ALINE VIEIRA PINHEIRO DE ARAUJO

Estudos pré-clínicos de toxicidade aguda e de doses
repetidas da fosfoetanolamina sintética

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título Mestre em
Ciências

Programa de Fisiopatologia
Experimental
Orientador: Prof. Dr. Durvanei
Augusto Maria

São Paulo, SP

2017

ALINE VIEIRA PINHEIRO DE ARAUJO

Estudos pré-clínicos de toxicidade aguda e de doses
repetidas da fosfoetanolamina sintética

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título Mestre em
Ciências

Programa de Fisiopatologia
Experimental
Orientador: Prof. Dr. Durvanei
Augusto Maria

São Paulo, SP

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Araujo, Aline Vieira Pinheiro de
Estudos pré-clínicos de toxicidade aguda e de
doses repetidas da fosfoetanolamina sintética /
Aline Vieira Pinheiro de Araujo. -- São Paulo, 2017.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Descritores: 1.Fosfoetanolamina sintética
2.Toxicidade 3.Medula óssea 4.Testes para
Micronúcleos 5.Mitocôndria 6.Reticulócitos

USP/FM/DBD-450/17

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos a DEUS, porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Meu infinito agradecimento e amor incondicional ao meu esposo e melhor amigo, Marcos. Sempre acreditando e me incentivando, além de renunciar tanto da própria vida e atrasar tantos projetos por essa causa. E nossa filha Lívia, que chegou alegrando e trazendo mais amor às nossas vidas durante esse mestrado, seu amor não me deixou desistir (ou surtar)!

Aos meus familiares, que além de tudo são os melhores amigos e irmãos, que reclamaram tanto da minha ausência neste processo, mas sempre com amor. E aos familiares do meu esposo que indiretamente também sempre nos apoiaram.

Ao professor Durvanei, que além da direção para o meu melhor trabalho, ter sido compreensivo, e me apoiado na minha gravidez e no meu retorno ao trabalho, além de sempre me incentivar e seguir em frente, melhorar, sempre cobrando mais. Isso com certeza fez de mim uma aluna melhor, mesmo que por tantos momentos eu tenha acreditado não ser capaz de corresponder.

Aos colegas e amigos do laboratório: Roseli, que literalmente colocou a “mão na massa” comigo, me ajudando nas coletas e necropsias dos camundongos; Arthur, que além da grande amizade que fizemos me auxiliou com as citometrias de fluxo; Manuela, que desde o começo sempre com muita paciência me ajudou e ensinou tantas coisas; Larissa, companheira desde a faculdade e que me apresentou ao professor Durvanei; Sônia, me deu tantas dicas no trato com os animais; Polyana por ter me auxiliado com a Histologia;

Heleusa e Beatriz pela ajuda com a realização das análises bioquímicas, sempre solícitas e educadas; Daniel, que sempre estava disposto a ajudar em tudo, mesmo sempre estando tão ocupado; Thaís, pelo incentivo e amizade; ao falecido Jorge que cuidou dos camundongos no biotério; Angelina e Maria Eduarda pelas ótimas conversas e tornarem os dias mais leves. Agradeço muito a vocês todos pela ajuda profissional e por sempre estarmos torcendo uns pelos outros.

Agradeço, também, à CAPES pelo apoio financeiro e ao pessoal da coordenação da Pós Graduação em Fisiopatologia, sempre atenderam prontamente a todas as dúvidas e solicitações.

E já que ninguém vence sozinho, quero agradecer mais uma vez e imensamente a todos!

RESUMO

ARAUJO, A.V.P. *Estudos pré-clínicos de toxicidade aguda e de doses repetidas da fosfoetanolamina sintética*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A Fosfoetanolamina Sintética (FO-S), monoéster-fosfolípide tem importante papel sobre a proliferação celular, indução da apoptose, em células tumorais, sem, contudo, afetar as células normais. Neste estudo foi avaliado o comportamento biológico e efeitos da toxicidade aguda da fosfoetanolamina sintética (FO-S), em experimentos de dose única e repetidas em camundongos saudáveis, contribuindo para validação pré-clínica. Os camundongos Balb-c de ambos os sexos receberam o composto FO-S via endovenosa nas doses de 50, 100, 250, 500 e 1000 mg/kg em dose única, e 50, 100 e 250 mg/kg em doses repetidas. No grupo dose única os animais que receberam 500 e 1000 mg/kg de FO-S apresentaram sinais de toxicidade, tais como: mortalidade de 33% dos animais; rebaixamento no sistema nervoso central e autônomo; flutuações das análises hematológicas; aumento dos níveis de TGO e TGP; diminuição de creatinina; análises da medula óssea mostraram diminuição das populações mielóides e linfóides; diminuição de células na fase G0/G1 do ciclo celular, assim como na fase S, e aumento na fase G2/M; alterações histológicas no coração, fígado e rins como necrose, esteatose, hialinização e hiperemia respectivamente. Tanto no grupo dose única, como no grupo doses repetidas, ocorreu aumento no número de reticulócitos no 7º dia após a aplicação, como resposta da medula óssea reativa, e as análises da sua celularidade revelaram atividade positiva do potencial elétrico mitocondrial. No grupo doses repetidas, os animais que receberam 50 mg/kg de FO-S apresentaram no 14º anemia leve, o grupo 100 mg apresentou aumento no número de leucócitos e linfócitos e o grupo 250 mg flutuações nos valores quantitativos de plaquetas, que retornaram à normalidade após 14 dias. As análises da medula óssea revelaram aumento de células no compartimento mielóide no grupo que recebeu 50 mg e aumento da celularidade no compartimento eritroide. A expressão dos marcadores de células precursoras hematopoiéticas da medula óssea, CD34, se mostrou aumentada no grupo que recebeu 250 mg aos 14 dias e diminuição dos marcadores de células mielóides e subtipos de linfócitos, CD43, nos grupos que receberam 100 e 250 mg/kg aos 7 e 14 dias. Os animais que receberam 250 mg/kg apresentaram alterações no parênquima pulmonar. A análise de autofagia por citometria de fluxo que não revelou resposta negativa, como estresse oxidativo, apresentando produção normal de vacúolos autofágicos, assim como o teste de presença de micronúcleos não demonstrou danos às células por alterações genéticas induzidas por toxicidade.

Descritores: fosfoetanolamina sintética; toxicidade; medula óssea; micronúcleo; mitocôndria; reticulócitos.

ABSTRACT

ARAUJO, A.V.P. Pre-clinical studies of acute and repeated-dose toxicity of synthetic phosphoethanolamine. [Dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2017.

Synthetic Phosphoethanolamine (FO-S), a monoester phospholipid has an important role on cell proliferation, induction of apoptosis, in tumor cells, without, however, significantly affecting normal cells. In this study the biological behavior and effects of acute toxicity of synthetic phosphoethanolamine (FO-S) were evaluated in single dose and repeated experiments in healthy mice, contributing to the pre-clinical validation of this compound as antitumor phospholipid. Mice of both sexes received intravenous FO-S compound at doses of 50, 100, 250, 500 and 1000 mg / kg in single dose, and 50, 100 and 250 mg / kg in repeated doses. In the single dose group, animals receiving 500 and 1000 mg / kg FO-S showed signs of toxicity, such as: 33% mortality of animals; lowering in the central and autonomic nervous system; fluctuations in hematological analyzes; increased levels of TGO and TGP; decreased creatinine; bone marrow analysis showed decreased myeloid and lymphoid populations; decrease of cells in the G0 / G1 phase of the cell cycle, as well as in the S phase, and increase in the G2 / M phase; histological changes in the heart, liver and kidneys such as hyperemia, necrosis and hyalinization. In both the single dose and repeated dose groups, there was an increase in the number of reticulocytes on the 7th day after application, as a response of the reactive bone marrow, and the cellularity analysis showed positive mitochondrial electrical potential activity. In the repeated dose group, animals receiving 50 mg / kg FO-S presented in the 14th mild anemia, the 100 mg group showed an increase in the number of leukocytes and lymphocytes and the group 250 mg fluctuations in the quantitative platelet values, which returned to the normality at 14 days. Bone marrow analysis revealed increased cell count in the myeloid compartment in the 50 mg group and increased cellularity in the erythroid compartment. Expression of CD34 marrow hematopoietic precursor cell markers was shown to be increased in the 250 mg group at 14 days and a decrease in myelodystic cell markers and CD43 lymphocyte subtypes in the groups receiving 100 and 250 mg / kg at 7 and 14 days. Animals that received 250 mg / kg presented changes in the lung parenchyma. Autophagy analysis was performed by flow cytometry that revealed no negative response, such as oxidative stress, presenting normal production of autophagic vacuoles, as well as the presence of micronuclei test did not demonstrate damage to the cells by genetic changes induced by toxicity.

Descriptors: synthetic phosphoethanolamine; toxicity; bone marrow; micronucleus; mitochondria; reticulocytes.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 FOSFOLIPÍDEOS	15
1.1.1 Fosfolipídeos Antitumorais.....	17
1.1.2 Fosfoetanolamina	21
1.2 NOVOS FÁRMACOS	24
1.3 TOXICIDADE	25
1.3.1 Toxicidade aguda – dose única	26
1.3.2 Toxicidade aguda – doses repetidas.....	27
2 OBJETIVOS.....	29
3 METODOLOGIA.....	31
3.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
3.2 PREPARAÇÃO DO COMPOSTO FO-S.....	34
3.3 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....	35
3.4 ANÁLISES DO NÚMERO TOTAL DE RETICULÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO	35
3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	35
3.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PELA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA.....	36
3.7 MIELOGRAMA	37
3.8 IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS E PRECURSORES DA MEDULA ÓSSEA.....	37
3.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA POR CITOMETRIA DE FLUXO	38
3.10 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR.....	39
3.11 ANÁLISE DE AUTOFAGIA POR FLUORESCÊNCIA DO MARCADOR LARANJA DE ACRIDINA COM CITÔMETRO DE FLUXO	40

3.12 TESTE DO MICRONÚCLEO DA MEDULA ÓSSEA.....**Erro!**
Indicador não definido.

3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... **Erro! Indicador não definido.**

4 RESULTADOS **Erro! Indicador não definido.**

4.1 GRUPO DOSE ÚNICA **Erro! Indicador não definido.**

4.1.1 Análise comportamental..... **Erro! Indicador não definido.**

4.1.2 Avaliação da mortalidade **Erro! Indicador não definido.**

4.1.3 Avaliação ponderal..... **Erro! Indicador não definido.**

4.1.4 Análises hematológicas..... **Erro! Indicador não definido.**

4.1.4.1 Eritrócitos **Erro! Indicador não definido.**

4.1.4.2 Leucócitos **Erro! Indicador não definido.**

4.1.4.3 Plaquetas **Erro! Indicador não definido.**

4.1.5 Análises do número de reticulócitos no sangue periférico .**Erro!**
Indicador não definido.

4.1.6 Análises bioquímicas..... **Erro! Indicador não definido.**

4.1.7 Análise das alterações macroscópicas e peso dos órgãos
internos..... **Erro! Indicador não definido.**

4.1.8 Avaliação histopatológica pela coloração de hematoxilina-
eosina **Erro! Indicador não definido.**

4.1.9 Mielograma **Erro! Indicador não definido.**

4.1.9.1 Análise Mielograma (Machos)**Erro! Indicador não**
definido.

4.1.9.2 Análise Mielograma (Fêmeas)**Erro! Indicador não**
definido.

4.1.10 Avaliação da atividade mitocondrial das células da medula
óssea por citometria de fluxo **Erro! Indicador não definido.**

4.1.11 Imunofenotipagem de células e precursores da medula óssea
..... **Erro! Indicador não definido.**

4.1.12 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo **Erro! Indicador não definido.**

4.2 GRUPO DOSES REPETIDAS Erro! Indicador não definido.

4.2.1 Análise comportamental.....	Erro! Indicador não definido.
4.2.2 Avaliação da mortalidade	811
4.2.3 Avaliação ponderal.....	822
4.2.4 Análises hematológicas.....	833
4.2.5 Análises bioquímicas.....	911
4.2.6 Análise das alterações macroscópicas e peso dos órgãos internos.....	922
4.2.7 Avaliação histopatológica pela coloração de hematoxilina- eosina	944
4.2.8 Mielograma	97
4.2.9 Imunofenotipagem das populações e precursores da medula óssea	1000
4.2.10 Avaliação da atividade mitocondrial das células da medula óssea por citometria de fluxo	1066
4.2.11 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo	1077
4.2.12 Análise de autofagia com marcador laranja de acridina por citometria de fluxo.....	1122
4.2.13 Avaliação do teste de micronúcleo.....	1144
5 CONCLUSÃO.....	1176
6 DISCUSSÃO.....	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Erro! Indicador não definido.29

1 INTRODUÇÃO

Produtos bio-ativos alvo-específicos obtidos por nanotecnologia, prometem desempenhar um papel decisivo no desenvolvimento de novos fármacos. Sendo necessário que ocorra maior interação entre os grupos que trabalham em diferentes áreas, como síntese orgânica, química medicinal, produtos naturais, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, entre outras. Segundo relatório da ANVISA, sobre a divulgação da relação de medicamentos novos, produtos biológicos e radiofármacos autorizados em 2016, 40% são medicamentos registrados como oncológicos (ANVISA 2017).

O câncer é responsável por uma, em cada seis causas de óbito no mundo: mais de 8,8 milhões de pessoas morrem da doença anualmente. Como a esperança de vida tem melhorado gradativamente, a incidência de câncer, estimada em 2012 em 14 milhões de casos novos, alcançará quase 21 milhões em 2030, segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) (OMS 2017) e o INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) (INCA 2015). Este cenário ilustra a necessidade de grande investimento no desenvolvimento de ações abrangentes para melhoria do controle, como também o desenvolvimento de novas terapias seletivas e humanizadas no tratamento e no diagnóstico precoce do câncer, como neste proposto estudo, a validação do uso da Fosfoetanolamina Sintética (FO-S) em apresentação e formulação farmacológicas estáveis e uso de boas práticas laboratoriais. A FO-S é uma molécula fosforilada artificialmente, com síntese inédita realizada pela primeira vez pelo nosso grupo, diferindo-se das moléculas atuais pelo seu nível de absorção em sistemas biológicos de aproximadamente 90%, com diversas propriedades anti-inflamatórias e apoptóticas, precursoras da fosfatidilserina, expressa pelas células apoptóticas. Este processo de morte celular possui um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual e é importante em certas condições patológicas, incluindo o câncer.

Os tratamentos tornaram-se mais eficazes com o surgimento de novos conhecimentos biológicos do câncer, e com a indução química da apoptose, já, as terapias convencionais com drogas antitumorais são pouco seletivas e efetivas. Nossos resultados demonstraram que a fosfoetanolamina é um potente indutor de morte celular. Em estudo realizado por Meneguelo em 2007 os animais portadores de tumores melanoma B16F10 foram tratados após o 14º dia do implante tumoral com solução aquosa de fosfoetanolamina sintética e mostraram em comparação aos quimioterápicos comerciais Taxol e Etoposideo que o tratamento induz citotoxicidade

seletiva para as células tumorais com IC50% de 1.69 ug/ml sem alterar a resposta proliferativa in vitro de células normais. Os animais portadores de tumores dorsais de melanoma B16F10 apresentaram significativa redução da carga tumoral, mostrando inibição da capacidade de crescimento e a metastatização. A avaliação hematológica sistêmica neste modelo não demonstrou alterações relevantes após a administração da fosfoetanolamina sintética em animais portadores de melanoma (MENEGUELO 2007). Conclui-se que a FO-S diminuiu significativamente o tamanho de tumores de forma seletiva, sem alterações em células normais, com vantagem em relação aos quimioterápicos comerciais, pois a mesma não apresentou os terríveis efeitos colaterais dos mesmos.

Neste projeto foram avaliadas as respostas à toxicidade aguda da FO-S, em dose única e doses repetidas, em modelos experimentais saudáveis, para uma nova abordagem estratégica no desenvolvimento de terapias antineoplásicas em humanos. As etapas deste projeto obedeceram às normas instituídas pelos órgãos competentes. São incorporados os quatro referenciais básicos da bioética: autonomia, não maleficência, beneficência e justiça. Considerando que as Boas Práticas Clínicas (BPC) constituem um padrão de qualidade científica e ética internacional para o desenho, a condução, o registro e o relato de estudos clínicos, que têm sua origem no código de Nuremberg (1947), na Declaração de Helsink (1948), de Tokyo (1975), de Veneza (1983) e de Hong Kong (1989), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) orienta as inspeções em Boas Práticas Clínicas, fundamentado no Documento das Américas, do qual o Brasil é signatário, na Conferência Internacional de Harmonização (ICH) e na Resolução RDC nº 39, de 01 de agosto de 2008, Anexo I, Art. 8º, parágrafo 2º que determina a realização de inspeções nos centros de pesquisa a fim de verificar o grau de aderência à legislação brasileira vigente e às boas práticas de experimentação pré-clínica e clínica (ANVISA, Guia Para A Condução De Estudos Não Clínicos De Segurança Necessários Ao Desenvolvimento De Medicamentos 2013).

1.1 FOSFOLIPÍDEOS

Fosfolipídeos (FLs) são os lipídeos mais abundantes das membranas celulares. Eles possuem um grupamento polar, situado no espaço citoplásmico aquoso, e duas caudas de hidrocarbonos hidrofóbicas (ou apolar), no interior da bicamada lipídica (VAN MEER G 2008); (ALBERTS, et al. 2010). Os fosfoglicerídeos são os principais FLs da maioria das membranas das células animais, possuem uma estrutura central de glicerol de três carbonos. Dois destes átomos de carbono se unem a duas longas cadeias de ácidos graxos por pontes ésteres, e o terceiro átomo de carbono está ligado a um grupo fosfato, o qual por sua vez é ligado a um entre vários tipos de grupos de cabeças. Combinando diferentes ácidos graxos e grupos de cabeças polares. As células produzem diferentes fosfoglicerídeos, dos quais, os principais das membranas das células de mamíferos são a fosfadidiletanolamina, a fosfatidilserina e a fosfatidilcolina. Outro fosfolipídeo importante, denominado esfingomielina é composto por esfingosina ao invés de glicerol. A esfingosina é uma longa cadeia acil com um grupo amino (NH_2) e dois grupos hidroxila (OH) em uma extremidade da molécula. Na esfingomielina, a cauda de ácido graxo é ligada ao grupo amino e o grupo fosfatidilcolina é ligado ao grupo hidroxila terminal deixando um grupo hidroxila livre. O grupo hidroxila livre contribui para propriedade polar do grupo de cabeça adjacente e pode formar ligações de hidrogênio com o grupo de cabeças do lipídeo vizinho, com uma molécula de água ou com uma proteína de membrana. Juntos, os FLs fosfatidilcolina, fosfadidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingomielina constituem mais da metade da massa de lipídeos da maioria das membranas celulares de mamíferos (ALBERTS, et al. 2010).

As moléculas lipídicas agregam-se espontaneamente mergulhando suas caudas hidrofóbicas de hidrocarbonos no interior e expondo suas cabeças hidrofílicas na água. Dependendo de sua forma, elas podem fazer isso de duas maneiras: podem formar micelas esféricas com as caudas para dentro ou formar folhas de camadas duplas, ou bicamada, com as caudas hidrofóbicas para o interior entre as cabeças hidrofílicas. As moléculas de FLs por serem cilíndricas, formam bicamadas espontaneamente em ambientes aquosos. As mesmas forças que fazem com que os FLs formem as bicamadas também proporcionam uma propriedade de autosselamento. Uma pequena fenda na bicamada cria uma borda livre em contato com água e, devido ao fato de serem energeticamente desfavoráveis, os lipídeos

tendem a se rearranjar espontaneamente para eliminar a borda livre. (Nas membranas plasmáticas eucarióticas, as fendas maiores são reparadas pela fusão de vesículas intracelulares.) A proibição das bordas livres tem profundas consequências: a única forma de uma bicamada evitar a existência de bordas é pelo fechamento sobre si mesma, formando um compartimento fechado. Esse comportamento excepcional, fundamental para a formação de células vivas, é decorrente da forma e da natureza anfifílica das moléculas de FLs (ALBERTS, et al. 2010).

Os FLs de membrana podem formar ligações não covalentes com proteínas periféricas de membrana, muitas vezes por atrações eletrostáticas, estabelecendo o modelo conhecido de mosaico fluído. Os FLs exercem diversas funções nas células, estabelecendo a barreira de permeabilidade, influenciando em uma ampla variedade de processos catalíticos e atuando como doadores para a síntese de macromoléculas. Além de ativamente influenciar na comunicação entre o meio intra e extracelular pela transdução de sinal celular e a interação lipídeo/proteína (VAN MEER G 2008).

Os fosfoglicerídeos podem sofrer a ação de hidrolases denominadas fosfolipases, de acordo com o local de atuação denominam-se A1, A2, C e D. As fosfolipases A1 e A2 atuam, respectivamente, nas ligações éster dos carbonos 1 e 2 do glicerol dos fosfoglicerídeos; o fosfoglicerídeo com menos um ácido graxo que resulta destes processos é denominado de lisofosfolipídeo (LSs). Uma fosfolipase que atua sobre o LSs catalisando a hidrólise do ácido graxo restante designa-se de fosfolipase B. A fosfolipase C atua na ligação fosfoéster que liga o glicerol ao fosfato, enquanto a fosfolipase D “separa” o fosfatidato da base. Para além de poder resultar da ação das fosfolipases A1 e A2, a formação de LSs também pode ocorrer por transferência do ácido graxo da posição 2 de um fosfoglicerídeo para o colesterol (MICHEL, et al. 1997).

Quando ocorre um excesso de LSs e estes entram em contato com uma membrana em equilíbrio, há a integração destes lipídeos exógenos na bicamada, tornando rapidamente, a membrana mais fluida e permeável. Quando as membranas estão em equilíbrio, elas apresentam uma série de poros, que representam a falta de FLs na estrutura e observa-se também a agregação destes poros, porém, a distribuição, o número e tamanho dos poros são alterados quando os LSs são introduzidos na membrana. Os LSs também possuem a capacidade de

formar lipossomas. Os FLs comuns tendem a formar micelas, mas estas são de grandes dimensões e de difícil absorção. Por outro lado, os LSs formam pequenos e compactos lipossomas que são mais facilmente absorvidos (PINTALUBA, A.S.A. 2016); (AKERS e DENBOW 2008).

