.3.4 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE)	66
5.3.4.1 Avaliação ponderal e consumo de água e de ração	66
5.3.4.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos	67
5.3.4.3 Avaliação dos índices dos órgãos	71
5.3.4.4 Análises anatomopatológicas	72
5.4 Avaliação da genotoxicidade	78
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	94
ANEXOS	114

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um importante problema de saúde pública em nível mundial, sendo considerado um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e multiplicação de células anormais que podem invadir diversos tecidos (JEMAL et al., 2011; KASALA et al., 2015). A carcinogênese é um processo de várias etapas que se inicia com a transformação das células sadias em células cancerosas, progride com hiperproliferação e culmina na aquisição de propriedades angiogênicas, potencial invasivo, e estabelecimento de lesões metastáticas (SINGH, 2013). De acordo com as estimativas fornecidas por Ferlay et al. (2013), até 2030 surgirão 22,2 milhões de novos casos de câncer e ocorrerão cerca de 13,2 milhões de mortes no mundo por ano.

Os métodos mais comuns para o tratamento do câncer são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Embora a quimioterapia seja um método altamente eficaz para o tratamento do câncer, ele produz efeitos secundários graves, que ocorrem devido à baixa especificidade dos fármacos antineoplásicos (SAFARZADEH et al., 2014). Desta forma, os esforços no campo das pesquisas científicas tem sido cada vez mais direcionados para o desenvolvimento de diferentes fármacos e sistemas 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).

Há mais de um século derivados da acridina são utilizados com fins comerciais. As acridinas são compostos heterocíclicos formados por dois anéis benzênicos fundidos a um anel piridínico no centro (BELMONT et al., 2007). Os derivados da acridina possuem diversas atividades biológicas comprovadas, e são utilizados clinicamente como antivirais (CSUK, 2004; ALY EL-MOGHAZY, 1994), anti-inflamatórios (KAROLAK-WOJCIECHOWSKA, 1996), analgésicos (SONDHI, 2004) e antineoplásicos (HARTWELL, 1946). A amsacrina (m-AMSA), o derivado acridínico mais conhecido, foi o primeiro inibidor de topoisomerase sintético aprovado para uso clínico (KETRON et al., 2012; BARROS et al., 2013). Ainda é utilizada no tratamento de leucemias agudas e linfomas, mas é ineficaz em tumores sólidos (SÁNCHEZ, 2006).

No entanto, o aparecimento de efeitos indesejáveis, o desenvolvimento de resistência e sua baixa biodisponibilidade tem limitado seu uso. Esses fatores estimularam os químicos sintéticos a modificarem estruturalmente este composto e produzirem diferentes derivados que tem mostrado importante atividade antitumoral (SÁNCHEZ, 2006).

Diante do exposto, evidencia-se a importância e a necessidade de estudos farmacológicos e toxicológicos de novas substâncias, na perspectiva de encontrar diferentes terapias para o tratamento de diversas doenças, dentre elas o câncer.

Nesse sentido, a síntese de derivados acridínicos permitiu a caracterização de diferentes compostos, dentre estes, o N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (ACS-AZ10), o qual não possui relatos na literatura de descrição química ou de efeitos farmacológicos e toxicológicos.

Vislumbrando o potencial farmacológico dos derivados da acridina e reconhecendo a importância descrita na literatura da m-AMSA, no presente trabalho optou-se por enveredar os estudos com o ACS-AZ10, um análogo sintético inédito deste fármaco, avaliando, por meio de ensaios *in vivo*, sua toxicidade e atividade antitumoral em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich.

Referencial Teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O Câncer

2.1.1 Etiologia, epidemiologia e tratamento

A carcinogênese é caracterizada por alterações genéticas e acumuladas nas células como resultado de mutações nos genes responsáveis pelo controle celular, o que inclui os processos de proliferação, diferenciação e morte. Estas mutações estão relacionadas ao aumento da atividade de proto-oncogenes e redução na regulação dos genes supressores tumorais (IVANOVA et al., 2013; KAHLOS et al., 2000; CALDAS, 1998).

Os proto-oncogenes atuam normalmente em diferentes níveis de proliferação celular, e podem promover o crescimento tumoral desordenado quando há mutação. Dentre estes podem ser citados o RAS (CANEVASCINI et al, 2005), MET (KAWAKAMI et al, 2014), MYC (GEILER, 2014) e ERK (Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares) (HE et al, 2014). Do mesmo modo, mutações nos genes supressores de tumor, que impedem a inibição da progressão do ciclo celular, facilitam deste modo o crescimento anormal de células transformadas (VERMEULEN, 2003; FOSTER, 2008). Dentre estes genes, estão o Rb (Retinoblastoma), p53 (Tp53) (IANNETTI et al., 2014), TGF- β (Fator de Crescimento Tumoral- β) (ZENG et al., 2014), FHIT (Tríade de Histidina Frágil) (GULER et al., 2004), e APC (Polipose Coli Adenomatosa) (ERDEM et al, 2014).

O processo de formação do câncer geralmente ocorre de forma lenta e suas causas são variadas podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. Os fatores internos são representados por alterações genéticas, onde o número dessas alterações aumenta o grau de malignidade, e podem ser mudanças hereditárias na expressão gênica que ocorrem independentemente das alterações na sequência de DNA primário. Dentre estas alterações estão a metilação do DNA, modificações covalentes das histonas e mudança de posicionamento de nucleossomas e de histonas variantes (ALMEIDA, 2005; WHO, 2010; ERDEM et al, 2013).

Fatores externos são os carcinógenos, podendo ser químicos (constituintes da fumaça do cigarro ou contaminantes de água e alimentos, por exemplo), físicos (ultravioleta e radiação ionizante) e biológicos (infecções por determinados vírus, bactérias e parasitas), que atuam isoladamente em uma das fases da carcinogênese, ou podem ser capazes de atuar em todas as etapas, sendo neste caso, classificados como carcinógenos completos (ALMEIDA, 2005; WHO, 2010; ERDEM et al, 2013).

O processo de carcinogênese pode ser dividido em diferentes fases, classificadas em: iniciação, promoção e progressão (ALMEIDA, 2005; ERDEM et al., 2014). A fase inicial do câncer inclui alterações celulares irreversíveis. A fase de promoção é a proliferação clonal de células e a fase de progressão inclui a etapa agressiva e metastática da doença (JENA, 2012; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2013), câncer é a denominação para um complexo de mais de 100 doenças que possuem em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Estas células se dividem rapidamente, de forma anormal, e tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos (JENA, 2012; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

Os tumores, que são lesões expansivas, podem ser benignos, essencialmente bem delimitados, de crescimento geralmente lento e de forma esférica, fechado dentro de uma cápsula fibrosa, não invasivo, e morfológicamente semelhante a seu precursor celular; e malignos, que raramente encapsulam, têm anormalidades morfológicas de tal modo que o seu tecido de origem pode ser irreconhecível e apresentam como principal propriedade a capacidade de invasão de tecidos vizinhos. Esse processo de invasão e alastramento, denominado metástase, pode avançar até atingir o sistema circulatório, permitindo que as células malignas espalhem-se a partir do tumor primário e atinjam outros sítios de disseminação por meio dos vasos sanguíneos, distantes do local original, e neles iniciem novas colônias de células neoplásicas (SILVA, 2007; TALMADGE; FIDLER, 2010).

Morfológicamente, as células cancerosas (tumor maligno) apresentam características primordiais que as diferem das células normais, dentre estas,

anormalidades no núcleo (volumoso, múltiplos, nucléolos visíveis, hiperploidia), anormalidades no tamanho das células (heterogêneas), anormalidades citoplasmáticas (aumento da relação citoplasma-núcleo), anormalidades da membrana citoplasmática (perda da inibição por contato, modificação da adesividade, modificação dos antígenos de superfície), entre outras (APTSIAURI et al., 2007).

O câncer tem como marcas de sua etiologia e manutenção os seguintes fatores: evasão da destruição pelo sistema imune, sinalização proliferativa sustentada, não responsividade a sinais supressores de crescimento, ativação de invasão e metástase, resistência à morte celular programada, que leva a imortalidade replicativa, reprogramação do metabolismo energético, indução de angiogênese e instabilidade do genoma (HANAHA; WEINBERG, 2011; CEKANOVA; RATHORE, 2014).

O desenvolvimento da maioria dos cânceres é devido a um defeito na defesa natural do organismo por meio de mecanismos que eliminam as células pré-malignas do corpo (PAVELIC, 2014). O câncer pode escapar do sistema imunológico por diversos mecanismos. Entre os principais, em nível de células tumorais, alterações genéticas podem levar a perda de antígenos imunogênicos, resistência aumentada por citotoxicidade mediada por células T e expressão reduzida de proteínas de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de Classe I. O resultado final dessas alterações é a seleção de variantes pouco imunogênicas que podem se tornar invisíveis ao sistema imune (SCHREIBER et al., 2011; MERKEI et al., 2013).

A capacidade de sustentar uma proliferação crônica é uma característica fundamental das células cancerosas. Os tecidos normais, de forma cuidadosa, controlam a produção e liberação de sinais produtores de crescimento fazendo com que a célula progrida no ciclo de crescimento e divisão celular, permitindo a homeostase do organismo e mantendo a arquitetura e função normal dos tecidos. As células neoplásicas, por meio da desregulação destes sinais, tornam-se controladoras de seus próprios destinos, levando a modulação de propriedades biológicas essenciais para a criação de um ambiente de crescimento indomável. Estes sinais são transmitidos em grande parte por fatores de crescimento que se ligam à receptores de superfície celular, contendo domínios intracelulares tirosina-

quinase. Na maioria das vezes, esses sinais, influenciam outras propriedades das células, tais como a sobrevivência de células e o metabolismo de energia (HANAHAH; WEINBERG, 2011; MARUYAMA, 2013).

A capacidade de evasão de programas que regulam negativamente o ciclo celular é outra característica das células tumorais. Muitos desses programas dependem das ações de genes supressores tumorais, onde grande quantidade deles atua de várias formas para limitar o crescimento celular e a proliferação. Os dois principais genes são a proteína retinoblastoma (RB) e as proteínas TP53. A RB integra sinais de várias fontes intra e extracelulares e, em resposta, decide se a célula deve progredir ou não no ciclo de crescimento e divisão celular. Assim, células tumorais com uma RB defeituosa e não funcional apresentam uma proliferação celular persistente. Já as proteínas TP53 recebem sinais intracelulares, monitorando a ocorrência de condições adversas no processo de proliferação celular, como danos ao genoma, níveis de glicose, oxigênio, dentre outros. Uma vez que não haja condições propícias para a replicação celular, as mesmas podem parar o processo de proliferação até que as condições sejam normalizadas, ou dependendo do caso ativar o processo de apoptose (HANAHAH; WEINBERG, 2011).

Os processos de invasão e metástase são extremamente complexos, e seus determinantes genéticos e bioquímicos permanecem incompreendidos. No nível mecanicista, eles são intimamente aliados. Ambos utilizam estratégias operacionais semelhantes, envolvendo alterações no acoplamento físico de células para a ativação e o seu microambiente extracelular de proteases. A capacidade de invasão e metástase consiste em passos sequenciais e relacionados que permitem que as células tumorais escapem da massa do tumor primário e colonizem novos tecidos no corpo, que podem ser desde tecidos adjacentes, como também locais distantes onde eles podem ter sucesso na criação de novas colônias, uma vez que, pelo menos inicialmente, nutrientes e espaço não são limitantes (HANAHAH, WEINBERG, 2000; NATARAJAN et al., 2014).

O processo de múltiplos passos de invasão e metástase tem sido esquematizado como uma sequência de passos discretos, muitas vezes chamados de cascata de invasão e metástase (TALMADGE; FIDLER, 2010; FIDLER, 2003). Esta representação vislumbra uma sucessão de mudanças biológicas nas células,

especialmente o comprometimento da adesão célula-célula no epitélio neoplásico, seguida de invasão local, por meio do intravasamento das células cancerosas em vasos sanguíneos e linfáticos próximos, trânsito destas células através dos sistemas linfático e hematogênico, seguida de fuga das mesmas do lúmen para o parênquima dos tecidos distantes (extravasamento), formação de pequenos nódulos de células cancerosas (micrometástases), e finalmente o crescimento de lesões micrometastáticas em tumores macroscópicos, este último passo a ser denominado de "colonização" (HANAHAAN; WEINBERG, 2011; JI et al., 2013). Então, este processo pode ser dividido em duas fases principais: a disseminação física das células cancerosas do tumor primário para tecidos distantes, e a adaptação destas células no novo microambiente tecidual invadido que resulta em colonização bem sucedida, ou seja, o crescimento de micrometástases em tumores macroscópicos (TALMADGE; FIDLER, 2010; HANAHAAN; WEINBERG, 2011).

Em alguns tipos de câncer, o tumor primário pode liberar fatores supressores sistêmicos que tornam tais micrometástases latentes, como revelado pelo crescimento metastático clinicamente aparente logo após a ressecção do crescimento primário (DEMICHELI, 2008; FOLKMAN, 2002). Em outros, no entanto, como nos casos de câncer de mama e melanoma, metástases macroscópicas podem entrar em erupção décadas depois de um tumor primário ter sido removido cirurgicamente ou farmacologicamente destruído, estes crescimentos tumorais metastáticos evidentemente refletem micrometástases latentes que conseguiram resolver o complexo problema da colonização dos tecidos (BARKAN, 2010; AGUIRRE-GHISO, 2007; TOWNSON; CHAMBERS, 2006).

O câncer é considerado um problema de saúde pública e sua incidência continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas, com tendência de aumento da incidência em todos os países e para todos os tipos de câncer (GUANCHE et al., 2007; CAVALINI et al., 2012).

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, no ano de 2012. Em 2030, a carga global é estimada em 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por

câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento. No Brasil, a estimativa para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil). Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, estimam-se 395 mil casos novos de câncer, 204 mil para o gênero masculino e 190 mil para o gênero feminino (BRASIL, 2014).

Frente às estatísticas, o câncer é uma doença de importância notável no mundo de hoje. É a segunda principal causa de morte no mundo, depois das doenças cardiovasculares e é projetada para ser a principal causa de morte dentro de anos. Diante da incidência elevada, o desenvolvimento e pesquisa de novas tecnologias para o tratamento desta enfermidade se faz necessário para proporcionar maior resposta ao tumor com menor toxicidade (ALAPATI et al., 2012).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos, o tratamento do câncer pode ser feito usando diferentes abordagens incluindo, quimioterapia, imunoterapia, radioterapia, cirurgia, transplante de medula óssea e outros tipos de tratamento como terapia alvo, terapia fotodinâmica e a laser e criocirurgia ou crioterapia que é a utilização de frio extremo produzido por nitrogênio líquido para destruir o tecido tumoral e é utilizada para tratar tumores externos, tais como aqueles sobre a pele. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade e mesmo assim, nem sempre estes métodos de tratamento são úteis e os resultados clínicos são aceitáveis (YANG et al., 2012; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

O compartimento intersticial do tumor é predominantemente formado por uma rede de colágeno e fibras elásticas. Interdispersos dentro desta estrutura reticulada está o fluido intersticial e constituintes macromoleculares (hialuronato e glicoproteínas), que formam um gel hidrófilo. O interstício, diferentemente da maioria dos tecidos normais, também é caracterizado por alta pressão intersticial levando o fluxo de fluido intersticial por convecção. Assim, o transporte de uma droga

anticâncer no interstício será regido de forma fisiológica (isto é, pressão) e físico-química da molécula (composição, estrutura, tamanho, configuração, carga, hidrofobicidade) (JAIN, 2001; JAIN, 1987 *apud* BRIGGER, 2012).

Assim, para um agente terapêutico exercer efeitos benéficos em células tumorais *in vivo*, é preciso superar os seguintes obstáculos: i) resistência do tumor ao fármaco em nível de barreiras fisiológicas (mecanismos não celulares), ii) resistência do tumor ao fármaco em nível celular (mecanismos celulares), e iii) a distribuição, biotransformação e eliminação de drogas anticâncer pelo organismo (BRIGGER, 2012).

Na quimioterapia, a resistência aos medicamentos clínicos pode ser definida como a ausência de redução do tamanho do tumor ou como a ocorrência de recaída clínica após uma resposta inicial positiva ao tratamento antitumoral. Em primeiro lugar, os mecanismos não-celulares de resistência a drogas podem ocorrer devido a regiões do tumor mal vascularizadas, o que pode efetivamente reduzir o acesso da droga ao tumor e, assim, proteger as células cancerosas da citotoxicidade (LINKS; BROWN, 1999; BRIGGER, 2012).

Em seguida, a resistência de tumores à intervenção terapêutica pode ser devido a mecanismos celulares, que são classificados em termos de alterações na bioquímica das células malignas. Compreende atividade alterada dos sistemas de enzimas específicas (por exemplo, a atividade da topoisomerase), mecanismos alterados da regulação de apoptose, ou de transporte, neste caso baseados em sistema de efluxo da P-glicoproteína, uma proteína associada a resistência à múltiplas drogas (MDR) (LINKS; BROWN, 1999; KRISHNA; MAYER, 2000; BRIGGER, 2012; HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010).

Desta forma, o tratamento do câncer tem como principais objetivos: a remoção do tumor primário, a prevenção de metástases, o aumento da sobrevida de pacientes e a busca por drogas com efeitos colaterais (imunossupressão e toxicidade gastrointestinal, por exemplo) reduzidos. O uso de drogas quimioterápicas que atuem como adjuvantes das terapias atualmente utilizadas é cada vez mais empregado (DAHANUKAR, THATTE, 1997; VIRK-BAKER et al., 2010).

A cirurgia é considerada a forma mais eficaz de tratamento, principalmente quando o tumor está em estágio inicial e o paciente não apresenta metástase. A terapia radioativa é frequentemente combinada com a cirurgia, com o objetivo de

aumentar a eficiência do tratamento. Mesmo isoladamente, a radioterapia pode diminuir tumores grandes, diminuir a recorrência e a chance de metástase, sendo um método antineoplásico muito utilizado. Entretanto, em aproximadamente dois terços dos pacientes, a neoplasia se caracteriza por micrometástases e torna-se necessário uma terapia sistêmica que pode ser efetuada com o tratamento quimioterápico (ALMEIDA et al., 2005).

Uma abordagem de tratamento com base apenas na quimioterapia, ou em combinação com procedimentos cirúrgicos, radiação e/ou terapia hormonal, alcançou ganhos terapêuticos significativos. Neste cenário, drogas antitumorais e antimetastáticas recém-descobertas podem ser combinadas com um largo espectro de moléculas (PAVELIC, 2014). Diante da exposição, o tratamento do câncer tem sofrido grandes avanços, que incluem benefícios da combinação quimioterápica, bem como a incorporação de terapia biológica, produzindo melhorias significativas na sobrevivência dos pacientes (SUDARAM et al., 2012).

Embora a quimioterapia continue sendo a espinha dorsal do tratamento do câncer atual, ela é limitada por um índice terapêutico estreito e toxicidade significativa conduzindo a efeitos colaterais graves e a resistência adquirida frequente. Estes obstáculos atentam para novas abordagens terapêuticas com base em várias combinações de medicamentos e procedimentos. Eles devem ser concebidos de uma forma que permita o ataque primário e metastático de células de câncer de maneiras diferentes. Isto pode ocorrer de forma direta, por meio da interferência com biomarcadores de membrana de células de câncer, percursos de sinalização celular intrínseco e alterações genéticas ou epigenéticas, ou indiretamente, por meio de efeitos imunomoduladores sistêmicos (PAVELIC, 2014).

Os antineoplásicos podem ser classificados em fármacos ciclo-celular específicos (CCS), quando exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular e fármacos ciclo-celular não específicos (CCNS), quando tem a capacidade de exterminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso no compartimento G0 (ALMEIDA et al., 2005).

Os fármacos ciclo-celular específicos incluem os agentes antimetabólitos que exercem seus efeitos principalmente por bloquearem bioquimicamente a síntese do DNA e, portanto, são restritos à fase S do ciclo celular. Alguns exemplos são os

análogos do ácido fólico: Metotrexato (MXT); análogos das pirimidinas: Fluorouracil (5-Fluorouracil; 5-FU); Floxuridina (5-Fluorodesoxiuridina; FUDR); Citarabina (citosina arabinosídeo, ara-C); e análogos das purinas: Mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP); Tioguanina (6-tioguanina; TG); Pentostatina (2'-desoxicoformicina); Fosfato de fludarabina (mono fosfato de 2-fluoro-arabinofuranosiladenina; Cladribina (2-clorodesoxiadenosina) (ALMEIDA et al., 2005).

Já os fármacos ciclo-celular não específicos podem ser subclassificados em relação ao mecanismo de ação no DNA, considerando que eles podem agir de diferentes maneiras, como por exemplo: i) interagindo diretamente com o DNA, como os agentes alquilantes, dentre estes, mostardas nitrogenadas, nitrossuréis e complexos de coordenação de platina; ii) formando radicais livres que interagem com o DNA fragmentando suas hélices, como a bleomicina; iii) interagindo com a fenda menor do DNA, como os fármacos berenil, pentamidina e análogos; iv) alterando as propriedades de pareamento das bases, como os agentes intercalantes proflavina, acridina, amsacrina; e v) inibindo a topoisomerase, como a doxorrubicina (ALMEIDA et al., 2005).

Os inibidores da angiogênese constituem uma classe de fármacos importantes, onde o primeiro fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) foi o bevacizumab, um anticorpo monoclonal humanizado direcionado contra o Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF), utilizado atualmente para tratamento de tumores metastáticos de pulmão, mama, rins e coloretal (GIULIANO; PAGÈS, 2013). A talidomida, introduzida em 1957 como uma droga sedativa, teve seu uso limitado pelo efeito antiangiogênico. Em 2006, o FDA nos EUA concedeu aprovação da talidomida em combinação com dexametasona para o tratamento de Mieloma Múltiplo (MM) em pacientes recém-diagnosticados, uma vez que foi considerado um potente inibidor da angiogênese. O efeito da talidomida também foi observado em modelos experimentais de câncer como carcinoma de Ehrlich (RABINOWITZ et al., 2008; EICHHOLZ et al., 2010; PEREIRA et al., 2013).

Em particular, anticorpos monoclonais (MoAbs) representam a maioria das terapias-alvo que têm sido investigadas e empregadas em ambientes clínicos até agora. Estes reagentes imunológicos reconhecem alvos moleculares cuja expressão está associada a tumores e/ou são essenciais para a sobrevivência e proliferação de

células tumorais, tais como o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), família CA125, MUC-1, e outras vias de sinalização que são anormais em tecidos tumorais, dentre estas, a via da EpCAM que é uma proteína encontrada em células epiteliais. Além disso, a orientação das células imunitárias por MoAbs tem provado ser uma estratégia eficaz para modular as funções do sistema imune (anti-CTLA-4, anti-CD3, anti-CD40). Muitos MoAbs tem sido aprovados para o tratamento de tumores ginecológicos, colorectal, mama, cabeça e pescoço, pulmão e câncer de células renais, dentre estes podem ser citados, Rituximab, Ibritumomab tiuxetan, Trastuzumab, Bevacizumab e Ipilimumab (BELLATI et al., 2011).

Outra modalidade farmacológica é a terapia endócrina utilizada de forma sistêmica no câncer de mama, a qual representa uma das principais estratégias para a redução da mortalidade. Um pouco mais de 20% das neoplasias de mama ocorrem em mulheres com idade inferior aos 50 anos, sendo que aproximadamente 60% destas apresentam positividade para o receptor de estrogênio (RE+), comparado a 80% de positividade em mulheres com idade superior aos 50 anos. Em vista destes fatores, observa-se que a terapia antiestrogênica exerce importante papel no manejo da maioria das mulheres com câncer de mama (BRASIL, 2011). O tamoxifeno é o fármaco da classe antiestrogênica mais utilizado, possuindo efeito antagônico ao estrogênio em tecido mamário (o que reduz a proliferação do tumor) e efeito de agonista parcial na periferia (reprimindo assim a desmineralização óssea comum no pós-menopausa) (LEAL; CUBERO; DEL GIGLIO, 2010).

Apesar do grande progresso na terapia do câncer, como demonstrado pela ampla diversidade farmacológica surgida nos últimos anos, muitos tumores ainda são de difícil remissão (RIVA et al., 2012). Diante do exposto, torna-se evidente a grande necessidade da busca e pesquisa contínua por um tratamento cada vez mais seguro e eficaz, uma vez que o desenvolvimento de novos fármacos com toxicidade cada vez mais reduzida para o tratamento das neoplasias é uma busca incessante da indústria farmacêutica e dos cientistas.

2.1.2 O controle do ciclo celular e apoptose

O ciclo celular é uma sequência complexa de eventos que permite que as células possam crescer e replicar. Estímulos de crescimento começam com a liberação de fatores de crescimento de uma célula. Estes fatores ligam-se a receptores na membrana celular e os sinais são depois transportados por meio de proteínas na membrana citoplasmática, que indicam a direção onde deve ocorrer a liberação dos fatores de transcrição dentro do núcleo. Esta sequência de eventos impulsiona a célula através do ciclo celular (HARTWELL; KASTAN, 1994; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; FOSTER, 2008).

A regulação de suas fases é um processo diretamente relacionado com a geração e desenvolvimento de neoplasias. É imprescindível que ocorra o controle para a manutenção do ritmo de proliferação, garantia da correta replicação do material genético, segregação dos cromossomos, e coordenação dos processos de diferenciação, senescência e morte (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

A célula que não está replicando encontra-se na fase G₀. Nesta fase, o DNA apresenta-se super-enovelado, com atividade nuclear baixa. Este estágio pode ser modificado para a fase G₁, onde há a preparação da célula para a multiplicação, com a produção de constituintes celulares que serão essenciais para a nova célula que será gerada, além da preparação para a síntese de DNA, que ocorrerá na fase S. Na fase G₂ há a síntese de componentes para a mitose (divisão celular com manutenção do número de cromossomos específico da espécie) como a produção do fuso mitótico, a qual ocorre na fase M. Após a divisão do material nuclear há a citocinese (que é a separação da célula mãe, formando as duas células filhas com suas organelas e demais constituintes celulares), finalizando o ciclo de replicação celular, com retorno à fase G₀. A célula tumoral ou transformada não finaliza o ciclo de replicação celular (não retorna à fase G₀), assim passa da fase M para nova fase G₁ (ALMEIDA et al., 2005; FOSTER, 2008).

A progressão das células via ciclo celular resulta em uma cascata bem caracterizada de eventos encontrada nas células em proliferação. A progressão ocorre por diferentes fases e é controlada pela atividade de cinases dependentes de ciclina (CDK). CDKs constituem uma família de 20 membros, dos quais, cinco (CDK1, 2, 3, 4, 6) têm sido associados com o controle do ciclo celular. A associação de uma CDK com uma ciclina forma um complexo ativo. As ciclinas são classificadas em quinze tipos, sendo as mais descritas as ciclinas A1 e A2; B1, B2 e B3; D1, D2 e

D3 e E1 e E2, e sua atividade CDK é estreitamente regulada durante as diferentes fases do ciclo celular por diversos mecanismos. No entanto, a ligação de proteínas inibidoras de CDKs limita a atividade de CDK. Estes inibidores são divididos em duas famílias diferentes (Cip/Kip e INK4) com base no seu mecanismo inibitório. Os três membros da família Cip/Kip (p21, p27, p57) ligam-se a todos os complexos Cdk/ciclina e inibem a sua atividade por ocuparem o sítio de ligação do ATP de CDKs. Inibidores INK4 (p16, p15, p18, p19) modificam a conformação Cdk4/6, inativando-a. A expressão elevada de inibidores CDKs resulta na parada do ciclo celular (MALUMBRES et al., 2009; GOPINATHAN, 2011; ORTEGA, 2002; ALBRECHT, 1998; PUJOL, 2000; ILYIN, 2003; XAVIER; CALDEZ; KALDIS, 2014).

A literatura tem mostrado o resultado de muitos trabalhos relacionados a avaliação da atividade antitumoral, nos quais as drogas estudadas induzem alterações morfológicas e bioquímicas nas células que exibem características de morte celular por apoptose, o que inclui a fragmentação internucleossômica do DNA, resultando no aparecimento de uma população de células em uma fase do ciclo celular denominada sub-G1 (HAN et al., 2014; PARSAAEE et al., 2013). O acúmulo de células nesta fase, que representam células com menor conteúdo de DNA, também caracteriza a indução de apoptose (WLODKOWIC et al., 2011).

Na maioria das vezes, a atividade antineoplásica de novos medicamentos está relacionada à capacidade de induzir morte celular como resposta a estímulos intra ou extracelulares. Os processos de morte celular são classificados morfológica e bioquimicamente em: apoptose, autofagia, necrose e mitose catastrófica. Alterações na coordenação desses tipos de morte celular estão implicadas na tumorigênese. A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem induzindo esse tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose em células tumorais (GRIVICICH et al., 2007; WLODKOWIC, 2011; GRAVINA et al., 2014).

Apoptose ou morte celular programada é um processo altamente controlado que é responsável pela remoção de células indesejáveis, velhas e danificadas (SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). Caracteriza-se por um fenômeno rápido, onde ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares perdem sua

posição no citoplasma, mas mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear (ARAVINDARAM; YANG, 2010; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014). Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Essas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas de corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; STRASSER; CORY; ADAMS, 2011).

A degradação celular e as alterações observadas em células apoptóticas são decorrentes da ativação de caspases (CAVALCANTI, 2010). As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific protease*) pertencem à família das cisteína proteases (possuem uma cisteína no sítio ativo) que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. As caspases sinalizam para apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (BOATRIGHT, 2003).

Como mecanismo de proteção contra ativação inadvertida, essas enzimas são sintetizadas na forma de precursores inativos (zimogênios), necessitando de clivagem para iniciar sua ativação (HENGARTNER, 2000). Estão constitutivamente presentes na maioria das células de mamíferos, e residem no citosol como pró-enzimas de cadeia única que estão especificamente envolvidas nos mecanismos moleculares dessa forma de morte celular (HAIL et al., 2006).

As caspases são ativadas em resposta a estímulos externos, tais como os ligantes para receptores de morte (TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e de Fas) presentes na membrana plasmática, denominada de via extrínseca da apoptose utilizando caspases 8 e 10, ou sinais internos que surgem a partir de danos aos componentes celulares mediada pela mitocôndria, denominada via intrínseca da apoptose envolvendo a ativação de caspase 9 (HAJRA; LIU, 2004; HAIL et al., 2006; DUNCAN et al., 2010; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

Reconhecer os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer é de grande importância para o tratamento da doença. Assim, considerando que a resistência a apoptose é uma das características do câncer, a indução de apoptose é um dos marcadores mais importantes de agentes citotóxicos antitumorais (SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014).

2.1.3 Angiogênese tumoral

O sistema vascular, composto por células endoteliais que revestem o lúmen dos vasos sanguíneos, forma uma complexa infraestrutura permitindo o transporte de moléculas e células no organismo. Assim, as células endoteliais agem como uma barreira semipermeável e controlam a transferência de moléculas e células da circulação para o tecido subjacente e vice-versa. Adicionalmente, o endotélio contribui para diversos processos fisiológicos, incluindo a coagulação, inflamação e angiogênese.

Na angiogênese, caracterizada pelo crescimento de novos vasos sanguíneos para fora dos capilares pré-existentes, as células endoteliais são as mais importantes. Para iniciar o crescimento dos vasos sanguíneos, estas células precisam estar ativas, uma vez que o volume delas é baixo. A ativação endotelial desencadeia uma cascata de sinalização celular rigidamente regulada, incluindo a degradação da matriz extracelular, brotamento, proliferação, migração e formação do tubo. Diante disto, novos vasos são formados e o processo de angiogênese termina com a deposição de nova matriz extracelular, atração de pericitos para a estabilização do vaso e retorno do fenótipo das células endoteliais ao repouso (GRIFFIOEN; MOLEMA, 2000; POTENTE et al., 2011; GRIFFIOEN et al., 2014).

A vascularização dos tumores é heterogênea, apresentando regiões que mostram necrose ou hemorragia, bem como regiões que são densamente vascularizadas a fim de manter um fornecimento adequado de nutrientes e oxigênio para o crescimento rápido do tumor. Os vasos sanguíneos do tumor apresentam várias anomalias em comparação com vasos fisiológicos normais, incluindo frequentemente uma proporção relativamente alta de proliferação de células endoteliais, aumento da tortuosidade, deficiência em pericitos e formação da

membrana basal anormal. Isso resulta em reforçada permeabilidade da vasculatura do tumor podendo ser regulada por vários mediadores, tais como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), bradicinina, óxido nítrico, prostaglandinas e metaloproteinases da matriz (BRIGGER, 2012).

O crescimento e potencial metastático da maioria dos tumores, tanto sólidos quanto hematológicos, são dependentes de angiogênese. Os tumores podem persistir no local por um período considerável de tempo que pode variar de meses a anos sem a formação de nova vascularização (MEDINGER, PASSWEGA, 2014). Folkman (1971) foi o primeiro a descrever que os tumores sólidos requerem o crescimento de novos vasos sanguíneos para suprimento de oxigênio e nutrientes.

No tumor, vários mecanismos estão envolvidos no processo de formação de novos vasos sanguíneos, entre eles, i) a cooptação da rede vascular existente, ii) a expansão da rede vascular existente por meio de brotamento (angiogênese por brotamento), iii) a remodelação e expansão dos vasos por meio da inserção de colunas de tecido intersticial para dentro do lúmen dos vasos pré-existentes (angiogênese intussusceptiva), e iv) o movimento de precursores de células endoteliais a partir da medula óssea ou do sangue periférico para o revestimento endotelial dos novos vasos (vasculogênese). Células progenitoras derivadas da medula óssea contribuem significativamente para a neovascularização em uma variedade de tumores (FOLKMAN, 1995; PEREZ-ATAYDE et al., 1997; LYDEN et al., 2001; MEDINGER, PASSWEGA, 2014).

A formação de novos vasos sanguíneos, caracterizado pela angiogênese, é um processo de múltiplos passos que são essenciais no desenvolvimento do tumor uma vez que promove o crescimento, proliferação, invasão e metástase. Cada passo deste processo representa um alvo potencial para a ação inibitória de drogas angiosupressoras, sendo de fundamental importância para a descoberta de novas terapias para o câncer (KESHET et al., 1999; VINAYAK et al., 2014).

O processo de angiogênese é controlado por um equilíbrio de fatores promotores e inibidores angiogênicos. A transição entre um fenótipo não angiogênico para angiogênico pode ocorrer quando os tumores se expandem e permitem que algumas células que estão fora do limite de difusão de oxigênio entrem em hipóxia (MOSERLE et al., 2009; RIBATTI et al. 2007; LIU et al, 2014). As células tumorais respondem à hipóxia pela ativação do fator de hipóxia-indutível, um

fator de transcrição que ativa os genes envolvidos no processo de angiogênese, tal como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e a sintase de óxido nítrico.

Proteínas pró-angiogênicas excedem, eventualmente, a concentração local de inibidores angiogênicos, permitindo que ocorra angiogênese, com o objetivo de suprir as necessidades tumorais para permitir o seu crescimento (NAUMOV et al., 2006; LIU et al., 2014).

De todas as vias de sinalização envolvidas na angiogênese tumoral, a mais proeminente e melhor caracterizada é a via VEGF, uma vez que executa uma função-chave em todas as etapas. A vasculatura tumoral induzida pelo VEGF tem uma série de anormalidades estruturais e funcionais que suportam o crescimento do tumor, incluindo o aumento da permeabilidade (LIU et al., 2014).

VEGF é o regulador central da angiogênese. É membro fundador de uma família de citocinas intimamente relacionadas que exercem funções críticas na angiogênese patológica e fisiológica. Ele aumenta a permeabilidade vascular ao plasma e às proteínas plasmáticas, um traço característico da microvasculatura do tumor e um passo crítico no início da geração do estroma tumoral. É um mitógeno seletivo para o endotélio vascular, porque os seus principais receptores tirosina-quinase são seletivamente (embora não exclusivamente) expressos sobre o endotélio vascular, e, além disso, é sobre-expresso em uma variedade de células tumorais humanas incluindo o cérebro, cólon, trato gastrointestinal, ovário e mama (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; CRISTINA et al., 2014).

Uma vez que o endotélio pode ser um alvo ou um fator causal de doença, a sua avaliação é uma ferramenta valiosa na investigação clínica. A avaliação integrada da função e disfunção endotelial incorporando, por exemplo, coagulação, propriedades inflamatórias, e tônus vascular são estritamente importantes (MUNARON, 2014).

O tratamento com anticorpos anti-VEGF inibiu significativamente o crescimento de várias linhagens de células tumorais e tem sido aprovado pela FDA para o tratamento de uma combinação com a quimioterapia principalmente em câncer colo-retal metastático, de pulmão, da mama metastatizado, e mais recentemente, o glioblastoma multiforme e carcinoma de células renais. No entanto, nem todos os ensaios têm sido positivos, indicando que as características individuais

de diferentes tumores devem ser estudadas, uma vez que a resistência a terapias anti-VEGF usadas isoladamente desenvolve-se após alguns meses de tratamento, na maioria dos pacientes (KERBEL, 2008; BURRIS III; ROCHA-LIMA, 2008; CRISTINA et al., 2014; LIU et al., 2014).

Outras vias além da VEGF, tais como o fator de crescimento de fibroblastos, PDGF, mTOR, citocinas inflamatórias e componentes da matriz extracelular, também mostraram envolvimento na angiogênese tumoral, todavia, as estratégias terapêuticas envolvendo o bloqueio destas vias de sinalização permanecem em grande parte ineficazes. Isso destaca a necessidade de terapias com outros alvos vasculares, onde a via *Delta-like 4-Notch* (DLL4-Notch) é um dos mais promissores alvos terapêuticos no tratamento do câncer. DLL4-Notch foi previamente conhecida pela sinalização desempenhada na angiogênese fisiológica, a exemplo da cicatrização de feridas e na gravidez, no entanto, muitos trabalhos têm mostrado o envolvimento de *Notch* na angiogênese patológica, tal como a angiogênese tumoral. Modelos experimentais revelaram o envolvimento de *Notch* na resistência às drogas anticâncer, indicando que pode ser uma nova abordagem terapêutica para o tratamento do câncer, superando a resistência de células tumorais aos medicamentos convencionais (LIU et al., 2014).

Nos últimos anos, a terapia antiangiogênica foi anunciada como uma nova alternativa ou complemento à terapia convencional do câncer, mostrando uma variedade de regimes que impedem a angiogênese tumoral e/ou crescimento de vasos sanguíneos no tumor, devido ao notável sucesso em ensaios realizados em camundongos (CRAWFORD; FERRARA, 2009; CRISTINA et al., 2014).

Inúmeras drogas quimioterápicas usadas na clínica demonstraram propriedades antiangiogênicas em modelos *in vitro* e *in vivo* além da sua capacidade para induzir morte celular programada. Dentre estas, estão o paclitaxel que inibe a polimerização dos microtúbulos, inibe a proliferação de células endoteliais vasculares, a motilidade e invasividade de uma maneira dose-dependente *in vitro* e induz efeito anti-angiogênico tumoral *in vivo*; a ciclofosfamida e etoposide que induzem apoptose; e 5-fluorouracil (5-FU), principalmente quando usado em combinações com outros quimioterápicos, induz apoptose, efeitos antiangiogênicos, redução da microdensidade dos vasos e redução da expressão de VEGF *in vivo* (WADA et al., 2007; HAIFU, 2014).

2.1.4 Toxicidade dos antineoplásicos

Sabendo-se dos diversos efeitos colaterais que os fármacos antineoplásicos apresentam como resultado de sua toxicidade sobre outras células do organismo que não as células tumorais, torna-se extremamente importante a investigação de possíveis efeitos tóxicos de potenciais fármacos antineoplásicos.

A utilização da quimioterapia antineoplásica como recurso terapêutico sistêmico contra o câncer baseia-se na busca pela destruição das células tumorais, que têm como característica o fato de se dividirem muito mais rápido que a maioria das células normais. Em contrapartida, células normais de rápido crescimento como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, são normalmente afetadas pela ação desses fármacos, o que culmina com o aparecimento de muitos efeitos indesejáveis a exemplo de diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e maior susceptibilidade às infecções, limitando desta forma, a dose do fármaco utilizada bem como reduzindo a qualidade de vida do paciente (BRANDÃO et al., 2010).

Relacionando fármacos antineoplásicos utilizados na clínica com seu perfil de toxicidade, podem ser citados a doxorrubicina que induz cardiotoxicidade e mielossupressão (PRADOS et al., 2012), a ciclofosfamida que induz cistite hemorrágica (SOUZA, 2000), o metotrexato, o docetaxel e a cisplatina que desencadeiam toxicidade renal (BEZERRA et al., 2008; KOROLKOVAS, 2010), e o 5-fluoruracil (5-FU) que apresenta como efeitos colaterais mais conhecidos a mielossupressão, alterações gastrointestinais, alterações hematológicas e também está associada a reações cardíacas (ROQUE; FORONES, 2006; STEGER; HAUTMANN; KOLBL, 2012).

Alterações hematológicas como anemia e trombocitopenia são relatadas em pacientes com câncer e são causas de morbidade e mortalidade com impacto negativo sobre a progressão da doença e a terapia antineoplásica. Dentre os seres humanos portadores de neoplasias em grau avançado, 50 a 70% apresentam anemia. Quanto ao leucograma, a leucocitose é alteração importante em pacientes com neoplasia e ocorre devido à complexa interação entre as células neoplásicas com o sistema imunológico e com a inflamação peritumoral. A leucocitose neutrofílica está fortemente associada ao pior prognóstico e mortalidade em seres

humanos com neoplasia, sobretudo naqueles em tratamento quimioterápico (DIETL et al., 2007; CONNOLLY et al., 2010; Da SILVA et al., 2014).

Diante das alterações hematológicas descritas na literatura, muitos pacientes com câncer já apresentam redução de eritrócitos, mas a terapia antineoplásica também prejudica esse quadro por induzir redução na síntese de eritrócitos e diminuição da sobrevivência, resposta medular inadequada ou ainda, distúrbio do metabolismo do ferro (CANÇADO, 2007; WEISS, 2005). Outro importante dano hematológico associado ao uso de drogas antineoplásicas é a atividade citotóxica frente eritrócitos. A literatura descreve dois fenômenos biológicos que resultam dessa hemólise secundária à terapêutica, são eles, a purpura trombocitopênica e a síndrome hemolítica urêmica (NIU; MIMS, 2012). Dentre os agentes quimioterápicos que induzem essa hemólise, encontram-se a bleomicina, ciclosporina, cisplatina e o agente mais comumente reportado na literatura, a mitomicina-C (WU et al., 1997).

Para evitar esses efeitos colaterais, novas modalidades terapêuticas que visam atingir especificamente o tumor com toxicidade reduzida estão em constante estudo (ADAMS, 2011).

Uma das modalidades terapêuticas utilizadas com o objetivo de tornar o tratamento mais eficaz e menos tóxico do que a terapia citotóxica clássica é o tratamento com terapia alvo, que direciona o fármaco antineoplásico a vias moleculares específicas do tumor. Dentre os fármacos utilizados para terapia direcionada do câncer, encontram-se os inibidores de receptor de fator de crescimento epidermico (EGFR), inibidores de receptor de fator de crescimento da insulina (IGFR), inibidores do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), entre outros (KOTHARI; ALMHANNA, 2015).

2.2 Estudo da farmacologia/toxicologia de fármacos com potencial anticâncer

O desenvolvimento de modelos experimentais tem contribuído para o estudo e a compreensão do mecanismo de ação de muitos compostos antineoplásicos (LONGATO et al., 2011). Para a descoberta de quimioterápicos, tanto os testes *in vitro* quanto os *in vivo* são amplamente utilizados. Desta forma, um grande avanço no estudo dos tumores tem sido a utilização de métodos experimentais, onde são

usados tumores transplantáveis ou transmissíveis. Esses são tumores de animais, mantidos em laboratório, pelo transplante de células tumorais a hospedeiros susceptíveis, como por exemplo, o tumor de Ehrlich (DAGLI, 1989; ASSIS, 2007).

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia transplantável de origem epitelial maligna que cresce em várias linhagens de camundongos na forma ascítica, quando as células são inoculadas na cavidade peritoneal, e na forma sólida quando inoculadas por via subcutânea (FERREIRA et al., 2007). Na forma ascítica, desenvolve uma carcinomatose peritoneal com grande acúmulo de fluido no abdome e na forma sólida, por sua vez, apresenta-se como uma massa palpável e de consistência firme com extensas áreas de necrose (DAGLI, 1989; GUERRA, 1983; VIEIRA et al., 2010).