Os FLs são caracterizados por uma temperatura de transição de fase, na qual a membrana passa de uma fase gel, onde a cadeia hidrocarbonada do lipídeo está em estado ordenado, para uma fase de cristal-líquido, onde as moléculas ficam com movimentos mais livres e os radicais hidrofílicos agrupados tornam-se completamente hidratados. O comprimento e a saturação da cadeia lipídica influenciam o valor da transição de fase. Portanto, diferentes membranas compostas por lipídeos distintos podem exibir diferentes níveis de fluidez na mesma temperatura (FRÉZARD, et al. 2005); (LASIC 1998). A permeabilidade dos lipossomas é relativamente baixa quando a temperatura é menor que a transição de fase dos lipossomas, sendo a mesma medida pelo fluxo ou pela taxa em que o soluto sai do compartimento aquoso, através da bicamada. Esta propriedade vai depender, no entanto, da natureza do soluto e da fluidez da membrana (FREZARD 1999). Na evolução de seu emprego como carreadores de fármacos, algumas alterações foram realizadas na estrutura básica dos lipossomas possibilitando maior aplicação terapêutica (TORCHILIN 2005).

1.1.1 Fosfolipídeos Antitumorais

Considera-se que a distribuição de diferentes FLs na bicamada membranar não é aleatória, e que sua redistribuição pode ser importante na estrutura e na sinalização celular. Através desta abordagem que, em busca de novas moléculas imunomoduladoras, proveniente dos FLs, na década de 1960, foi identificado o primeiro análogo metabolicamente estável da Lisofosfatidilcolina (LisoFC). Desde então, a utilização dos lisofosfolipídios (LSs) como fonte de novos compostos bioativos tem sido baseada na conhecida atividade biológica, atuando como reguladores de diversas atividades enzimáticas celulares, tais como a ativação de macrófagos peritoneais e o aumento e modificação da resposta imunológica (BERKOVIC 1998); (VAN BLITTERSWIJK e VERHEIJ 2013).

Muitos lipídeos assimetricamente concentrados na parte citoplasmática da membrana celular possuem importantes funções na sinalização celular. Vários grupos polares ligados a lipídeos estão envolvidos em vias de sinalização, entre os quais podem ser destacados a serina, a colina e o inositol e seus derivados fosfatados. Um dos principais mecanismos de sinalização envolvendo lipídios é a clivagem de fosfatidilinositois de membrana para a formação de Diacilglicerol (DAG) e Inositol-1,4,5-Trifosfato (IP3) por Fosfolipase C (PLCs). IP3 pode se ligar á receptores do retículo endoplasmático, liberando Ca^{2+} destes estoques, enquanto que DAG pode ativar diversas isoformas de Proteínas Kinase C (PKCs) (TOKER 1998).

Entretanto, como os LSs são instáveis metabolicamente e rapidamente metabolizados na membrana celular, foram realizados esforços na tentativa de aumentar a estabilidade química destes compostos, potencializando sua capacidade imunomoduladora. Modificações estruturais na LisoFC, como a substituição da ligação éster por éter na região que conecta o glicerol a cadeia de hidrocarbonetos foram realizadas, tornando as estruturas análogas metabolicamente resistentes à acetiltransferases e as lisofosfolipases, responsáveis pelo metabolismo dos FLs (EIBL, et al. 1967). No decurso do desenvolvimento, Munder e colaboradores demonstraram pela primeira vez, que entre alguns destes análogos sintetizados, em especial, o grupo de alquil-derivados, apresentavam efetiva atividade citotóxica e citostática em linhagens de células tumorais (MUNDER e MODOLELL 1973); (ANDREESEN, et al. 1978). Os alquilfosfolipídeos sintéticos pertencem a uma classe heterogênea de agentes antineoplásicos. Apresentam alta estabilidade metabólica, e potente atividade citotóxica contra diferentes tipos de tumores, devido à ação antiploriferativa e indução de apoptose, observadas para diversos tipos de células tumorais humanas *in vitro* e *in vivo*, além da atividade antiparasitária *in vitro* (ARTHUR e BITTMAN 1998); (HECZKOVA e SLOTT 2006); (LI, et al. 2006); (PAPAZAFIRI, et al. 2005); (VINK, et al. 2007).

Estes éteres derivados da LisoFC pertencem a uma promissora nova classe de agentes com atividade antitumoral, tais como edelfosina, miltefosina, perifosina, erucilfosfocolina e erufosina. Em contraste, com a maioria dos medicamentos quimioterápicos usados atualmente, como a cisplatina ou taxol, os Alquilfosfolipídios Antitumorais (AFTs), além de serem potentes sensibilizadores da quimioterapia e radioterapia convencionais, não têm como alvo o DNA ou o citoesqueleto celular, e

sim, seus efeitos tumorais estão relacionados com a modificação do *turnover* na membrana celular, após se inserirem na membrana plasmática levam a uma gama de efeitos biológicos que levam a morte celular, são seletivos para células tumorais, induzindo parada de crescimento e apoptose (JIMÉNEZ-LÓPEZ, et al. 2010); (POSADAS, et al. 2005); (SOTO e SOTO 2006); (VAN BLITTERSWIJK e VERHEIJ 2013).

É conhecido o fato de que a membrana plasmática possui receptores específicos capazes de sentir as mudanças do meio, e eles são necessários para responder de diversas formas a todos os estímulos ambientais, pois a regulação e função da membrana plasmática dependem do transporte e processos endocíticos adequados para a composição e renovação da membrana e proteínas plasmáticas (KAMALESH, et al. 2017). A dinâmica das membranas celulares, permitem que as mesmas aumentem e diminuam, permitindo assim a remoção e substituição de seus componentes moleculares, como os constituintes do citoesqueleto e fosfolipídios (STAYCOVA M 2011).

Aquilfosfolipídeos sintéticos são facilmente inseridos no folheto externo da membrana plasmática. Podem atravessar a membrana espontaneamente, que por sua vez é um processo lento por ser energeticamente desfavorável, ou com a ajuda de um transportador/translocador lipídico dependente de ATP, ou, em células de linfoma/leucemia são internalizadas por endocitose dependente de microdomínios lipídicos (VAN BLITTRSWIJK 2008).

Os alquilfosfolipídios exibem um mecanismo de ação comum através da interrupção da homeostase do colesterol, pois inibem a chegada de colesterol da membrana plasmática ao retículo endoplasmático, o que induz uma resposta envolvendo uma maior expressão gênica e níveis mais altos de várias proteínas relacionadas à via da biossíntese, bem como absorção de colesterol mediada por receptor, resultando em acúmulo de colesterol dentro da célula, redução de fosfatidilcolina e biossíntese de esfingomielina. Os microdomínios de membrana específicos têm, portanto, sua integridade e funcionalidade prejudicadas, já que esses distúrbios alteram a proporção de fosfolipídios transportadores de colina para o colesterol, crítico para os processos de sinalização vitais para a sobrevivência e crescimento celular (JIMÉNEZ-LÓPEZ, et al. 2010).

Os dois primeiros agentes antitumorais pertencentes à família das alquilfosfocolinas estudados em ensaios clínicos foram a edelfosina (1-0-octadecil-2-

O-metil-sn-glicero-3-fosfocolina, Et-18-OCH₃) e a miltefosina (hexadecilfosfocolina) (OBERLE, MASSING e KRUG 2005). Os lipídeos antitumorais sintéticos são divididos em dois grandes subtipos: O primeiro, composto pelos alquil éter fosfolipídios, coletivamente chamados de éter lipídios antitumorais ou análogos AFTs, contendo ligações éter no glicerol dos FLs, o principal protótipo da classe é a Edelfosina. O segundo grupo é formado pela alquilfosfocolina (AFC), que na sua estrutura não apresenta o glicerol, sendo formado por um álcool de cadeia longa esterificado a uma simples fosfobase, com o principal protótipo representante, a hexadecilfosfocolina (HefC; Miltefosina) (MOLLINEDO, DE LA IGLESIA-VICENTE, et al. 2010); (BUSTO, et al. 2008).

Edelfosina destaca-se na prática clínica como eficaz no tratamento de leucemia aguda, sendo capaz de induzir apoptose o que permitiu tornar-se o protótipo para a elaboração de novos éteres-derivados. Com relação aos estudos de estrutura atividade, claramente indicam que as substituições em C2 e C3 da Edelfosina bloqueiam completamente a capacidade da molécula de induzir a apoptose. Além disso, a presença de um curto grupo, O-metil-não-hidrolizável em C2, bem como um grupo polar na cabeça da fosfocolina no C3 são críticos para suas ações apoptóticas. No entanto, a cadeia de O-octadecil em C1 pode ser substituída por outros O-alquil de cadeia longa sem afetar a habilidade do éter lipídico de induzir a apoptose (FUJIWARA 1997); (MOLLINEDO, DE LA IGLESIA-VICENTE, et al. 2010).

A Miltefosina foi um dos primeiros AFTs desenvolvidos, aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), para uso oral no tratamento de leishmaniose visceral, além de, atuar como agente antifúngico. Contrário à maioria dos AFTs, a Miltefosina é metabolizada sistemicamente por fosfolipases, gerando subprodutos atóxicos como a fosfocolina e 1,2 diacilfosfatidilcolina. A Miltefosina também apresenta potente atividade antitumoral *in vitro*, entretanto, tem sua utilização clínica limitada à aplicação tópica e oral, devido ao alto grau de hemólise, tem sido utilizada, portanto, na clínica para o tratamento tópico de metástases cutâneas de câncer de mama e no linfoma cutâneo, sendo também amplamente utilizada para o tratamento da leishmaniose tropical (DUMMER, et al. 1993); (KHADEM VATAN, et al. 2011). Recentemente, a miltefosina teve a aprovação do Ministério da Saúde e da Agricultura para a comercialização do Milteforan™ para tratamento da leishmaniose visceral canina (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA 2016).

Devido aos promissores efeitos antitumorais da Edelfosina e da Miltefosina, estes são considerados modelos estruturais na busca de novos AFTs. Como exemplo de novos análogos desta classe, destaca-se o Erucilfosfolcolina (ErFC), que se difere da Miltefosina no comprimento da cadeia alquila e a presença de uma ligação dupla. Essas diferenças estruturais são responsáveis pela alteração no comportamento farmacológico e nos aspectos físico-químicos, como o aumento da hidrofobicidade, resultando na formação de uma estrutura lamelar membranosa, eliminando a toxicidade hemolítica, podendo desta forma, ser administrado por via intravenosa (BAGLEY, et al. 2011).

Os alquilfosfolípidios conferem resistência às membranas lipídicas, pois tem a capacidade de se inserirem facilmente às mesmas, devido à sua estrutura química, resistindo à degradação catabólica. O grau de insaturação das cadeias de alquilfosfolípidios e a quantidade de colesterol vai determinar o nível de divisões em bicamadas lipídicas. O mecanismo de ação da Miltefosina, apesar de ainda não ter sido precisamente estabelecido, teria seu alvo de atividade nas membranas do retículo endoplasmático, onde estão localizadas as enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, além da transdução de sinal dependente de lipídeos que ocorre na membrana (GEILEN CC 1994); (BERKOVIC D 2003); (VAN BLITTRSWIJK 2008); (BARRATT G 2009).

1.1.2 Fosfoetanolamina

Os FLs de etanolamina são componentes estruturais essenciais das membranas celulares e desempenham papéis regulatórios na divisão celular, sinalização, ativação, autofagia e fagocitose (BAKOVIC, FULLERTON e MICHEL 2007). A fosfoetanolamina foi isolada de tumores malignos bovinos, por OUTHOUSE, em 1936, fornecendo a primeira comprovação da existência deste composto, no estado livre, na natureza (OUTHOUSE 1936). Após essa descoberta, outros pesquisadores encontraram a fosfoetanolamina em intestino de ratos e em tecidos cerebrais de bovinos (AWAPARA 1950); (FOLSCH 1959).

A fosfoetanolamina endógena é sintetizada por duas rotas biológicas, a primeira corresponde à via clássica de Kennedy utilizando colina e a etanolaminaquinase, que são amplamente presentes em eucariotos. Estas enzimas

catalisam o passo da via Kennedy, que é a fosforilação ATP-dependente na etanolamina ou colina, formando fosfoetanolamina e ou fosfocolina (GIBELLINI 2010). Uma segunda via envolve o cálcio estimulando a incorporação de serina, etanolamina e colina nos fosfolípides endógenos já existentes, em reações que não precisam de ATP (PERRY 1971).

Por outro lado, a fosfoetanolamina está envolvida na fosforilação oxidativa mitocondrial e na síntese das membranas mitocondriais. Vários trabalhos enfocaram os diferentes comportamentos químicos dos fosfolípidos, fosfoproteínas e outras classes de organofosforados (FOLSCH 1959). Por estarem presentes em tecidos orgânicos normais como o cérebro e em alguns tumores, surgiu um especial interesse científico nos compostos fosforilados, com o objetivo de se elucidar o papel bioquímico destas substâncias.

A FO-S pode ocorrer em um processo não clássico, utilizando como substrato a esfingosina-1-fosfato (S1P) pela ação da S1P lyase, com a formação do produto final fosfoetanolamina sintética e o hexadecanol (GIBELLINI 2010).

A fosfoetanolamina orgânica e a etanolamina (EA) estão presentes no cérebro normal em grandes quantidades e sua dose também se encontra aumentada em vários tipos de tumores, onde este aumento pode ser da ordem de até 10 vezes (PERRY 1971). Essas aminas estão envolvidas no metabolismo dos fosfolípidos e são precursoras da fosfatidiletanolamina e da fosfatidilcolina, dois dos quatro fosfolípidos que compõe a membrana celular (CORAZZI 1986). Foi demonstrado por vários pesquisadores que a FO-S e a EA são liberadas por despolarização em algumas circunstâncias, embora não se saiba qual o verdadeiro significado fisiológico desta constatação, discute-se ainda, quais as reais interações eletroquímicas envolvidas na dimerização do composto fosfoetanolamina no organismo (CORAZZI 1986); (MAIRE 1984).

Estudos indicam que muitas patologias do SNC e tumores inespecíficos têm causa provável na deficiência de fosfoetanolamina. Em pacientes com doença de Alzheimer confirmadas neuropatologicamente, foram dosados a fosfoetanolamina nas regiões de predileção da doença. Os dados foram comparados com cérebros normais da mesma idade. Constataram que com diferenças estatisticamente significantes, quando comparados com cérebros normais da mesma idade, os níveis de fosfoetanolamina se encontravam 64% reduzidos no córtex temporal (área 21 de

Brodmann), 48% no córtex frontal (área 9 de Brodmann) e 40% no hipocampus (ELLISON, BEAL e MARTIN 1987).

A quimioterapia e a radioterapia, os tratamentos de primeira escolha empregados na terapia do câncer, são destituídas de toxicidade seletiva, provocando efeitos colaterais graves, como a inibição da resposta imunológica. O objetivo principal da pesquisa quimioterápica visa a descoberta de novos agentes capazes de inibir especificamente a multiplicação de células neoplásicas, sem afetar a divisão das células normais (FISHER e PETERS 1994); (MU e FENG 2003). O avanço no tratamento de tumores malignos é ainda modesto e a busca por novos tratamentos para as doenças neoplásicas, tem estimulado pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos e a procura por compostos com atividade biológica específica e seletiva (MU e FENG 2003).

Em estudo dos efeitos antiproliferativos e apoptóticos da FO-S no melanoma B16F10, as análises hematológicas revelaram que o composto FO-S não causou mielossupressão e demonstrou estimular a produção de glóbulos vermelhos. A histologia dos tumores dorsais tratados com FO-S apresentou efeito modulador estimulando a síntese de componentes fibrilares (colágeno tipo I; pró-colágeno), promovendo a substituição da densidade das células tumorais por área de fibrose intra-tumoral. As análises histoquímicas dos componentes da matriz fibrilar do colágeno tipo I e pró-colágeno mostraram que a FO-S induz síntese de “novo” da matriz extracelular, possivelmente pela substituição da densidade das células tumorais, como também pelo aumento das áreas de fibrose encontradas nos grupos tratados. Os animais do grupo controle e tratados com 3,3 e 1,65 mg/mL

FO-S que foram submetidos a cintilografia com marcação radioativa $[[^{99m}\text{Tc}](\text{V})(\text{DMSA})_2]$, durante o período experimental demonstraram regressão tumoral através do método não invasivo de marcação específica para tumores sólidos apresentando uma significativa diferença entre, os animais tratados com FO-S nas diferentes concentrações, desta forma sendo considerado de acordo com os padrões internacionais estabelecidos pelo NCI (National Cancer Institute), como agente antitumoral de alta efetividade. De acordo com os padrões estabelecidos pelo NCI com relação à eficácia, a fosfoetanolamina sintética é um agente antitumoral de efetividade altamente significativa (MENEGUELO 2007). Inúmeros trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo estão sendo realizados no intuito de vetorizar, através do uso de nanocarreadores, os fármacos para as massas

tumorais, evitando atingir as células normais. Entre os nanocarreadores, podem ser citados os lipídicos, como os lipossomas e as nano-partículas lipídicas. Os nanocarreadores lipídicos são sistemas biocompatíveis, biodegradáveis e desprovidos de toxicidade, portanto, com enorme potencial para carrear fármacos citotóxicos (OLIVEIRA, et al. 2012).

Estudos do nosso grupo evidenciaram a citotoxicidade da FO-S e sua capacidade de indução da apoptose através da via mitocondrial de linhagens celulares de leucemia in vitro. Em vivo, a FO-S demonstra efeitos antiproliferativos em modelo de leucemia promielocítica aguda (APL), reduzindo o número de CD117(+) e Gr-1(+) células mielóides imaturas na medula óssea, baço e fígado. Tais características conferem ao composto grande importância para o tratamento de leucemia, pois a FO-S prejudica a expansão dos clones malignos CD34(+)/CD117(+), CD34(+) e Gr-1(+) na medula óssea além de induzir a apoptose de células imaturas no baço e fígado (FERREIRA, SANTANA, et al. 2013).

1.2 NOVOS FÁRMACOS

Introduzir um novo medicamento na terapêutica é um processo longo e oneroso. Todo o processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos dura cerca de doze anos, com probabilidade de sucesso muito pequena (L. LIMA 2007). De cada 30.000 moléculas sintetizadas, 20.000 (66,7%) entram na fase de estudos pré-clínicos; 200 (0,67%) entram na fase I dos estudos clínicos; 40 (0,13%) passam para a fase II; 12 (0,04%) entram na fase III e somente nove (0,027%) são aprovadas pelos órgãos regulatórios. É importante mencionar ainda, que apenas um medicamento aprovado (0,003%) é incluído nos protocolos terapêuticos (CALIXTO e SIQUEIRA JÚNIOR 2008). A escolha do planejamento a ser adotada para o desenho molecular do ligante dependerá do nível de conhecimento estrutural sobre o alvo terapêutico eleito. Quando o novo ligante se encontra disponível em estado de pureza adequado, é submetido ao processo de validação do conceito terapêutico à origem da eleição do alvo e identificação das propriedades farmacocinéticas deste ligante, candidato a composto-protótipo, realizando-se bioensaios farmacológicos in vivo. Se ocorrer sucesso nesta etapa, o novo composto-protótipo é descoberto,

tornando-se candidato a fármaco que atuará no alvo eleito (BARREIRO e FRAGA 2005).

Problemas farmacocinéticos e toxicológicos foram as principais causas de falha no desenvolvimento de novos fármacos nos anos 90, pois se centralizavam apenas nas fases finais de desenvolvimento de fármacos, geravam altos custos e levavam a reiniciar a procura de um novo agente terapêutico. Nesse contexto, evidenciou-se a necessidade de que essas duas características sejam estudadas o mais cedo possível durante o processo de descobrimento de um novo fármaco visando minimizar custos e tempo de investigação de novos agentes terapêuticos (WATERBEEMD e GIFFORD 2003).

Os estudos pré-clínicos têm como objetivo principal a avaliação farmacológica em sistemas in vitro e em animais in vivo para a obtenção do maior conhecimento possível acerca das propriedades e dos efeitos adversos do fármaco em desenvolvimento. Ao mesmo tempo, a farmacocinética é testada em animais. O composto é submetido a testes de toxicidade a curto e longo prazo em animais, para que suas propriedades farmacológicas possam ser definidas dentro de uma relação dose-resposta (FERREIRA, et al. 2009). A duração do teste pré-clínico toxicológico está relacionada com a provável duração do uso terapêutico. Os estudos clínicos correspondem à pesquisa conduzida em pacientes, ou em voluntários sadios, usualmente, destinada a avaliar um novo tratamento (LIMA, et al. 2003).

A Anvisa, em 3 anos, mais que dobrou o número de registros de medicamentos, produtos biológicos e insumos farmacêuticos ativos (IFAs). Em 2016, a Agência concedeu 882 registros, contra 366 no ano de 2014. Houve um ritmo constante na agilidade das análises desses produtos, com 773 novos produtos registrados em 2015.

1.3 TOXICIDADE

A medula óssea é um tecido protegido por ossos como o esterno, íliaco, costela, e fêmur, é a fonte produtora e distribuidora de células hematológicas e seus precursores. Em seu microambiente ocorre uma complexa manutenção, esta regida e estimulada por citocinas e fatores de crescimento que atuam tanto no estroma quanto no parênquima, induzindo ou suprimindo a produção, proliferação,

diferenciação e maturação celular (PAPAYANNOPOULOU e SCADDEN 2008); (MÜLLER-SIEBURG 1995); (WHETTON 1999); (BRYDER, ROSSI e WEISSMAN 2006).

Os testes toxicológicos pré-clínicos permitem o embasamento científico para prever os principais efeitos colaterais e as consequências de uma overdose para posterior escalonamento em humanos (CHAMPMAN 2010). O objetivo principal de estudos toxicológicos pré-clínicos é identificar uma dose inicial segura para estudos clínicos de fase I, o potencial toxicológico do fármaco e a reversibilidade dos efeitos adversos (NEWELL, et al. 2004). Lesão e morte celulares induzidas por fármacos são geralmente causadas por metabólitos reativos do fármaco, envolvendo interações não covalentes e/ou covalentes com moléculas-alvo, em vários tecidos, incluindo a medula óssea. A morte celular é frequentemente “auto infligida” através da deflagração da apoptose, e não causada por necrose aguda. As interações não covalentes incluem: peroxidação lipídica; produção de radicais citotóxicos de oxigênio; reações que causam depleção de GSH (glutathiona reduzida), resultando em “estresse oxidativo”; modificação de grupos SH em enzimas-chave (Ca²⁺-ATPase, GSSG redutase) e proteínas estruturais. A ligação covalente à proteína pode produzir um imunógeno; a ligação ao DNA pode provocar carcinogênese e teratogênese (RANG, DALE e RITTER 2001).

1.3.1 Toxicidade aguda – dose única

Para avaliação da toxicidade aguda em dose única, quanto ao modelo animal a ser estudado, devem ser conduzidos com no mínimo duas espécies de mamíferos, incluindo uma espécie não roedora. A amostra deve contemplar números iguais de machos e fêmeas. Utilizar duas vias de administração: a pretendida para administração em humanos e a endovenosa. Se a administração endovenosa for a pretendida para uso em humanos, a utilização de apenas esta via para estudos de toxicidade de dose única é suficiente. A dose limite a ser testada será aquela em que se alcance evidência de toxicidade não letal ou até no máximo 1000 mg/kg/dia para roedores e não roedores. Em situações, em que essa dose não resulte em uma margem de 10 vezes a exposição clínica e a dose clínica exceda 1 grama por dia, deve ser considerada a menor dose disponível entre 10 vezes a exposição clínica,

2000 mg/kg/dia ou a máxima dose disponível. Deve haver um período de observação dos animais, no mínimo 14 dias após a administração da droga. No dia da administração os animais devem ser observados no mínimo duas vezes e, posteriormente, no mínimo uma vez ao dia. Os parâmetros a serem avaliados são a mortalidade; sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais); variações no peso corporal e no consumo de ração e água; patologia clínica (hematologia, bioquímica); latência, duração e reversibilidade da toxicidade; investigações anátomo e histopatológicas. Estes estudos devem ser realizados anteriormente à Fase I da Pesquisa Clínica. Não é exigida a determinação de DL50 (dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) por ser um método que implica em grande precisão estatística, conforme o Guia Para A Condução De Estudos Não Clínicos De Toxicologia E Segurança Farmacológica Necessários Ao Desenvolvimento De Medicamentos (ANVISA, Guia Para A Condução De Estudos Não Clínicos De Segurança Necessários Ao Desenvolvimento De Medicamentos 2013).

1.3.2 Toxicidade aguda – doses repetidas

Os estudos de toxicidade de doses repetidas têm como objetivo, caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração repetida. A partir deles é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, bioquímicas, anátomo e histopatológicas, além de informações sobre a indicação do nível de efeito não observado (NOEL) e nível de efeito adverso não observado (NOAEL) (ANVISA, Guia Para A Condução De Estudos Não Clínicos De Segurança Necessários Ao Desenvolvimento De Medicamentos 2013). As características de número, espécies e vias a serem utilizadas, são as mesmas utilizadas na administração de dose única, e, as doses utilizadas em estudos de administrações repetidas geralmente são estabelecidas a partir das informações produzidas em estudos de toxicidade aguda ou testes piloto para indicação de doses. Geralmente 3 doses são utilizadas, sendo a mais alta escolhida com a expectativa produzir efeitos tóxicos observáveis, mas não morte nem sofrimento intenso e respeitando-se o limite máximo de 1000 mg/kg/dia em roedores e não-roedores ou as situações particulares discutidas no item “dosagem” dos estudos de toxicidade de dose única. As demais doses são

estabelecidas em sequencia descendente sugerindo-se intervalos de 2 a 4 vezes. Duração mínima dos estudos de toxicidade de doses repetidas: se o período de intervenção na pesquisa clínica for até 2 semanas, a duração mínima dos estudos de toxicidade de doses repetidas para roedores e não roedores será de 2 semanas; entre 2 semanas e 6 meses de intervenção. Os parâmetros a serem avaliados nos roedores são os mesmos utilizados para os de dose única. Para avaliação do potencial de toxicidade de doses repetidas podem ser utilizados os guias da Organisation for Economic Co-operation and Development OECD (OECD 2008) (ANVISA, Guia Para A Condução De Estudos Não Clínicos De Segurança Necessários Ao Desenvolvimento De Medicamentos 2013).

2 *OBJETIVOS*

O objetivo principal desse estudo foi avaliar a toxicidade aguda do fármaco fosfoetanolamina sintética em experimentos de dose única e doses repetidas (toxicidade subcrônica), em experimentos com camundongos da linhagem Balb-c.

- ✓ Avaliar e investigar os mecanismos envolvidos em possíveis lesões causadas pela droga agudamente;
- ✓ Realizar avaliação de risco; determinar níveis toleráveis e estabelecer condições seguras para uso da fosfoetanolmanina sintética, contribuindo para a validação pré-clínica deste composto e para o desenvolvimento de novas terapias seletivas e humanizadas;
- ✓ Determinar as informações dos seguintes parâmetros: análises clínicas; bioquímicas; histopatológicas; efeitos colaterais e hipocráticos; assim como a análise da resposta da medula óssea, tendo como normas as boas práticas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA);
- ✓ Avaliar a mutagenicidade da fosfoetanolamina, por meio do ensaio do micronúcleo em medula óssea;
- ✓ Avaliar a atividade imunoestimulatória da fosfoetanolamina, através da contagem diferencial de células do sangue e da medula óssea;
- ✓ Avaliar os parâmetros biométricos dos animais submetidos aos diferentes tratamentos com a fosfoetanolamina através dos pesos relativos dos órgãos e controle ponderal corpóreo;
- ✓ Avaliação da resposta fisiológica ou patológica com a análise da autofagia utilizando fluorocoma laranja de acridina e fases do ciclo celular por citometria de fluxo.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para avaliação da toxicidade aguda da FO-S, em dose única, foram escolhidas as doses de 50, 100 mg/kg (doses terapêuticas sem efeitos adversos observados em camundongos), 250 mg/kg; 500 mg/kg e 1000 mg/kg, sendo que em trabalhos anteriores realizados por nosso grupo para tratamento de tumores, as maiores doses utilizadas foram de 80 mg/kg e 100 mg/kg de FO-S, administrada pelas vias intraperitoneal e venosa. Nesses estudos, obtivemos redução significativa do volume tumoral e aumento na taxa de sobrevida global em camundongos portadores de melanoma dorsal B16F10, e a redução no número de metástases no parênquima pulmonar no modelo carcinoma de células renais murino (RENCA) (A. FERREIRA, R. MENEGUELO, et al. 2012); (FERREIRA, SANTANA, et al. 2013).

Os estudos propostos neste projeto foram conduzidos de acordo com as Boas Práticas de Laboratório (BPL).

Para o grupo Dose única foram utilizados 80 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, 40 machos e 40 fêmeas (nulíparas e não grávidas), com aproximadamente 25 ± 5 g, idade aproximada de 6 a 8 semanas, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan. Antes do início dos experimentos, os animais passaram por um período de aclimação no biotério durante sete dias para a observação do comportamento e das condições gerais. Foram mantidos em caixas de polipropileno com tampa de aço inox, dieta e água “ad libitum”, iluminação da sala foi mantida em um ciclo claro/escuro de 12 horas, a fase clara iniciada às 06:00 horas. Durante todo o experimento, os animais permaneceram em sala com umidade e temperatura controladas (umidade relativa de 65 a 70% e temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Foi realizada a observação e registro de todos os grupos quanto ao comportamento, mortalidade, evolução ponderal, consumo de água e ração, assim como peso dos órgãos dos camundongos após a necropsia. Os animais foram marcados, a partir da base da cauda, para acompanhamento e observação da evolução da intoxicação, com traços feitos com uma caneta marcadora permanente correspondente aos números ordinais. Os animais tratados foram divididos em 5 grupos experimentais (n=12) , cada grupo recebeu uma das doses do composto FO-S a seguir: 50 mg/kg; 100 mg/kg; 250 mg/kg; 500 mg/kg e 1000 mg/kg, como Grupo Controle (n total=20) foi utilizado solução salina. Um remanescente de cada grupo foi destinado às observações subsequentes, até 28 dias após a última

inoculação, para se detectar a ocorrência tardia, recuperação ou persistência dos efeitos tóxicos existentes, conforme *O Guia De Orientação Para O Ensaio De Produtos Químicos* (OECD 2008).

No Grupo Doses Repetidas (6 doses por 2 semanas), foram utilizados 144 camundongos Balb/c, sendo 72 machos e 72 fêmeas, com aproximadamente 25g $\pm$ 5g, idade aproximada de 6 a 8 semanas, dieta e água “*ad libitum*” e mesmos cuidados descritos para o grupo dose única.

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais (n total de cada grupo: 48). Os grupo receberam 50 mg/kg; 100 mg/kg; 250 mg/kg do composto FO-S, diluído em água destilada; como *Grupo Controle* foi utilizado solução salina. Cada grupo foi subdividido em 3 grupos: Subgrupo 1: 10 machos e 10 fêmeas eutanasiados ao 7º dia após a última aplicação; Subgrupo 2: 10 machos e 10 fêmeas eutanasiados ao 14º dia após a última aplicação, e Subgrupo 3: 4 machos e 4 fêmeas como grupo controle inoculados com solução salina.

Após as inoculações de ambos os grupos os animais foram observados para a detecção de possíveis sinais tóxicos de caráter geral (ambulação, irritabilidade, piloereção, grooming, ptose, hiperatividade e tremores), nos intervalos de 0, 15, 30 e 60 minutos, após 4 horas, 24h e diariamente durante 14 dias. Após os períodos de 24h, 7 dias e 14 dias da última inoculação, amostras do sangue periférico foram coletadas do plexo infra orbital dos camundongos dos diferentes grupos (tratados e controles). Aos 7º e 14º dias os camundongos foram eutanasiados para retirada da medula óssea dos ossos fêmur e tíbia, para a avaliação da celularidade e expressão de marcadores de maturação, diferenciação celular, e de sangue para bioquímica. Neste período também foi observada a probabilidade de sobrevida através do teste Kaplan-Meier, calculando-se o grau de significância e o Log-Rank. Os animais tratados e do grupo controle foram eutanasiados por indução anestésica de Cloridato de Cetamina (100-150 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (10-15 mg/kg) via intraperitoneal, seguida de exsanguinação, e seus órgãos coletados (pulmões, coração, linfonodos, baço, fígado, rins, ovário e testículos) para análise histopatológica.

Tabela 1 – Doses do composto FO-S administrados nos camundongos Balb/c nos grupos dose única e doses repetidas. (n total dos grupos = 224).

<u>Grupo Dose Única</u> – Inoculação endovenosa (n total do grupo: 80). Camundongos Balb/c:
Grupo I-A: Tratados: 12 camundongos, 6 machos e 6 fêmeas-inoculados com 50 mg/kg de FO-S Controle: 4 camundongos, 2 machos e 2 fêmeas- inoculados com solução salina
Grupo I-A: Tratados: 12 camundongos, 6 machos e 6 fêmeas-inoculados com 100 mg/kg de FO-S Controle: 4 camundongos, 2 machos e 2 fêmeas- inoculados com solução salina
Grupo II-A: Tratados: 12 camundongos, 6 machos e 6 fêmeas - inoculados com 250mg/kg de FO-S Controle: 4 camundongos, 2 machos e 2 fêmeas- inoculados com solução salina
Grupo III-A: Tratados: 12 camundongos, 6 machos e 6 fêmeas - inoculados com 500 mg/kg de FO-S Controle: 4 camundongos, 2 machos e 2 fêmeas- inoculados com solução salina
Grupo III-A: Tratados: 12 camundongos, 6 machos e 6 fêmeas - inoculados com 1000 mg/kg de FO-S Controle: 4 camundongos, 2 machos e 2 fêmeas- inoculados com solução salina
<u>Grupo Doses Repetidas – Inoculação endovenosa (n total do grupo: 144). Camundongos Balb/c:</u>
Grupo I-B: Tratados: 40 camundongos, 20 machos e 20 fêmeas- inoculados com 50 mg/kg de FO-S Controle: 8 camundongos, 4 machos e 4 fêmeas- inoculados com solução salina
Grupo II-B: Tratados: 40 camundongos, 20 machos e 20 fêmeas- inoculados com 100 mg/kg de FO-S Controle: 8 camundongos, 4 machos e 4 fêmeas- inoculados com solução salina
Grupo III-B: Tratados: 40 camundongos, 20 machos e 20 fêmeas- inoculados com 250 mg/kg de FO-S Controle: 8 camundongos, 4 machos e 4 fêmeas- inoculados com solução salina

3.2 PREPARAÇÃO DO COMPOSTO FO-S

A Fosfoetanolamina sintética (FO-S) foi preparada de acordo com Outhouse (1963), com grau de pureza de 99%, e foi analisada por cromatografia de alta performance (HPLC). A solução estoque de 1M foi dissolvida em água, corrigido pH com monoetanolamina e armazenada à temperatura ambiente. A mesma já foi formulada em nosso laboratório para estudos anteriores e se mostrou estável (MENEGUELO 2007); (A. FERREIRA, et al. 2011); (FERREIRA, R. MENEGUELO, et al. 2012); (A. FERREIRA, R. MENEGUELO, et al. 2012).

3.3 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

As amostras de sangue dos grupos dose única e doses repetidas, na presença do anticoagulante EDTA, foram obtidas da veia orbital dos camundongos BALB/c, após anestesia local com anestésico ocular cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1%. As coletas foram realizadas em condições normais e não estressantes. O número total de eritrócitos, leucócitos e plaquetas do grupo dose única foi submetido à contagem manual em câmara de Neubauer. Para contagem de plaquetas, 20 µl de líquido de Brecher foi utilizado para 1 µl de sangue e a contagem foi realizada no quadrado central da câmara sob um microscópio com objetiva de 40 x. Para contagem de leucócitos, 20 µl de solução de Turk foram utilizados para 2 µl de sangue, nos 4 quadrados dos cantos, na objetiva de 10X. Na contagem de células vermelhas, foram utilizados 1000 µl de solução salina para 1 µl de sangue e a contagem foi realizada no quadrado central da câmara ao microscópio com objetiva de 40 x.

O hemograma do grupo Doses Repetidas foi obtido através do contador hematológico Pentra-XL 80 (HORIBA Medical ABX, SAS).

3.4 ANÁLISES DO NÚMERO TOTAL DE RETICULÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO

Alíquotas de sangue periférico dos animais tratados com FO-S e grupo controle foram incubados na proporção 1:1 com a solução de azul de cresil brilhante 1%, e incubadas por 20 minutos a 37°C. Foram realizados esfregaços em lâminas, secos ao ar e avaliados em microscópio de luz. Foram observados 1000 eritrócitos, considerando as formas imaturas das linhagens eritrocíticas, contendo RNA nuclear citoplasmático com dois ou mais grânulos azurófilos.

3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Após indução anestésica com Cloridrato de Cetamina (100-150 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (10-15 mg/kg) via intraperitoneal, foi realizada exsanguinação

obtidas do plexo da veia retro-orbital, para coleta de amostras de sangue (volume ~250uL) para estudo bioquímico dos animais dos diferentes grupos, em condições normais e não estressantes. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos e após, o sobrenadante foi separado do sangue total, armazenado em eppendorf e refrigerado a 4°C até o momento da análise. As análises bioquímicas de TGO (transaminase glutâmico-oxalacética), TGP (transaminase glutâmico-pirúvica), ureia e creatinina foram realizadas mediante a calibração dos parâmetros utilizando amostras de controles obtidas de camundongos normais, sadios como padrão de referência. Todas as análises foram realizadas por automação com o auxílio do analisador bioquímico modelo Rx4040 Randox laboratórios Ltda, EUA.

3.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PELA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA-EOSINA

Após a eutanásia, os órgãos internos foram removidos, foram retirados pequenos fragmentos de aproximadamente 0.2cm² dos tecidos (pulmões, baço, fígado e rins) dos animais tratados e controles, pesados e fixados por 24 horas em tampão formalina 10%, tamponado, pH 7.4 para a realização de análises histopatológicas. Após o período de fixação de 24 horas as amostras foram acondicionadas em cápsulas histológicas e colocadas no autotécnico (Leica® modelo RM 2145), para processamento *overnight*, sendo desidratadas em doses crescentes de álcool etílico a 70, 80 e 90%. Posteriormente, as amostras foram diafanizadas em xilol contendo misturas sequencialmente concentradas de parafina durante 12 horas e inclusas em parafina quente no equipamento (Leica® modelo EG 1160). Os blocos foram microtomizados no aparelho (Leica® modelo RM 2145) obtendo cortes de 5 µm dispostos em lâmina de vidro de 75 x 25 mm³, realizado dois níveis de corte para cada área de estudo e coradas com Hematoxilina-eosina para avaliação de alterações teciduais em microscopia óptica.

3.7 MIELOGRAMA

Após eutanásia dos animais por exsanguinação pós-anestesia, foi realizada a dissecação, limpeza e coleta das amostras da medula óssea do fêmur e tíbia, pela inserção de uma seringa de 1ml, com 50ul de solução salina e agulha hipodérmica (13x0,45 mm) no canal medular para confecção do esfregaço. Foram avaliadas 200 células nucleadas da medula óssea, quanto à sua celularidade, distribuição na lâmina e coloração, seguido da divisão, identificação e contagem das células por compartimentos (eritroide, mieloide, linfoide e monocítico). Após esta avaliação morfológica, a análise quantitativa foi realizada em aumento na objetiva de imersão (100x).

3.8 IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS E PRECURSORAS DA MEDULA ÓSSEA

As células avaliadas por citometria de fluxo foram as precursoras mesenquimais e hematopoiéticas, foram utilizados marcadores envolvidos na adesão, quimiotaxia celular, e diferenciação de linfócitos, (Tabela 2).

As suspensões das células obtidas da medula óssea em solução salina foram centrifugadas por 5 minutos a 2000rpm, em temperatura ambiente. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspenso em 100µl de solução FACS-Flow e marcadas com 1ug de anticorpo primário específico, conforme descrito na Tabela 2, e incubado por 20 minutos, em temperatura ambiente. Após este período, centrifugado 2 vezes por 5 minutos a 2000 rpm, em temperatura ambiente, e seguido da incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo Alexa Fluor-488, por 2 horas. No final da incubação os anticorpos não ligados aos marcadores foram removidos após a lavagem por 2 vezes em tampão FACS-Flow e ressuspendidos em 200µl no tampão FACS-Flow contendo 1% paraformaldeído. As aquisições das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo FACScan (BD, San Jose, CA) usando excitação no comprimento de onda 488nm, programa Cell-Quest e analisados no programa WinMDI-2.9, para o grupo dose única e para o grupo doses repetidas foi utilizado o citômetro Guava Express Pro®.

Tabela 2 - Anticorpos monoclonais utilizados para caracterização imunofenotípica de células mesenquimais e hematopoiéticas de medula óssea murina

Anticorpo	Especificidade	Fabricante
Anti-CD90	Células tronco mesenquimais	Santa Cruz SC53456
Anti-CD34	Progenitores hematopoiéticos e endoteliais	R&D Systems AF6518
Anti-CD4	Linfócitos T auxiliar, monócitos/macrófagos	R&D Systems FAB1356P
Anti-CD8	Linfócitos T citotóxico	Abcam ab182032
Anti-CD56	Linfócitos Nk	R&D Systems MAB7820
Anti-CD43	Células mielóides, subtipos linfócitos B	Abcam ab1211
MCP1	Proteína quimiotática de macrófagos	R&D Systems MAB7820

3.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para análise do potencial da membrana mitocondrial foi utilizado o corante fluorescente catiônico e permeável á membrana celular Rodamina 123, utilizando a capacidade da mitocôndria em sequestrar este corante. Quando a membrana está sem alterações ocorre maior fluorescência, e quando há alteração ocorre o contrário, há menor fluorescência por causa da passagem da rodamina por essa membrana alterada até o interior da mitocôndria (PETIT 1992).

As células da medula óssea foram coletadas com solução salina, e colocadas em tubos tipo “ependorf”, centrifugadas 1.500 rpm por 5 min, o precipitado foi

ressuspenso em 200µl de Rodamina 123 (Sigma®), por 15 min a 37°C protegidas de luminosidade, centrifugadas 1.500 rpm por 5 min, foram ressuspensas em 200µl de PBS. As aquisições das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo FACScan (BD, San Jose, CA) usando excitação no comprimento de onda 488nm, programa Cell-Quest e analisados no programa WinMDI-2.9 para o grupo dose única, e para o grupo doses repetidas foi utilizado o citômetro Guava Express Pro® que forneceram a intensidade da marcação com rodamina 123.

3.10 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR

O efeito dos tratamentos com a FO-S sobre as células do compartimento da medula óssea, foi avaliado quanto à capacidade de modificar a distribuição das células no ciclo celular. As análises foram determinadas pela quantificação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo, com a marcação de iodeto de propídeo (PI).

As células da medula óssea foram coletadas com solução salina, colocadas em tubos tipo “eppendorf”, foi acrescentado tampão Facs-Flow e centrifugadas 1.500 rpm por 5 min, o precipitado foi ressuspenso em 200 µl de tampão Facs-Flow , adicionado 10 µl de Triton x-100, incubado por 30 minutos em temperatura ambiente, As células foram então tratadas com 40 mg/ml iodeto de propídeo e 10 mg/ml de álcool-RNase , incubado por 12h ao abrigo da luz, centrifugado por 10 minutos à 1500 rpm, desprezado o sobrenadante e ressuspenso em 200 µl de tampão Facs-Flow e em seguida as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

As células do grupo dose única foram analisadas no citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, EUA), e das células do grupo Doses Repetidas foram realizadas através do Software Guava Express Pro®. Os resultados obtidos demonstram a distribuição da população celular nas fases do ciclo celular sub-haploide, com DNA fragmentado, fase G0/G1, fase S e fase G2/M, os dados foram apresentados em porcentagem.

3.11 ANÁLISE DE AUTOFAGIA POR FLUORESCÊNCIA DO MARCADOR LARANJA DE ACRIDINA COM CITÔMETRO DE FLUXO

A autofagia é um processo de degradação de componentes celulares e está envolvida em processos tanto fisiológicos como patológicos. O marcador Laranja de Acridina (AO) é um fluoróforo metacromático que fluoresce vermelho em organelas vesiculares ácidas e verde no restante da célula, sendo assim, a marcação com AO um método rápido e barato para detecção deste tipo de organelas, que aumentam durante a indução de autofagia. Acridine-orange é um corante de ligação de ácido nucleico de células (TRAGANOS e DARZYNKIEWICZ 1994).

As células da medula óssea foram coletadas com solução salina, colocadas em tubos tipo “eppendorf”, foi acrescentado tampão Facs-Flow e solução de salina tamponada com fosfatos (PBS) mais albumina do soro bovino (BSA) e centrifugadas 1.500 rpm por 5 min, o precipitado foi ressuspenso em 200 µl de tampão Facs-Flow, adicionado AO, incubado por 40 minutos em 37° C, centrifugado por 10 minutos à 1500 rpm, desprezado o sobrenadante e ressuspenso em 200 µl de tampão Facs-Flow e em seguida as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo Guava Express Pro®.

3.12 TESTE DO MICRONÚCLEO DA MEDULA ÓSSEA

O Teste de Micronúcleo em Medula Óssea de camundongos é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte da bateria de testes recomendada para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY 2001).

Conforme técnica já descrita, foi realizada eutanásia dos camundongos do grupo doses repetidas após o 7º e 14º dias da inoculação da FO-S, para a realização do teste de detecção da presença de micronúcleo.