É um tumor espécie-específico e corresponde ao adenocarcinoma mamário de camundongos fêmeas que foi transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1906 (SILVA, 2003). Originalmente de crescimento sólido foi convertido na forma ascítica por Loewenthal & Jahn (1932), e desde então é estudado na forma sólida, ou na forma ascítica (EHRlich, 1906; KLEIN; KLEIN, 1960).

O tumor de Ehrlich apresenta células intensamente pleomórficas e anaplásicas, com relação núcleo-citoplasma elevada, núcleo com cromatina frouxa e nucléolos múltiplos e proeminentes. O índice mitótico é alto, com várias figuras de mitose atípicas. O estroma é constituído por fibras colágenas e delicados capilares. No tumor sólido, observam-se extensas áreas de necrose e hemorragia (PORTUGAL, 2012). Esse carcinoma apresenta rápido crescimento e um comportamento muito agressivo (BHATTACHARYA et al., 2011).

A agressividade deste carcinoma não depende do grau de hemorragia e não é alterada pela linhagem do camundongo onde é feito o repique, no entanto, cada linhagem reage de maneira específica, podendo apresentar maior ou menor tempo de sobrevida. Em camundongos Suíços, estudos demonstraram que o tumor de Ehrlich, quando inoculado na cavidade peritoneal, desencadeia uma resposta inflamatória local e ascite, gerando aumento da permeabilidade vascular que resulta na formação de edema, migração celular e formação progressiva do líquido ascítico (KODAMA et al., 1975; FECCHIO et al., 1990; NASCIMENTO et al., 2006).

O exame macroscópico da forma ascítica, depois de aproximadamente sete dias de implante na cavidade peritoneal, revela a presença de grande quantidade de

fluido discretamente viscoso e de aspecto leitoso. Após o décimo dia de inoculação intraperitoneal do tumor, cerca de 90% das células peritoneais são células tumorais (GUERRA, 1983; FECCHIO et al., 1990; SANTOS-BERGAMI, 2004). A formação do fluido ascítico é essencial para o crescimento do tumor, afinal seus constituintes servem de fonte nutricional para as células tumorais (FECCHIO et al., 1990; NASCIMENTO et al., 2006).

O líquido ascítico ou fluido ascítico existe em uma quantidade fisiológica mínima na cavidade peritoneal, no entanto, a quantidade anormalmente aumentada na cavidade abdominal, gerando o seu acúmulo, é denominado de ascite (KARCHER; PHERSON, 2011). A ascite é, portanto, definida como sendo o acúmulo deste líquido na cavidade peritoneal. Esse quadro ocorre devido a um aumento da pressão venosa, a qual se estende aos capilares do peritônio causando a transudação de líquido para o abdômen ou quando aumenta a pressão nos sinusoides hepáticos (de 5 a 10 mm/Hg) podendo haver a transudação pela própria superfície do fígado. Uma terceira causa de ascite pode ser a diminuição da pressão coloidosmótica do plasma, porém, muitas vezes as três causas podem estar envolvidas (HAUSBERGER et al., 2001).

Uma das vantagens da utilização deste modelo é a possibilidade da padronização do número de células a serem inoculadas nos animais, tanto para o crescimento na forma ascítica como sólida, uma vez que é possível obter conhecimento prévio da quantidade de células tumorais presentes no fluido ascítico a serem inoculados facilitando a quantificação destas células (quantificação do crescimento e regressão da massa tumoral), bem como o estudo da célula tumoral propriamente dita mostrando resultados precisos e reprodutíveis (DAGLI, 1989; MATSUZAKI, 2004; VENDRAMINI-COSTA et al., 2010).

Além da importância da avaliação da atividade antitumoral, como a maioria das drogas antineoplásicas tem índice terapêutico estreito, é de extrema importância a avaliação da toxicidade utilizando modelos experimentais *in vivo* (TALMADGE et al., 2007).

Para os estudos de toxicidade, as substâncias teste são tipicamente administradas pela via que se espera ser usada em humanos e desta forma, são conduzidos de maneira a aumentar gradativamente o tempo de utilização da substância, iniciando-se pelos estudos de toxicidade aguda. Quando esse esquema

é seguido, cada estudo desenvolvido provê informações úteis para um estudo de maior duração que venha a ser realizado subsequentemente (GAD, 2007; ANVISA, 2013).

Os estudos de toxicidade aguda são utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração. O guia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2013) recomenda a utilização de métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um menor número de animais, tais como os preconizados nos guias da OECD “Guidelines for Testing of Chemicals”, dentre estes o Guia de nº 423 (OECD, 2001).

Os estudos de toxicidade aguda da OECD geralmente estão baseados na administração da substância a um grupo de animais, e dependendo da taxa de sobrevivência desse grupo inicial, outros grupos são adicionados ao estudo recebendo doses maiores ou menores da substância teste. A sobrevivência dos animais e sinais gerais de toxicidade são observados durante um período pré-determinado de tempo por meio de um protocolo abrangente de observações e análise dos animais após a administração da substância. Os resultados de um estudo bem desenvolvido de toxicidade aguda podem ajudar a prever possíveis sinais de toxicidade e órgãos alvo quando os humanos são expostos às substâncias, ajudando a estabelecer categorias de risco e a seleção de doses a serem utilizadas em estudos clínicos (ALMEIDA, 2006; ANVISA, 2013).

Estudos pré-clínicos *in vivo* de novos candidatos a fármacos compreendem uma composição de diferentes parâmetros a serem avaliados, incluindo parâmetros bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos para avaliar possíveis sinais de toxicidade (BEZERRA et al., 2008; BEZERRA et al., 2009; GONZAGA et al., 2009; LINS et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010). Nesses estudos farmacológicos/toxicológicos, após exposição às drogas, são analisados parâmetros que avaliam possíveis alterações na função hepática, como as transaminases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); função renal, como ureia e creatinina, bem como nos parâmetros hematológicos como o eritrograma, leucograma e plaquetograma. Ainda, exames

anatomopatológicos (macro e microscópicos) são de extrema importância, pois analisam estrutura e função, em nível celular.

Dentre os ensaios de avaliação da toxicidade, a genética toxicológica ou genotoxicidade está incluída e visa o estudo dos processos que alteram a base genética da vida, quer seja na sua estrutura físico-química (DNA), processo classificado como mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético a níveis celulares e orgânicos, identificados, respectivamente, como carcinogênese e teratogênese (SILVA et al., 2003, SILVA et al., 2007; SAMPAI et al., 2012).

O ensaio de micronúcleo constitui um modelo *in vivo* para investigação da toxicidade genética utilizando medula óssea ou sangue periférico por meio da quantificação dos danos no DNA. A investigação de dano no DNA é de particular importância, uma vez que esses danos em células germinativas podem levar a mutações genéticas que são passadas para as gerações seguintes (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011; HINTZSCHE; RIESE; STOPPER, 2012; HAGIO et al., 2014). O dano no DNA da célula pode ocorrer pela exposição a agentes químicos ou físicos e então, fragmentos cromossômicos, chamados de micronúcleos, são observados como resultado de mitoses atípicas (ALMEIDA et al., 2015).

Esse teste baseia-se na detecção de substâncias genotóxicas que quebram os cromossomos ou que interferem na formação do fuso mitótico, alterando a distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular. O micronúcleo é um corpúsculo cromatínico adicional e separado do núcleo principal de uma célula durante a divisão celular constituído por cromossomos (aneugênese) ou seus fragmentos (clastogênese) que se atrasam em relação aos demais. Resulta de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou experimentais induzidas ou ainda, falhas no fuso celular, sendo, portanto, excluído dos novos núcleos formados por ocasião da telófase (ALBAS et al., 2014).

Diante deste contexto, o teste de micronúcleo é uma ferramenta amplamente utilizada para a pesquisa e investigação da segurança de inúmeras substâncias, classificando-as ou não como genotóxicas/mutagênicas e fornecendo resultados com forte suporte estatístico (ALBAS et al., 2014).

2.3 Derivados acridínicos e o N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida

Derivados de acridina foram recentemente investigados como intercalantes de DNA. Estas moléculas são caracterizadas pela presença de um sistema policíclico planar que apresenta três anéis e um ou dois grupos substituintes. Os derivados de acridina são relevantes no campo de desenvolvimento de medicamentos para estabelecer novos agentes quimioterapêuticos. A atividade biológica das acridinas tem sido atribuída a planaridade destas estruturas aromáticas, que pode intercalar na dupla cadeia de DNA, interferindo assim, com as funções celulares (BARROS et al., 2012; GHOSH et al., 2010; LAFAYETTE et al., 2013).

O DNA é o principal alvo de várias drogas antitumorais, e muitos destes agentes de direcionamento de DNA induzem alterações conformacionais no DNA, tais como dobramento e desenrolamento da dupla hélice. Estas mudanças de conformação podem ter efeitos diferentes em células. Eles podem desencadear a apoptose, resultado desejado no tratamento do câncer (EASTMAN, 1990 *apud* DUTTA et al., 2013).

Diante disto, os intercalantes de DNA estão entre os agentes terapêuticos mais importantes e promissores para o tratamento de muitas doenças, tais como o câncer. Apesar da falta de entendimento mecanicista detalhado do processo de intercalação no nível molecular, é conhecido que a interação de ligação entre as moléculas e os ácidos nucleicos leve a uma mudança significativa em suas estruturas e pode ter uma influência importante nas suas funções fisiológicas (NETO; LAPIS, 2009; MUKHERJEE et al., 2008; LAFAYETTE et al., 2013).

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

Os derivados da acridina possuem diversas atividades biológicas comprovadas (HARTWELL, 1946). Dentre eles, pode-se citar a amsacrina (m-AMSA), o derivado acridínico mais conhecido, que foi o primeiro inibidor de topoisomerase sintético aprovado para uso clínico como antineoplásico (BELMONT et al., 2007; KETRON et al., 2012). Ainda é utilizada no tratamento de leucemias agudas e linfomas, mas é ineficaz em tumores sólidos. No entanto, seu uso tem sido reduzido devido ao aparecimento de alguns fatores limitantes, como por exemplo, o aparecimento de efeitos colaterais, o desenvolvimento de resistência ao tratamento e sua baixa biodisponibilidade, fatores estes que influenciaram os químicos sintéticos a modificarem estruturalmente este composto e produzirem diferentes derivados que têm mostrado importante atividade antitumoral (SÁNCHEZ, 2006).

Dentre os derivados sintéticos da amsacrina foi obtido o N'-(2-cloro-6-metoxiacridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)acrilohidrazida (ACS-AZ10) (Figura 1), um análogo sintético inédito, que não apresenta nenhum relato na literatura de atividade farmacológica ou toxicidade.

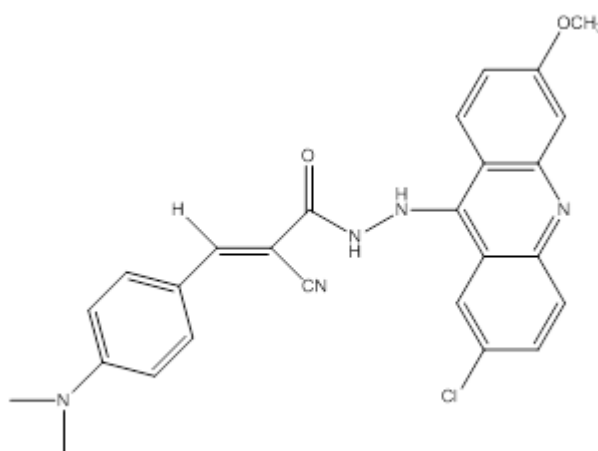


Figura 1 – Estrutura do N'-(2-cloro-6-metoxiacridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)acrilohidrazida (ACS-AZ10).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade e atividade antitumoral do derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (ACS-AZ10).

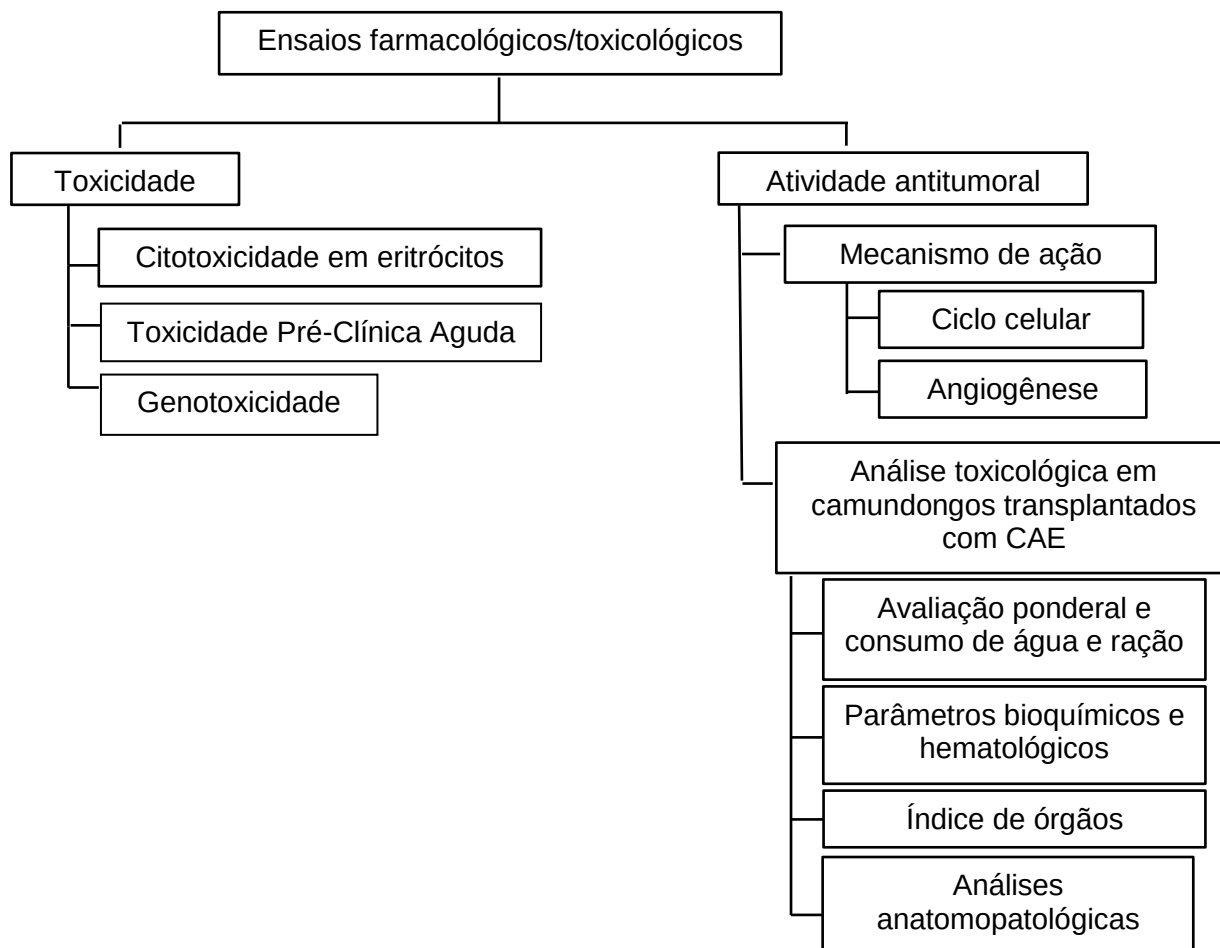
3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do ACS-AZ10 em eritrócitos de camundongos;
- Avaliar a toxicidade pré-clínica aguda do ACS-AZ10 em camundongos;
- Avaliar a genotoxicidade *in vivo* do ACS-AZ10;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do ACS-AZ10 frente células tumorais malignas de carcinoma de Ehrlich;
- Investigar possível mecanismo de ação do ACS-AZ10 por meio de estudos do ciclo celular;
- Avaliar o efeito antiangiogênico do ACS-AZ10;
- Avaliar o perfil de toxicidade *in vivo* do ACS-AZ10 após tratamento de doses repetidas em modelo de tumor de Ehrlich.

Material e Métodos

Os estudos toxicológicos e farmacológicos DO ACS-AZ10 foram realizados de acordo com o fluxograma abaixo.

Fluxograma 1 - Representação esquemática dos métodos utilizados para a avaliação da toxicidade e atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*.



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

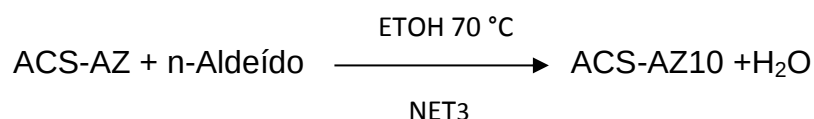
As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Oncofarmacologia (ONCOFAR) e no biotério Prof. Thomas George, ambos do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Material

4.2.1 Obtenção do ACS-AZ10

O ACS-AZ10 foi obtido por técnicas específicas, e gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura, do Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular da Universidade Estadual da Paraíba.

Para produção do ACS-AZ10, foi adicionado, em um balão de 100 mL, 20 mL de EtOH (etanol) e o produto de partida ACS-AZ. Após esse procedimento, foram adicionados o dimetilaminobenzaldeído e 10 mL de EtOH em agitação magnética em quantidades equimolares. Após essa etapa, foi adicionada a essa reação 20 gotas de trietilamina (NET3) e então a mistura foi colocada em agitação e refluxo de 70 °C por 12 horas, acompanhada por Cromatografia em Camada Delgada. Em seguida, o produto formado foi filtrado e os cristais lavados com etanol gelado por três vezes (5 mL).



O composto sintetizado teve suas características físico-químicas descritas por meio do cálculo do Fator de Retenção (RF) e Faixa de Fusão (FF) e sua estrutura foi elucidada por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN C^{13}) e

Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H^1). Além disso, foi calculado o rendimento de cada um dos compostos (Quadro 1).

Quadro1- Características físico-químicas do ACS-AZ e do derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (ACS-AZ10).

Código	Fator de Retenção (RF)	Faixa de Fusão (C°)	Rendimento (%)	Peso molecular	Estrutura molecular	Aparência
ACS-AZ	0,40	258-267	99%	340	C ₁₇ H ₁₃ O ₂ N ₄ Cl	Amarelo
ACS-AZ10	0,64	227-229	62,45	471	C ₂₆ H ₂₂ O ₂ N ₅ Cl	Laranja

4.2.2 Linhagem celular

Para os ensaios *in vivo* foi usada a linhagem de células de adenocarcinoma mamário de camundongo (Carcinoma ascítico de Ehrlich) mantidas na cavidade peritoneal de camundongos Swiss no Biotério Prof. Thomas George.

4.2.3 Animais

Camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, foram utilizados pesando entre 30 e 35 g, com faixa etária aproximada de 60 dias, obtidos do biotério Prof. Thomas George (IPeFarM/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C), com livre acesso à comida (*pellets* de ração da marca Purina®) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno, colocadas nas grades metálicas das gaiolas em sua parte superior. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de doze horas. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram mantidos no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFPB, sob a certidão Nº 0801/14.

4.3 Métodos

4.3.1 Citotoxicidade frente eritrócitos

Os ensaios para avaliação da citotoxicidade em eritrócitos foram realizados segundo Kang et al. (2009), com algumas modificações. Os eritrócitos foram obtidos de sangue de camundongos Swiss coletado do *sinus orbital*. A agulha foi heparinizada (heparina sódica - Parinex® - Hipolabor) para prevenir coagulação. Para obter a suspensão de eritrócitos, 1 mL de sangue total foi solubilizado em 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e então centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos. O plasma sobrenadante foi descartado e esse processo repetido duas vezes. Os eritrócitos foram finalmente ressuspensos em PBS, obtendo uma suspensão de eritrócitos a 0,5% (v/v) que foi utilizada para o ensaio de hemólise. ACS-AZ10 foi solubilizado em DMSO (5%) e preparado em PBS, no dobro das concentrações desejadas (até 1250 µg/mL). A cada 100 µL dessas soluções foi adicionado 100 µL da suspensão de eritrócitos, em quadruplicata. Os controles positivo e negativo foram também utilizados, pela incubação de eritrócitos em uma solução de 0,1% de Triton X-100 (Sigma- Aldrich®) em PBS (2 mL) e DMSO (5%) em PBS (2 mL), respectivamente. A placa de 96 poços foi mantida sob agitação suave por 60 minutos. Após esse período, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante cuidadosamente removido. Após a remoção, foi adicionado a cada poço 200 µL de solução de Triton X-100 (0,1%) e a placa foi cuidadosamente agitada. A quantidade de hemólise causada pela solução do Triton X-100 (0,1%) foi determinada espectrofotometricamente a 415 nm e serviu como prova inversa para determinação da CH₅₀ (concentração do que produz 50% de hemólise) do ACS-AZ10.

4.3.2 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

O ensaio de toxicidade aguda em camundongos foi realizado de acordo com o “Guidelines for Testing of Chemicals” nº 423 da OECD, com algumas modificações (OECD, 2001).

Camundongos, (n=3 fêmeas), incluindo o controle, foram submetidos a doses de 300 mg/kg ou 2000 mg/kg do ACS-AZ10 por via intraperitoneal (i.p.), e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (salina e tween 80 a 12%).

O nível de dose para ser usada como a dose de partida é selecionado a partir de um dos quatro níveis fixos, 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. Quando não existe qualquer informação sobre a substância a ser testada, por razões de proteção dos animais, recomenda-se a utilização de uma dose inicial de 300 mg/kg. Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL50 (dose responsável pela morte de 50% dos animais experimentais), todavia fornece uma estimativa do seu valor, bem como permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o “Globally Harmonized Classification System” - GHS.

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após a administração, foi realizada observação cuidadosa para se detectar sinais tóxicos de caráter geral nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; após 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental descrito por Almeida et al. (1999) (ANEXO A).

4.3.3 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE)

Células de CAE com cinco a sete dias de crescimento foram aspiradas da cavidade peritoneal de camundongos e implantadas por via intraperitoneal (0,5 mL - 4×10^6 células/mL) nos animais experimentais (DOLAI et al., 2012). Vinte e quatro horas após o implante, o ACS-AZ10 foi solubilizado em Tween 80 (12%) e administrado diariamente por via intraperitoneal (i.p.) a grupos de seis animais, nas doses de 7,5; 15 ou 30 mg/kg, por nove dias. 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) (Sigma-Aldrich®), 25 mg/kg, como droga padrão.

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

Para a avaliação do efeito antitumoral do ACS-AZ10, um dia após a última administração do tratamento descrito no item 4.3.3, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, o líquido ascítico foi coletado da cavidade peritoneal e o volume foi medido e expresso em mL. Uma alíquota foi retirada para a determinação da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão do azul de tripan. Para tanto, foram incubados volumes semelhantes de líquido ascítico e de uma solução de 0,4% do corante, seguido de análise das células em câmara de Neubauer. Este ensaio avalia a habilidade de células viáveis, com membrana plasmática intacta, excluírem o corante azul de tripan, permitindo assim, a quantificação dessas células (RENZI; VALTOLINA; FORSTER, 1993).

A massa do tumor foi determinada pela diferença dos pesos dos camundongos antes e depois da retirada do líquido ascítico e expresso em gramas (g). O total celular ($\times 10^7$ células) 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. Cálculo da massa do tumor: $M_T = P_A (g) - P_D (g)$ e total celular: $T_C = V_T (mL) \times V_C (\times 10^6/mL)$, onde:

M_T : massa do tumor (g);

P_A : peso dos camundongos antes da retirada do líquido ascítico;

P_D : peso dos camundongos depois da retirada do líquido ascítico;

T_C : total celular ($\times 10^7$ células);

V_T : volume do tumor (mL);

V_C : viabilidade celular ($\times 10^6$ /mL).

4.3.3.2 Análise do ciclo celular

Os animais transplantados com células de CAE foram tratados por nove dias com ACS-AZ10 conforme descrito no item 4.3.3. Um dia após a última administração, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e as células coletadas da cavidade peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos foram ressuspensas em solução de NaCl 0,9% (p/v) a fim de se obter uma concentração final de 1×10^6 células/mL. Para a análise do ciclo

celular, as suspensões celulares foram centrifugadas a 3000 rpm, por cinco minutos, o sobrenadante foi desprezado e a suspensão foi homogeneizada. Foram adicionados 300 µL da solução fluorocrômica hipotônica (HFS) [citrato de sódio 0,1% (p/v) e Triton X-100; 0,1% (p/v)] (Sigma-Aldrich® – T-8787, EUA), 50 µg/mL de Iodeto de Propídeo (PI) e água ultrapura (Milli-Q, volume final = 50 mL). Em seguida, a leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FacsCanto II, BD, EUA), adquirindo-se 10.000 eventos/amostra. Os dados foram obtidos com o software Diva e tratados no programa WinMDI versão 2.9.

4.3.3.3 Avaliação do efeito antiangiogênico

Os animais transplantados com células de CAE foram tratados por nove dias com ACS-AZ10 conforme descrito no item 4.3.3. No dia seguinte após a administração da última dose, os animais foram eutanasiados, 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 do software AVSOFT®. A microdensidade dos vasos foi determinada pela área ocupada por vasos sanguíneos dividido pela área total selecionada (AGRAWAL et al., 2011).

4.3.3.4 Avaliação da toxicidade em animais transplantados com células de CAE

4.3.3.4.1 Avaliação ponderal e do consumo de água e de ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos produzidos pelo tratamento com ACS-AZ10, os animais foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados os consumos de água e de ração.

4.3.3.4.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

No dia seguinte após a administração da última dose, após jejum de quatro horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg– i.p.), e amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada.

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

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se kits específicos para o analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (*Roche Diagnostic System*) e o analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter Vet* (Horiba ABX Diagnostics), respectivamente. As extensões sanguíneas foram coradas com coloração panótica e analisadas em microscópio óptico, para realização da contagem diferencial de leucócitos.

4.3.3.4.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Para o cálculo dos seus índices, os órgãos (timo, baço, fígado, rins e coração) foram extirpados, pesados e examinados macroscopicamente para investigação de mudanças de coloração, hemorragias ou outras alterações. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

4.3.3.4.4 Análises anatomopatológicas

Após a pesagem, os órgãos (fígado e rins) dos animais da dose de 30 mg/kg de ACS-AZ10 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, seguindo os métodos habituais. Em micrótomo rotativo semi-automático, os fragmentos tissulares emblocados em parafina, foram seccionados em espessura de 3,0 µm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e Tricrômico de

Masson, este último destinado ao estudo do tecido hepático. Em seguida foram examinados ao microscópio óptico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As análises histopatológicas foram realizadas com a colaboração da Profa. Dra. Karina Karla de Paula Medeiros do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

4.3.4 Avaliação da genotoxicidade

Para o ensaio do micronúcleo em sangue periférico, grupos de seis camundongos foram intraperitonealmente tratados com dose única de 2000 mg/kg do ACS-AZ10. 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 confecções 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 da frequência de eritrócitos micronucleados (OECD, 1997).

4.4 Análise estatística

Para os ensaios *in vitro* com eritrócitos, foram realizados três experimentos em triplicata. O valor de CH₅₀ foi calculado por meio da expressão dos resultados como uma porcentagem dos controles.

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

Para o ensaio do micronúcleo em sangue periférico foi utilizado teste *t-Student* com pós teste de Mamm-Whitney, onde os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.), sendo os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de camundongos

O ACS-AZ10 não provocou hemólise nas concentrações testadas (até 1250 µg/mL), portanto sua CH₅₀ foi considerada maior que 1000 µg/mL.

5.2 Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda

O tratamento de camundongos com 300 mg/kg do ACS-AZ10 não provocou mortes, enquanto que o tratamento com 2000 mg/kg induziu morte em apenas um animal experimental, como mostrado na Tabela 1. O valor de DL50 foi estimado, segundo o Guia n. 423 da OECD (ANEXO B), em torno de 2500 mg/kg e pela classificação GSH o ACS-AZ10 se enquadrou na categoria 5 (> 2000-5000).

Ainda, foram observados nos primeiros 15 minutos alguns efeitos característicos de alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) (Tabela 1), como contorções abdominais e abdução das patas do trem posterior nas duas doses testadas. Na dose de 300 mg/kg, foi observado ainda, efeitos do tipo estereotipia, e na maior dose (2000 mg/kg), foram observados também, efeitos depressores do SNC como ptose.

Tabela 1 - Efeitos da administração de doses únicas (i.p.) do derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida em camundongos.

Grupo		M/T	Efeitos comportamentais
Controle		0/3	Nenhum
ACS-AZ10 (300 mg/kg)	Experimento 1	0/3	Contorções abdominais, abdução das patas do trem posterior, estereotipia
	Experimento 2	0/3	Contorções abdominais, abdução das patas do trem posterior
ACS-AZ10 (2000 mg/kg)		1/3	Contorções abdominais, abdução das patas do trem posterior, ptose

M/T – morte/tratado

*Doses determinadas pelo Guia nº423 da OECD (OECD, 2001).

*Parâmetros avaliados segundo Almeida et al (1999).

*ACS-AZ10 (derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida)

5.3 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em modelo de CAE

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

Camundongos transplantados com tumor ascítico de Ehrlich foram tratados via intraperitoneal com ACS-AZ10 (7,5; 15 ou 30 mg/kg), por nove dias, para avaliação do seu efeito antitumoral *in vivo*.

Significante redução no volume tumoral foram observados nos grupos tratados com as doses de 15 mg/kg ($0,04 \pm 0,01$ mL; $p < 0,05$) ou 30 mg/kg ($0,04 \pm 0,01$ mL; $p < 0,05$) de ACS-AZ10, assim como o 5-FU ($0,01 \pm 0,01$ mL; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($12,07 \pm 0,48$ mL).

A massa tumoral também apresentou significativa redução após tratamento com ACS-AZ10 nas doses de 15 mg/kg ($1,95 \pm 0,11$ g; $p < 0,05$) ou 30 mg/kg ($2,80 \pm 0,24$ g; $p < 0,05$), bem como após tratamento com o 5-FU ($1,78 \pm 0,23$ g; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($13,50 \pm 0,78$ g).

O terceiro parâmetro avaliado, a viabilidade celular, também mostrou diminuição significativa nas doses de 15 mg/kg ($11,25 \pm 8,92 \times 10^6$ células/mL; $p < 0,05$) ou 30 mg/kg ($2,83 \pm 0,93 \times 10^6$ células/mL; $p < 0,05$) de ACS-AZ10, assim

como o 5-FU ($0,27 \pm 0,07 \times 10^6$ células/mL; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($129,30 \pm 13,15 \times 10^6$ células/mL).

Por fim, o total celular também mostrou diminuição significativa nas doses de 15 mg/kg ($0,04 \pm 0,03 \times 10^7$ células; $p < 0,05$) ou 30 mg/kg ($0,03 \pm 0,02 \times 10^7$ células; $p < 0,05$) de ACS-AZ10, bem como o 5-FU ($0,03 \pm 0,01 \times 10^7$ células; $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle ($134,50 \pm 24 \times 10^7$ células; $p < 0,05$) (Tabela 2).

O tratamento com a dose de 7,5 mg/kg de ACS-AZ10 não induziu redução significativa nos parâmetros avaliados.

Tabela 2 - Efeitos do tratamento do derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida e 5-Fluorouracil no volume e massa tumoral, viabilidade celular e total celular em camundongos transplantados com CAE.

Grupos	Dose (mg/kg)	Volume tumoral (mL)	Massa tumoral (g)	Viabilidade celular ($\times 10^6$ cél./mL)	Total Celular ($\times 10^7$)
Controle	-	$12,07 \pm 0,48$	$13,50 \pm 0,78$	$129,30 \pm 13,15$	$134,50 \pm 24,33$
5-FU	25	$0,01 \pm 0,01^a$	$1,78 \pm 0,23^a$	$0,27 \pm 0,07^a$	$0,03 \pm 0,01^a$
ACS-AZ10	7,5	$10,10 \pm 1,09$	$12,82 \pm 1,08$	$99,06 \pm 10,52$	$87,13 \pm 10,03$
ACS-AZ10	15	$0,04 \pm 0,01^a$	$1,95 \pm 0,11^a$	$11,25 \pm 8,92^a$	$0,04 \pm 0,03^a$
ACS-AZ10	30	$0,04 \pm 0,01^a$	$2,80 \pm 0,24^a$	$2,83 \pm 0,93^a$	$0,03 \pm 0,02^a$

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais.

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

*ACS-AZ10 (derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida).

*5-FU (5-Fluorouracil)

5.3.2 Análise do ciclo celular

O tratamento de nove dias com ACS-AZ10 induziu alterações significativas na distribuição das células de CAE nas diferentes fases do ciclo celular (Gráfico 1).

O tratamento com a dose de 7,5 mg/kg de ACS-AZ10 induziu um aumento na percentagem de células na fase sub-G1 para 9,2% com consequente diminuição na percentagem de células na fase G0/G1 para 34,2% quando comparado ao grupo controle (1,9% e 47,7%, respectivamente). Já o tratamento com a dose de 15 mg/kg de ACS-AZ10 levou a uma diminuição na percentagem de células na fase G0/G1 (37,7%) e um aumento da percentagem de células na fase G2/M (23,5%) quando comparado ao grupo controle (47,7% e 17,7%, respectivamente).

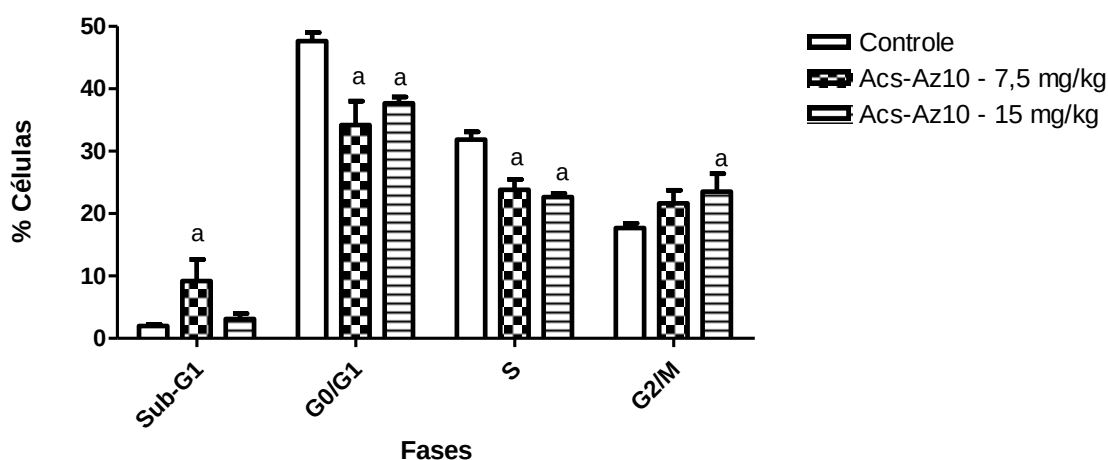


Gráfico 1 – Percentagem de células de CAE nas fases do ciclo celular após tratamento com solução 12% tween 80 (controle) e do derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (7,5 ou 15 mg/kg). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5.3.3 Angiogênese peritoneal

A microdensidade vascular peritumoral foi quantificada no grupo controle e nos grupos submetidos ao tratamento com ACS-AZ10 nas doses de 7,5 mg/kg ou 15 mg/kg. Uma redução na microdensidade dos vasos foi observada nos grupos tratados com ACS-AZ10 ($19,3 \pm 6,8\%$; $p < 0,05$ e $19,4 \pm 6,2\%$; $p < 0,05$ para as doses de 7,5 mg/kg e 15 mg/kg, respectivamente), assim como no grupo tratado com a droga padrão ($8,0 \pm 2,1\%$; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($75,3 \pm 13,9\%$) (Figura 2).

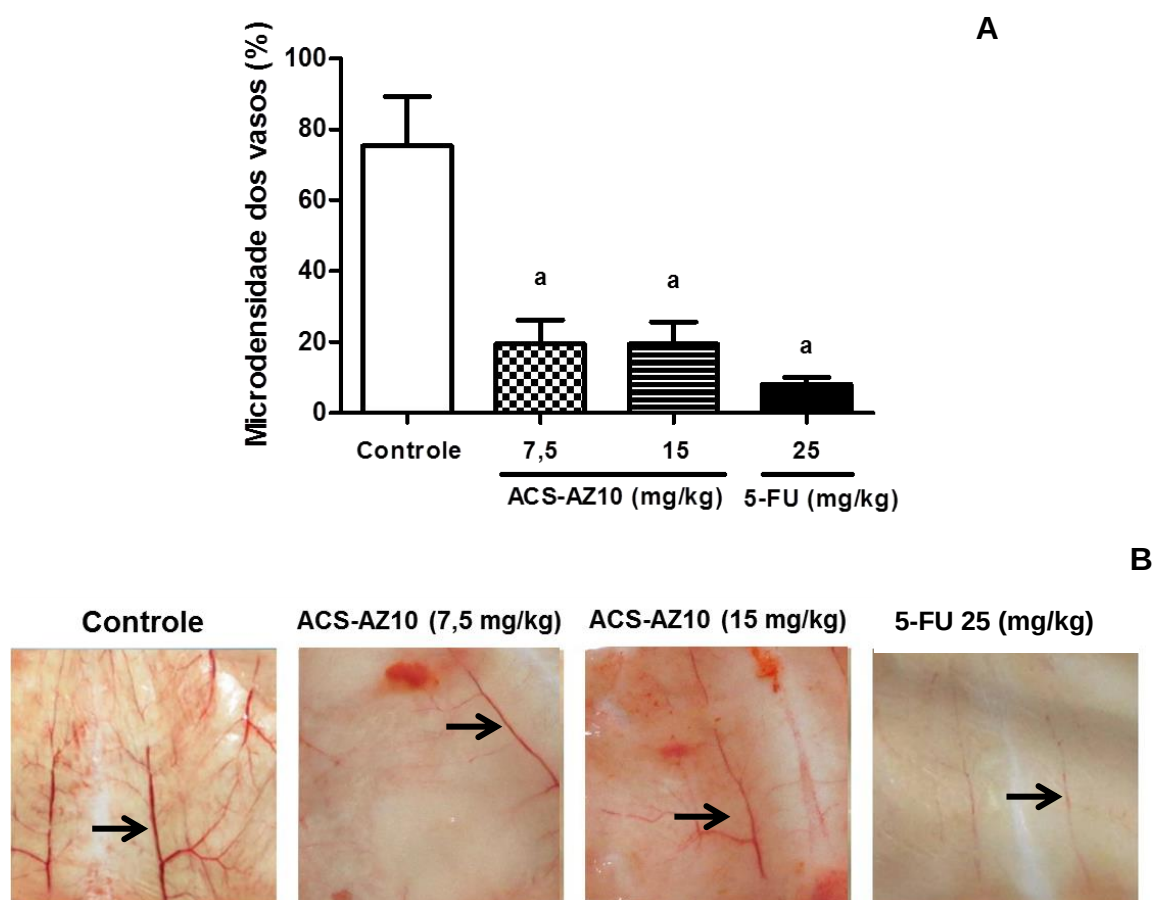


Figura 2 - Efeito do tratamento com o derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (ACS-AZ10) e 5-Fluorouracil (5-FU) na microdensidade dos vasos peritoneais de camundongos transplantados com CAE. A: Microdensidade dos vasos. Determinado pela área ocupada por vasos sanguíneos dividido pela área total selecionada. B: Membrana peritoneal dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais analisado por ANOVA seguido de Dunnett. ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

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

5.3.4.1 Avaliação ponderal e consumo de água e de ração

Na tabela 3 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e de ração, avaliados durante os nove dias de tratamento com ACS-AZ10, bem como a evolução ponderal dos animais.

De acordo com os resultados obtidos, não foram observadas alterações significativas do consumo de água e de ração por parte dos animais tratados com as doses de 7,5; 15 e 30 mg/kg de ACS-AZ10, bem como dos animais tratados com 5-FU, quando comparados ao grupo controle.

Em relação ao peso corporal, ao serem avaliados os animais após a retirada/drenagem do volume de tumor ascítico residual, foi verificada uma diminuição significativa desse parâmetro nos animais tratados com o 5-FU ($26,04 \pm 0,87$ g; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($30,01 \pm 0,76$ g). Todavia, os tratamentos com as diferentes doses de ACS-AZ10 não induziram alteração significativa na evolução ponderal dos animais.

Tabela 3 - Consumo de água e de ração, e evolução ponderal de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução 12% tween 80 (controle), derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (7,5, 15 e 30 mg/kg) e 5-Fluorouracil (25 mg/kg).

Grupos	Dose (mg/kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	-	$45,00 \pm 1,29$	$31,46 \pm 2,60$	$31,92 \pm 0,47$	$30,01 \pm 0,76$
5-FU	25	$38,75 \pm 1,57$	$25,89 \pm 2,24$	$31,73 \pm 0,98$	$26,04 \pm 0,87^a$
ACS-AZ10	7,5	$38,57 \pm 0,92$	$27,91 \pm 2,25$	$31,07 \pm 0,63$	$28,15 \pm 1,20$
ACS-AZ10	15	$41,25 \pm 1,25$	$35,04 \pm 3,08$	$31,47 \pm 1,26$	$30,48 \pm 0,74^b$
ACS-AZ10	30	$45,00 \pm 2,99$	$24,98 \pm 2,26$	$32,30 \pm 1,02$	$29,74 \pm 0,47$

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais

^a $p < 0,05$ comparado ao controle ANOVA seguido de Tukey

^b $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com 25 mg/kg do 5-FU por ANOVA seguido de Tukey.

*ACS-AZ10 (derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida).

*5-FU (5-Fluorouracil)

5.3.4.2 Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos

A análise toxicológica dos efeitos de ACS-AZ10 incluiu também a avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Observou-se um aumento significativo

na atividade da enzima hepática ALT no grupo tratado com a dose de 15 mg/kg de ACS-AZ10 ($66,50 \pm 6,36$ U/L; $p < 0,05$), em comparação ao controle ($37,00 \pm 8,26$ U/L) (Tabela 4).

Em relação à função renal, não foram observadas alterações significativas para os parâmetros ureia e creatinina em nenhum dos grupos tratados com ACS-AZ10 ou com a droga padrão (5-FU).

Tabela 4- Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução 12% tween 80 (controle), derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (7,5, 15 e 30 mg/kg) e 5-Fluorouracil (25 mg/kg)

Grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
*Parâmetros Normais	-	70 - 400	25 - 100	15 - 40	0,2 – 0,6
Controle	-	$175,4 \pm 15,30$	$37,00 \pm 8,26$	$28,00 \pm 5,48$	$0,29 \pm 0,03$
5-FU	25	$166,7 \pm 17,01$	$44,50 \pm 7,33$	$33,15 \pm 4,09$	$0,27 \pm 0,01$
ACS-AZ10	7,5	$135,7 \pm 24,56$	$16,83 \pm 5,76$	$40,43 \pm 6,11$	$0,26 \pm 0,07$
ACS-AZ10	15	$211,5 \pm 14,28$	$66,50 \pm 6,36^a$	$42,08 \pm 4,32$	$0,26 \pm 0,01$
ACS-AZ10	30	$193,0 \pm 11,45$	$49,80 \pm 5,16$	$37,10 \pm 1,94$	$0,27 \pm 0,02$

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

*Parâmetros bioquímicos normais de camundongos fêmeas (GAD, 2007).

*ACS-AZ10 (derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida).

*5-FU (5-Fluorouracil)

No que diz respeito à avaliação hematológica não foram observadas alterações significantes na contagem total de hemácias, na concentração de hemoglobina e nos valores do hematócrito dos grupos tratados com ACS-AZ10 ou com a droga padrão (5-FU) quando comparados ao grupo controle (Tabela 5). Em relação aos parâmetros hematimétricos, também não foram observadas alterações

significantes nos parâmetros avaliados representados pelo Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média (CHCM) das hemácias nos grupos tratados com ACS-AZ10 ou com a droga padrão (5-FU) quando comparados ao grupo controle (Tabela 5).

Em relação à contagem total de leucócitos, não foram observadas alterações significativas nos grupos tratados com ACS-AZ10 ou no grupo tratado com a droga padrão (Tabela 5). Na contagem diferencial de leucócitos, foi observada redução significativa na percentagem de linfócitos ($31,33 \pm 5,18\%$; $p < 0,05$) no grupo tratado com a dose de 7,5 mg/kg, quando comparado ao grupo controle ($54,13 \pm 5,52$) e diminuição significativa na percentagem de neutrófilos nos grupos tratados com as doses de 15 mg/kg ($25,00 \pm 4,04\%$; $p < 0,05$) e 30 mg/kg ($23,00 \pm 3,52\%$; $p < 0,05$) de ACS-AZ10, quando comparado ao grupo controle ($43,70 \pm 4,78\%$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Tabela 5 - Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução 12% tween 80 (controle), derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (7,5, 15 e 30 mg/kg) e 5-Fluorouracil (25 mg/kg).