Após a eutanásia dos camundongos, foram retirados o fêmur e tíbia, a epífise proximal cortada e a medula óssea removida segundo protocolo modificado por ZAMBRANO et al., (1982). A medula óssea foi lavada com soro fetal bovino, centrifugada a 1000 rpm, por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento

ressuspendido, em volume de 20uL. Uma gota do sedimento foi transferida para uma lâmina, o esfregaço confeccionado por distensão e, corado pelo método de Giemsa. Os esfregaços foram observados em microscópio óptico comum e o número de micronúcleos foi estabelecido em 1.000 eritrócitos por lâmina, em cada animal, dos diferentes grupos experimentais (ZAMBRANO 1982).

3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As taxas de probabilidade de sobrevida global foram submetidas ao teste estatístico de Kaplan-Meyer seguido do teste de log-rank. Na análise estatística descritiva, os resultados de variáveis discretas foram expressos como frequências absolutas e percentuais. Para variáveis contínuas, foram apresentados valores de média $\pm$ desvio padrão. Quando a comparação incluiu mais de dois grupos, foi utilizado o modelo de análise de variância (ANOVA) com um fator, e para verificar diferenças significativas entre os grupos estudados, foi aplicado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, ou pós teste de Dunnett's, Tukey's ou Student-Newman-Keus. Os valores que foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP) dos experimentos independentes, considerando-se como valores significantes * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. Os dados foram analisados utilizando o Software Graph Pad Prism 5.

4 RESULTADOS

4.1 GRUPO DOSE ÚNICA

4.1.1 Análise comportamental

O comportamento dos animais foi observado sistematicamente para avaliar o screening hipocrático que fornece uma estimativa geral da toxicidade da substância quanto às características apresentadas após a administração do composto FO-S imediatamente após a inoculação, nas horas seguintes, após 24h e durante 14 dias, com o objetivo de se quantificar os efeitos destes sobre os parâmetros: a) Estado de consciência (aparência geral, irritabilidade); b) Coordenação motora (atividade geral, resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção abdominal, marcha, locomoção, reflexo de endireitamento); c) Tônus muscular (tônus das patas, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia); d) Reflexos (auricular, córneo-palpebral, dor); e) Atividade do sistema nervoso central (tremores, convulsões, contrações musculares, resposta de “Straub”, sedação, hipnose, anestesia) e f) Atividade do Sistema Nervoso Autônomo (vasoconstrição, vasodilatação, lacrimação, salivação, ptose palpebral, micção, defecação, piloereção, respiração e frequência cardíaca).

Os animais dos grupos controle e tratado com 50, 100 e 250 mg/kg não apresentaram alterações clínicas detectáveis, nem imediatamente após a administração do composto, nem nas horas seguintes, nem após 14 dias (Tabela 3).

Dos camundongos tratados com 500 mg/kg, 33,3% apresentaram imediatamente após a administração do composto, alteração no estado de consciência, sem resposta ao toque e reflexo de endireitamento e tônus muscular, apresentaram contorção abdominal e aparentemente contrações musculares leves, fenômeno que durou aproximadamente dez segundos seguidos da diminuição desses sinais, apresentaram letargia, durante aproximadamente três minutos, voltando às suas características e respostas normais após esse tempo (Tabela 3).

Por outro lado, 33,3% dos animais do grupo tratado com 1000 mg/kg (machos e fêmeas), apresentaram, imediatamente após a administração do composto, acentuada alteração no estado de consciência, contorção abdominal, contrações musculares, tremores e convulsões, por aproximadamente cinco segundos seguidos da morte dos animais (Tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação do comportamento Neural e Motor dos camundongos machos e fêmeas inoculados com as diferentes doses de FO-S imediatamente e 24h após a inoculação (n) cada grupo tratado=6, n cada grupo controle=4 (n total=80).

	Controle		50 mg		100 mg		250 mg		*500 mg		*1000 mg	
	1ª h	24h	1ª h	24h	1ª h	24h	1ª h	24h	1ª h	24h	1ª h	24h
Estado de consciência	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	0	+++
Coordenação motora	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	0	+++
Tônus muscular	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	0	+++
Reflexos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	0	+++
Sistema Nervoso Central	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+++	0
Sistema Nervoso Autônomo	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0	+++

+++ presença acentuada da característica; ++ presença moderada da característica; + presença discreta da característica; 0 ausência da característica; *33,3% dos animais deste grupo apresentou cada uma das características.

4.1.2 Avaliação da mortalidade

Os resultados obtidos das curvas de probabilidade de sobrevivência pelo teste de Kaplan Meier foi significativo ($p < 0.0042$) para a dose de 1000 mg/kg (Tabela 4 e 5), demonstrando seu efeito tóxico neste grupo imediatamente após a inoculação da FO-S. Os outros grupos de experimentação não apresentaram modificação na taxa de mortalidade (Tabela 4 e 5).

Tabela 4 – Avaliação da mortalidade do grupo tratado de camundongos machos. Número de animais mortos após tratamento com a Phos em dose única, por grupo, nas primeiras 24h, 7, 14, 21 e 28 dias (n total= 40)

Doses (mg/kg)	Mortalidade - Machos				
	24h	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
50	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
100	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
250	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
500	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
1000	2/6	0/4	0/4	0/4	0/4
Controle	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

Tabela 5 – Avaliação da mortalidade do grupo de camundongos fêmeas. Número de animais mortos após tratamento com a Phos em dose única, por grupo nas primeiras 24h, 7, 14, 21 e 28 dias (n total=40)

Doses (mg/kg)	Mortalidade - Fêmeas				
	24h	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
50	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
100	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
250	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
500	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
1000	2/6	0/4	0/4	0/4	0/4
Controle	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

4.1.3 Avaliação ponderal

Os animais foram pesados antes do início da administração da FO-S, e após, periodicamente durante 28 dias, assim como consumo de ração e água procurando-se, desta maneira, realizar a distribuição homogênea e estatística do peso total dos animais entre os diferentes grupos. O grupo de animais tratado machos 50 mg aos 14 dias; 100 mg aos 21 dias; 500 mg aos 14 dias; e das fêmeas 50 mg (7º dia); 100 e 500 mg (14º dia), e 250 mg aos 14 e 21 dias, apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) do peso ponderal, retornando à normalidade aos 28 dias (Figura 1 e 2). O consumo de ração e água permaneceu contínuo sem alterações significativas que justificassem a diminuição de peso (Tabela 6).

Tabela 6 – Tabela da média do consumo de ração dos camundongos machos e fêmeas após tratamento com FO-S dos diferentes grupos. Análise estatística de variância ANOVA obtida pelo programa GraphPad Prism 5, sendo não significativa ($p > 0,01$) para todos os grupos, comparados aos grupos controles.

Dia	Consumo de ração(g)					
	Controle	50 mg ^{ns}	100 mg ^{ns}	250 mg ^{ns}	500 mg ^{ns}	1000 mg ^{ns}
1-6	170	173	175	173	165	173
7-13	175	177	172	180	179	185
14-20	85	84	84	90	90	89
21-28	75	79	75	77	74	68

ns: não significativo.

Figura 1 - Gráficos de dispersão da variação de peso dos camundongos machos dos grupos Controle e Tratado com FO-S: (A) 50 mg/kg; (B) 100 mg/kg; (C) 250 mg/kg; (D) 500 mg/kg e (E) 1000 mg/kg. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$, $p^{} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.**

Figura 2 - Gráficos de dispersão da variação de peso dos camundongos fêmeas dos grupos Controle e Tratado com FO-S: (A) 50 mg/kg; (B) 100 mg/kg; (C) 250 mg/kg; (D) 500 mg/kg e (E) 1000 mg/kg. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p < 0.05$ $p^{**} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.

4.1.4 Análises hematológicas

As contagens do número total de eritrócitos, leucócitos e plaquetas do grupo dose única, foram submetidas a contagem manual em câmara de Neubauer.

4.1.4.1 Eritrócitos

Após o sétimo dia da administração do composto FO-S, os grupos de camundongos machos 100, 250, 500mg apresentaram aumento significativo no número de eritrócitos em relação ao grupo controle; o grupo 1000 mg/kg, por outro lado, mostrou diminuição significativa; aos 14 dias somente o grupo 100 mg/kg aumentou seu número de eritrócitos; aos 21 dias o grupo 50 mg também apresentou aumento, porém ocorreu diminuição significativa no grupo 1000 mg (Figura 3).

Os camundongos fêmeas do grupo 50 mg (7 dias) e 1000 mg (14 dias), após a aplicação da FO-S apresentaram diminuição significativa no número de eritrócitos em relação ao grupo controle; no 21º o grupo 50 mg aumentou seu número de eritrócitos e aos 28 dias estes números retornaram à sua normalidade em relação aos seus respectivos grupos controles (Figura 4).

4.1.4.2 Leucócitos

Comparado ao grupo Controle, o número de leucócitos totais dos camundongos machos do grupo 250 mg no 14º dia e do grupo 500 mg no 21º dia apresentaram aumento significativo no número de leucócitos (Figura 5).

No grupo das fêmeas, o números de leucócitos totais dos grupos 50 mg dos dias 7, 14 e 21 apresentaram diminuição significativa (Figura 6).

4.1.4.3 Plaquetas

Após 7 dias da inoculação de FO-S, comparado ao grupo Controle, o número de plaquetas dos camundongo machos, grupo 1000 mg diminuiu significativamente, por outro lado aos 21 dias o grupo 50 mg apresentou aumento significativo no número de plaquetas, ambos retornaram aos níveis normais comparado aos respectivos grupos controles nas semanas seguintes (Figura 7).

O número total de plaquetas dos grupos das fêmeas apresentou maior variação: os grupos 250 e 500 mg (7 dias) demonstraram diminuição significativa; no 14º dia, o número de plaquetas do grupo 50 mg aumentou e o grupo 100 mg diminuiu significativamente; o grupo 50 mg (21 dias) apresentou aumento, e os grupos 100 e 1000 mg (21 dias) apresentaram diminuição significativa no número de plaquetas (Figura 8).

Figura 3 - Gráfico de barras do número total de eritrócitos dos camundongos machos dos grupos controle e tratado com FO-S. Conforme as semanas após tratamento: (A) 7 dias; (B) 14 dias; (C) 21 dias; (D) 28 dias. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$, $p^{} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.**

Figura 4 - Gráfico de barras do número total de eritrócitos dos camundongos fêmeas dos grupos controle e tratado com FO-S. Conforme as semanas após tratamento: (A) 7 dias; (B) 14 dias; (C) 21 dias; (D) 28 dias. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$ $p^{} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.**

Figura 5 - Gráfico de barras do número total de leucócitos dos camundongos machos dos grupos controle e tratado com FO-S. Conforme as semanas após tratamento: (A) 7 dias; (B) 14 dias; (C) 21 dias; (D) 28 dias. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$ $p^{} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.**

Figura 6 - Gráfico de barras do número total de leucócitos dos camundongos fêmeas dos grupos controle e tratado com FO-S. Conforme as semanas após tratamento: (A) 7 dias; (B) 14 dias; (C) 21 dias; (D) 28 dias. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$ $p^{} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.**

Figura 7 - Gráfico de barras do número total de plaquetas dos camundongos machos dos grupos controle e tratado com FO-S. Conforme as semanas após tratamento: (A) 7 dias; (B) 14 dias; (C) 21 dias; (D) 28 dias. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$ $p^{} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.**

Figura 8 - Gráfico de barras do número total de plaquetas dos camundongos fêmeas dos grupos controle e tratado com FO-S. Conforme as semanas após tratamento: (A) 7 dias; (B) 14 dias; (C) 21 dias; (D) 28 dias. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$, $p^{} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.**

4.1.5 Análises do número de reticulócitos no sangue periférico

As amostras de sangue foram obtidas e confeccionadas conforme descrito no item 4.4. Todos os animais dos diferentes grupos tratados dos camundongos machos, no 7º dia apresentaram aumento significativo no número de reticulócitos, todos retornaram aos níveis de normalidade com relação aos respectivos grupos controles e se mantiveram assim até o 28º dia de experimentação (Figura 9).

O grupo de camundongos fêmeas que recebeu 50 mg do composto FO-S não apresentou diferença estatística significativa em seu número total de reticulócitos em

todas as semanas de tratamento; o grupo 100 mg apresentou aumento no 7º e 14º dias e após isso voltou aos níveis normais, relacionados ao grupo controle, nas semanas seguintes; ocorreu aumento significativo também, no grupo 250 mg nos dias 7, 14 e 21, retornando à normalidade no 28º dia; aumentaram significativamente também os grupos 500 mg (nos dias 7 e 14) e 1000 mg (nos dias 7 e 28) (Figura 10).

Figura 9 - Gráfico de barras do número total de reticulócitos dos camundongos machos dos grupos controle e tratado com FO-S. Conforme as doses administradas: (A) 50 mg/kg; (B) 100 mg/kg; (C) 250 mg/kg; (D) 500 mg/kg e (E) 1000 mg/kg. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$ $p^{} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.**

Figura 10 - Gráfico de barras do número total de reticulócitos dos camundongos fêmeas dos grupos controle e tratado com FO-S. Conforme as doses administradas: (A) 50 mg/kg; (B) 100 mg/kg; (C) 250 mg/kg; (D) 500 mg/kg e (E) 1000 mg/kg. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$ $p^{**} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.

4.1.6 Análises bioquímicas

As atividades das enzimas hepáticas TGO (transaminase glutâmico-oxalacética), TGP (transaminase glutâmico-pirúvica) e, e os níveis séricos de ureia e creatinina foram dosados por meio de sistema automatizado, analisador bioquímico Randox laboratórios Ltda, EUA, Modelo Rx4040. As amostras de sangue do dia 14

após o tratamento com as dose única de FO-S nos grupos de camundongos machos e fêmeas revelaram alterações significativas nos níveis de TGO e TGP que se mostraram aumentados (Figura 11 e 12). Os níveis de creatinina (mg/dl) dos grupos de camundongos fêmeas que receberam 250, 500 e 1000 mg de FO-S, apresentaram diminuição significativa de seus níveis plasmáticos(Figura 12).

Figura 11 - Gráfico de barras do perfil bioquímico. Camundongos machos dos grupos controle e tratado com as diferentes doses de FO-S aos 14 dias após inoculação em dose única. (A) Creatinina; (B) Ureia; (C) TGO; (D) TGP. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$ $p^{**} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's e pós-teste de Student-Newman-Keus.

Figura 12 - Gráfico de barras do perfil bioquímico. Camundongos fêmeas dos grupos controle e tratado com as diferentes doses de FO-S aos 14 dias após inoculação em dose única. (A) Creatinina; (B) Ureia; (C) TGO; (D) TGP. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$ $p^{**} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's e pós-teste de Student-Newman-Keus.

4.1.7 Análise das alterações macroscópicas e peso dos órgãos internos.

Após os períodos de 14, e 28 dias da inoculação, os animais foram eutanasiados para retirada da medula óssea dos ossos fêmur e tíbia, para a avaliação da celularidade e coleta dos órgãos para avaliação histopatológica. Macroscopicamente, os órgãos coletados apresentaram aspecto, coloração, tamanho, e consistência normais (Figura 13). Não ocorreram alterações significativas no peso dos órgãos internos, como também, não foram detectadas a presença de coágulos ou hemorragias intracavitárias.

Tabela 8 – Peso dos órgãos internos dos camundongos machos e fêmeas dos grupos controle e tratado após 28 dias, com as diferentes doses de FO-S. Valores expressos como média $\pm$ dp. Análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$ $p^{**} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.

Machos 28 dias		ns					
		Controle	50 mg	100 mg	250 mg	500 mg	1000 mg
Baço		0,065 $\pm$ 0.014	0,079 $\pm$ 0.013	0,089 $\pm$ 0.012	0,085 $\pm$ 0.007	0,079 $\pm$ 0.013	0,070 $\pm$ 0.014
Rins		0,520 $\pm$ 0.042	0,465 $\pm$ 0.049	0,500 $\pm$ 0.057	0,495 $\pm$ 0.007	0,490 $\pm$ 0.028	0,515 $\pm$ 0.049
Fígado		1,575 $\pm$ 0.106	1,585 $\pm$ 0.106	1,575 $\pm$ 0.106	1,625 $\pm$ 0.035	1,555 $\pm$ 0.092	1,655 $\pm$ 0.007
Pulmões		0,310 $\pm$ 0.028	0,300 $\pm$ 0.028	0,332 $\pm$ 0.032	0,315 $\pm$ 0.035	0,305 $\pm$ 0.021	0,325 $\pm$ 0.035

Fêmeas 28 dias		ns					
		Controle	50 mg	100 mg	250 mg	500 mg	1000 mg
Baço		0,081 $\pm$ 0.004	0,080 $\pm$ 0.004	0,080 $\pm$ 0.001	0,082 $\pm$ 0.003	0,081 $\pm$ 0.003	0,082 $\pm$ 0.002
Rins		0,490 $\pm$ 0.014	0,492 $\pm$ 0.011	0,494 $\pm$ 0.007	0,497 $\pm$ 0.004	0,498 $\pm$ 0.015	0,492 $\pm$ 0.011
Fígado		1,475 $\pm$ 0.049	1,465 $\pm$ 0.064	1,502 $\pm$ 0.018	1,467 $\pm$ 0.045	1,499 $\pm$ 0.013	1,504 $\pm$ 0.008
Pulmões		0,300 $\pm$ 0.028	0,297 $\pm$ 0.025	0,300 $\pm$ 0.026	0,297 $\pm$ 0.018	0,305 $\pm$ 0.021	0,309 $\pm$ 0.013

ns: não significativo

4.1.8 Avaliação histopatológica pela coloração de hematoxilina-eosina

As análises histopatológicas dos órgãos dos camundongos Balb/c tratados com as doses 500 e 1000 mg apresentaram alterações no coração, fígado e rins. O parênquima do coração de camundongo morto logo após a inoculação de FO-S 1000 mg/kg revelou áreas de hemorragia e necrose no endocárdio (Figura 14-A); o parênquima renal apresentou zona cortical profunda com tubos excretórios e canais coletores distorcidos e dilatados com a presença de hiperemia moderada difusa em camundongos tratados com 1000 mg/kg FO-S (Figura 14- B e C), assim como o parênquima renal de camundongo tratado com 500 mg/Kg FO-S, apresentou presença de material hialino na porção medular marginal à papila renal, após 14 dias de tratamento agudo (Figura 14-D). O parênquima hepático de camundongo tratado com 1000 mg/Kg, demonstrou presença de hiperemia difusa moderada, após 14 dias de tratamento agudo (Figura 14-E). O parênquima hepático de camundongo tratado com 500 mg/Kg, revelou desarranjo parcial da arquitetura do parênquima hepático, após 14 dias de tratamento agudo (Figura 14-F).

Figura 14 – Fotomicrografias dos cortes histológicos dos órgãos internos. (A) Parênquima do coração de camundongo que recebeu 1000 mg/kg de FO-S, destacam-se áreas de hemorragia e necrose no endocárdio, aumento 10x. (B e C) Parênquima renal apresentando zona cortical profunda com tubos excretórios e canais coletores distorcidos e dilatados com a presença de hiperemia moderada difusa, em camundongos tratados com 1000 mg/kg, aumento 40x. (D) Parênquima renal de camundongo tratado com 500 mg/Kg, observa-se destaque com presença de material hialino na porção medular marginal à papila renal, aumento 10 x. (E) Parênquima esplênico normal de camundongo tratado com 1000 mg/Kg, aumento 10 x. (F) Parênquima hepático de camundongo tratado com 500 mg/Kg, destaca-se desarranjo parcial da arquitetura do lóbulo hepático, presença de hepatócitos com esteatose e aumento do espaço sinusoidal, aumento 40 x.

4.1.9 Mielograma

Após eutanásia dos animais, foi realizada a dissecação, limpeza e coleta das amostras da medula óssea do fêmur e tíbia, para confecção do esfregaço e a obtenção da suspensão celular. Foi realizada a análise quantitativa em aumento de 100x na objetiva de imersão, com a contagem das células das diferentes populações como as linhagens eritroide, mieloide, linfoide e monocítica (Figuras 12-16), estabelecendo as percentagens.

Figura 15 – Fotomicroscopia de células da medula óssea. Análise do mielograma (aumento 100x), onde se destacam (setas): precursores das populações eritroides, como o Proeritroblastos (A e B); (C) Eritroblasto Basofílico; (D) Eritroblastos policromáticos e ortocromáticos.

Figura 16 – Fotomicroscopia de células da medula óssea. Análise do mielograma (aumento 100x) onde se destacam precursores da população mieloide: (A e B) Mieloblastos; (C) Mielócito e (D) Metamielócito.

Figura 17 – Fotomicroscopia de células da medula óssea. Análise do mielograma (aumento 100x), onde se destacam precursores da população monocítica: (A) Promonócito e (B) Monócito.

Figura 18 – Fotomicroscopia de células da medula óssea. Análise do mielograma (aumento 100x), onde se destacam precursores linfoides: (A) Linfoblasto e (B) Linfócito.

Figura 19 – Fotomicroscopia de células da medula óssea. Análise do mielograma (aumento 100x), onde se destacam: (A e B) Megacariócitos e (C e D) Plasmócitos.

4.1.9.1 Análise Mielograma (Machos)

As análises da celularidade da medula óssea dos camundongos machos, revelaram que o grupo de animais tratados 50 mg apresentaram no 28º dia após a inoculação do composto FO-S, diminuição significativa do número de precursores da linhagem eritroide; aumento no 28º dia dos precursores mieloides e a diminuição do compartimento monocítico no 14º dia (Figura 20-A).

O grupo de animais que receberam 100 mg do composto FO-S apresentou no 28º dia após a inoculação do composto FO-S, diminuição no número de precursores da linhagem eritroide; aumento do número do compartimento de células mieloides aos 14 e 28 dias, diminuição do compartimento linfoide aos 14 dias e aumento no 28º dia. (Figura 20-B).

No 28º dia após a inoculação do composto FO-S, o grupo de animais que recebeu 250 mg apresentou aumento do número de precursores eritroides; aumento de precursores mieloides aos 14 dias e diminuição do compartimento linfoide aos 14 e 28 dias (Figura 20-C).

O grupo de animais tratados com 500 mg, no 28º dia aumentou a população de precursores eritroides e mieloides no 14º dia e diminuiu aos 28 dias; diminuição no número de células do compartimento linfoide aos 14 e 28 dias, e aumentou a celularidade monocítica aos 28 dias (Figura 20-D).

Após 14 e 28 dias de tratamento ocorreu aumento significativo de precursores eritroides; diminuição de precursores mieloides aos 14 dias; aumento do compartimento linfocítico no 14º dia e diminuição no 28º dia (Figura 20-E).