Parâmetro	*Parâmetros normais	Controle	5-FU 25 mg/kg	ACS-AZ10 7,5 mg/kg	ACS-AZ10 15 mg/kg	ACS-AZ10 30 mg/kg
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	5,7 – 9,0	8,37 $\pm$ 0,15	7,54 $\pm$ 0,43	8,44 $\pm$ 0,35	8,11 $\pm$ 0,33	7,84 $\pm$ 0,35
Hemoglobina (g/dL)	14,5 – 17,5	14,08 $\pm$ 0,44	12,10 $\pm$ 0,78	12,65 $\pm$ 0,28	13,30 $\pm$ 0,46	12,42 $\pm$ 0,19
Hematócrito (%)	45 – 57	44,25 $\pm$ 1,04	39,93 $\pm$ 2,13	43,40 $\pm$ 1,26	44,27 $\pm$ 1,88	42,26 $\pm$ 0,59
VCM (fm^3)	45–55	52,84 $\pm$ 0,66	53,10 $\pm$ 1,23	53,55 $\pm$ 0,91	54,58 $\pm$ 0,78	54,20 $\pm$ 1,84
HCM (pg)	13–16	15,36 $\pm$ 0,36	16,13 $\pm$ 0,77	15,63 $\pm$ 0,29	16,47 $\pm$ 0,25	15,96 $\pm$ 0,75
CHCM (g/dL)	29–34	28,85 $\pm$ 0,38	30,30 $\pm$ 0,87	29,20 $\pm$ 0,31	30,10 $\pm$ 0,51	29,42 $\pm$ 0,64
Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	2,0 –11,5	12,26 $\pm$ 1,35	13,53 $\pm$ 2,22	12,98 $\pm$ 1,26	10,44 $\pm$ 1,09	12,86 $\pm$ 1,19
Linfócitos (%)	60 - 90	54,13 $\pm$ 5,52	57,17 $\pm$ 3,86	31,33 $\pm$ 5,18 ^{a,b}	70,67 $\pm$ 4,63	72,20 $\pm$ 3,63
Neutrófilos (%)	10 - 40	43,70 $\pm$ 4,78	37,67 $\pm$ 3,83	57,50 $\pm$ 4,92 ^b	25,00 $\pm$ 4,04 ^a	23,00 $\pm$ 3,52 ^a
Monócitos (%)	0 - 6	4,60 $\pm$ 0,60	4,83 $\pm$ 0,87	4,83 $\pm$ 0,91	4,20 $\pm$ 0,49	4,00 $\pm$ 0,84
c	0 - 5	0,91 $\pm$ 0,29	0,33 $\pm$ 0,21	1,20 $\pm$ 0,58	0,67 $\pm$ 0,33	0,80 $\pm$ 0,37

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais e comparado ao controle por ANOVA seguido de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado com grupo 5-FU.

*Parâmetros bioquímicos normais de camundongos fêmeas (GAD, 2007).

*ACS-AZ10 (derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida).

*5-FU (5-Fluorouracil)

5.3.4.3 Avaliação dos índices dos órgãos

Na Tabela 6 estão expressos os valores referentes aos índices dos órgãos dos animais após nove dias de tratamento com ACS-AZ10.

Nenhuma alteração significativa nos índices de fígado, rins e baço foi observada entre os grupos de animais tratados com ACS-AZ10 nas doses avaliadas quando comparados ao grupo controle.

Houve um aumento significativo no índice do coração nos animais do grupo tratado com 15 mg/kg de ACS-AZ10 ($4,47 \pm 0,11$ mg/g; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle ($3,48 \pm 0,29$ mg/g). Uma diminuição significativa no índice do timo também foi observada nos animais do grupo tratado com a droga padrão (25 mg/kg) ($1,31 \pm 0,27$ mg/g; $p < 0,05$) em comparação ao grupo controle ($3,42 \pm 0,60$ mg/g).

Tabela 6 - Índices dos órgãos de camundongos transplantados com CAE após tratamento com solução 12% tween 80 (controle), derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida (7,5, 15 e 30 mg/kg) e 5-Fluorouracil (25 mg/kg).

Grupos	Dose (mg/kg)	Índice de coração (mg/g)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)	Índice de timo (mg/g)	Índice de baço (mg/g)
Controle	-	$3,48 \pm 0,29$	$62,14 \pm 2,82$	$9,90 \pm 0,63$	$3,42 \pm 0,60$	$4,79 \pm 0,76$
5-FU	25	$4,07 \pm 0,12$	$56,70 \pm 2,01$	$10,91 \pm 0,47$	$1,31 \pm 0,27^a$	$3,74 \pm 0,48$
ACS-AZ10	7,5	$4,29 \pm 0,24$	$71,27 \pm 1,96^b$	$11,35 \pm 0,42$	$3,38 \pm 0,38^b$	$4,28 \pm 0,73$
ACS-AZ10	15	$4,47 \pm 0,11^a$	$58,23 \pm 1,14$	$11,59 \pm 0,71$	$3,47 \pm 0,66^b$	$7,11 \pm 0,26^b$
ACS-AZ10	30	$4,29 \pm 0,25$	$55,29 \pm 7,43$	$12,08 \pm 1,14$	$2,02 \pm 0,16$	$7,34 \pm 0,84^b$

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de seis animais.

^a $p < 0,05$ comparado ao controle transplantado por ANOVA seguido de Tukey.

^b $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com 25 mg/kg do 5-FU por ANOVA seguido de Tukey.

*ACS-AZ10 (derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida).

*5-FU (5-Fluorouracil)

5.3.4.4 Análises anatomopatológicas

Para avaliação mais detalhada dos possíveis efeitos tóxicos do ACS-AZ10 sobre os órgãos dos animais tratados, foi realizada uma avaliação histopatológica especificamente nos rins e fígado.

Os rins removidos dos animais transplantados com CAE dos grupos controle e tratados com 5-FU (25 mg/kg) ou ACS-AZ10 (30 mg/kg), apresentaram-se dentro dos limites de normalidade histológica com arquitetura glomerular e tubular preservada. Os glomérulos (corpúsculo de Malpighi) estavam preservados, inclusive numericamente, envolvidos por fina cápsula de Bowman, e o tufo capilar sustentado por delicado mesângio (Figura 2A), fazendo relação com a arteríola renal e túbulos contorcidos proximais (Figura 2B). Em relação, a dose de 30 mg/kg de ACS-AZ10, no menor aumento (100x) pode-se observar as distintas zonas renais pela nítida diferença de coloração e distribuição de estruturas tubulares. O córtex, mais interno, fortemente eosinofílico pela abundância de túbulos contorcidos proximais e corpúsculos renais e a medula, mais externa, de coloração menos intensa, devido ao grande número de túbulos coletores com lúmens mais amplos (Figura 2C). No maior aumento (400x) pode-se observar com mais detalhes todas as estruturas presentes nestas duas zonas renais. Os glomérulos apresentam-se bem distribuídos e uniformes, envolvidos por fina cápsula de Bowman e tufo capilar sustentado por delicado mesângio. Os túbulos contorcidos proximais abundantes, próximos aos glomérulos, apresentavam epitélio cúbico preservado e citoplasma fortemente eosinofílico que diferenciava-se dos túbulos contorcidos distais, com menor eosinofilia citoplasmática e lúmen mais amplo (Figura 2D). Os túbulos coletores com lúmen bem visíveis apresentaram epitélio simples cúbico a colunar baixo distribuídos entre os segmentos delgado e espesso da alça de Henle e diversos capilares sanguíneos (Figura 2E). O único achado histopatológico foi a presença de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário em áreas isoladas (Figura 2F), mas características de dano renal como necrose tubular e glomerulonefrite não foram encontrados.

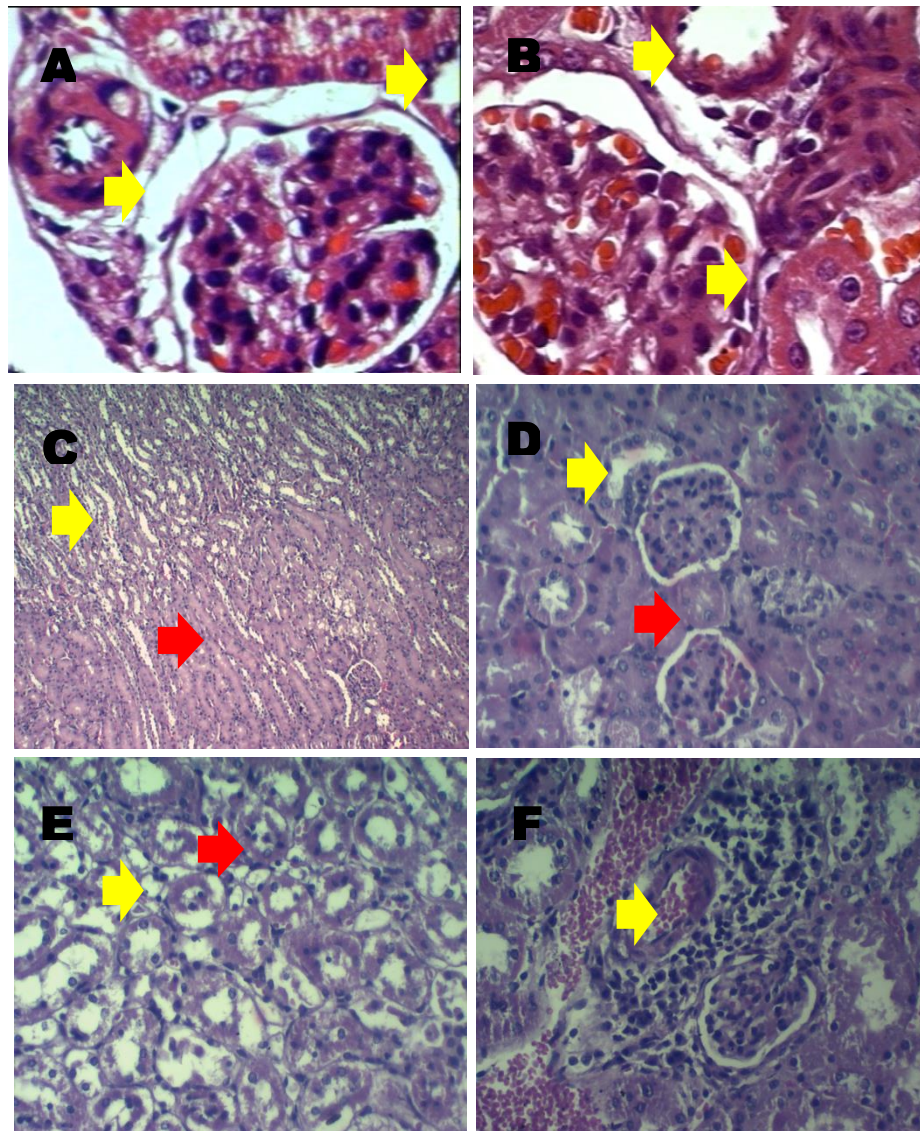


Figura 3 – Figuras representativas da histopatologia dos rins dos diferentes grupos experimentais: (A) Controle transplantado - Glomérulo preservado envolvido por cápsula de Bowman com tufo capilar sustentado por delicado mesângio; (B) 5-FU (25 mg/kg) - Glomérulo preservado envolvido por cápsula de Bowman com tufo capilar sustentado por delicado mesângio e sua relação com arteríola renal e túbulos contorcidos proximais. (C) ACS-AZ10 (30 mg/kg) – Zona cortical (seta amarela) e medular(seta vermelha) (HE 10x); (D) ACS-AZ10 (30 mg/kg) - Glomérulo de Malpighi, túbulo contorcido proximal (seta vermelha) e distal (seta amarela) (HE 400x); (E) ACS-AZ10 (30 mg/kg) - Zona medular - Alças de Henle (seta vermelha) e túbulos coletores (seta amarela) (HE 400x); e (F) ACS-AZ10 (30 mg/kg) - Infiltrado inflamatório perivascular (HE 400x).

Ao exame microscópico, os fígados dos animais do grupo controle transplantado apresentaram arquitetura do tipo lobular normal, com veias hepáticas terminais de paredes finas, presença de inflamação sinusoidal leve e ausência de

fibrose lobular (Figura 3A). No seio do lóbulo, identificou-se discreto infiltrado inflamatório linfohistiocítico, em raros focos. Os hepatócitos estavam normais, isomorfos e apresentavam necrose focal, além de estarem circundados por agregados linfo-histiocitários, em raros sítios. Os raros focos de necrose parenquimatosa são vistos nas zonas III (Figura 3B). Não foram observadas atividades periportal e perisseptal.

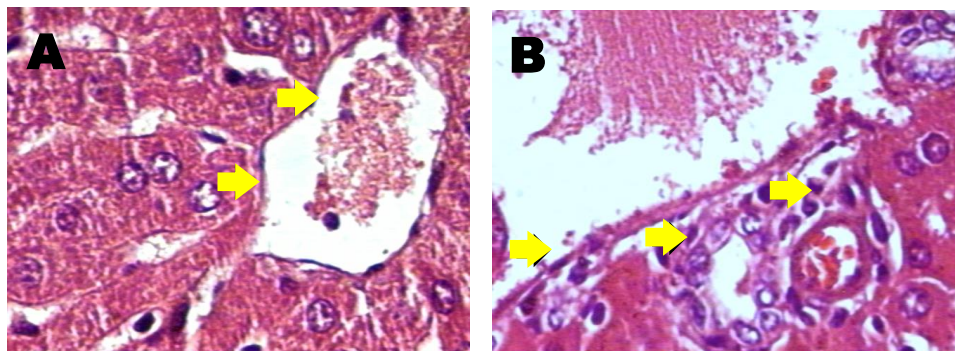


Figura 4 - Figuras representativas da histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais: (A) Controle transplantado – Veia hepática terminal com parede fina e permeável aos sinusóides; (B) Controle transplantado – Infiltrado linfo-histiocitário na zona III; Hematoxilina-eosina (400 x).

Ao exame microscópico, os fígados dos animais tratados com ACS-AZ10 na dose de 30 mg/kg apresentaram alterações histológicas, reacionais, focais, mínimas. Os hepatócitos isomorfos encontravam-se organizados em cordões, direcionados para as veias hepáticas centrolobulares, e entre estes cordões, os sinusóides hepáticos, de paredes delgadas. Os espaços portais encontravam-se regularmente distribuídos, cuja matriz apresentava a tríade portal de Glisson composta de um ramo da artéria hepática, um ramo da veia porta e um ducto biliar (Figura 4A). Em maior aumento pode-se observar a morfologia poligonal típica dos hepatócitos com núcleo evidente, mas em algumas áreas pode-se observar hepatócitos acidófilos isolados característicos de necrose coagulativa (Figura 4B).

Em algumas áreas foram observados infiltrados inflamatórios linfo-histiocitário perivascular e subcapsular acompanhado de hiperplasia de células de kupffer e congestão venosa (Figuras 4C e 4D).

Nas lâminas coradas com tricrômio de masson pode-se confirmar a ausência de fibrose no espaço subcapsular e na tríade portal que apresentava discreta coloração azulada devido à presença de fibras colágenas característico da capsula e da parede vascular (Figura 4E).

Foram observadas para os animais tratados com o 5-FU, além das características descritas acima, atividade periportal e perisseptal com discreta necrose em “saca-bocado” (pequenas áreas em poucos espaços portais) (Figura 4F), atividade parenquimatosa com necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários, em numerosos sítios (Figura 5G), e fenômenos hepatocelulares de poliploidia (Figura 4H).

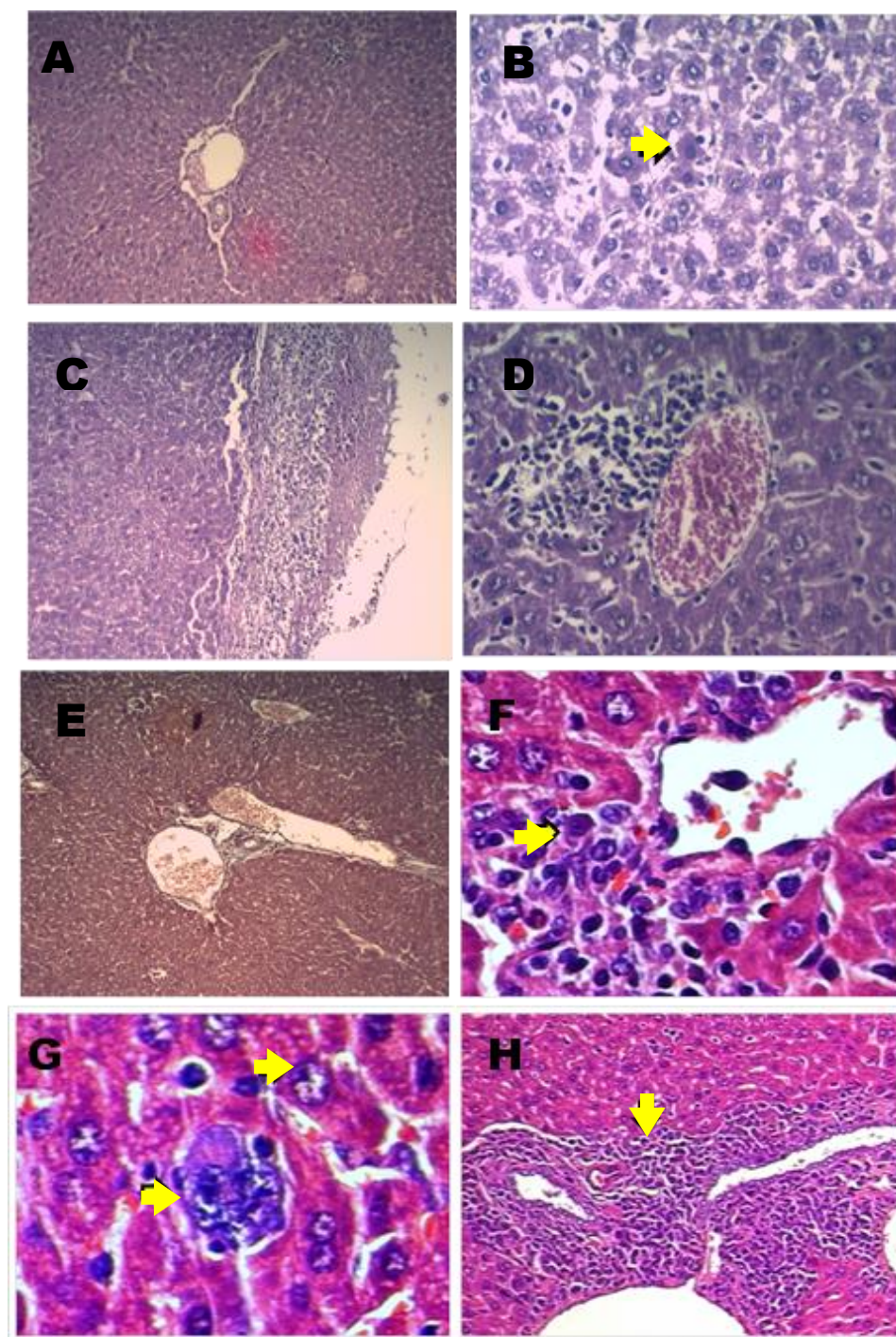


Figura 5 - Figuras representativas da histopatologia dos fígados dos diferentes grupos experimentais: (A) ACS-AZ10 (30 mg/kg) – Arquitetura Hepática preservada com espaço porta e cordões hepáticos (HE 100 x); (B) ACS-AZ10 (30 mg/kg) – Hepatócitos eosinofílicos isolados (HE 400x); (C) ACS-AZ10 (30 mg/kg) – Infiltrado inflamatório subcapsular (HE 100x); (D) ACS-AZ10 (30 mg/kg) - perivascular e congestão venosa (HE 400x); (E) ACS-AZ10 (30 mg/kg) - Espaço porta (Tricrômico de masson 100x); (F) - 5-FU (25 mg/kg) - Discreta necrose em “saca- bocado” (G) 5-FU (25 mg/kg) – Regeneração hepatocelular poliploide; (H) 5-FU (25 mg/kg) – Portite linfoistiocitária em nível moderado comprometendo o espaço portal, HE (100 ou 400 x).

5.4 Avaliação da genotoxicidade

Para avaliar o possível efeito genotóxico *in vivo* do ACS-AZ10 foi realizado o ensaio do micronúcleo, cujo resultado é apresentado abaixo, na Tabela 7. O tratamento dos animais com dose única de 2000 mg/kg do ACS-AZ10 não induziu aumento na frequência de eritrócitos micronucleados no sangue periférico quando comparados ao grupo controle (12% de Tween 80).

Tabela 7 - Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com o derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida e ciclofosfamida (i.p.), após 48 horas do tratamento.

Grupos	Dose (mg/kg)	Número de células micronucleadas
Controle	-	4,00 ± 0,52
Ciclofosfamida	50	14,50 ± 2,60 ^a
ACS-AZ10	2000	3,25 ± 0,75

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado aos pares por teste T de Student (Mann-Whitney). ^a $p < 0,05$ comparado ao controle.

*ACS-AZ10 (derivado acridínico N'-(2-cloro-6-metoxi-acridin-9-yl)-2-ciano-3-(4-dimetilaminofenil)-acrilohidrazida).

Discussão

6 DISCUSSÃO

O câncer é uma doença complexa e de alta incidência no mundo, sendo considerado um problema de saúde pública (ZHANG et al., 2014; CAVALINI; CRUZ; SILVA, 2012). Diante disto, as pesquisas relacionadas às neoplasias malignas tornam-se cada vez mais intensas. No tratamento do câncer, a quimioterapia é usada para impedir ou diminuir o crescimento de células cancerosas que se dividem rapidamente, prolongando assim, a vida dos pacientes. Estudos recentes mostram avanços na detecção e tratamento do câncer, permitindo um aumento no número de pacientes que vivem com esta doença (MCALPINE et al., 2014).

No entanto, um dos maiores obstáculos para o sucesso da quimioterapia no tratamento de alguns tipos de neoplasias é o desenvolvimento, por parte das células tumorais, do fenômeno de resistência aos fármacos utilizados (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010). Além do fenômeno de resistência às drogas, a toxicidade observada em decorrência dos tratamentos faz da pesquisa por diferentes estratégias quimioterápicas uma busca incessante (CALGAROTTO et al., 2012).

Diante deste contexto, os derivados da acridina vêm sendo amplamente estudados em todo o mundo, apresentando uma grande diversidade de atividades biológicas, dentre elas, atividade antiproliferativa com resultados promissores, o que tem despertado grande interesse dos centros de pesquisa, tendo a m-AMSA como derivado acridínico mais conhecido e utilizado atualmente na clínica como antineoplásico (LAFAYETTE et al., 2013).

Desta forma, para investigar o potencial do derivado acridínico ACS-AZ10, um análogo sintético inédito da m-AMSA, na terapia anticâncer, bem como sua toxicidade, o presente trabalho investigou a toxicidade *in vitro*, por meio da avaliação da atividade citotóxica em eritrócitos de sangue periférico de camundongos Swiss.

Os eritrócitos são células sanguíneas desprovidas de organelas, e certos fatores químicos como substâncias (Espécies Reativas de Oxigênio- ERO) podem provocar a sua morte por induzir a ruptura imediata da membrana, com consequente liberação de hemoglobina (Hb), processo denominado de hemólise (FÖLLER et al., 2013).

Os eritrócitos representam o tipo de célula mais abundante no corpo de um mamífero e é possível inferir que a estabilidade mecânica de sua membrana é um

indicador para avaliação da citotoxicidade de uma droga em estudo frente células não tumorais do organismo, fornecendo por meio de seus resultados, indícios para uma possível toxicidade *in vivo* (SILVA, 2007; FÖLLER et al., 2013).

A investigação da citotoxicidade em linhagens não tumorais é importante, tendo em vista que, se o tecido sadio e o tumoral exibirem sensibilidade similar ao medicamento, não haverá janela terapêutica e, na concentração em que o tumor responder, a célula hígida responderá também e o tecido será danificado (HOFMANN, 2008). Diante disto, a investigação de citotoxicidade em eritrócitos deve ser realizada uma vez que, os antineoplásicos podem produzir anemia não apenas pelo efeito mielossupressor na medula óssea, mas também pelo efeito hemolítico direto no sangue (NIU; MIMS, 2012).

Considerando que não foi observado efeito hemolítico até a maior concentração testada (1250 µg/mL), pode-se inferir que o ACS-AZ10 apresentou baixo efeito citotóxico contra eritrócitos. Tal atividade corrobora com resultados da literatura, uma vez que estudos indicam que alguns derivados acridínicos apresentam baixo efeito citotóxico contra eritrócitos (ROOPAN; KHAN, 2011).

Para a determinação de doses seguras a serem usadas no teste de avaliação da atividade antitumoral *in vivo* em camundongos, foi realizado inicialmente o ensaio de toxicidade pré-clínica aguda na mesma espécie animal.

Com base nos resultados obtidos, ACS-AZ10 pode ser considerada uma substância de baixa toxicidade nas condições experimentais avaliadas, uma vez que a DL_{50} foi estimada em um valor acima de 2000 mg/kg (ROSIDAH et al., 2009; MAHMOOD et al., 2010; ALGARIRI et al., 2014). Esses dados diferem de alguns dados da literatura que mostram que derivados acridínicos são considerados tóxicos após a avaliação de sua toxicidade aguda. Como exemplo, pode-se citar o Bis (7)-tacrina (1,7-N-heptileno-bis-9,9'-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina), análogo da tacrina (9-amino-1,2,3,4 -tetrahidroaminoacridina), que é um inibidor de segunda geração da acetilcolina, é considerado tóxico pelos resultados do ensaio de toxicidade aguda (PAN et al., 2007).

A baixa toxicidade do ACS-AZ10 é corroborada pelo fato de que nos experimentos realizados os efeitos característicos de alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) como contorções abdominais e abdução das patas do trem posterior

nas duas doses testadas, foram considerados sem importância clínica, pois desapareceram após 30 minutos da administração.

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 (ODEGHE; UWAKWE; MONAGO, 2012; AMELO; NAGPAL; MAKONNEN, 2014). Isso justifica desta forma a escolha das doses utilizadas para os experimentos de atividade antitumoral *in vivo*.

Para os ensaios *in vivo*, foi utilizada a linhagem de Carcinoma ascítico de Ehrlich, um tumor murino que tem se mostrado um excelente modelo de neoplasia experimental. Trata-se de neoplasia transplantável de origem epitelial maligna, e corresponde ao adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea, (SILVA, 2003; PORTUGAL, 2012).

Os resultados obtidos no ensaio de avaliação da atividade antitumoral *in vivo* após nove dias de tratamento mostraram que o ACS-AZ10 nas doses de 15 ou 30 mg/kg, possui efeito semelhante em reduzir a massa tumoral, o volume, a viabilidade e o total celular quando comparado ao antineoplásico 5-FU (25 mg/kg), não havendo diferença significativa entre o efeito produzido pelo ACS-AZ10 e pela droga padrão utilizada. O mesmo não ocorreu com a menor dose do ACS-AZ10 (7,5 mg/kg), que não mostrou efeito antitumoral significativo considerando todos os parâmetros avaliados.

Alguns análogos da acridina têm sido utilizados como fármacos antineoplásicos devido ao seu potencial anticancerígeno, a exemplo da amsacrina e nitracrina, que foi usada clinicamente por vários anos. E ainda, alguns derivados de acridina com grupos substituintes (nitro, metoxi, metilo, aminoácidos, aminoalquilamino ou hidroxialquilamino), dentre os quais, 1-nitro-9-alquilamino-acridina e 1-nitro-9-(hidroxi-alquilamino)-acridina são promissores por apresentar potente atividade antitumoral e baixa toxicidade confirmadas por vários testes *in vitro* e *in vivo* (CHOLEWIŃSKI; DZIERZBICKA; KOŁODZIEJCZYK, 2011).

O 5-Fluorouracil, um agente antimetabólito que possui uma uracila fluorada em que o átomo de hidrogênio da posição 5 foi substituído pelo átomo de flúor (KOROLKOVAS, 2010), exerce seu efeito principalmente por bloquear bioquimicamente a síntese do DNA e, portanto, está restrito à fase S do ciclo celular (ALMEIDA et al., 2005). O 5-FU age inibindo a timidilato sintase a partir da sua

incorporação ao nucleotídeo, produzindo um análogo da deoxiuridina monofosfato (dUMP). Este análogo forma uma ligação covalente com a timidilato sintase (TS), e o complexo ternário timidilato sintase/5-fluorodeoxiuridina monofosfato/5,10- metilene-tetraidrofolato inibe a síntese de DNA (BALUZ; DO CARMO; ROSAS, 2002). Este fármaco é amplamente utilizado na clínica médica principalmente para o tratamento de neoplasias gastrointestinais e carcinoma de cabeça e pescoço (ROQUE; FORONES, 2006; STEGER; HAUTMANN; KOLBL, 2012).

A regulação do ciclo celular também é um processo diretamente relacionado com a geração e desenvolvimento de neoplasias. Existem pontos de verificação nas fases G1 e G2 do ciclo que são responsáveis pelo prosseguimento ou parada do mesmo. No câncer, as células são incapazes de pausar em ambos os pontos de verificação, resultando em desregulação do ciclo celular o que representa uma das principais características das células neoplásicas (XAVIER; CALDEZ; KALDIS, 2014).

A fim de estudar os mecanismos moleculares envolvidos na atividade antitumoral apresentada pelo ACS-AZ10, a avaliação do perfil do ciclo celular de células tumorais de Ehrlich foi realizada.

ACS-AZ10, quando administrado na dose de 7,5 mg/kg, induziu parada do ciclo celular na fase Sub-G1, como evidenciado pelo aumento da quantidade de células nessa fase do ciclo, o que foi acompanhado por uma redução da quantidade de células na fase G0/G1.

As células em apoptose apresentam uma redução na marcação do DNA após utilização de diferentes fluorocromos, como o iodeto de propídeo, que tem sido usado para detecção desse processo de morte de celular. Dessa forma, o aparecimento de células com DNA com menor marcação do que àquele das células em G0/G1, o qual representa o pico Sub-G1, tem sido considerado como marcador da célula em morte por apoptose. Várias observações indicam que a diminuição na marcação do DNA, observado em células em apoptose, é consequência da perda parcial de DNA dessas células, caracterizadas por dano no DNA devido à ativação de endonucleases endógenas e liberação subsequente de fragmentos de DNA de baixo peso molecular a partir da célula, antes da análise por citometria de fluxo (DARZYNKIEWICZ et al., 1992; WANG et al., 2011).

Os resultados da análise de citometria de fluxo corroboram com o estudo de mecanismo de ação de derivados de acridina que param o ciclo celular na fase Sub G1(AUGUSTIN et al., 2014).

O tratamento dos animais com ACS-AZ10 na dose de 15 mg/kg induziu bloqueio na progressão do ciclo celular na fase G2/M, evidenciado pelo aumento da quantidade de células nessa fase, o que foi acompanhado por uma redução da quantidade de células na fase G0/G1. Uma possível justificativa para esse resultado é que o mecanismo de ação do ACS-AZ10 pode envolver o bloqueio pré-mitótico devido à ligação com a topoisomerase II, impedindo que essa enzima complete sua função e repare as duas fitas de DNA que foram previamente quebradas no processo de divisão celular, agindo de forma semelhante aos derivados da podofilotoxina, etoposídeo e teniposídeo (BRANDÃO et al., 2010).

Este efeito pode estar relacionado também a uma ação do ACS-AZ10 por inibir a formação dos microtúbulos, em um mecanismo de ação semelhante a fármacos antineoplásicos como a vimblastina, vincristina e vinorelbina (CHOI et al., 2014). Ou ainda, por meio de ação direta sobre os microtúbulos, uma vez que agentes de ligação de microtúbulos induzem o bloqueio em células na fase G2/M do ciclo celular (WANG et al., 2015). Esse mecanismo ocorre de forma semelhante ao antineoplásico paclitaxel, o qual promove estabilização dos microtúbulos formados durante a divisão celular, impedindo a despolimerização necessária à replicação das células (SOUZA, 2004). Os resultados da análise do ciclo celular, nesta fase, condizem com o estudo de mecanismo de ação de inibidores da enzima topoisomerase II, dentre estes inibidores pode-se citar aclarubicina, novobiocina e merbarone, assim como os derivados da acridina que são inibidores desta enzima, e também bloqueiam o ciclo celular na fase G2/M (LARSEN; ESCARGUEILB; SKLADANOWSKIA, 2003).

A ausência do pico sub-G1, característico de apoptose, nos animais tratados com 15 mg/kg do ACS-AZ10 pode ser justificada considerando que o maior efeito produzido por essa dose, em comparação com a dose de 7,5 mg/kg, pode ter levado a intensa apoptose com consequente fagocitose dessas células no período do tratamento que, por isso, não foram quantificadas no fluido peritoneal no final do experimento.

O termo angiogênese tem sido empregado atualmente para descrever o crescimento de brotos endoteliais a partir de vênulas pós-capilares preexistentes e para demonstrar os processos de crescimento e remodelamento de uma rede vascular primitiva em uma complexa. A formação de novos vasos sanguíneos é necessária durante o crescimento dos tecidos e remodelação, a fim de fornecer nutrientes e oxigênio suficientes e superar a restrição básica superfície/volume em processos biológicos. Ainda, a angiogênese é um importante processo para a sobrevivência e progressão da neoplasia. A vascularização é requerida para que o tumor primário se mantenha vivo e, principalmente, para a disseminação das metástases, sendo a angiogênese um processo necessário no início e no fim da cascata metastática (FOLKMAN, 1976; FOLKMAN; BREM, 1999; PORTUGAL, 2012; MUNARON, 2014).

Cada passo deste processo representa um alvo potencial para a ação de drogas antiangiogênicas. Essa compreensão levou a descoberta de terapias necessárias no tratamento do câncer e outras doenças pró-angiogênicas. Até a data, têm sido relatados cerca de 300 agentes antiangiogênicos e mais de 80 deles são fármacos utilizados em diferentes fases de ensaios clínicos. A maioria das drogas antiangiogênicas é eficaz contra uma grande variedade de tumores (KESHET; BEN-SASSON, 1999; VINAYAK et al., 2014).

O tratamento com as diferentes doses de ACS-AZ10 diminuiu significativamente a capacidade angiogênica do carcinoma ascítico de Ehrlich, portanto, pode-se inferir que o mecanismo de ação antitumoral do ACS-AZ10 envolve, pelo menos parcialmente, um efeito antiangiogênico. Sendo assim, outros ensaios devem ser realizados com o objetivo de identificar em qual(is) alvo(s) molecular(es) a substância atua para produzir esse efeito, uma vez que, não existem relatos na literatura sobre a interferência de derivados acridínicos na angiogênese tumoral.

Diante de inúmeros relatos na literatura de efeitos adversos produzidos a partir da utilização de drogas antineoplásicas, a utilização de ensaios de toxicidade que avaliem possíveis alterações da homeostasia do organismo exposto à quimioterapia é imprescindível. O tratamento dos animais experimentais com doses repetidas das amostras por nove dias difere do ensaio de toxicidade aguda, pois

permite avaliar os efeitos produzidos pelo acúmulo da substância em doses terapêuticas no organismo.

Diante disto, para avaliação do perfil de toxicidade de ACS-AZ10 nos animais experimentais, alguns parâmetros como consumo de água e de alimentos e a evolução ponderal foram analisados. Os resultados obtidos com o 5-FU em relação a esses parâmetros corroboram com dados da literatura que mostram efeitos anoréticos para este fármaco. Considerando que praticamente todas as drogas antineoplásicas causam alterações gastrointestinais, dentre elas a anorexia que está diretamente associada à desnutrição e à perda de peso (OLIVEIRA, 2010), sendo esta última tipicamente associada à toxicidade (TALMADGE et al., 2007), e ainda que o tratamento com o ACS-AZ10 não alterou esse parâmetro, pode-se inferir que esta substância não induz esse efeito indesejável tão comum a maioria dos tratamentos antineoplásicos.

O fígado exerce uma das funções mais importantes do organismo na defesa, a detoxificação, convertendo as toxinas lipofílicas aos metabólitos mais hidrofílicos que podem ser eliminados do corpo através da urina, uma vez que os rins constituem o principal órgão excretor (GRANT, 1991; STANCA et al., 2008; MALKANTHI; PATERSON; BARNES, 2014).

O fígado está localizado em uma posição estratégica no corpo humano e regula a homeostase metabólica através da produção de energia e moléculas utilizadas por outras células em tecidos próximos ou muito distantes. O fígado possui a capacidade única de se regenerar após ferimento (WASHABAU et al., 2013; XAVIER; CALDEZ; KALDIS, 2014).

O dano hepático induzido por medicamentos pode ser hepatocelular, o que se traduzirá pelo aumento plasmático das enzimas transaminases aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT), o que faz dessas enzimas os principais indicadores desse tipo de dano (RUSSO; JACOBSON, 2002; BERTOLAMI, 2005). Com a lesão hepática, estas enzimas podem extravasar para o plasma e podem ser úteis para o diagnóstico e monitoramento desse tipo de lesão. Apesar de poderem também estar aumentadas em outros órgãos, elas são os principais marcadores de lesão celular, especialmente hepatopatias (HENRY, 2008; BRANCO, 2009).

AST é uma enzima encontrada no fígado, mas também no músculo esquelético e cardíaco, rins, pâncreas e eritrócitos. No fígado, é encontrada no citoplasma (40%) e nas mitocôndrias (60%) dos hepatócitos. Quando qualquer um desses tecidos é danificado, a AST é liberada no sangue. Como não há um método laboratorial para saber qual a origem da AST encontrada no sangue, o diagnóstico da causa do seu aumento deve levar em consideração a possibilidade de lesão em qualquer um dos órgãos onde é encontrada. Já a ALT é encontrada em altas concentrações apenas no citoplasma dos hepatócitos, o que a torna útil para o diagnóstico de agressão hepática, com relativa especificidade (JORGE, 2006; BRANCO, 2009).

O tratamento com ACS-AZ10 na dose de 15 mg/kg produziu aumento significativo nos níveis plasmáticos da transaminase ALT quando comparado ao grupo controle. A alanina aminotransferase é uma enzima mais específica para a avaliação de dano hepático, a sua elevação acompanha o dano hepatocelular agudo. Desta forma, pode-se afirmar que houve alteração funcional do fígado (CHIDA et al., 2003). Este resultado é corroborado por relatos da literatura de derivados acridínicos que mostram hepatotoxicidade para estas substâncias (PAN et al., 2007). No entanto, apesar da dose de 15 mg/kg de ACS-AZ10 induzir aumento significativo de ALT, seu valor permanece dentro da faixa de valores normais para a espécie (GAD, 2007).

Os rins regulam funções vitais do organismo como equilíbrio hídrico, ácido-básico e eletrolítico, participando de funções hormonais e regulação da pressão arterial (CURY; BRUNETTO; AYDOS, 2010). A avaliação da função renal pode ser realizada por meio da determinação das concentrações sanguíneas de ureia e creatinina.

A ureia é um produto da degradação do metabolismo dos aminoácidos, produzida a partir da amônia no ciclo da ureia hepática (GROSS; WEHRLE; BUSSEMAKER, 1996). Tem sido recomendado que a aplicabilidade das determinações da ureia no soro é significativamente potencializada quando os resultados da ureia são considerados juntamente com os resultados das determinações da creatinina (HENRY, 2008).

No músculo, a creatina é convertida em fosfocreatina, que serve como uma fonte rica em energia. Sob condições fisiológicas, a creatina perde água

espontaneamente, formando sua amida cíclica, a creatinina. Uma vez formada, a creatinina não é reutilizada no metabolismo corporal e assim funciona exclusivamente como um produto de degradação (HENRY, 2008). A creatinina é excretada na circulação em uma taxa relativamente constante. Uma fração substancial da sua excreção nos rins é resultado da secreção tubular proximal. A creatinina também é filtrada livremente pelos glomérulos, mas não é reabsorvida. Seus níveis séricos elevados estão associados com uma redução da taxa de filtração glomerular e, portanto, distúrbios renais (HENRY, 2008).

Os tratamentos com ACS-AZ10 ou com 5-FU, não induziram alterações nos níveis plasmáticos de ureia e creatinina, sugerindo que o ACS-AZ10 possui baixa toxicidade renal, nas doses avaliadas. Esses dados corroboram resultados relatados na literatura de derivados acridínicos, a exemplo da amsacrina que possui baixa toxicidade renal (MICETICH et al., 1982).

Os eritrócitos, células do tecido sanguíneo, têm como principal função o transporte de oxigênio. Em relação aos leucócitos sua principal função é a proteção do corpo contra infecções, trabalhando em conjunto com as proteínas imunoglobulinas e do sistema complemento, formando os mecanismos de defesa do hospedeiro. Os leucócitos também produzem citocinas que aumentam a função ou estimulam a proliferação de outras células. A redução do número de leucócitos pode ocorrer em mais de uma das populações de células e são denominadas de leucopenia, enquanto que o aumento destas células é denominado de leucocitose (EVANS, 2009).

Alterações hematológicas constituem uma das consequências mais frequentes do uso de quimioterápicos no tratamento do câncer, as alterações mais frequentes nos pacientes são neutropenia, anemia, leucopenia e plaquetopenia (ROQUE; FORONES, 2006; STEGER; HAUTMANN; KOLBL, 2012).

Diferentemente da maioria dos agentes antineoplásicos, o ACS-AZ10 não provocou alterações na maioria dos parâmetros hematológicos dos animais tratados. Observou-se apenas uma redução dos neutrófilos nos animais tratados com a dose de 7,5 mg/kg, bem como redução de linfócitos nos animais tratados com as doses de 15 mg/kg ou 30 mg/kg, não apresentando alteração significativa na contagem total de leucócitos, não possuindo, portanto, significado clínico relevante. No entanto, a redução de hemoglobina e hematócrito nos três grupos tratados com

ACS-AZ10 em relação aos valores dos parâmetros normais para a espécie, mesmo que sem significância estatística, pode ser justificado pela anemia que ocorre em pacientes com câncer, ou seja, o próprio implante do tumor produziu essa redução.

A análise histopatológica não evidenciou alterações nos rins dos animais tratados com a maior dose de ACS-AZ10 e com o 5-FU, demonstrando uma baixa toxicidade do composto sobre esse órgão e corroborando com os resultados dos parâmetros bioquímicos de avaliação da função renal, nos quais não houve alteração nos parâmetros avaliados, ureia e creatinina.

O fígado é dividido em lobos que são conectados por ramos da veia porta, a artéria hepática e ducto biliar. A principal atividade metabólica do fígado é fornecida pelos hepatócitos que representam de 60% a 80% da sua massa, enquanto outras células, tais como células epiteliais das vias biliares, células de Kupffer, células endoteliais sinusoidais, e células NK específicas do fígado participam da manutenção e reparação do sistema imunológico (XAVIER; CALDEZ; KALDIS, 2014).

O hepatócito, célula hepática predominante, é responsável, dentre outras funções, pela detoxificação de xenobióticos (SIRICA et al., 2008). Esta célula encontra-se rodeada de capilares sinusoides e de vasos linfáticos. As células de Kupffer são macrófagos fixos nas membranas dos sinusoides e podem ser encontradas em todo o fígado (MATOS; DANTAS-CORRÊA, 2010).

A análise histopatológica do fígado dos animais do grupo controle mostrou a presença de fígado reacional que pode ser consequência local de um efeito sistêmico (tumor). Os animais tratados com o 5-FU sofreram um dano hepático característico de necrose, corroborando assim, com dados da literatura (PITA et al., 2012). O tratamento com a dose de 30 mg/kg do ACS-AZ10 induziu alterações comuns relatadas na literatura como evidência de fraca hepatotoxicidade em que a retirada da droga ou ajuste de dose geralmente conduz a uma rápida melhora e reversão dos danos (MONTENEGRO et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2007). Adicionalmente, pode-se dizer que o fígado é um órgão com alta capacidade regenerativa e adaptativa e até mesmo quando hepatócitos acidófilos isolados com necrose por coagulação, como as observadas no fígado destes animais, entretanto com o tecido conjuntivo está preservado, a regeneração é completa (KUMMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004).

É possível observar diante deste contexto, que ACS-AZ10 apresentou significativo efeito antitumoral com dose inferior (15 mg/kg) àquela do 5-FU (25 mg/kg), no entanto, os efeitos tóxicos observados para o 5-FU não foram observados com o ACS-AZ10.