4.1.9.2 Análise Mielograma (Fêmeas)

As análises da medula óssea dos camundongos fêmeas, revelaram que o grupo de camundongos que recebeu 50 mg apresentou após 14 e 28 dias da inoculação do composto FO-S, diminuição significativa do número de precursores eritroides, aumento dos precursores mieloides e linfoides nos 14º e 28º dias e diminuição do compartimento monocito no 14º dia (Figura 21-A).

O grupo de animais que recebeu 100 mg do composto FO-S apresentou aumento (14º dia) seguida da diminuição (28º dia) dos precursores mieloides,

diminuição do compartimento linfoide (14^o dia) seguida de seu aumento (28^o dia), e aumento do compartimento monocítico aos 14 e 28 dias (Figura 21-B).

Após a inoculação do composto FO-S, o grupo 250 mg apresentou aumento do número de precursores eritroides (14 e 28 dias) e diminuição dos compartimentos mieloide e linfoide, ambos nos 14^o e 28^o dias (Figura 21-C).

O grupo de animais que recebeu 500 mg apresentou aumento do número de precursores eritroides (14 e 28 dias) e diminuição dos compartimentos mieloide e linfoide, ambos aos 14 e 28 dias (Figura 21-D).

No grupo 1000 mg ocorreu aumento significativo de precursores eritroides (14 e 28 dias) e diminuição significativa do compartimento linfoide (14 e 28 dias) (Figura 21-E).

Figura 20 - Gráfico de barras da distribuição das proporções dos compartimentos da medula óssea das séries eritroide, mieloide, linfoide e monocítica. Camundongos machos, dos grupos controle e tratado com as diferentes doses do composto FO-S: (A) 50 mg/kg; (B) 100 mg/kg; (C) 250 mg/kg; (D) 500 mg/kg e (E) 1000 mg/kg. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$ $p^{**} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.

Figura 21 - Gráfico de barras da distribuição das proporções dos compartimentos da medula óssea das séries eritroide, mieloide, linfoide e monocítica. Camundongos Fêmeas dos grupos controle e tratado com as diferentes doses do composto FO-S: (A) 50 mg/kg; (B) 100 mg/kg; (C) 250 mg/kg; (D) 500 mg/kg e (E) 1000 mg/kg. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$ $p^{**} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.

4.1.10 Avaliação da atividade mitocondrial das células da medula óssea por citometria de fluxo

As análises do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células da medula óssea foram realizadas em citômetro de fluxo após marcação pela sonda fluorescente Rodamina 123, e mostraram que o tratamento com a FO-S no grupo de camundongos saudáveis machos e fêmeas não alterou significativamente o percentual de células polarizadas de ambos os grupos controle e tratado (Figura 22-A e B).

Figura 22 - Gráficos de barras e dot plots dos valores da porcentagem do potencial mitocondrial das células da medula óssea. Camundongos machos (A) e fêmeas (B), tratados com as diferentes doses de FO-S. Análise estatística com valores de não significância ($p > 0,05$), obtido pelo teste de variação ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey's.

4.1.11 Imunofenotipagem de células e precursores da medula óssea

Após os tratamentos com FO-S, foi analisada a celularidade da medula óssea quanto às expressões dos marcadores dos precursores hematopoiéticos, mesenquimais e células dendríticas por citometria de fluxo. Foram definidos os quadrantes (Gates) com base em cada população; padrões de expressão dos marcadores e da positividade das células marcadas no quadrante superior em função da intensidade de fluorescência, FL1-H para os marcadores fluorescentes marcados com FITC (verde) e FL2-H para os marcadores fluorescentes marcados com PE (vermelho); e a comparação entre as porcentagens da expressão dos marcadores nos grupos tratados em relação ao grupo controle. Os dados foram adquiridos pelo programa WinMDI versão 2.9, a partir dos dot plots no citômetro de fluxo FACSCalibur, e apresentados em gráfico de barras das médias $\pm$ desvio padrão.

A expressão dos seguintes marcadores: CD90 (marcador de células tronco mesenquimais); células tronco hematopoiéticas CD34; marcador CD4 (linfócito T auxiliar); marcador CD8 (linfócito T citotóxico); marcador CD56 (linfócito T natural killer); marcador de células mieloides CD43; e a proteína quimiotática de macrófagos MCP1 nas populações de granulócitos, monócitos e linfócitos não revelou alterações significativas (Figura 23).

Figura 23 – Gráficos de barras e dot plots representativos dos valores da porcentagem da expressão dos marcadores dos compartimentos de células da medula óssea. Camundongos dos grupos controle e tratado com as diferentes doses de FO-S (A) CD90; (B) CD34. Valores de significância com $p < 0.05$, $p^{**} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey's.

Figura 23 – Gráficos de barras e dot plots representativos dos valores da porcentagem da expressão dos marcadores dos compartimentos de células da medula óssea. Camundongos dos grupos controle e tratado com as diferentes doses de FO-S (C) CD4; (D) CD8. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $** < 0.001$ e $*** < 0.0001$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey's.

Figura 23 – Gráficos de barras e dot plots representativos dos valores da porcentagem da expressão dos marcadores dos compartimentos de células da medula óssea. Camundongos dos grupos controle e tratado com as diferentes doses de FO-S (E) CD56; (F) CD43; (G) MCP1. Valores de significância com $p < 0.05$, $** < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey's.

4.1.12 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

Foi avaliada a capacidade da FO-S de modificar o perfil de distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular das células da medula óssea. Os camundongos foram tratados com a FO-S nas doses de 50, 100, 250, 500 e 1000 mg/kg no estudo de toxicidade aguda, sendo quantificadas as porcentagens de célula. Com o tratamento de dose única com a FO-S, as fases do ciclo celular sofreram significativas alterações na distribuição das populações celulares, quando comparado ao grupo controle (Figuras 24 -25).

Em relação ao grupo controle, ocorreu diminuição de DNA fragmentado nos grupos de animais machos que receberam 100 e 1000 mg. A distribuição da população celular neste grupo nos camundongos fêmeas não sofreu alterações significativas. (Figura 24 e 25 - A).

As células na fase G0/G1 diminuíram significativamente nos grupos de camundongos machos tratados com 50 e 1000 mg e aumentaram no grupo 250 mg. Nos grupos de tratamentos das fêmeas com 50, 100 e 250 mg ocorreu aumento dessa população, por outro lado, ocorreu diminuição de células nesta fase no grupo 1000 mg. (Figura 24 e 25 - B).

Houve aumento de células na fase S nos grupos de camundongos machos que receberam 100 mg, diminuição de células no grupo 1000 mg de fêmeas (Figura 24 e 25- C).

Comparado ao grupo controle, ocorreu diminuição de células na fase G2/M no grupo 250 mg dos machos, por outro lado ocorreu aumento no grupo 1000 mg. A distribuição da população celular neste grupo nos camundongos fêmeas não sofreu alterações significativas. (Figura 24 e 25 - D).

Figura 24 - Gráficos de barras representativos dos valores da porcentagem das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular das células da medula óssea. Camundongos machos tratados com as diferentes doses de FO-S: (A) DNA fragmentado, (B) G0/G1, (C) S e (D) G2/M, 14 dias após inoculação única. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $** < 0.001$ e $*** < 0.0001$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle e tratado, através do teste de variação ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.

Figura 25 - Gráficos de barras representativos dos valores da porcentagem das médias $\pm$ dp das fases do ciclo celular das células da medula óssea. Camundongos fêmeas tratados com as diferentes doses de FO-S: (A) DNA fragmentado, (B) G0/G1, (C) S e (D) G2/M, 14 dias após inoculação única. Valores de significância com $p^* < 0.05$ e $** < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle e tratado, através do teste de variação ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.

4.2 GRUPO DOSES REPETIDAS

4.2.1 Análise comportamental

O comportamento dos animais foi observado sistematicamente para avaliar o screening hipocrático que fornece uma estimativa geral da toxicidade da substância quanto às características apresentadas após a administração do composto FO-S imediatamente após a inoculação, nas horas seguintes, após 24h e durante 14 dias, com o objetivo de se quantificar os efeitos destes sobre os parâmetros: a) Estado de consciência (aparência geral, irritabilidade); b) coordenação motora (atividade geral, resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção abdominal, marcha, locomoção, reflexo de endireitamento); c) tônus muscular (tônus das patas, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia); d) reflexos (auricular, córneo-palpebral, dor); e) atividade do sistema nervoso central (tremores, convulsões, contrações musculares, resposta de “Straub”, sedação, hipnose, anestesia) e f) atividade do Sistema Nervoso Autônomo (vasoconstrição, vasodilatação, lacrimação, salivação, ptose palpebral, micção, defecação, piloereção, respiração e frequência cardíaca).

Os animais dos grupos controle e tratado com 50, 100 e 250 mg/kg não apresentaram alterações clínicas detectáveis, nem imediatamente após a administração do composto, nem nas horas seguintes, assim como após 14 dias (Tabela 9 e Figura 27).

Tabela 9 - Avaliação do comportamento Neural e Motor (grupo doses repetidas) dos camundongos machos e fêmeas inoculados com as diferentes doses de FO-S imediatamente após a inoculação e 24h após a inoculação (n total=144).

	Controle		50 mg		100 mg		250 mg	
	1 ^a h	24h	1 ^a h	24h	1 ^a h	24h	1 ^a h	24h
Estado de consciência	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Coordenação motora	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Tônus muscular	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Reflexos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Sistema Nervoso Central	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema Nervoso Autônomo	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+++ presença acentuada da característica; ++ presença moderada da característica; + presença discreta da característica; 0 ausência da característica.

Figura 26 – Observação e avaliação clínica dos camundongos Balb/c. Machos e fêmeas dos grupos tratados após inoculação das diversas doses de FO-S. Não foram observadas alterações visíveis de comportamento que se evidenciam efeitos tóxicos.

4.2.2 Avaliação da mortalidade

Os resultados obtidos das curvas de probabilidade de sobrevivência pelo teste de Kaplan Meier foi não significativo ($p < 0.05$) para todas as doses do grupo doses repetidas não havendo mortes neste grupo nem imediatamente após a inoculação da FO-S até os 14 dias seguintes (Tabela 10).

Tabela 10 – Avaliação da mortalidade do grupo controle e tratado de camundongos Balb/c machos e fêmeas após tratamento com a Phos em doses repetidas (n total= 144)

Doses (mg/kg)	Mortalidade					
	Machos ^{ns}			Fêmeas ^{ns}		
	24h	7 dias	14 dias	24h	7 dias	14 dias
50	0/20	0/10	0/10	0/20	0/10	0/10
100	0/20	0/10	0/10	0/20	0/10	0/10
250	0/20	0/10	0/10	0/20	0/10	0/10
Controle	0/12	0/6	0/6	0/12	0/6	0/6

ns= não significativo

4.2.3 Avaliação ponderal

Os animais foram pesados antes do início da administração da FO-S, e após, periodicamente durante 14 dias, assim como consumo de ração e água procurando-se, desta maneira, realizar a distribuição homogênea e estatística do peso total dos animais entre os diferentes grupos de tratamento.

Somente o grupo de animais fêmeas tratado com 50 mg no 7º dia apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) do peso, retornando à normalidade aos 14 dias. O consumo de ração e água permaneceu contínuo sem alterações significativas que justificassem a diminuição de peso (Tabela 11-13).

Tabela 11 – Média do consumo de ração dos camundongos Balb/c machos e fêmeas após tratamento com FO-S dos diferentes grupos, n de cada grupo tratado=10. Análise estatística obtida pelo programa GraphPad Prism 5, sendo não significativa ($p > 0,01$) para todos os grupos, comparados ao grupo controle.

Dia	Consumo de Ração (g) ^{ns}			
	Controle	50 mg/kg	100 mg/kg	250 mg/kg
1-6	259	278	277	268
7-14	253	275	286	278

ns= não significativo

Tabela 12 – Média $\pm$ dp do consumo de água dos camundongos machos e fêmeas após tratamento com FO-S dos diferentes grupos. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA ($*p < 0.1$) obtida pelo programa GraphPad Prism 5, sendo não significativa para todos os grupos, comparados ao grupo controle.

	Consumo de Água (ml) ^{ns}		
	dias -0-7 Controle	dias 1-7	dias 7-14
Machos	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp
50 mg	38.0 $\pm$ 2.8	36.0 $\pm$ 2.8	35.5 $\pm$ 2.1
100 mg	39.0 $\pm$ 2.8	36.0 $\pm$ 1.4	34.5 $\pm$ 2.1
250mg	39.5 $\pm$ 2.1	39.0 $\pm$ 2.8	35.5 $\pm$ 2.1
Fêmeas	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp
50 mg	36.0 $\pm$ 2.8	34.0 $\pm$ 2.8	37.5 $\pm$ 2.1
100 mg	36.0 $\pm$ 1.4	37.5 $\pm$ 2.1	36.5 $\pm$ 2.1
250mg	38.0 $\pm$ 2.8	38.0 $\pm$ 2.8	37.5 $\pm$ 2.1

ns= não significativo

Tabela 13 – Média $\pm$ dp da variação de peso dos camundongos Balb/c machos e fêmeas após tratamento com FO-S dos diferentes grupos. Análise estatística obtida pelo programa GraphPad Prism 5, sendo significativa $^*(p>0,01)$ para o grupo de camundongos fêmeas 50 mg aos 7 dias comparado ao grupo controle.

	Controle	50 mg	100 mg	250 mg
Machos	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp
1 dia	24.80 $\pm$ 1.79	24.00 $\pm$ 1.58	24.80 $\pm$ 1.30	26.60 $\pm$ 1.14
7 dias	28.00 $\pm$ 1.58	26.20 $\pm$ 1.30	27.40 $\pm$ 1.14	28.00 $\pm$ 1.58
14 dias	29.40 $\pm$ 1.14	27.60 $\pm$ 1.14	28.00 $\pm$ 1.58	30.00 $\pm$ 1.58
Fêmeas	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp
1 dia	24.80 $\pm$ 1.92	24.80 $\pm$ 1.92	26.60 $\pm$ 1.14	25.00 $\pm$ 1.58
7 dias	26.20 $\pm$ 1.30	23.00 $\pm$ 1.58*	25.40 $\pm$ 2.07	24.20 $\pm$ 0.84
14 dias	25.00 $\pm$ 1.58	23.00 $\pm$ 1.58	26.00 $\pm$ 1.58	25.80 $\pm$ 1.30

4.2.4 Análises hematológicas

As amostras de sangue dos animais dos grupos doses repetidas, na presença do anticoagulante EDTA, foram obtidas da veia plexo retro orbital dos camundongos BALB/c. As coletas foram realizadas em condições normais, não estressantes, sem uso de sedação e com o uso de colírio anestésico. O hemograma dos animais do grupo doses repetidas foi obtido através do contador hematológico de uso veterinário Pentra-XL 80 (HORIBA Medical ABX, SAS).

No grupo de animais machos que receberam 50 mg, ocorreu diminuição significativa no número de reticulócitos e linfócitos em 24h; monócitos aos 7 dias; eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas após 14 dias. Neste grupo, houve aumento significativo no número de plaquetas e monócitos em 24h; eosinófilos aos 7 dias; reticulócitos e monócitos no 14^o dia. Por outro lado, no grupo de animais fêmeas, houve diminuição significativa no número total de leucócitos e linfócitos em 24h; eritrócitos, hemoglobina e na dose de hemoglobina corpuscular média (MCHC), e após o 7^o dia ocorreu aumento significativo no número de plaquetas e eosinófilos, e dos reticulócitos e monócitos no 14^o dia (Tabela 14).

Os animais machos que receberam 100 mg, apresentaram diminuição significativa no número de granulócitos em 24h; reticulócitos aos 7 dias; monócitos e eosinófilos aos 14 dias. Neste grupo também houve o aumento significativo no número de reticulócitos e basófilos em 24h; granulócitos, eosinófilos e basófilos aos

7 dias; reticulócitos, leucócitos, granulócitos e linfócitos no 14º dia. No grupo de camundongos fêmeas, houve diminuição significativa no número total de granulócitos, linfócitos e monócitos em 24h e eosinófilos aos 14 dias. Ocorreu aumento significativo no número de linfócitos no 7º dia e granulócitos no 14º dia (Tabela 15).

No grupo dos animais machos tratados com 250 mg, ocorreu diminuição significativa no número de leucócitos e linfócitos em 24h, e leucócitos, granulócitos e monócitos aos 7 dias. Também foi encontrado o aumento significativo dos eritrócitos, reticulócitos e plaquetas em 24h; reticulócitos, plaquetas, granulócitos e linfócitos aos 7 dias, e reticulócitos no 14º dia. No grupo de camundongos fêmeas, houve diminuição significativa de granulócitos, linfócitos e eosinófilos em 24h; leucócitos, granulócitos, linfócitos e monócitos aos 7 dias; eosinófilos e basófilos no 14º dia. Ocorreu aumento no número de reticulócitos, leucócitos, linfócitos e monócitos em 24h e de reticulócitos aos 7 e 14 dias (Tabela 16).

Tabela 14 - Tabela da média $\pm$ dp do hemograma dos camundongos machos e fêmeas após tratamento com FO-S 50 mg/kg. Análise estatística obtida pelo programa GraphPad Prism 5, considerando-se como valores significantes $p < 0.05$ e $** < 0.005$ e $*** < 0.0005$.

MACHOS	Controle 24h		Tratado 24h		Controle 7 dias		Tratado 7 dias		Controle 14 dias		Tratado 14 dias	
	média $\pm$ dp		média $\pm$ dp		média $\pm$ dp		média $\pm$ dp		média $\pm$ dp		média $\pm$ dp	
RBC # x 10 ⁶ /ul	10.64 0.50		10.90 1.30		9.86 0.13		9.25 0.59		7.84 1.54		*4.22 1.61	
HGB g/dL	14.90 0.56		15.34 1.54		15.35 0.07		14.54 1.21		12.15 1.91		**5.7 2.38	
HCT %	55.25 1.84		55.40 6.32		47.40 0.57		45.54 2.69		38.45 3.04		**19.94 5.81	
MCV fL	52.03 0.79		51.28 0.58		48.00 0.00		49.82 2.43		48.50 0.71		*52.2 1.10	
MCH pg	13.98 0.19		14.26 0.11		15.50 0.28		15.94 0.60		15.40 0.28		15.98 0.24	
MCHC g/dL	26.93 0.18		27.86 0.45		32.35 0.49		32.04 0.52		31.70 1.13		30.70 0.77	
Reticulócitos %	7.00 0.51		***3.76 0.83		5.40 1.13		4.96 0.99		3.90 0.14		***7.88 1.29	
PLT # x 10 ³ /ul	552.75 29.76		*584.26 60.97		719.00 90.51		670.80 35.65		605.00 26.87		***368.4 76.53	
MPV fL	6.33 0.36		5.80 0.58		6.05 0.35		5.94 0.11		5.85 0.35		6.50 0.42	
PCT %	17.08 0.39		***0.16 0.02		0.46 0.07		0.41 0.05		0.38 0.12		0.17 0.09	
WBC # x 10 ³ /ul	12.66 2.15		11.12 1.76		6.20 1.70		5.24 1.00		3.80 0.42		6.34 1.31	
Gran # x 10 ³ /ul	3.43 0.56		3.80 0.45		1.21 0.39		1.74 0.27		0.58 0.06		0.92 0.15	
Lymph # x 10 ³ /ul	8.48 0.43		*6.7 1.14		3.37 0.62		3.06 0.66		3.13 0.49		5.08 1.14	
Mon # x 10 ³ /ul	0.35 0.06		**0.48 0.04		0.38 0.04		***0.09 0.02		0.15 0.07		0.16 0.04	
Eos # x 10 ³ /ul	0.04 0.01		0.04 0.01		0.04 0.01		0.05 0.01		0.06 0.01		0.04 0.02	
Bas # x 10 ³ /ul	0.03 0.01		0.04 0.00		0.05 0.01		0.04 0.01		0.04 0.01		0.03 0.01	
Gran %	32.48 5.53		37.36 5.48		27.80 4.10		31.54 4.97		15.30 2.97		15.06 2.02	
Lymph %	64.13 6.51		57.50 4.81		57.70 8.63		63.60 5.75		81.75 4.45		80.44 3.49	
Mon %	2.43 0.36		***3.96 0.21		2.30 0.42		1.68 0.11		1.65 0.21		**2.8 0.50	
Eos %	0.70 0.27		0.66 0.11		0.30 0.14		*0.86 0.09		0.95 0.07		0.46 0.32	
Bas %	0.63 0.19		0.66 0.13		0.85 0.07		0.66 0.09		0.55 0.07		0.44 0.11	

FÉMEAS	Controle 24h		Tratado 24h		Controle 7 dias		Tratado 7 dias		Controle 14 dias		Tratado 14 dias	
	média ± dp		média ± dp		média ± dp		média ± dp		média ± dp		média ± dp	
RBC # x 10 ⁹ /ul	10.59	0.39	10.67	0.5	8.88	0.47	9.45	0.36	7.33	0.26	**3.44	2.34
HGB g/dL	14.9	0.32	14.88	0.6	14.35	0.64	14.46	1.11	10.4	0.14	***6.7	0.65
HCT %	56.43	1.25	55.84	2.03	44.2	1.27	45.96	2.31	32.15	1.63	31.22	3.39
MCV fL	53.38	0.76	53.36	0.33	49.5	0.71	49.82	2.43	50.5	0.71	52.2	1.1
MCH pg	14.03	0.29	14.16	0.15	16	0.14	15.94	0.6	16.45	0.49	15.98	0.24
MCHC g/dL	26.38	0.43	26.6	0.24	32.2	0.14	32.04	0.52	32.35	1.2	*30.7	0.77
Reticulócitos %	5.98	0.17	5.4	0.55	5	0.57	4.76	0.68	5	0.28	***8.24	1.13
PLT # x 10 ³ /ul	407.75	33.14	478.8	73.47	433	56.57	***655	21.21	494	33.94	448.4	35.74
MPV fL	6.4	0.5	6.48	0.4	6.35	0.07	5.98	0.16	6.1	0.28	6.5	0.42
PCT %	0.21	0.07	0.19	0.14	0.27	0.04	0.41	0.05	0.3	0.12	0.17	0.09
WBC # x 10 ³ /ul	13.75	0.66	*11.72	1.2	5.2	0.57	5.28	0.55	4.15	0.35	5.81	0.85
Gran # x 10 ³ /ul	4.08	0.5	4.28	0.3	1.27	0.21	1.95	0.08	0.86	0.23	1.39	0.42
Lymph# x 10 ³ /ul	9.13	0.67	**7.02	1.12	3.77	0.3	3.18	0.52	3.29	0.06	4.23	0.77
Mon # x 10 ³ /ul	0.55	0.06	0.49	0.05	0.15	0.07	0.1	0.02	0.1	0.01	0.19	0.05
Eos # x 10 ³ /ul	0.04	0.01	0.04	0.01	0.03	0.01	0.04	0.01	0.06	0.01	0.04	0.02
Bas # x 10 ³ /ul	0.03	0.01	0.04	0.01	0.06	0	0.04	0.01	0.04	0.01	0.03	0.01
Gran %	29.1	3.43	31.4	7.35	32.55	11.1	30.34	9.65	17.6	6.36	14.66	2.58
Lymph %	65.25	1.15	64.66	7.76	62.85	8.84	63.6	5.75	78.6	9.48	80.44	3.49
Mon %	4.4	0.34	4.24	0.43	1.1	0.28	1.68	0.11	1.05	0.21	***2.56	0.38
Eos %	0.65	0.17	0.64	0.09	0.3	0.14	***0.86	0.09	0.85	0.07	0.52	0.15
Bas %	0.6	0.14	0.62	0.08	0.88	0.11	0.68	0.04	0.55	0.07	0.44	0.11

RBC= Eritrócitos; HGB= Hemoglobina; HCT= Hematócrito; MCV= Volume corpuscular médio; MCH= Hemoglobina corpuscular média;

MCHC= Concentração de hemoglobina corpuscular média; PLT= Plaquetas; MPV= Volume plaquetário médio; PCT= Procalcitonina;

WBC= Leucócitos totais; Gran= Granulócitos; Lymph= Linfócitos; Mon= Monócitos; Eos= Eosinófilos; Bas= Basófilos.