Alterações genotóxicas são definidas como aquelas que causam algum prejuízo ao material genético celular como quebra de fita simples ou dupla, formação de adutos de base, lesão cromossomal, entre outras (SAMPAL et al., 2012). Diante disto, é imprescindível a realização de ensaios de genotoxicidade, uma vez que, grande parte dos antineoplásicos podem causar efeitos colaterais que incluem indução de genotoxicidade em células não tumorais, o que pode levar a um efeito carcinogênico (VIEIRA; PAULA; CHEN-CHEN, 2010).

Dentre os antineoplásicos com essa característica, encontram-se a ciclofosfamida, um agente alquilante, utilizado no tratamento de neoplasias em geral e amplamente conhecido por sua capacidade mutagênica (JUNIOR, 2012) e o etoposídeo, um inibidor da topoisomerase II, que é um potente indutor de quebra de cadeias de DNA (SMART et al., 2008; PARRELLA et al., 2015).

A contagem dos micronúcleos é feita para monitorar as alterações celulares em áreas expostas a agentes genotóxicos. Estes fragmentos de DNA só aparecem em células que tenham completado pelo menos uma divisão celular após ser afetado por um agente genotóxico. A não incorporação dos fragmentos é geralmente devido a falta de centrômeros, que impede que os fragmentos migrem para os pólos do fuso, no final da anáfase. Os fragmentos de DNA que são deixados para trás são incorporados no núcleo secundário e mantidos no citoplasma da célula (ALMEIDA et al., 2015).

O tratamento com ACS-AZ10 não provocou aumento significativo no número de eritrócitos micronucleados no sangue periférico dos animais tratados com dose única de 2000 mg/kg, levando ao entendimento da ausência de capacidade genotóxica desta substância. Esse resultado corrobora com dados na literatura que demonstra ausência de genotoxicidade no ensaio de micronúcleo da amsacrina, principal representante da classe dos derivados acridínicos (LYNCH et al., 2008).

Considerando os dados apresentados, podemos inferir que o ACS-AZ10 apresenta baixa toxicidade e potente atividade antitumoral *in vivo*. Esse trabalho apresenta dados relevantes, tanto do ponto de vista farmacológico como

toxicológico, que subsidiam a realização de testes pré-clínicos adicionais, especialmente de mecanismo de ação, e posteriormente testes clínicos com o referido derivado acridínico (ACS-AZ10).

Conclusões

7 CONCLUSÕES

De acordo com os estudos realizados com o derivado acridínico ACS-AZ10, pode-se concluir que:

- ACS-AZ10 apresentou fraca citotoxicidade em eritrócitos de camundongos;
- ACS-AZ10 apresentou baixa toxicidade aguda em camundongos;
- ACS-AZ10 apresentou potente atividade antitumoral *in vivo* em modelo de carcinoma ascítico de Ehrlich;
- O mecanismo de ação antitumoral de ACS-AZ10 envolve a interferência na progressão do ciclo celular e ação antiangiogênica;
- ACS-AZ10 apresentou baixa toxicidade *in vivo*, em animais com CAE submetidos a tratamento de doses repetidas (nove dias);
- ACS-AZ10 não apresentou genotoxicidade *in vivo*.

Referências

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

AGUIRRE-GHISO, J.A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. **Nature Reviews Cancer**, vol. 7, pp. 834–846, 2007.

ALAPATI, V., NOOLVI, M. N., MANJULA, S. N., PALLAVI, K. J., PATEL, H. M., TIPPESWAMY, B. S., SATYANARAYANA, S. V. In vivo anti-tumour activity of novel Quinazoline derivatives. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 16, n. 13, p. 1753-1764, 2012.

ALBAS, C.S.; SOUZA, J.P.; NAI, G.A.; PARIZI, J.L.S. Avaliação da genotoxicidade da Ilex paraguariensis (erva mate) pelo teste do micronúcleo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.2, supl. I, p.345-349, 2014.

ALBRECHT, J. H.; POON, R. Y.; AHONEN, C. L.; RIELAND, B. M.; DENG, C.; CRARY, G. S. Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver. **Oncogene**. Vol. 16, pp. 2141–2150, 1998.

ALGARIRI, K.; ATANGWHO, I.J.; MENG, K.Y.; ASMAWI, M.Z.; SADIKUN, A.; MURUGAIYAH, V. Antihyperglycaemic and Toxicological Evaluations of Extract and Fractions of Gynura procumbens Leaves. **Tropical life sciences research**, Vol. 1, pp. 75-93, 2014.

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, V. D., LEITÃO, A., REINA, L. D. C. B., MONTANARI, C. A., DONNICI, C. L., & LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-29, 2005.

ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ALMEIDA, A. F., TORRE EDO, N., SELAYARAN MDOS, S., LEITE, F. R., DEMARCO, F. F., LOGUERCIO, A. D., ETGES, A. Genotoxic potential of 10% and 16% Carbamide Peroxide in dental bleaching. **Brazilian oral research**, Vol. 29, no. 1, pp. 1-7, 2015.

ALY EL-MOGHAZY, S. M.; MIKHAEL, A. N.; EISSA, A. A. H.; EBEID, M. Y. **Egypt J. Pharm. Sci.**, 34, 401, 1994.

- 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.
- 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.
- APTSIAURI, N. et al. Role of altered expression. of HLA class I molecules in cancer progression. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 601, p. 123-131, 2007.
- ARAVINDARAM, K.; YANG, N. S. Anti-Inflammatory Plant Natural Products for Cancer Therapy. **Planta Médica**. v. 76, p. 1103–1117, 2010.
- ASSIS, F. A., Efeito do selênio orgânico e da vitamina E no crescimento tumoral e na resposta imunológica ao tumor experimental de Ehrlich. [Tese de mestrado- Universidade Estadual de Minas Gerais], Belo Horizonte, MG, 2007.
- AUGUSTIN, E., NIEMIRA, M., HOŁOWNIA, A., MAZERSKA, Z. CYP3A4-dependent cellular response does not relate to CYP3A4-catalysed metabolites of C-1748 and C-1305 acridine antitumor agents in HepG2 cells. **Cell biology international**, Vol. 38, no. 11, pp. 1291-1303, 2014.
- BALUZ, K.; DO CARMO, M. G. T.; ROSAS, G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. **Revista Brasileira de Cancerologia**. Vol.48, no. 4, pp. 597-560, 2002.
- BARKAN, D., GREEN, J.E., CHAMBERS, A.F. Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. **European journal of cancer**, Vol. 46, pp. 1181–1188, 2010.
- BARROS, F. W. A.; SILVA, T. G.; PITTA, M. G. R.; BEZERRA, D. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; MOURA, M. A. F. B.; ABREU, F. C.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; IDA, R. P.; GOULART, M. O. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, Vol. 20, pp. 3533–3539, 2012.
- BARROS, F. W., BEZERRA, D. P., FERREIRA, P. M., CAVALCANTI, B. C., SILVA, T. G., PITTA, M. G., AND PESSOA, C. Inhibition of DNA topoisomerase I activity and induction of apoptosis by thiazacridine derivatives. **Toxicology and applied pharmacology**, Vol 268 No 1, pp. 37-46, 2013.
- BELLATI, F., NAPOLETANO, C., GASPARRI, M. L., VISCONTI, V., ZIZZARI, I. G., RUSCITO, I., et al. Monoclonal antibodies in gynecological cancer: a critical point of view. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, 2011.
- BELMONT, P., BOSSON, J., GODET, T., TIANO, M. Acridine and acridone derivatives, anticancer properties and synthetic methods: where are we now?

Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), Vol 7 No 2, pp. 139-169, 2007.

BERGERS, G., HANAHAN, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. **Nature Reviews Cancer**. Vol. 8, pp. 592–603, 2008.

BERTOLAMI, M. C. Mechanisms of hepatotoxicity. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, vol. 85 suppl.5, 2005.

BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; DE ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 156-63, 2008.

BEZERRA, D. P.; MARINHO FILHO, J. D.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; PESSOA, O. D.; TORRES, M. C.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, F. A.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 8, p. 1224-31, 2009.

BHATTACHARYA, S.; HALDAR, P. *Trichosanthes dioica* root extract induces tumor proliferation and attenuation of antioxidant system in albino mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. **Interdisciplinary toxicology**, v. 4, n. 4, p. 184-190, 2011.

BOATRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current opinion in cell biology**, v. 15, n. 6, p. 725-731, 2003.

BRANCO, A. C. S. C. Avaliação da toxicidade pré-clínica crônica de *Foeniculum vulgare* Mill. [Tese de Doutorado pela Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba], João Pessoa, JP, f. 136, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Tratamento do Câncer, Quimioterapia. Rio de Janeiro, 2015.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química E Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, n. 5, p. 631-651, 2002.

BURRIS III, H. ROCHA-LIMA, C. New therapeutic directions for advanced pancreatic cancer: targeting the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor pathways. **Oncologist**, vol. 13, no. 3, pp. 289–298, 2008.

CALDAS, C. Molecular assessment of cancer. **British medical journal**, Vol 316, pp.1360–1363, 1998.

CALGAROTTO, A. K., da SILVA PEREIRA, G. J., BECHARA, A., PAREDES-GAMERO, E. J., BARBOSA, C. M., et al. Autophagy inhibited Ehrlich ascitic tumor cells apoptosis induced by the nitrostyrene derivative compounds: relationship with cytosolic calcium mobilization. **European journal of pharmacology**, v. 678, n. 1, p. 6-14, 2012.

CANÇADO, R. D. Multiple Myeloma and anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, vol. 29 no. 1, 2007.

CANEVASCINI, S., MARTI, M., FRÖHLI, E., HAJNAL, A. The Caenorhabditis elegans homologue of the proto-oncogene ect-2 positively regulates RAS signalling during vulval development. **EMBO reports**, v. 6, n. 12, p. 1169-1175, 2005.

CAVALINI, L. T.; CRUZ, P. S.; SILVA, G. M.; SILVA, I. F. Perfil da Assistência em um Hospital Universitário: Informações do Registro Hospitalar de Câncer, 2000-2009. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 2, p. 153-161, 2012.

CAVALCANTI, B. C. (2010), Avaliação in vitro do potencial citotóxico de derivados arilaminados Nor- β -lapachônicos: Estudos de mecanismo de ação. 170 f. Tese (Doutorado em Farmacologia), Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

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

CHIDA, V. V.; MOREIRA, M. B.; LEME, L. F. P.; FAGUNDES, D. J.; RAMALHO, C. E. B.; NOVO, N. F.; MONTERO, E. F. S. ESTUDO DA FUNÇÃO HEPÁTICA DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS SUBMETIDOS A DIFERENTES PRESSÕES DE PNEUMOPERITÔNIO COM CO₂. **Acta Cirúrgica Brasileira**. Vol. 18, no. 1, 2003.

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

CHOI, B. H.; CHATTOPADHAYA, S.; THANH, L. N. et al. Suprafenacine, an indazole-hidrazide agent, targets cancer cells through microtubule destabilization. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. 1-13, 2014.

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

CRISTINA, C., LUQUE, G. M., DEMARCHI, G., LOPEZ VICCHI, F., ZUBELDIA-BRENNER, L., PEREZ MILLAN, M. I., BECU-VILLALOBOS, D. et al. Angiogenesis in Pituitary Adenomas: Human Studies and New Mutant Mouse Models. **International journal of endocrinology**, v. 2014, 2014.

CRAWFORD, Y., FERRARA, N. VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. **Cell and Tissue Research**, vol. 335, no. 1, pp. 261–269, 2009.

CSUK, R.; BARTHEL, A.; BREZESINSKI, T.; RASCHKE, C. Bioorg. **Medicinal Chemistry Letters**, Vol 14, pp. 4983, 2004.

CURY, J. L.; BRUNETTO, A. F.; AYDOS, R. D. Negative effects of chronic kidney failure on lung function and functional capacity. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 14, n. 2, pp. 91-98, 2010.

DAGLI, M.L.Z. Disseminação linfática do Tumor de Ehrlich: Estudo experimental. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo, SP, 1989, 148 f.

DAHANUKAR, S. A., THATTE, U. M. Current status of Ayurveda in phtyomedicine. **Phytomedicine**. Vol. 4, pp. 359- 368, 1997.

DARZYNKIEWICZ, S.; DEL BINO, B. G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M. A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. **Cytometry**, v. 13, p. 795-808, 1992.

DEMICHELI, R., RETSKY, M.W., HRUSHESKY, W.J., BAUM, M., GUKAS, I.D. The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations. **Annals of Oncology**, Vol. 19, pp. 1821–1828, 2008.

DIETL, B., MARIENHAGEN, J., SCHÄFE, C., KÖLBL, O. The Prognostic Value of Anaemia at Different Treatment Times in Patients with Locally Advanced Head and Neck Cancer Treated with Surgery and Postoperative Radiotherapy. **Clinical Oncology**. Vol. 19, no. 4, pp. 228-233, 2007.

DOLAI, N., KARMAKAR, I., KUMAR, R. B. S., KAR, B., BALA, A.; HALDAR, P. K. Evaluation of antitumor activity and in vivo antioxidant status of Anthocephalus cadamba on Ehrlich ascites carcinoma treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 865-870, 2012.

DUNCAN, J. S., TUROWEC, J. P., VILK, G., LI, S. S. C., GLOOR, G. B. LITCHFIELD, D. W. Regulation of cell proliferation and survival: Convergence of protein kinases and caspases. **Biochimica et Biophysica Acta**. Vol. 1804, pp. 505–510, 2010.

DUTTA, S.; SNYDER, M.,J.; ROSILE, D.; BINZ, K. L.; ROLL, E. H.; SURYADI, J.; BIERBACH, U.; GUTHOLD, M. PT-ACRAMTU, a platinum-acridine anticancer agent, lengthens and aggregates, but does not stiffen or soften DNA. **Cell Biochem Biophys**. Vol. 67, no. 3, pp. 1103-1113, 2013.

EASTMAN, A. Activation of programmed cell death by anticancer agents - cisplatin as a model system. **Cancer Cells-a Monthly Review**. Vol. 2, pp. 275–280, 1990.

EBOS, J. M., LEE, C.R., KERBEL, R.S. Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy. **Clinical Cancer Research**, Vol. 15, pp. 5020–5025, 2009.

EHRLICH, P. Experimentelle carcinom studien na Mausem. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** Vol. 1, pp. 78-80, 1906.

EICHHOLZ, A.; MERCHANT, S; GAYA, A. M. Antiangiogenesis therapies: their potential in cancer management. **OncoTargets and Ther**. Vol. 3, pp. 69–82, 2010.

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

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

FECCHIO, D., SIROIS, P., RUSSO, M., JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**. Vol. 14, no. 1, 125–132, 1990.

FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., ERVIK, M., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS C., et al. GLOBOCAN 2012 v1. 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer 766 Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. c2013 [cited 2013 Oct 17]. globocan.iarc.fr.2013.

FERRARA, N., DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine Reviews**, vol. 18, no. 1, pp. 4–25, 1997.

FERREIRA, E., SILVA, A. E., SERAKIDES, R., GOMES, M. G., CASSALI, G. D., Ehrlich tumor as model to study artificial hyperthyroidism influence on breast cancer. **Pathology Research and Practice**, vol. 203, no. 1, pp. 39–44, 2007.

FIDLER, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 453-458, 2003.

FÖLLER, M.; HARRIS, I.S.; ELIA, A.; JOHN, R.; LANG, F.; KAVANAGH, T.J.; MAK, T.W. Functional significance of glutamate-cysteine ligase modifier for erythrocyte survival in vitro and in vivo. **Cell Death Differ**. 2013

FOLKMAN, J. The vascularization of tumor. **Sci Am**. Vol. 234, pp. 59–73. 1976.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **New England Journal of Medicine**, Vol. 285, pp.1182–1186, 1971.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.

Nature medicine, Vol. 1, pp. 27–31, 1995.

FOLKMAN, J., BREM, H. Angiogenesis and inflammation. Inflammation basic principles and clinical correlates. 3a. ed. Pp. 821–839, 1999.

FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Seminars in oncology**, Vol. 29(6, Suppl 16), pp. 15–18, 2002.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, n. 2, p. 144-149, 2008.

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

GEILER, C; ANDRADE, I; GREENWALD, D. Exogenous c-Myc Blocks Differentiation and Improves Expansion of Human Erythroblasts In vitro. **International journal of stem cells**, v. 7, n. 2, p. 153, 2014.

GHOSH, R.; BHOWIK, S.; BAGCHI, A.; DAS, D.; GHOSH, S. Chemotherapeutic potential of 9-phenyl acridine: Biophysical studies on its binding to DNA. **European Biophysics Journal**, Vol. 39, pp.1243–1249, 2010.

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

GONZAGA, M. L.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P.; DE ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; SOARES, S. A.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by an alpha-(1→4)-glucan-beta-(1→6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. **Journal of Natural Medicine**, v. 63, n. 1, p. 32-40, 2009.

GOPINATHAN, L.; RATNACARAM, C. K.; KALDIS, P. Established and novel Cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development. **Cell Cycle in Development**, Vol. 53, pp. 365–389, 2011.

GRANT, D. M. Detoxification pathways in the liver. **Journal of inherited metabolic disease**, Vol. 14, pp. 421-430, 1991.

GRAVINA, G. L., SENAPEDIS, W., MCCAULEY, D., BALOGLU, E., SHACHAM, S., FESTUCCIA, C. Nucleo-cytoplasmic transport as a therapeutic target of cancer. **Journal of hematology & oncology**, v. 7, n. 1, p. 85, 2014.

GRIFFIOEN, A. W., MOLEMA, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. **Pharmacological reviews**, Vol. 52, pp.237-268, 2000.

GRIFFIOEN, A. W.; THIJSSSEN, V. L. Galectins in tumor angiogenesis. **Annals of translational medicine**, v. 2, n. 9, 2014.

GRIVICICH, I., REGNER, A., ROCHA, A. B. D. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-43, 2007.

GROSS, P.; WEHRLE, R.; BUSSEMAKER, R. Hyponatremia: Pathophysiology, differential diagnosis and new aspects of treatment. **Clinical Nephrology**, v. 46, p. 273-276, 1996.

GUANCHE, G. H.; GARCÍA, A. E.; GONZÁLEZ, I. J.; SALOMÓN, Z. E.; PÉREZ, M. P.; Cancer trends in hospital morbidity and lethality. **Anales de medicina interna**, 2007.

GUERRA, J. L. Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do Tumor de Ehrlich. São Paulo. Tese de Doutorado- FMVZ da Universidade de São Paulo. 1983.

GULER, G., UNER, A., GULER, N., et al. The fragile genes FHIT and WWOX are inactivated coordinately in invasive breast carcinoma. **Cancer**; v. 100 n. 8, pp. 1605-1614, 2004.

HAGIO, S., FURUKAWA, S., ABE, M., KURODA, Y., HAYASHI, S., OGAWA, I. Repeated dose liver micronucleus assay using adult mice with multiple genotoxicity assays concurrently performed as a combination test. **The Journal of toxicological sciences: an official journal of the Japanese Society of Toxicology**, Vol. 39, no. 3, pp. 437-445, 2014.

HAIFU, L., WOZNIAK, A., SCIOT, RAF., CORNILLIE, JASMIEN., WELLENS, J., LOOY, T. V., VANLEEuw, U., STAS, M., HOMPEs, D., RYCHTER, M. D., SCHÖFFSKI, P. Pazopanib, a Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Suppresses Tumor Growth through Angiogenesis in Dedifferentiated Liposarcoma Xenograft Models. **Translational Oncology**. Vol. 7, no. 6, pp. 665–671, 2014.

HAIL JR, N., CARTER, B. Z., KONOPLEVA, M., ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11, n. 6, p. 889-904, 2006.

HAJRA, K. M.; LIU, J. R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**. v. 9, p. 691-704, 2004.

HAN, H. Y., KIM, H., SON, Y. H., LEE, G., JEONG, S. H., RYU, M. H. Anti-cancer effects of *Kochia scoparia* fruit in human breast cancer cells. **Pharmacognosy magazine**. v. 10, n. Suppl 3, p. S661, 2014.

HANAHAN, D., COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell**. Vol. 21, pp. 309–322, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

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

HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell cycle and cancer. **Science**, Vol. 266, pp. 1821-1828, 1994.

HAUSBERGER, R.; DE BEM, R.S.; ALENCAR, B.L.F.; PEDROSO, M.L.A.; BOARETTI, A.C.; MESSIAS-REASON, L.J.T. Comportamento do sistema complemento no líquido ascítico de diferentes etiologias. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v.37, n.3, p. 187-196, 2001.

HE, J., XIE, N., YANG, J., GUAN, H., CHEN, W., WU, H., YU, L et al. siRNA-Mediated Suppression of Synuclein γ Inhibits MDA-MB-231 Cell Migration and Proliferation by Downregulating the Phosphorylation of AKT and ERK. **Journal of breast cancer**, v. 17, n. 3, p. 200-206, 2014.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 685-687, 2000.

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

HINTZSCHE, H., RIESE, T., STOPPER, H. Hyperthermia-induced micronucleus formation in a human keratinocyte cell line. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, pp. 71-74, 2012.

HOFMANN, J. Resistance to chemotherapy. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 8, p. 1368, 2008.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (mdr) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, v. 33, p. 2148-2154, 2010.

IANNETTI, A., LEDOUX, A.C., TUDHOPE, S.J., SELLIER, H., ZHAO, B., MOWLA, S., MOORE, A., HUMMERICH, H., GEWURZ, B.E., COCKELL, S.J., JAT, P.S., WILLMORE, E., PERKINS, N.D. Regulation of p53 and Rb links the alternative NF- κ B pathway to EZH2 expression and cell senescence. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 9, 2014.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2013: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2013.

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

JAIN, R. K. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. **Cancer research**, Vol. 47, pp. 3039–3051, 1987.

JAIN, R. K. Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from in vivo imaging of gene expression and function. **Journal of controlled release**, Vol. 74, pp. 7–25, 2001.

JAIN, R. K. A New Target for Tumor Therapy. **The new england journal of medicine**, Vol. 25, pp. 2667-2671, 2009.

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

JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E., and FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, Vol 61 No 2, pp. 69-90, 2011.

JENA, J. A., Study on Natural Anticancer Plants, **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 1 No.1, pp. 365–368, 2012.

JI, K., YE, L., MASON, M. D., JIANG, W. G. The Kiss-1/Kiss-1R complex as a negative regulator of cell motility and cancer metastasis (Review). **International journal of molecular medicine**, v. 32, n. 4, p. 747-754, 2013.

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

JORGE, S. G. Exames laboratoriais. Hepcentro, 2006. Disponível em: <<http://www.hepcentro.com.br/exames.htm>>. Acesso em: 28 out. 2014, 22:06:30.

ILYIN, G. P.; GLAISE, D.; GILOT, D.; BAFFET, G.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. O. Regulation and role of p21 and p27 cyclin-dependent kinase inhibitors during hepatocyte differentiation and growth. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, Vol. 285, pp. G115–G127, 2003.

KAHLOS, K., SOINI, Y., PAKKO, P., SAILY, M., LINNAINMAA, K., KINNULA, V. L. Proliferation, apoptosis, and MnSOD in malignant mesothelioma. **International journal of cancer**, 88, 37–42, 2000.

KANG, C.; MUNAWIR, A.; CHA, M.; SOHN, E-T; LEE, H.; KIM, J. S.; YOON, W. D.; LIM, D.; KIM, E. Cytotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) venom. **Comparative Biochemical and Physiology**, v. 150, p. 85-90, 2009.

KARCHER, D.; PHERSON, M. Cerebrospinal, synovial, serous body fluids, and alternative specimens. In: McPherson R, Pincus M, editores. Henry's - Clinical diagnosis and management by laboratory methods. **Elsevier Saunders**, p.502–507, 2011.

KAROLAK-WOJCIECHOWSKA, J.; KWIATKOWSKI, W.; OBNISKA, J.; ZEJC, A. 3-(m-Bromophenyl)-1-(3-methyl-2-pyridyl) pyrrolidin-2, 5-dione. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, v. 52, n. 7, p. 1808-1810, 1996.

KASALA, E. R., BODDULURU, L. N., MADANA, R. M., ATHIRA, K. V., GOGOI, R., BARUA, C. C. CHEMOPREVENTIVE AND THERAPEUTIC POTENTIAL OF CHRYSIN IN CANCER: MECHANISTIC PERSPECTIVES. **Toxicology letters**, 2015.

KAWAKAMI, H., OKAMOTO, I., OKAMOTO, W., TANIZAKI, J., NAKAGAWA, K., & NISHIO, K. Targeting MET Amplification as a New Oncogenic Driver. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1540-1552, 2014.

KERBEL, R. S. Tumor angiogenesis. **The New England Journal of Medicine**, vol. 358, no. 19, pp. 2039–2049, 2008.

KESHET, E., BEN-SASSON, S. A. Anticancer drug targets: approaching angiogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, Vol.104, pp.1497-501, 1999.

KETRON, A. C., DENNY, W. A., GRAVES, D. E., & OSHEROFF, N. Amsacrine as a topoisomerase II poison: importance of drug–DNA interactions. **Biochemistry**, Vol 51 No 8, pp. 1730-1739, 2012.

KIRSCH-VOLDERS, M., G. PLAS, A. ELHAJOUJI, M. LUKAMOWICZ, L. GONZALEZ, K. VANDE LOOCK, I. DECORDIER. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of toxicology**, Vol. 85, pp. 873–899, 2011.

KLEIN, G., E. Klein. Conversion of solid neoplasms into ascites tumors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Vol. 63, pp. 640-661, 1960.

KODAMA, M., KODAMA, T. Enhancing Effect of Hydrocortisone on Hematogenous Metastasis of Ehrlich Ascites Tumor in Mice. **Cancer research**, Vol. 35, pp. 1015–1021, 1975.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

KOTHARI N, ALMHANNA K. Current status of novel agents in advanced gastroesophageal adenocarcinoma. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, Vol. 6, no. 1, pp. 60-74, 2015.

KRISHNA, R.; MAYER, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer—mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Vol. 11, pp. 265–283, 2000.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. Robbins & Cotran Pathology Basis of Disease. China: W B Saunders, 2004.

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

LARSEN, A. K.; ESCARGUEILB, A. E.; SKLADANOWSKIA, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**. Vol. 99, Issue 2, pp.167–181, 2003.

LEAL, J. H. S.; CUBERO, D.; DEL GIGLIO, A.; Palliative hormonal therapy for breast cancer: a practical review literature. **Revista Brasileira de Clínica Médica**. v. 8, n. 4, p.338-343, 2010.

LINKS, M.; BROWN, R. Clinical relevance of the molecular mechanisms of resistance to anti-cancer drugs. **Expert reviews in molecular medicine**, Vol. 1, pp. 1–21, 1999.

LINS, K. O.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P.; ALENCAR, N. M.; LIMA, M. W.; TORRES, V. M.; FARIAS, W. R.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA LOTUFO, L. V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 20-6, 2009.

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

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

LIU, Z., FAN, F., WANG, A., ZHENG, S., LU, Y. Dll4-Notch signaling in regulation of tumor angiogenesis. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 140, n. 4, p. 525-536, 2014.

LONGATO, G. B.; RIZZO, L. Y.; SOUSA, I. M. de O.; TINTI, S. V.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA G. M.; RUIZ, A. L. T. G.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. In vitro and in vivo anticancer activity of extracts, fractions, and eupomatenoid-5 obtained from *Piper regnellii* leaves. **Planta Médica**, 2011.

LYDEN, D., HATTORI, K., DIAS, S., COSTA, C., BLAIKIE, P., BUTROS, L., et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. **Nature medicine**, Vol. 7, pp. 1194–1201, 2001.

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

MALKANTHI, E.; PATERSON, E.; BARNES, D. M. An open label pilot study to evaluate the efficacy of Spanish black radish on the induction of phase I and phase II

enzymes in healthy male subjects. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. Vol.14, pp.475, 2014.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-166, 2009.

MALUMBRES, M.; HARLOW, E.; HUNT, T.; HUNTER, T.; LAHTI, J.M.; MANNING, G.; MORGAN, D.O.; TSAI, L.-H.; WOLGEMUTH, D.J. Cyclin-dependent kinases: A family portrait. **Nature cell biology**, Vol. 11, pp. 1275–1276, 2009.

MAHMOOD, A. A.; MARIOD, A. A.; AL-BAYATY, F.; ABDEL-WAHAB, S. I. Anti-ulcerogenic activity of *Gynura procumbens* leaf extract against experimentally-induced gastric lesions in rats. **Journal of Medicinal Plants Research**. Vol.48, no. 8, pp. 685–691, 2010.

MARUYAMA, E. O., YU, H. I., JIANG, M., FU, J., & HSU, W. Gpr177 deficiency impairs mammary development and prohibits Wnt-induced tumorigenesis. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. 56644, 2013.

MATSUZAKI, P. Avaliação dos efeitos do extrato etanólico, resíduo butanólico e resíduo aquoso de *Pfaffia paniculata* sobre o crescimento do tumor de Ehrlich em suas formas ascítica e sólida. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2004

MATTOS, A. A., DANTAS-CORRÊA, E. B., Tratado de hepatologia. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.

MCALPINE, H.; JOUBERT, L.; MARTIN-SANCHEZ, F.; MEROLLI, M.; DRUMMOND, K. J. A systematic review of types and efficacy of online interventions for cancer patients. 2014.

MEDINGER, M.; PASSWEG, Jakob. Role of tumour angiogenesis in haematological malignancies. **Swiss medical weekly**, v. 144, p. w14050, 2014.

MERKEI, C. A.; Medrano, R. F. V.; Barauna, V. G.; Strauss, B. E. Combined p19Arf and interferon-beta gene transfer enhances cell death of B16 melanoma in vitro and in vivo. **Cancer Gene Therapy**. V. 20, pp. 317-325, 2013.

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.

MOSERLE, L., AMADORI, A., INDRACCOLO, S. The angiogenic switch: implications in the regulation of tumor dormancy. **Current molecular medicine**, Vol. 9, pp. 935–941, 2009.

MONTENEGRO, R. C.; FARIAS, R. A. F.; PEREIRA, M. R. P.; ALVES, A. P. N. N.; BEZERRA, F. S.; ANDRADE-NETO, M.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of pisosterol in mice bearing with S180 tumor. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 454-7, 2008.

MUKHERJEE, A.; LAVERY, R.; BAGCHI, B.; HYNES, J.T. On the molecular mechanism of drug intercalation into DNA: A simulation study of the intercalation pathway, free energy, and DNA structural changes. **Journal of the American Chemical Society**, Vol. 130, pp. 9747–9755, 2008.

MUNARON, L. Systems biology of ion channels and transporters in tumor angiogenesis: An omics view. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, 2014.

NASCIMENTO, F. R. F.; CRUZ, G. V. B.; PEREIRA, P. V. S.; MACIEL, M. C. G.; SILVA, L. A.; AZEVEDO, A. P. S.; BARROQUEIRO, S. B.; GUERRA, R. N. M. Ascitic and Solid Tumor Inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. Treatment. **Life Sciences**, v.78, p. 2650-2653, 2006.

NATARAJAN J, HUNTER, K., MUTALIK, V. S., RADHAKRISHNAN, R. Overexpression of S100A4 as a biomarker of metastasis and recurrence in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Applied Oral Science**, v. 22, n. 5, p. 426-433, 2014.

NAUMOV, G. N., AKSLEN, L. A., FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. **Cell Cycle**. Vol. 5, pp. 1779–1787, 2006.

NETO, B. A. D.; LAPIS, A. A. M. Recent developments in the chemistry of deoxyribonucleic acid (DNA) intercalators: Principles, design, synthesis, applications and trends. **Molecules**. Vol. 14, pp.1725–1746, 2009.

NIU, J., MIMS, M. P. Oxaliplatin-induced thrombotic thrombocytopenic purpura: case report and literature review. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 31, p. e312-e314, 2012.

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

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

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

OLIVEIRA, J. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BEZERRA, D. P.; ALENCAR, N. M.; MARINHO-FILHO, J. D.; FIGUEIREDO, I. S.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ALVES, A. P.; RAMOS, M. V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 382, n. 2, p. 139-149, 2010.

ORTEGA, S.; MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1602, n. 1, p. 73-87, 2002.

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

PARRELLA, A., LAVORGNA, M., CRISCUOLO, E., RUSSO, C., ISIDORI, M. Eco-genotoxicity of six anticancer drugs using comet assay in daphnids. **Journal of Hazardous Materials**, Vol. 6, 286C, pp. 573-580, 2015.

PARSAEE, H.; ASILI, J.; MOUSAVI, S. H.; SOOFI, H.; EMAMI, S. A.; TAYARANI-NAJARAN, Z. Apoptosis Induction of Salvia chorassanica Root Extract on Human Cervical Cancer Cell Line. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, Vol. 12, no.1, pp. 75–83, 2013.

PAVELIC, J. Combined Cancer Therapy. **Current Pharmaceutical Design**. Vol. 20, No. 42, 2014.

PEREIRA, B. G., FIALHO, S. L., DE SOUZA, C. M., CASSALI, G. D., SILVA-CUNHA, A. Evaluation of the effects of thalidomide-loaded biodegradable devices in solid Ehrlich tumor. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 2, p. 129-132, 2013.

PEREZ-ATAYDE, A. R., SALLAN, S. E., TEDROW, U., CONNORS, S., ALLRED, E., FOLKMAN, J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. **The American journal of pathology**, Vol. 150, pp. 815–21, 1997.

PITA, J. C. L. R., XAVIER, A. L., SOUSA, T. K. G. D., MANGUEIRA, V. M., TAVARES, J. F., JÚNIOR, R. J. D. O., Castello-Branco, M. V. S. et al. In vitro and in vivo antitumor effect of trachylobane-360, a diterpene from *Xylopia langsdorffiana*. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9573-9589, 2012.

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

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

PORTUGAL, L. M. Avaliação da eficácia antitumoral e toxicidade de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina no tratamento de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas René Rachou. 2012.

POTENTE, M., GERHARDT, H., CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell**. Vol.146, pp. 873-87, 2011.

PRADOS, J., MELGUIZO, C., ORTIZ, R., VÉLEZ, C., ALVAREZ, P.J., ARIAS, J.L., RUÍZ, M.A., GALLARDO, V., ARANEGA, A. Doxorubicin-Loaded Nanoparticles: New

Advances in Breast Cancer Therapy, **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, Vol. 12, pp. 1058-1070, 2012.

PUJOL, M. J.; JAIME, M.; SERRATOSA, J.; JAUMOT, M.; AGELL, N.; BACHS, O. Differential association of p21Cip1 and p27Kip1 with cyclin E-CDK2 during rat liver regeneration. **Journal of hepatology**, Vol. 33, pp. 266–274, 2000.

RABINOWITZ, R., KATZ, G., ROSNER, M., PRI-CHEN, S., SPIERER, A. The effect of thalidomide on neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, Vol. 246, no. 6, pp. 843–848, 2008.

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

RIBATTI, D., NICO, B., CRIVELLATO, E., ROCCARO, A. M., VACCA, A. The history of the angiogenic switch concept. **Leukemia**. Vol. 21, pp. 44–52, 2007.

RIVA, D.; BARISON, A.; STEFANELLO, M. E. A.; POLIQUESI, C. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; SALVADOR, M. J. Estudo químico de *Sinningia allagophylla* guiado por testes de atividade antiproliferativa. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 974-977, 2012.

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

ROSIDAH, Y. M. F.; AHMAD, M.; SADIKUN, A.; AKOWUAH, G. A.; ASMAWI, M. Z. Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol.123, no.2, pp. 244–249, 2009.

ROOPAN, S. M.; KHAN, F. R. N. SnO₂ nanoparticles mediated nontraditional synthesis of biologically active 9-chloro-6, 13-dihydro-7-phenyl-5H-indolo [3, 2-c]-acridine derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 20, n. 6, p. 732-737, 2011.

RUSSO, M. W.; JACOBSON, I. M. How to use statins in patients with chronic liver disease. **Cleveland Clinic journal of medicine**, Vol. 71, pp. 58-62, 2002.

SAFARZADEH, E., SANDOGHCHIAN, S. S., BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment, **Advanced pharmaceutical bulletin**, Vol 4, pp. 421-427. 2014.

SAMPAI, J.; TREMÉA, R., MARCO, M. G., VIEIRA, R. B., TACCA, J. A., STRÖHER, D. J., PILAR, B. C., GÜLLICH, A. A. C., SCHWANZ, M., MANFREDINI, V. Estudo da genotoxicidade in vitro e in vivo após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. obtidos por infusão. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 4, p. 462-467. 2012.

SÁNCHEZ, I.; RECHES, R.; CAIGNARD, D. H.; RENARD, P.; PUJOL, M. D.
European Journal Medicinal Chemistry, Vol 41, pp. 340, 2006.

SANTOS-BERGAMI, P.C.; MARIO, M.; BARBUTO, A.J.M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life sciences**, v. 75, p. 245-255, 2004.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J.; Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**. v. 331 no. 6024, pp. 1565-1570, 2011.

SILVA, A. Efeito do hipotireoidismo no tumor de Ehrlich na deficiência ou suficiência dos esteróides sexuais femininos (dissertação). Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2003.

SILVA, T. H. Á., BUTERA, A. P., LEAL, D. H. S., & ALVES, R. J. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese-Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta 3$. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 1, 2007.

SILVA, A. H. C.; SILVA2, D. M., RIBAS, C. R., DITTRICH, R. L., DORNBUSCH, P. T., GUÉRIOS, S. D. ALTERAÇÕES NO HEMOGRAMA DE CADELAS COM NEOPLASIA MAMÁRIA. **Ciencia Animal Brasileira.**, v.15, n.1, p. 87-92, 2014.

SINGH, S. R. Cancer stem cells: Recent developments and future prospects. **Cancer letters**, Vol. 338 No1, pp. 1-2, 2013.

SMART, D. J., HALICKA, H. D., SCHMUCK, G., TRAGANOS, F., DARZYNKIEWICZ, Z., WILLIAMS, G. M. Assessment of DNA double-strand breaks and γ H2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 641, n. 1, p. 43-47, 2008.

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

SOUZA, C. A., VIGORITO, A. C., ARANHA, F. G. P., OLIVEIRA, G. B., EID, K. A., RUIZ, M. A. Terapêutica citoprotetora em pacientes tratados com quimio e/ou radioterapia anti neoplásica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 2, p. 123-8, 2000.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Quimica Nova**, v. 27, n. 2, p. 308-312, 2004.

STANCA, C. M.; BABAR, J.; SINGAL, V.; OZDENEROL, E.; ODIN, J. A. Pathogenic role of environmental toxins in immune-mediated liver diseases. **Journal of immunotoxicology**, Vol. 5, pp. 59-68, 2008.

STEGER, F.; HAUTMANN, M. G. KOLBL, O. 5-FU-induced cardiac toxicity - an underestimated problem in radiooncology? **Radiation Oncology**. Vol. 7, pp. 212, 2012.

STRASSER, A.; CORY, S. ADAMS, J. M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. **EMBO Journal**. vol. 30, n. 18, p. 3667-83, 2011.

SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; REDDANNA, P. Anti-proliferative and Apoptotic Effects of Celecoxib on Human Chronic Myeloid Leukemia in vitro. **Cancer Letters**, v. 224, p. 31-43, 2005.

TALMADGE, J. E., SINGH, R. K., FIDLER, I.J., RAZ, A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **The American journal of pathology**, Vol. 170, pp. 793–804, 2007.

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective, **Cancer research**, Vol. 70 No.14, pp. 5649-5669. 2010.

TOWNSON, J.L., & CHAMBERS, A.F. Dormancy of solitary metastatic cells. **Cell Cycle**, vol. 5, pp. 1744–1750, 2006.

VASCONCELOS, T. H. C. et al. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 583-591, 2007.

VENDRAMINI-COSTA, D. B. et al. Effect of goniotalamin on the development of Ehrlich solid tumor in mice. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 18, p. 6742-6747, 2010.

VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE, D.R., BERNEMAN, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell proliferation**, Vol 36, pp.131-149, 2003.

VIEIRA, J.; MATSUZAKI, P.; NAGAMINE, M. K.; HARAGUCHI, M.; AKISUE, GORNIK, G.; S. L.; DAGLI, M. L. Z. Inhibition of Ascitic Ehrlich Tumor Cell Growth by Intraperitoneal Injection of *Paffia paniculata* (Brazilian ginseng) Butanolic Residue. **Brazilian archives of biology and technology**. v. 53, n. 3, p. 609-613, 2010.

VIEIRA, P. M.; PAULA, J. R.; CHEN-CHEN, L. *Solanum paniculatum* L. Leaf and Fruit Extracts: assessment of modulation of cytotoxicity and genotoxicity by micronucleus test in mice. **Journal of Medicinal Food**, v.13, n.6, p.1-7, 2010.

VINAYAK, R., PUTTANANJIAH, S., CHATTERJI, A., SALIMATH, B. Anti-proliferative and angio-suppressive effect of *Stoechospermum marginatum* (C. Agardh) Kutzing extract using various experimental models. **Nutrition research and practice**. v. 8, n. 4, p. 377-385, 2014.

VIRK-BAKER, M. K., NAGY, T. R., BARNES, S. Role of Phytoestrogens in Cancer Theraphy. **Planta Medica**. Vol. 76, pp. 1132-1142, 2010.

WADA, H., NAGANO, H., YAMAMOTO, H., ARAI, I., OTA, H., NAKAMURA, M., DAMDINSUREN, B., NODA, T., MARUBASHI, S., MIYAMOTO, A., TAKEDA, Y., UMESHITA, K., DOKI, Y., DONO, K., NAKAMORI, S., SAKON, M., MONDEN, M. Combination therapy of interferon-alpha and 5-fluorouracil inhibits tumor angiogenesis in human hepatocellular carcinoma cells by regulating vascular endothelial growth factor and angiopoietins. **Oncology reports**, Vol. 18, no. 4, pp. 801-809, 2007.

WANG, H. M.; CHIU, C. C.; WU, P. F. et al. Subamolide E from Cinnamomum subavenium induces Sub-G1 cell-cycle arrest and caspase-dependent apoptosis and reduces the migration ability of human melanoma cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, p. 8187-8192, 2011.

WANG, Y. R., XU, Y., JIANG, Z. Z., GUERRAM, M., WANG, B., ZHU, X., ZHANG, L. Y. Deoxypodophyllotoxin Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis in SGC-7901 Cells and Inhibits Tumor Growth in Vivo. **Molecules**. Vol. 20, no. pp. 1661-1675, 2015.

WASHABAU, R. J.; CHANDLERS, M.L., STEINER, J.M., SYRING, R.J., TWEDT, D.C., WAHSABAU, R.J., WILLARD, M.D. CHAPTER 61—Liver In Canine and Feline. **Gastroenterology**. pp. 849–957, 2013.

WEISS, G., GOODNOUGH, L. T. Anemia of chronic disease. **New England Journal of Medicine**, Vol. 352, no. 1, 011-23, 2005.

WHO. Câncer. 2010. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 12 dez. 2014. 9:38:20.

WLODKOWIC, D., TELFORD, W., SKOMMER, J., DARZYNKIEWICZ, Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. **Methods in cell biology**, v. 103, pp. 55, 2011.

WU, D. C., LIU, J. M., CHEN, Y. M., YANG, S., LIU, S. M., CHEN, L. T., WHANG-PENG, J. Mitomycin-C induced hemolytic uremic syndrome: a case report and literature review. *Japanese journal of clinical oncology*, v. 27, n. 2, p. 115-118, 1997.

WU, T. T., ZHOU, S. H. Nanoparticle-Based Targeted Therapeutics in Head-And-Neck Cancer. **International Journal of Medical Sciences**, Vol 12 No 2, pp. 187, 2015.

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

YANG, G., LI, X., LI, X., WANG, L., LI, J., SONG, X., CHEN, J., GUO, Y., SUN, X., WANG, S., ZHANG, Z., ZHOU, X., LIU, J. Traditional chinese medicine in cancer

care: a review of case series published in the chinese literature. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

ZHANG, Q.; PAN, E.; LIU, L.; HU, W.; HE, Y.; XU, Q.; LIANG, C. Study on the Relationship between Manganese Concentrations in Rural Drinking Water and Incidence and Mortality Caused by Cancer in Huai'an City. **BioMed research international**,

2014.

ZENG, Z., GORTER, D. J., KOWALSKI, M., TEN DIJKE, P., & SHIMMI, O. Ter94/VCP Is a Novel Component Involved in BMP Signaling. **PloS one**, v. 9, n. 12, p.114475, 2014.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiology Science**, v. 19, p.124-28, 2004.

ANEXO A – 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					
Iritabilidade					
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					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação					
Respiração forçada					
Lacrimajamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

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