Tabela 15 - Tabela da média $\pm$ dp do hemograma dos camundongos machos e fêmeas após tratamento com FO-S 100 mg/kg. Análise estatística obtida pelo programa GraphPad Prism 5, considerando-se como valores significantes $p < 0.05$ e $** < 0.005$ e $*** < 0.0005$

MACHOS	Controle 24h		Tratado 24h		Controle 7 dias		Tratado 7 dias		Controle 14 dias		Tratado 14 dias	
	média $\pm$ dp		média $\pm$ dp		média $\pm$ dp		média $\pm$ dp		média $\pm$ dp		média $\pm$ dp	
RBC # x 10 ⁶ /ul	7.50	0.81	8.48	0.82	9.37	0.05	9.39	0.46	8.84	1.18	9.50	0.86
HGB g/dL	10.90	1.09	12.02	1.29	14.35	0.17	13.83	0.85	13.05	1.79	14.28	1.31
HCT %	33.55	3.27	36.90	4.04	42.95	0.64	41.44	2.20	38.70	4.73	42.01	3.74
MCV fL	44.82	0.89	44.43	2.66	45.86	0.43	44.12	1.23	43.71	0.34	43.23	3.31
MCH pg	14.56	0.18	14.08	0.50	15.33	0.10	14.71	0.47	14.81	0.01	15.03	0.19
MCHC g/dL	32.54	0.11	32.53	1.86	33.41	0.09	33.36	0.38	33.71	0.47	33.99	0.31
Reticulócitos %	3.60	0.82	***7.32	0.54	6.50	0.26	***3.36	0.43	4.65	0.60	***6.96	0.79
PLT # x 10 ³ /ul	615.50	47.82	690.80	86.72	905.50	35.22	841.70	64.46	825.50	35.45	859.60	41.08
MPV fL	5.30	0.20	5.44	0.23	5.50	0.12	5.40	0.18	5.65	0.17	5.42	0.25
PCT %	0.33	0.03	0.38	0.04	0.50	0.03	0.45	0.03	0.42	0.06	0.48	0.04
WBC # x 10 ³ /ul	5.48	0.56	4.44	0.34	6.65	0.55	6.90	0.89	4.88	0.75	*6.18	0.58
Gran # x 10 ³ /ul	1.54	0.17	***0.79	0.06	1.00	0.13	**1.39	0.16	0.85	0.17	*1.20	0.18
Lymph # x 10 ³ /ul	3.75	0.62	2.97	0.42	5.58	0.67	5.73	0.59	3.56	0.64	***6.41	0.47
Mon # x 10 ³ /ul	0.10	0.01	0.10	0.02	0.07	0.02	**0.11	0.01	0.09	0.01	*0.06	0.01
Eos # x 10 ³ /ul	0.04	0.01	0.03	0.01	0.02	0.01	**0.04	0.01	0.07	0.01	***0.02	0.01
Bas # x 10 ³ /ul	0.04	0.03	***0.17	0.02	0.07	0.01	0.04	0.02	0.04	0.01	0.02	0.01
Gran %	28.05	4.94	25.24	8.88	16.45	0.87	21.24	6.59	18.20	1.27	20.30	6.39
Lymph %	68.35	6.43	65.87	8.50	81.20	1.39	75.39	7.35	70.35	8.37	76.99	7.02
Mon %	1.73	0.15	2.04	0.21	1.10	0.23	2.76	0.23	3.15	0.29	1.00	0.27
Eos %	0.65	0.25	0.80	0.29	0.30	0.12	0.86	0.29	2.15	0.29	0.56	0.27
Bas %	0.56	0.08	1.90	0.17	0.95	0.17	0.62	0.18	0.58	0.10	0.46	0.09

FÊMEAS	Controle 24h		Tratado 24h		Controle 7 dias		Tratado 7 dias		Controle 14 dias		Tratado 14 dias	
	média ± dp		média ± dp		média ± dp		média ± dp		média ± dp		média ± dp	
RBC # x 10 ⁶ /ul	8.10	0.65	8.99	1.34	9.92	0.05	9.86	0.82	8.84	1.18	9.50	0.86
HGB g/dL	11.88	1.37	13.18	2.22	15.25	0.17	15.07	1.24	13.05	1.79	14.28	1.31
HCT %	37.70	3.12	40.02	6.45	45.75	0.17	44.95	3.41	38.70	4.73	42.01	3.74
MCV fL	46.53	3.19	45.20	0.46	46.14	0.07	45.63	0.73	43.71	0.34	43.23	3.31
MCH pg	14.65	0.53	15.14	0.47	15.38	0.09	15.29	0.22	14.81	0.01	15.03	0.19
MCHC g/dL	31.57	2.77	32.52	0.87	33.33	0.25	33.51	0.38	33.71	0.47	33.99	0.31
Reticulócitos %	2.30	0.26	6.40	0.91	5.05	0.53	3.48	0.41	5.25	0.41	6.04	0.26
PLT # x 10 ³ /ul	593.25	65.86	663.80	124.93	798.00	16.17	785.80	63.94	744.00	129.33	879.00	60.71
MPV fL	5.33	0.39	5.68	0.29	5.45	0.06	5.47	0.12	5.65	0.17	5.42	0.25
PCT %	0.37	0.05	0.41	0.01	0.43	0.00	0.43	0.03	0.42	0.06	0.48	0.04
WBC # x 10 ³ /ul	6.10	0.53	3.16	0.73	3.65	0.29	5.11	0.97	4.83	0.21	7.90	0.60
Gran # x 10 ³ /ul	1.38	0.32	***0.53	0.14	0.77	0.11	0.89	0.15	0.85	0.26	*1.28	0.22
Lymph # x 10 ³ /ul	4.44	0.49	***2.18	0.67	2.72	0.23	**4.16	0.34	3.66	0.58	4.47	0.44
Mon # x 10 ³ /ul	0.13	0.02	***0.04	0.01	0.10	0.01	0.07	0.02	0.09	0.01	0.06	0.02
Eos # x 10 ³ /ul	0.05	0.02	0.03	0.01	0.03	0.02	0.02	0.02	0.07	0.02	***0.02	0.01
Bas # x 10 ³ /ul	0.05	0.01	0.06	0.01	0.03	0.01	0.03	0.01	0.04	0.01	0.02	0.01
Gran %	21.90	7.33	18.34	3.03	20.90	1.15	16.56	3.20	18.20	1.27	20.30	6.39
Lymph %	72.50	9.86	68.68	6.73	74.55	0.52	80.94	3.58	70.35	8.37	76.99	7.02
Mon %	2.45	0.45	2.52	0.44	2.63	0.26	1.60	0.39	2.63	0.43	1.54	0.42
Eos %	1.43	0.32	0.75	0.43	1.08	0.26	0.36	0.36	1.93	0.10	0.56	0.41
Bas %	0.85	0.45	0.90	0.12	1.30	0.35	0.58	0.11	0.58	0.10	0.38	0.08

RBC= Eritrócitos; HGB= Hemoglobina; HCT= Hematócrito; MCV= Volume corpuscular médio; MCH= Hemoglobina corpuscular média;

MCHC= Concentração de hemoglobina corpuscular média; PLT= Plaquetas; MPV= Volume plaquetário médio; PCT= Procalcitonina;

WBC= Leucócitos totais; Gran= Granulócitos; Lymph= Linfócitos; Mon= Monócitos; Eos= Eosinófilos; Bas= Basófilos.

Tabela 16 - Tabela da média $\pm$ dp do hemograma dos camundongos machos e fêmeas após tratamento com FO-S 250 mg/kg. Análise estatística obtida pelo programa GraphPad Prism 5, considerando-se como valores significantes $p < 0.05$ e $** < 0.005$ e $*** < 0.0005$.

MACHOS	Controle 24h		Tratado 24h		Controle 7 dias		Tratado 7 dias		Controle 14 dias		Tratado 14 dias	
	média $\pm$ dp		média $\pm$ dp		média $\pm$ dp		média $\pm$ dp		média $\pm$ dp		média $\pm$ dp	
RBC # x 10 ⁶ /ul	8.09 0.55		9.72 0.85		7.78 4.17		11.04 0.24		9.89 0.08		10.21 0.20	
HGB g/dL	12.53 0.85		**14.64 0.74		15.45 0.87		16.12 0.77		15.15 0.10		15.74 0.37	
HCT %	39.45 1.79		***48.84 1.58		49.13 1.87		49.02 0.65		48.65 0.37		50.40 0.92	
MCV fL	49.53 0.62		48.16 1.01		45.65 1.20		44.18 0.52		49.18 0.10		49.32 0.11	
MCH pg	15.45 0.13		15.02 0.35		15.15 0.13		14.62 0.42		15.25 0.06		15.38 0.10	
MCHC g/dL	31.53 0.81		31.20 0.32		32.85 1.26		33.44 0.43		31.08 0.05		31.18 0.16	
Reticulócitos %	3.55 0.72		***7.12 0.41		4.45 0.58		***7.68 0.23		5.50 0.26		***8.08 0.64	
PLT # x 10 ³ /ul	740.8 44.9		***905.2 53.3		852.3 41.2		***1002 38.5		971.3 19.0		1050.4 15.7	
MPV fL	5.70 0.41		5.42 0.15		5.73 0.15		5.46 0.05		5.60 0.00		5.70 0.19	
PCT %	0.38 0.04		0.44 0.09		0.49 0.03		0.53 0.05		0.55 0.01		0.60 0.02	
WBC # x 10 ³ /ul	6.45 0.73		*5.18 0.96		6.10 0.58		**4.27 0.17		3.85 0.44		4.18 0.22	
Gran # x 10 ³ /ul	1.40 0.23		1.30 0.20		2.33 0.25		***0.89 0.09		0.80 0.07		0.83 0.07	
Lymph # x 10 ³ /ul	4.83 0.49		*3.634 0.59		3.47 0.65		3.03 0.35		2.80 0.38		3.11 0.21	
Mon # x 10 ³ /ul	0.18 0.05		0.13 0.04		0.28 0.03		***0.09 0.04		0.13 0.03		0.12 0.04	
Eos # x 10 ³ /ul	0.05 0.01		0.06 0.01		0.04 0.01		0.04 0.01		0.06 0.01		0.07 0.01	
Bas # x 10 ³ /ul	0.04 0.01		0.04 0.01		0.03 0.01		0.03 0.00		0.03 0.01		0.04 0.01	
Gran %	20.63 5.25		25.18 2.09		43.60 7.02		***21.94 1.07		20.58 1.03		19.86 1.23	
Lymph %	75.48 3.86		70.72 2.68		49.63 9.41		***74.08 1.09		72.73 2.62		74.62 1.42	
Mon %	3.00 0.61		2.44 0.25		5.20 0.52		***2.46 0.71		3.23 0.49		3.16 0.72	
Eos %	0.70 0.24		0.98 0.22		0.70 0.24		0.98 0.43		1.50 0.24		1.54 0.32	
Bas %	0.75 0.39		0.72 0.39		0.53 0.10		0.62 0.26		0.65 0.19		1.02 0.52	

FÊMEAS	Controle 24h		Tratado 24h		Controle 7 dias		Tratado 7 dias		Controle 14 dias		Tratado 14 dias	
	média ± dp		média ± dp		média ± dp		média ± dp		média ± dp		média ± dp	
RBC # x 10 ⁶ /ul	9.13 0.56		9.84 1.29		11.07 0.94		11.16 0.62		10.05 0.27		9.59 1.37	
HGB g/dL	13.90 1.16		15.02 1.86		16.95 1.45		16.84 0.92		15.78 0.37		14.72 2.21	
HCT %	44.13 4.42		47.84 5.69		50.70 2.03		50.02 2.56		50.85 1.31		49.48 4.97	
MCV fL	48.27 2.67		48.62 0.67		45.90 2.28		44.82 0.42		50.48 0.21		49.80 0.67	
MCH pg	15.21 0.52		15.22 0.13		15.28 0.10		15.06 0.11		15.65 0.10		15.32 0.20	
MCHC g/dL	31.51 0.78		31.32 0.19		33.33 1.56		33.62 0.16		30.98 0.05		30.80 0.41	
Reticulócitos %	3.00 0.16		***5.64 0.26		4.30 0.26		***9.64 0.48		5.70 0.26		***7.04 0.90	
PLT # x 10 ³ /ul	752.25 84.43		879.20 124.66		848.00 49.86		926.40 75.72		756.75 60.21		817.20 80.20	
MPV fL	5.63 0.26		5.44 0.09		5.63 0.19		5.56 0.26		5.75 0.10		5.64 0.25	
PCT %	0.42 0.05		0.48 0.07		0.48 0.01		0.51 0.02		0.43 0.03		0.46 0.05	
WBC # x 10 ³ /ul	6.23 0.88		***11.68 1.19		6.98 0.34		**3.88 0.57		4.98 0.21		5.16 1.56	
Gran # x 10 ³ /ul	1.33 0.39		1.77 0.33		1.84 0.29		***0.90 0.06		0.77 0.14		0.70 0.23	
Lymph # x 10 ³ /ul	4.62 0.64		***9.61 0.91		4.81 0.08		**2.81 0.50		3.89 0.32		4.25 1.26	
Mon # x 10 ³ /ul	0.13 0.02		**0.21 0.03		0.20 0.03		**0.10 0.03		0.17 0.03		0.18 0.02	
Eos # x 10 ³ /ul	0.06 0.03		0.03 0.01		0.06 0.03		0.04 0.02		0.09 0.03		*0.03 0.03	
Bas # x 10 ³ /ul	0.06 0.02		0.07 0.02		0.06 0.02		0.03 0.01		0.07 0.01		*0.03 0.02	
Gran %	21.15 4.16		*15.04 1.89		26.33 2.82		23.54 3.06		15.53 2.98		13.52 1.76	
Lymph %	74.33 2.66		*82.18 2.19		69.20 4.54		72.04 3.22		78.13 5.24		82.28 2.11	
Mon %	2.30 0.42		1.88 0.18		2.88 0.41		2.94 0.22		2.98 0.39		3.00 0.27	
Eos %	1.93 0.45		***0.20 0.13		0.83 0.39		0.98 0.38		2.28 0.43		***0.38 0.41	
Bas %	0.98 0.31		0.62 0.13		0.93 0.49		0.68 0.31		1.45 0.17		**0.62 0.36	

RBC= Eritrócitos; HGB= Hemoglobina; HCT= Hematócrito; MCV= Volume corpuscular médio; MCH= Hemoglobina corpuscular média;

MCHC= Concentração de hemoglobina corpuscular média; PLT= Plaquetas; MPV= Volume plaquetário médio; PCT= Procalcitonina;

WBC= Leucócitos totais; Gran= Granulócitos; Lymph= Linfócitos; Mon= Monócitos; Eos= Eosinófilos; Bas= Basófilos.

4.2.5 Análises bioquímicas

As atividades das enzimas hepáticas TGO (transaminase glutâmico-oxalacética), TGP (transaminase glutâmico-pirúvica) e os níveis séricos de ureia e creatinina foram determinados em analisador bioquímico automatizado, laboratórios Randox Ltda, EUA, Modelo Rx4040. As amostras de sangue após o 7º dia de tratamento do estudo de toxicidade doses repetidas de FO-S não mostraram alterações significativas nos níveis das transaminases hepáticas (TGO e TGP) como também nos níveis de creatinina e ureia. As análises realizadas no 14º dia de experimentação também não mostraram alterações significativas (Tabela 17 e 18).

Tabela 17 – Média do perfil bioquímico – doses repetidas. Camundongos machos dos grupos controle e tratado com as diferentes doses de FO-S após 7 e 14 dias. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$ $p^{**} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.

	Controle	50 mg	100 mg	250 mg
Machos 7 dias^{ns}	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp
Creatinina mg/dL	0.42 $\pm$ 0.05	0.44 $\pm$ 0.06	0.41 $\pm$ 0.05	0.37 $\pm$ 0.02
Ureia mg/dL	75.10 $\pm$ 8.05	74.86 $\pm$ 6.74	61.56 $\pm$ 5.17	63.27 $\pm$ 7.98
TGO U/L	113.16 $\pm$ 25.91	159.75 $\pm$ 15.48	143.75 $\pm$ 41.41	127.5 $\pm$ 46.81
TGP U/L	33.66 $\pm$ 13.81	45.625 $\pm$ 16.13	20.62 $\pm$ 9.69	54.62 $\pm$ 12.51
Machos 14 dias^{ns}				
Creatinina mg/dL	0.45 $\pm$ 0.20	0.45 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.04	0.34 $\pm$ 0.03
Ureia mg/dL	67.04 $\pm$ 6.05	78.98 $\pm$ 8.53	67.26 $\pm$ 9.82	67.85 $\pm$ 11.54
TGO U/L	241.83 $\pm$ 73.49	167.37 $\pm$ 24.21	234.37 $\pm$ 70.11	268.87 $\pm$ 81.43
TGP U/L	45.33 $\pm$ 11.71	69.87 $\pm$ 21.54	25.37 $\pm$ 21.85	63.25 $\pm$ 15.79

Tabela 18 – Média do perfil bioquímico – doses repetidas. Camundongos machos dos grupos controle e tratado com as diferentes doses de FO-S após 7 e 14 dias. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$ $p^{**} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.

	Controle	50 mg	100 mg	250 mg
Fêmeas 7 dias^{ns}	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp
Creatinina mg/dL	0.51 $\pm$ 0.18	0.50 $\pm$ 0.09	0.49 $\pm$ 0.16	0.71 $\pm$ 0.14
Ureia mg/dL	75.10 $\pm$ 8.05	74.86 $\pm$ 6.74	61.56 $\pm$ 5.17	63.27 $\pm$ 7.98
TGO U/L	113.16 $\pm$ 25.91	179.62 $\pm$ 30.51	143.75 $\pm$ 41.41	127.5 $\pm$ 46.81
TGP U/L	48.83 $\pm$ 11.55	62.37 $\pm$ 13.00	24.00 $\pm$ 7.41	28.87 $\pm$ 18.72
Fêmeas 14 dias^{ns}				
Creatinina mg/dL	0.56 $\pm$ 0.13	0.57 $\pm$ 0.33	0.63 $\pm$ 0.12	0.47 $\pm$ 0.13
Ureia mg/dL	65.08 $\pm$ 5.13	77.4 $\pm$ 19.39	69.14 $\pm$ 9.35	57.95 $\pm$ 4.07
TGO U/L	103.33 $\pm$ 55.02	141.37 $\pm$ 103.29	181.28 $\pm$ 106.63	181.37 $\pm$ 112.79
TGP U/L	66.33 $\pm$ 15.64	83.14 $\pm$ 42.87	74.42 $\pm$ 43.02	31.62 $\pm$ 10.58

ns= não significante

4.2.6 Análise das alterações macroscópicas e peso dos órgãos internos (necropsia)

Após os períodos de 7 e 14 dias da inoculação, os animais foram eutanasiados para retirada da medula óssea dos ossos fêmur e tíbia, para a avaliação da celularidade e coleta dos órgãos para avaliação histopatológica. Macroscopicamente, após necropsia, os órgãos coletados apresentaram aspecto, coloração, tamanho e consistência normais (Figura 26). Não ocorreram alterações significativas no peso dos órgãos internos dos camundongos em todas as doses administradas.

Figura 26 – Aspecto dos camundongos mortos e órgãos internos após administração do composto FO-S. Camundongos Balb/c machos e fêmeas mortos após inoculação de FO-S nas diferentes doses. Aspecto normal dos órgãos internos, após necropsia.

Tabela 19 – Peso dos órgãos internos dos camundongos machos e fêmeas dos grupos controle e tratado após 7 e 14 dias, com a dose de FO-S 50 mg/kg. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA (* $p < 0.05$) obtida pelo programa GraphPad Prism 5.

	Controle	7 dias	14 dias
Machos - 50 mg^{ns}	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp
Baço	0.05 $\pm$ 0.07	0.10 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00
Rins	0.45 $\pm$ 0.07	0.50 $\pm$ 0.00	0.40 $\pm$ 0.00
Fígado	1.40 $\pm$ 0.00	1.50 $\pm$ 0.14	1.40 $\pm$ 0.00
Pulmão	0.30 $\pm$ 0.00	0.40 $\pm$ 0.14	0.35 $\pm$ 0.07
Testículos	0.05 $\pm$ 0.07	0.05 $\pm$ 0.07	0.00 $\pm$ 0.00
Fêmeas - 50 mg^{ns}			
Baço	0.05 $\pm$ 0.07	0.10 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.00
Rins	0.45 $\pm$ 0.07	0.50 $\pm$ 0.00	0.40 $\pm$ 0.00
Fígado	1.40 $\pm$ 0.00	1.50 $\pm$ 0.14	1.40 $\pm$ 0.00
Pulmão	0.30 $\pm$ 0.00	0.40 $\pm$ 0.14	0.35 $\pm$ 0.07
Ovários	0.05 $\pm$ 0.07	0.05 $\pm$ 0.07	0.00 $\pm$ 0.00

ns= não significativo

Tabela 20 – Peso dos órgãos internos dos camundongos machos e fêmeas dos grupos controle e tratado após 7 e 14 dias, com a dose de FO-S 100 mg/kg. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA (* $p < 0.05$) obtida pelo programa GraphPad Prism 5.

	Controle	7 dias	14 dias
Machos - 100 mg^{ns}	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp
Baço	0.25 $\pm$ 0.21	0.40 $\pm$ 0.14	0.15 $\pm$ 0.07
Rins	0.50 $\pm$ 0.14	0.45 $\pm$ 0.07	0.45 $\pm$ 0.07
Fígado	1.55 $\pm$ 0.07	1.45 $\pm$ 0.07	1.70 $\pm$ 0.00
Pulmão	0.25 $\pm$ 0.07	0.25 $\pm$ 0.07	0.20 $\pm$ 0.00
Testículos	0.05 $\pm$ 0.07	0.05 $\pm$ 0.07	0.00 $\pm$ 0.00
Fêmeas - 100 mg^{ns}			
Baço	0.20 $\pm$ 0.10	0.25 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.00
Rins	0.45 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.05
Fígado	1.35 $\pm$ 0.05	1.30 $\pm$ 0.10	1.45 $\pm$ 0.05
Pulmão	0.30 $\pm$ 0.10	0.30 $\pm$ 0.00	0.25 $\pm$ 0.05
Ovários	0.05 $\pm$ 0.05	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00

ns= não significativo

Tabela 21 – Peso dos órgãos internos dos camundongos machos e fêmeas dos grupos controle e tratado após 7 e 14 dias, com a dose de FO-S 250 mg/kg. Valores da média $\pm$ dp e análise estatística de variância ANOVA (* $p < 0.05$) obtida pelo programa GraphPad Prism 5.

	Controle	7 dias	14 dias
Machos - 250 mg^{ns}	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp	média $\pm$ dp
Baço	0.20 $\pm$ 0.14	0.15 $\pm$ 0.07	0.10 $\pm$ 0.00
Rins	0.50 $\pm$ 0.14	0.45 $\pm$ 0.07	0.45 $\pm$ 0.07
Fígado	1.50 $\pm$ 0.14	1.60 $\pm$ 0.14	1.65 $\pm$ 0.07
Pulmão	0.25 $\pm$ 0.07	0.25 $\pm$ 0.07	0.25 $\pm$ 0.07
Testículos	0.05 $\pm$ 0.07	0.05 $\pm$ 0.07	0.05 $\pm$ 0.07
Fêmeas - 250 mg^{ns}			
Baço	0.20 $\pm$ 0.10	0.15 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.00
Rins	0.35 $\pm$ 0.05	0.40 $\pm$ 0.00	0.35 $\pm$ 0.05
Fígado	1.30 $\pm$ 0.10	1.20 $\pm$ 0.00	1.25 $\pm$ 0.05
Pulmão	0.30 $\pm$ 0.10	0.25 $\pm$ 0.05	0.35 $\pm$ 0.05
Ovários	0.05 $\pm$ 0.05	0.00 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.05

ns= não significativo

4.2.7 Avaliação histopatológica pela coloração de hematoxilina-eosina

As análises histopatológicas dos órgãos dos camundongos Balb/c tratados com a dose 250 mg/kg apresentaram alterações nos parênquimas do pulmões. O parênquima pulmonar de camundongo que recebeu FO-S 250 mg/kg revelou áreas de bronquíolos respiratórios e saco alveolar com a presença de congestão e saída

de sangue para o espaço interalveolar (Figura 27-A), enquanto o parênquima pulmonar do camundongo que recebeu 50 mg/kg apresentou aspecto normal (Figura 27-B). Os órgãos reprodutores não apresentaram alterações, no parênquima ovariano destacam-se áreas de maturação folículos (Figura 28-A) e o parênquima testicular de camundongo que recebeu FO-S 250 mg/kg com a presença de espermatozoides no túbulo seminífero (Figura 28-B), assim como os demais órgãos, destacamos parênquima de linfonodo com células linfáticas no folículo da cortical (Figura 29-A) e parênquima renal com áreas medular e cortical normais (Figura 29-B).

Figura 27 – Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos dos órgãos dos camundongos Balb/c tratados com FO-S. (A) Análise do parênquima pulmonar de camundongo que recebeu FO-S 250 mg/kg, destacam-se áreas de bronquíolos respiratórios e saco alveolar com a presença de congestão e saída de sangue para o espaço interalveolar. (B) Parênquima pulmonar de camundongo que recebeu FO-S 50 mg/kg apresentando aspecto normal, aumento 10 x.

Figura 28 – Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos dos órgãos dos camundongos Balb/c tratados com FO-S. (A) Análise do parênquima do ovário de camundongo que recebeu FO-S 250 mg/kg, destacam-se áreas de maturação folículos ovarianos. (B) Análise do parênquima testicular de camundongo que recebeu FO-S 250 mg/kg apresentando aspecto normal, com a presença de espermatozoides no túbulo seminífero. Aumento 10 x.

Figura 29 – Fotomicrografias dos cortes histológicos dos órgãos dos camundongos Balb/c tratados com FO-S. (A) Análise do parênquima do linfonodo de camundongo que recebeu FO-S 250 mg/kg, apresentando aspecto normal com células linfáticas no folículo da cortical, e (B) Análise do parênquima renal de camundongo que recebeu FO-S 250 mg/kg apresentando aspecto normal, aumento 10 x.

4.2.8 Mielograma

Após eutanásia dos animais, foi realizada a dissecação, limpeza e coleta das amostras da medula óssea do fêmur e tíbia, para confecção do esfregaço. Foi realizada a análise quantitativa em aumento de 100x ou na objetiva de imersão com a contagem das células mais abundantes como as linhagens eritroide, mieloide, linfóide e monocítica, conforme já demonstrado nas (Figuras 15-19).

As análises da medula óssea dos camundongos machos, revelaram que o grupo que recebeu 50 mg apresentou no 7º dia após a última inoculação do composto FO-S, diminuição significativa do número de precursores eritroides; aumento no 7º e 14º dias dos precursores mielóides e diminuição dos precursores linfóides. (Figura 30-A).

O grupo de animais machos que recebeu 100 mg apresentou no 7º dia aumento significativo do número de precursores eritroides, e diminuição do número do compartimento mieloide (Figura 30-B).

As análises da medula óssea dos camundongos fêmeas, revelaram que o grupo de animais tratados 50 mg demonstrou no 14º dia diminuição significativa do número de precursores linfóides (Figura 31-A).

No 14º dia os animais que receberam 100 mg apresentaram diminuição dos precursores eritroides (Figura 31-B).

O grupo que recebeu 250 mg, apresentou aumento de precursores eritroides aos 14º dias e do compartimento monocítico no 7º dia, como também, a diminuição de precursores mielóides no 7º dia, e linfóides no 14º dia (Figura 31-C).

Figura 30 - Gráfico de barras das médias $\pm$ dp da distribuição das proporções dos compartimentos da medula óssea das séries eritroide, mieloide, linfoide e monocítica. Camundongos machos, dos grupos controle e tratado com as diferentes doses do composto FO-S: (A) 50 mg/kg; (B) 100 mg/kg; (C) 250 mg/kg; (D) 500 mg/kg e (E) 1000 mg/kg. Análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.

Figura 31 - Gráfico de barras das médias $\pm$ dp da distribuição das proporções dos compartimentos da medula óssea das séries eritroide, mieloide, linfoide e monocítica. Camundongos fêmeas, dos grupos controle e tratado com as diferentes doses do composto FO-S: (A) 50 mg/kg; (B) 100 mg/kg; (C) 250 mg/kg; (D) 500 mg/kg e (E) 1000 mg/kg. Análise estatística de variância ANOVA com significância $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$ obtida pelo programa GraphPad Prism 5 seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.

4.2.9 Imunofenotipagem das populações e precursores da medula óssea

Após os tratamentos com FO-S, a celularidade da medula óssea foi analisada quanto às expressões dos marcadores de precursores hematopoiéticos, mesenquimais e células dendríticas por citometria de fluxo. Foram definidos os padrões de expressão dos marcadores e da positividade das células marcadas no quadrante superior direito em função da intensidade de fluorescência, FL1-H para os marcadores fluorescentes marcados com FITC (verde) e FL2-H para os marcadores fluorescentes marcados com PE (vermelho); e a comparação entre as porcentagens da expressão dos marcadores nos grupos tratados em relação ao grupo controle adquiridos pelo Guava® Express Pro.

A expressão do marcador de células tronco mesenquimais CD90, nas células da medula óssea mostrou-se diminuída nos grupos de animais fêmeas que receberam 100 e 250 mg de FO-S após 7 e 14 dias (Figura 31-A), diferentemente da expressão no grupo de camundongos machos que não sofreu alteração (Figura 30-A).

O marcador de células tronco hematopoiéticas CD34, nas células da medula óssea mostrou-se aumentada no 14º dia nos animais machos que receberam 250 mg (Figuras 30-B e 31-B).

Os marcadores das populações linfocitárias CD4 (linfócito T auxiliar), CD8 (linfócito T citotóxico) e CD56 (linfócito T natural killer) se mantiveram normais em relação aos grupos controles (Figuras 30-C, D e E) e (Figuras 31-C, D e E).

A expressão do marcador de células mieloides CD43, nas células da medula óssea, demonstraram diminuição significativa nos grupos de animais machos que receberam 100 e 250 mg aos 7 e 14 dias; porém sem alterações no grupo de camundongos fêmeas (Figuras 30-F e 31-F).

A proteína quimiotática de macrófagos MCP1 não teve alteração em sua expressão nos grupos de animais machos e fêmeas (Figuras 30-G e 31-G).

Figura 32 - Gráficos de barras das médias $\pm$ dp e dot plots representativos dos valores da porcentagem da expressão dos marcadores dos compartimentos de células da medula óssea. Camundongos machos controle e tratado com as diferentes doses de FO-S e marcadores: (A) CD90; (B) CD34. Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey's.**

Figura 32 - Gráficos de barras das médias $\pm$ dp e dot plots representativos dos valores da porcentagem da expressão dos marcadores dos compartimentos de células da medula óssea. Camundongos machos controle e tratado com as diferentes doses de FO-S e marcadores: (C) CD4; (D) CD8; (E) CD43. Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey's.

Figura 32 - Gráficos de barras das médias $\pm$ dp e dot plots representativos dos valores da porcentagem da expressão dos marcadores dos compartimentos de células da medula óssea. Camundongos machos controle e tratado com as diferentes doses de FO-S e marcadores: (F) CD56; (G) MCP1. Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey's.**

Figura 33 - Gráficos de barras das médias $\pm$ dp e dot plots representativos dos valores da porcentagem da expressão dos marcadores dos compartimentos de células da medula óssea. Camundongos fêmeas controle e tratado com as diferentes doses de FO-S e marcadores: (A) CD90; (B) CD34; (C) CD4. Valores de significância com $p^* < 0.05$, $** < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey's.

Figura 33 - Gráficos de barras das médias $\pm$ dp e dot plots representativos dos valores da porcentagem da expressão dos marcadores dos compartimentos de células da medula óssea. Camundongos fêmeas controle e tratados com as diferentes doses de FO-S e marcadores: (D) CD8; (E) CD43; (F) CD56; (G) MCP1. Valores de significância com $p < 0.05$, $** < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey's.

4.2.10 Avaliação da atividade mitocondrial das células da medula óssea por citometria de fluxo

As análises do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células da medula óssea do Grupo Doses Repetidas foram realizadas em citômetro de fluxo após marcação pela sonda fluorescente Rodamina 123, aos 7º e 14º dias que receberam múltiplas doses de FO-S, mostraram que o tratamento com a FO-S não alterou significativamente o percentual de células polarizadas (Figura 35-A e B).

Figura 34 - Gráficos de barras das médias $\pm$ dp e Dot plots representativos das porcentagens do potencial mitocondrial das células da medula óssea. (A) camundongos machos e (B) camundongos fêmeas, tratados com as doses repetidas de FO-S, após 7º e 14º dias. Valores de significância com $p^* < 0.05$, $p^{} < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.**

4.2.11 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

Foi realizado o teste para avaliar a capacidade da FO-S de modificar o perfil de distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular. Os camundongos foram tratados com a FO-S nas doses 50, 100 e 250 mg em doses repetidas. As porcentagens de células da medula óssea nas diferentes fases do ciclo celular foram quantificadas, por citometria de fluxo após os tratamentos.

Os histogramas representativos das diferentes fases do ciclo celular foram obtidos pelo citômetro de Fluxo Guava® Express Pro.

As análises da medula óssea revelaram que a FO-S não alterou significativamente a distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular.

Figura 35 - Gráficos de barras da médias $\pm$ dp representativos dos valores da porcentagem das fases do ciclo celular das células da medula óssea. Camundongos machos dos grupos controle e tratado com as diferentes doses de FO-S aos 7 e 14 dias: (A e B) DNA fragmentado; (C e D) Fase G0/G1; (E e F) Fase S; (G e H) Fase G2/M. Valores de significância com $p^* < 0.05$, $** < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado, através do teste de variação ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.

Figura 36 - Histogramas representativos das fases do ciclo celular das células da medula óssea. Camundongos machos do grupo controle e tratados com as diferentes doses de FO-S, nos 7º e 14º dias após a última inoculação das múltiplas doses. (A) Grupo Controle (B) Grupo Tratado 50 mg aos 7 dias (C) Grupo Tratado 100 mg aos 7 dias (D) Grupo Tratado 250 mg aos 14 dias.

Figura 37 - Gráficos de barras das médias $\pm$ dp representativos dos valores da porcentagem das fases do ciclo celular das células da medula óssea. Camundongos fêmeas dos grupos controle e tratado com as diferentes doses de FO-S aos 7 e 14 dias: (A e B) DNA fragmentado; (C e D) Fase G0/G1; (E e F) Fase S; (G e H) Fase G2/M. Valores de significância com $p^* < 0.05$, $** < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$, obtidos pelas comparações das diferentes fases do ciclo celular dos grupos controle X tratado, através do teste de variação ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.

Figura 38 - Histogramas representativos para avaliação das diferentes fases do ciclo celular das células da medula óssea. Camundongos fêmeas dos grupos controle e tratados com as diferentes doses de FO-S, nos 7º e 14º dias após a última inoculação das múltiplas doses. (A) Grupo Controle (B) Grupo Tratado 50 mg aos 7 dias (C) Grupo Tratado 100 mg aos 7 dias (D) Grupo Tratado 250 mg aos 14 dias.

4.2.12 Análise de autofagia com marcador laranja de acridina por citometria de fluxo

Laranja de acridina é utilizado como marcador fluorescente que por ser uma base fraca, aceita prótons em meios com pH ácido, se tornando moléculas carregadas positivamente que não mais possuem a capacidade de atravessar membranas celulares, ficando, então, retida em compartimentos ácidos, como os autofagossomos maduros, e fluoresce vermelho em organelas vesiculares ácidas e verde no restante da célula. (TRAGANOS e DARZYNKIEWICZ 1994)

As análises obtidas por citometro de fluxo, em células da medula óssea não revelaram mudanças significativas na produção de vacúolos autofágicos nos grupos de animais tratados dos diferentes grupos.

Figura 39 - Gráficos de barras das médias $\pm$ dp representativos dos valores das porcentagens de vacúolos ácidos autofágicos presentes nas células da medula óssea.

Camundongos machos (A) e fêmeas (B) dos grupos controles e tratados com as diferentes doses de FO-S após 7 e 14 dias. Valores de significância com $p^* < 0.05$, $** < 0.001$ e $p^{***} < 0.0001$, obtido pelo teste de variação do ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett's.

Figura 40 – Dot plots representativos da atividade autofágica das células da medula óssea

Camundongos machos e fêmeas dos grupos controle e tratados com as diferentes doses de FO-S, após os 7º e 14º dias. (A) Grupo de machos Controle e Tratado 100 mg aos 14 dias (B) Grupo de fêmeas Controle e Tratado 250 mg aos 7 dias.

4.2.13 Avaliação do teste de micronúcleo

O Teste do micronúcleo (MN) foi realizado comparando-se a frequência de MNs encontrados nas diferentes doses de tratamento com FO-S em relação ao controle. Na Tabela- 22 são apresentadas as médias e desvios padrão da frequência de MNs para os dias 7 e 14 após a inoculação, o número de micronúcleos foi estabelecido em 1.000 eritrócitos e/ou linfócitos por lâmina, em cada animal. As diferentes doses avaliadas não apresentaram diferenças significativas em relação aos respectivos grupos controles.

Figura 41 – Fotomicrografias da avaliação da presença de MN em células da medula óssea. Camundongos dos grupos controle (A e B) e tratados (C e D). Observam-se eritrócitos e linfócitos preservados com aspecto normal sem a presença de micronúcleos evidentes, aumento 100x.

Figura 42 – Fotomicrografias da avaliação da presença de MN em células da medula óssea. Camundongos tratados com FO-S 250 mg (A) e FO-S 100 mg (B). observam-se (setas) em células primitivas mononucleadas da medula óssea a presença de micronúcleos externos (A) e no interior do citoplasma (B), aumento 100x.

Tabela 22 – Média $\pm$ dp da distribuição da frequência de micronúcleos das células da medula óssea dos camundongos machos e fêmeas após tratamento com FO-S dos diferentes grupos. Análise estatística com valores de não significância ($p > 0,05$), obtido pelo teste de variação ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey's.

Doses (mg/kg)	Machos ^{ns}		Fêmeas ^{ns}	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
	média $\pm$ DP	média $\pm$ DP	média $\pm$ DP	média $\pm$ DP
Controle	1.5 $\pm$ 0.71	1.5 $\pm$ 0.71	2.5 $\pm$ 0.71	1.5 $\pm$ 0.71
50	1.5 $\pm$ 0.71	1.5 $\pm$ 0.71	1.5 $\pm$ 0.71	2.5 $\pm$ 0.71
100	1.5 $\pm$ 0.71	1.5 $\pm$ 0.71	2.5 $\pm$ 0.71	2.5 $\pm$ 0.71
250	2.5 $\pm$ 0.71	1.5 $\pm$ 0.71	1.5 $\pm$ 0.71	1.5 $\pm$ 0.71

ns: não significativo

5 *DISCUSSÃO*

Neste estudo, demonstramos que a FO-S produziu efeitos tóxicos importantes quando aplicada em dose única nas doses de 500 e 1000 mg/Kg, e em doses repetidas na dose de 250 mg/kg. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo demonstraram que a FO-S tem efeitos citotóxicos seletivos para células tumorais.

Os estudos pré-clínicos têm como objetivo principal a avaliação farmacológica em sistemas *in vitro* e em animais *in vivo* para a obtenção do maior conhecimento possível acerca das propriedades e dos efeitos adversos do fármaco em desenvolvimento; ao mesmo tempo, a farmacocinética é testada em animais, o composto é submetido a testes de toxicidade a curto e longo prazo em animais, para que suas propriedades farmacológicas possam ser definidas dentro de uma relação dose-resposta (FERREIRA, F.G., et al. 2009); identificar uma dose inicial segura para estudos clínicos de fase I, o potencial toxicológico do fármaco e a reversibilidade dos efeitos adversos. Em estudo realizado por Newell e colaboradores (2004) dados toxicológicos pré-clínicos em roedores e dados clínicos na fase I foram comparados para 14 compostos antitumorais e, com apenas uma exceção, os dados obtidos de roedores foram capazes de prever uma dose inicial segura para os compostos, sendo eficazes em prever em particular os efeitos hematológicos (NEWELL, et al. 2004). A avaliação farmacocinética pré-clínica permite o estudo do curso temporal do fármaco no organismo, compreendendo os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Os parâmetros farmacocinéticos são derivados da medida temporal da dose do fármaco no sangue ou plasma. O principal objetivo e importância da avaliação dos parâmetros farmacocinéticos é a determinação da posologia necessária para a eficácia do futuro tratamento farmacológico (WATERBEEMD e GIFFORD 2003). Uma das etapas que deverão compor o dossiê da fosfoetanolamina sintética. Desta forma, neste projeto, buscamos investigar se o composto fosfoetanolamina sintética (FO-S) poderia produzir efeitos tóxicos em camundongos Balb/c, quando de sua administração em dose única, em doses repetidas. A princípio foi escolhida uma dose partindo da maior já utilizada em camundongos por nosso grupo, e que não alteraram a volemia após a sua administração e produziram efeito biológico antitumoral importante, e em seguida, foi escolhida a dose limite a ser testada, que segundo a ANVISA deve ser aquela em que se alcance evidência de toxicidade não letal ou até no máximo 1000 mg/kg/dia para roedores e não roedores.

Comparando os efeitos de toxicidade dos FLs antitumorais, como a Edelfosina e a Miltefosina foram inicialmente consideradas como moléculas promissoras devido às suas propriedades imunomoduladoras e atividade inibidora sobre a proliferação de células tumorais *in vitro* e *in vivo*, porém, os ensaios de citotoxicidade realizados em uma grande variedade de tumores sólidos e hematológicos, tais como a leucemia e em células normais, demonstraram que estes agentes não foram altamente seletivos para as células tumorais devido à instabilidade metabólica molecular, alto potencial hemolítico e toxicidade gastrointestinal. Portanto, a Edelfosina é usada apenas para a purificação e reinfusão das células da medula óssea de pacientes com leucemia aguda (ANDREESEN, et al. 1978); (MUNDER, et al. 1979); (RUNGE, et al. 1980); (MOLLINEDO, FERNÁNDEZ-LUNA, et al. 1997); (MOLLINEDO, DE LA IGLESIA-VICENTE, et al. 2010); (RUITER, et al. 1999); (SCHERF, et al. 1987); (BERDEL, FINK e RASTETTER 1987). A Miltefosina tem sua utilização clínica limitada à aplicação tópica e oral para o tratamento tópico de metástases cutâneas de câncer de mama e no linfoma cutâneo, sendo também amplamente utilizada para o tratamento da leishmaniose tropical em humanos e recentemente teve a aprovação do Ministério da Saúde e da Agricultura para a comercialização do Milteforan™ para tratamento da leishmaniose visceral canina (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA 2016); (DUMMER, et al. 1993); (KHADEM VATAN, et al. 2011). Nossos estudos em ensaios de atividade hemolítica com eritrócitos de camundongos e humanos, a FO-S não mostrou atividade hemolítica, contrário aos demais compostos lipídeos alquilados descritos na literatura (VAN BLITTERSWIJK e VERHEIJ 2013); (VAN BLITTERSWIJK 2008); (PACHIONI, et al. 2013). A FO-S, em estudo *in vivo*, foi capaz de inibir o crescimento de tumores como o melanoma e do carcinoma renal murino de forma superior aos quimioterápicos Dacarbazina e ao Sunitinib. No modelo de metástase pulmonar utilizando as células, a FO-S reduziu o número de nódulos metastáticos pulmonares e aumentou a taxa de sobrevivência dos animais. Os efeitos terapêuticos da FO-S também foram avaliados no modelo de leucemia promielocítica aguda (LPA) transplantada em camundongos NOD/Scid. O tratamento com a FO-S reduziu o número de blastos periféricos e infiltrados na medula óssea e nos parênquimas, esplênico e hepático. De forma superior a Daunorrubicina e ao Ácido all-transretinóico (ATRA), a FO-S induziu apoptose nos clones malignos que expressão CD34+, bem como nas células CD117+/Gr-1+. Os resultados mostraram

que a FO-S inibiu o crescimento tumoral e aumentou a sobrevida dos animais sem, contudo, causar toxicidade hematológica ou no fígado (FERREIRA, SANTANA, et al. 2013).

Recentemente, demonstrou-se que as estratégias de combinação, em que os alquilfosfolípidos utilizados em associação com outros agentes quimioterápicos, representam novas abordagens terapêuticas promissoras. No futuro, a estimativa de novas moléculas à base de lipídeos em um único agente e combinações de tratamentos, podem também ser avaliadas. Isto pode fornecer uma série de opções de tratamento importantes na gestão do câncer avançado e metastático (MURRAY, HRAIKI, et al. 2015).

Foram avaliados o comportamento e mortalidade dos animais tratados com as diferentes doses da FO-S em estudos de toxicologia aguda e em múltiplas doses. No grupo dose única, dos camundongos tratados com 500 mg/kg, 33% apresentaram imediatamente após a administração do composto, alteração no estado de consciência, sem resposta ao toque e reflexo de endireitamento e tônus muscular, apresentaram contorção abdominal e aparentemente contrações musculares leves, fenômeno que durou aproximadamente dez segundos seguidos da diminuição desses sinais, apresentaram letargia, durante aproximadamente três minutos, voltando às suas características e respostas normais após esse tempo, e não apresentaram mais alterações após isso nos 28 dias seguintes. Semelhantemente, somente 33% dos animais dos grupos tratados com 1000 mg/kg (machos e fêmeas), apresentaram, imediatamente após a administração do composto, acentuada alteração no estado de consciência, contorção abdominal, contrações musculares, tremores e convulsões, por aproximadamente cinco segundos seguidos da morte dos animais. Podemos concluir através desses dados a toxicidade da FO-S em doses aumentadas. Os animais do grupo doses repetidas não apresentaram alteração de comportamento nem logo após a administração do composto e nem nos 14 dias que se seguiram.

Outro aspecto observado ao longo do tratamento foi a variação do ganho de peso dos animais tratados com FO-S em relação ao grupo controle, apesar de não serem detectados sinais de caquexia, a curva do ganho de peso dos animais do grupo controle foi diferente dos animais tratados, em ambos os grupos, que em alguns dias se mostrou menor, possivelmente por alterações nas vias de sinalização do metabolismo lipídico, pois o consumo de ração e de água permaneceu dentro da

média da normalidade. Os animais do grupo dose única que apresentaram diminuição de peso, retornaram ao ganho de peso normal aos 28 dias, comparados aos respectivos grupos controles, e no grupo doses repetidas somente o grupo de fêmeas 50 mg aos 7 dias apresentou essa diminuição, e também voltou ao peso normal no 14º dia.

Análogos lipídicos são utilizados como drogas potenciais para a regulação da morte celular mitocondrial, função modulada pela FO-S. A mitocôndria desempenha um papel importante na produção de energia, como o ATP, a regulação da viabilidade celular, apoptose, e a biossíntese de grandes moléculas estruturais e reguladoras, tais como lipídeos. Como no câncer ocorre disfunção mitocondrial há a oportunidade para o desenvolvimento de drogas moleculares para alcançar especificamente tais defeitos, e corrigir a regulação de cascatas de sinalização de sobrevivência celular, e o equilíbrio entre fatores pró e antiapoptóticos. Moléculas à base de lipídeos que atuam, direta ou indiretamente na mitocôndria, e alguns destes agentes já entraram em ensaios clínicos porque são especificamente alvos conhecidos de defeitos mitocondriais na célula tumoral (MURRAY, DYARI, et al. 2014). No presente estudo, foram avaliadas as atividades mitocondriais das células da medula óssea após a administração da FO-S, em doses únicas e múltiplas, como um marcador de toxicidade, já que as injúrias teciduais são muitas vezes, ocasionadas ou sofreram efeito por danos mitocondriais. Na presença de agentes tóxicos, a capacidade energética celular, a produção de ATP pela fosforilação oxidativa mitocondrial fica comprometida pela interrupção da transferência de elétrons, que pode ocorrer pela liberação de uma série de mediadores da inflamação, que são capazes de comprometer a função mitocondrial e causar hipóxia em órgãos vitais (Wu RQ 2002). O tratamento com a FO-S em camundongos saudáveis, dose única e doses múltiplas não alterou significativamente o percentual de células da medula óssea polarizadas e viáveis metabolicamente.

As análises hematológicas em estudos sobre o estado de saúde dos animais são descritas na literatura por ter alta correlação em prever toxicidade humana (OLSON, et al. 2000). Uma anemia causada por diminuição de hemoglobina e queda da taxa de oxigênio tecidual estimula a produção de eritropoietina, que por sua vez aumenta o número de normoblastos na medula óssea. (COTRAN, KUMAR e COLLINS 2000). No presente estudo, os camundongos do grupo dose única que receberam 1000 mg/kg apresentaram anemia leve aos 7 e 21 dias após o

tratamento, ocorrendo aumento da celularidade de células eritroides da medula óssea no grupo de fêmeas aos 14 e 28 dias. E no grupo doses repetidas, os que receberam 50 mg/kg de FO-S apresentaram anemia aos 14 dias após o tratamento com FO-S, sendo que houve diminuição de células no compartimento eritroide da medula óssea, deste mesmo grupo no 7º dia, voltando à normalidade aos 14 dias. Logo após uma perda de sangue aguda, os eritrócitos continuam normocíticos e normocrômicos, porém, a medula óssea começa a se regenerar surgindo alterações no sangue periférico, uma delas é o aumento do número de reticulócitos (10 a 15% depois de 7 dias) (COTRAN, KUMAR e COLLINS 2000). Tanto o aumento como a diminuição dos elementos celulares e precursores da medula óssea, podem ter sofrido alteração devido a estimulação da FO-S sobre a medula óssea ou suas unidades formadoras de colônia, ou pode ser de uma resposta do organismo frente a coleta de sangue semanal dos camundongos especificamente do grupo dose única, além de uma coleta 24h após inoculação (dados não informados), já que a coleta do grupo doses repetidas (para cada grupo animal), foi mais espaçada (2 semanas). Tanto no grupo dose única, como no grupo doses repetidas, ocorreu aumento no número de reticulócitos no 7º dia após a aplicação, como resposta da medula óssea reativa. As plaquetas do grupo dose única aos 28 dias, em todos os grupos de machos e fêmeas, apresentaram valores dentro da normalidade, comparado aos grupos controles. No grupo doses repetidas somente o grupo 50 mg apresentou aumento em 24h e diminuição aos 14 dias. As lâminas de esfregaço sanguíneo analisadas não apresentaram alterações em sua morfologia.

A quimioterapia, por não ter especificidade, e afetar além de células tumorais, as células saudáveis, causa mielotoxicidade, um dos efeitos colaterais mais comuns e de grande letalidade aos pacientes, pois acarreta supressão da imunidade celular e humoral, com aumento da suscetibilidade aos quadros infecciosos graves (BONASSA e SANTANA 2005). A FO-S demonstrou ter seletividade induzindo as células tumorais a apoptose, preservando células saudáveis. Ferreira et al em 2012 observaram que a FO-S não afetou a viabilidade de células endoteliais humanas, fibroblastos e linfócitos murinos. (FERREIRA, R. MENEGUELO, et al. 2012). Nosso estudo do grupo dose única demonstrou que os camundongos machos que receberam 250 e 500 mg/kg apresentaram leucocitose. Os camundongos fêmeas que receberam 50 mg/kg apresentaram leucopenia nos tempos iniciais, porém estes níveis retornaram à normalidade aos 28 dias. O grupo doses repetidas de uma

maneira geral apresentou aumento no número de leucócitos e linfócitos nos tempos iniciais, retornando aos níveis normais no 14^o dia. Dados reforçados pelas análises da medula óssea. O grupo dose única, mostrou aumento da população mieloide, e diminuição da população linfoide nos camundongos que receberam 500 e 1000 mg/kg. No grupo doses repetidas ocorreu aumento de células no compartimento mieloide e diminuição do compartimento linfocítico. Algumas anemias hemolíticas podem resultar da formação de auto-anticorpos, que pode indicar a existência de um distúrbio primário dos linfócitos. (Cotran, Kumar e Collins 2000). Resultados anteriores obtidos por nosso grupo apresentaram aumento significativo de leucócitos e hemácias, após a administração do composto FO-S, em animais portadores de modelos de tumores experimentais. Provavelmente, a presença de tumor nestes experimentos, que exige uma resposta imunológica mais potente do organismo, como também a superdosagem utilizada nos testes de toxicidade aguda, foram fatores estimuladores para o aumento de produção de glóbulos brancos. A toxicidade hematológica dos quimioterápicos está relacionada ao curto ciclo celular, pois a hematopoiese caracteriza-se pela alta atividade mitótica e rápida proliferação celular, semelhante ao crescimento tumoral, o que torna a medula óssea susceptível aos efeitos dos quimioterápicos (E. BONASSA 1992); (WOODLOCK e J.E. 1995). Com estes resultados demonstramos mais uma vez a seletividade da FO-S. Em estudo in vivo em 2013, Ferreira et al demonstraram que o tratamento com a FO-S nas doses de 40 e 80 mg/kg foi capaz de inibir a progressão de tumores hematológicos, no modelo de leucemia promielocítica aguda a FO-S diminuiu o número de células imaturas CD34+ e CD 117+ no baço e no fígado e blastos no sangue periférico, sendo a morte celular induzida por apoptose via mitocondrial, bloqueando assim, a capacidade de auto renovação de clones malignos. Podemos observar, portanto, que as alterações hematológicas observadas não demonstraram efeito deletério ao organismo sadio, reveladas pela reatividade da medula óssea diante dos tratamentos, assim como número de reticulócitos, exceto pelo grupo 1000 mg/kg, o qual apresentou mortalidade significativa.

Estes resultados foram reforçados pela expressão de marcadores específicos que demonstram a presença e atividade das populações celulares da medula óssea, onde podemos observar que não ocorreu diminuição significativa na expressão dos marcadores de células tronco hematopoiéticas CD34, pelo contrário, no 14^o dia houve aumento na produção dessa população no grupo de animais do grupo dose

única, que receberam 250 mg/kg de FO-S. Podemos notar que os grupos que receberam 50 mg/kg de FO-S não sofreram nenhuma alteração em suas populações. Por outro lado, os grupos de animais machos que receberam 100 e 250 mg/kg de FO-S após 7 e 14 dias mostraram diminuição na expressão do marcador de células mieloides CD43, o qual também marca células T e subtipos de linfócitos B, entretanto, sistemicamente, não ocorreu diminuição de leucócitos, ocorreu diminuição de linfócitos pontuais nas 24h após o tratamento retornando à normalidade aos 7 e 14 dias, ou seja, podemos concluir que a diminuição da expressão deste marcador não foi relevante sistemicamente, por não causar efeitos tóxicos notáveis no sistema imune, já que a produção da medula óssea de glóbulos brancos e vermelhos foi contínua. Os camundongos fêmeas que receberam 100 e 250 mg/kg de FO-S apresentaram diminuição na expressão do marcador de células tronco mesenquimais após 7 e 14 dias, porém não houve alteração significativa no grupo de camundongos machos.

Os efeitos antitumorais da FO-S avaliados *in vivo*, em camundongos portadores de melanoma B16F10 mostram que FO-S reduziu o volume tumoral aumentando a taxa de sobrevida. Além disso, o tempo de duplicação do tumor e no crescimento tumoral foi significativamente reduzido em comparação com camundongos não tratados, neste mesmo estudo, as análises histológicas revelaram que FO-S induziu alterações na morfologia celular, características típicas da apoptose, em adição as grandes áreas de necrose correlacionam com uma diminuição do tamanho do tumor. Os resultados apresentados suportam a hipótese de que FO-S tem efeitos antitumorais pela indução de apoptose, assim como a inibição da proliferação de células por parada em G2/M. No modelo de camundongos portadores de tumor ascítico de Ehrlich foi demonstrado que a FO-S, a uma dose de 35 e 70 mg/kg, inibiu o crescimento tumoral e aumentou o tempo de vida de animais sem provocar toxicidade hepática. Mais uma vez, os dados de doses terapêuticas e efetivas, mostraram a inexistência de toxicidade em doses múltiplas, pois nestes experimentos os animais foram tratados e acompanhados por mais de 35 dias (A. FERREIRA, R. MENEGUELO, et al. 2012); (FERREIRA, R. MENEGUELO, et al. 2012). No presente estudo não ocorreram alterações significativas das populações nas fases do ciclo celular, em relação aos grupos controles, reforçando mais uma vez a seletividade da FO-S para agir em células tumorais, sua ação preferencialmente na membrana celular e não no DNA ou

citoesqueleto celular, tendo em vista que a vascularização tumoral é descontínua, com fenestrações maiores do que em células sadias (JIMÉNEZ-LÓPEZ, et al. 2010); (CARMELIET e Jain 2000).

Autofagia é um processo de autodefesa, proteção e sobrevivência contra o estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático e a deficiência de nutrientes, uma resposta do organismo frente a ambientes desfavoráveis (GALLAGHER, WILLIAMSON e CHAN 2016); (WU, M.C. e BOHMANN 2009). É um processo fisiológico, consistindo num componente básico da resposta ao estresse incorporado (KROEMER, et al. 2010). Em condições normais é levado a um nível basal, porém, sob condições patológicas, os componentes citoplasmáticos, incluindo organelas danificadas e proteínas dobradas são entregues em autofagossomos de membrana dupla, que então se fundem com os lisossomos, induzindo degradação autofágica (GAN, et al. 2015). Existe uma complexa ligação entre o metabolismo lipídico e a autofagia, de forma que as alterações no conteúdo lipídico intracelular modulam a via da autofagia como, por exemplo, a interferência dos alquilfosfolípidos com o tráfego de colesterol da membrana plasmática para o retículo endoplasmático (SINGH, et al. 2009); (RÍOS-MARCO, et al. 2013). Ríos-Marco et al. relataram um acúmulo de vesículas autofágicas dentro das células tumorais, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão, quando expostas a concentrações não tóxicas de diferentes alquilfosfolípidos como miltefosina, edelfosina, perifosina e erucilfosfocolina (RÍOS-MARCO, et al. 2013). No presente estudo a FO-S não alterou significativamente a produção de vacúolos autofágicos, demonstrando um sinal de não toxicidade por não ter estressado o organismo.

Estudos demonstram que agentes genotóxicos, como drogas, vírus e radiações podem resultar em instabilidade e danos ao DNA genômico, levando a um aumento de alterações no material genético das células, e transformações genéticas associadas à carcinogênese, como a formação de micronúcleos. Descontroles genéticos no ciclo celular e alterações cromossômicas são na sua maior parte, causados por agentes mutagênicos e carcinogênicos (MARTINS e FILHO 2003). Em nosso estudo, utilizamos a frequência de micronúcleos como uma importante ferramenta para marcação biológica de alteração celular, pela sua capacidade de identificação de células com defeitos cromossômicos por exposição à carcinógenos, e concluímos que a avaliação após os tratamentos com a FO-S, em doses repetidas, não foi mutagênica.

A avaliação das funções renal e hepática é de extrema importância na prática clínica para obtenção de diagnósticos; análise de respostas aos tratamentos, e até para o prognóstico. Durante os testes de toxicidade, a ocorrência de lesão hepática e/ou renal, faz com que seja um motivo comum para abandono de uma nova droga potencial. O fígado é exposto a doses elevadas de metabólitos provenientes dos fármacos, e os túbulos renais recebem doses maiores de metabólitos das drogas, do que os demais tecidos, e se mostram mais vulneráveis a fármacos que interferem na contratilidade das arteríolas. (RANG, DALE e RITTER 2001). Os níveis plasmáticos bioquímicos dos animais no grupo doses repetidas não sofreram alterações significativas após o tratamento com FO-S, entretanto, no grupo dose única, os níveis de creatinina (mg/dl) dos grupos de camundongos fêmeas 250, 500 e 1000 mg apresentaram diminuição significativa de seus níveis plasmáticos, por outro lado os níveis plasmáticos de ureia, não apresentaram alterações significativas. Um dos motivos para essa diminuição dos níveis de creatinina, poderia ser atrofia muscular e outras enfermidades relacionadas, pois a dose sanguínea de creatinina é proporcional à massa muscular, porém, os camundongos não apresentaram nenhum sinal dessas alterações ou caquexia. A depuração renal de creatinina tem uma longa história como marcador de taxa de filtração glomerular (TFG), porém, Perrone et al. consideraram a dosagem de creatinina sérica pouco sensível, por: detectar quedas na TFG apenas quando superiores a 50%; mostrar valores normais por não identificar alterações iniciais da TFG; por sofrer secreção tubular, levando a uma super estimativa da filtração glomerular, especialmente em pacientes com função renal diminuída (SMITH 1951); (Perrone, N.E. e Levey 1992). Dalton em 2011 ressaltou que a creatinina sérica não é um biomarcador perfeito da TFG, mas ainda é uma medida muito boa da TFG e, de longe, o mais sensível biomarcador para detectar pequenas mudanças da TFG de um indivíduo (DALTON 2011).

Os resultados das análises bioquímicas séricas para avaliação da função renal não demonstraram alterações significativas, apesar disso, constatamos alterações na análise histopatológica, como, tubos excretórios e canais coletores distorcidos e dilatados com presença de hiperemia moderada difusa e presença de material hialino na porção medular marginal à papila renal, em camundongos tratados com 500 e 1000 mg/kg. Há uma condição denominada azotemia onde ocorre o aumento sistêmico de ureia e creatinina, demonstrando que função renal está diminuída e com 75% dos néfrons sem funcionar adequadamente. Portanto, os

nossos resultados demonstram que as alterações histopatológicas demonstradas, até o momento da eutanásia não atingiram mais de 75% do parênquima renal funcional (MAXIE 2007); (NEWMAN 2009).

Ainda no grupo dose única no dia 14, após o tratamento com FO-S, nos grupos de machos e fêmeas revelou aumento significativo das enzimas intracelulares TGO (transaminase glutâmico-oxalacética), e TGP (transaminase glutâmico-pirúvica). TGO está presente no citoplasma dos hepatócitos e nas membranas das mitocôndrias, encontrada principalmente no coração, fígado, musculatura esquelética e rins. TGP é exclusivamente citoplasmática, e é encontrada principalmente no fígado e rins (BURTIS e BRUNS 2008). Essas enzimas são de grande interesse clínico, pois auxiliam no diagnóstico de lesões hepáticas e cardíacas, que foram provocadas por infarto do miocárdio, drogas tóxicas ou infecções. Após essas afecções, as transaminases extravasam das células lesadas para a corrente sanguínea (LEHNINGER 2006). Taxa exacerbada dos níveis de TGP pode sugerir hepatite aguda e aumentos mais brandos podem sugerir doença hepatocelular crônica, cirrose, neoplasia ou hepatopatia por parasitas (TENNANT 1997). O fígado se torna incapacitado de metabolizar as gorduras de maneira adequada, pois substâncias tóxicas provocam inflamação e degeneração gordurosa pela lesão de mitocôndrias, o que pode levar à destruição celular e inflamação. (YEH 2011). As análises microscópicas, que revelaram hiperemia difusa moderada e desarranjo parcial da arquitetura do parênquima hepático, em concordância com a elevação dos níveis séricos das enzimas TGO e TGP nos animais tratados com as doses 500 e 1000 mg/kg de FO-S demonstrou a presença de lesão hepática sub-aguda. A morfologia da lesão hepática induzida por toxinas varia consideravelmente com o tipo, dose e a duração da exposição à toxina (MACLACHLAN e CULLEN 1998). Como também observamos hemorragia e necrose no tecido do miocárdio, podemos sugerir que a congestão hepática pode ter ocorrido por disfunção cardíaca ou a presença de trombos na circulação sistêmica.

6 CONCLUSÃO

- ✓ A FO-S quando administrada em doses únicas de 500 e 1000 mg/kg causou sinais de toxicidade, tais como: mortalidade; rebaixamento no sistema nervoso central e autônomo; flutuações das análises hematológicas; aumento dos níveis de TGO e TGP; diminuição de creatinina; diminuição das populações da medula óssea de precursores mieloides e linfoides; aumento na fase G2/M do ciclo celular; alterações histológicas no coração, fígado e rins como necrose, esteatose e hialinização respectivamente.
- ✓ Os animais do grupo doses repetidas demonstraram que as análises da medula óssea, do sangue periférico e expressão dos marcadores apresentaram aumento na estimulação e produção de células mieloides e eritroides.
- ✓ Os animais que receberam 250 mg/kg apresentaram alterações no parênquima pulmonar.
- ✓ Em ambos os grupos observamos como resposta da medula óssea reativa o aumento no número de reticulócitos no 7º dia após a aplicação e não observamos disfunção nas atividades mitocondriais.
- ✓ No grupo doses repetidas a produção de vacúolos autofágicos e micronúcleos permaneceu normal revelando que não ocorreu estresse oxidativo nem danos às células por alterações genéticas induzidas por toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU LILA, A. S., Ishida, T., & Kiwada, H. "Targeting anticancer drugs to tumor vasculature using cationic liposome." *Pharmaceutical research*, 2010: 27(7), 1171– 83.
- AKERS, R.M., e D.M. DENBOW. "'Digestive System" Anatomy and Physiology of Domestic Animals." *Blackwell Publishing*, 2008: 1018-1097.
- ALBERTS, B., A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, e P. WALTER. "Biologia Molecular da Célula ." In: *Biologia Molecular da Célula. 5ª Edição*, por B. ALBERTS, A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS e P WALTER, 617-623. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ANDRESEN, R., et al. "Selective destruction of human leukemic cells by alkyllysophospholipids." *Cancer Res.*, 1978: 38(11 Pt 1):3894-9.
- ANVISA. 24 de 02 de 2017.
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/3322895/Relat%C3%B3rio+GG+MED+2016/e4d64b02-fb9f-4432-b07d-39d774cef466> (acesso em 02 de 10 de 2017).
- . *Guia Para A Condução De Estudos Não Clínicos De Segurança Necessários Ao Desenvolvimento De Medicamentos*. 31 de Janeiro de 2013.
<http://portal.anvisa.gov.br> (acesso em 23 de Agosto de 2015).
- ARIAS-MENDOZA, F., M.R. SMITH, e T.R. BROWN. "Predicting treatment response in non-Hodgkin's lymphoma from the pretreatment tumor content of phosphoethanolamine plus phosphocholine." *Acad Radiol*, 2004: 11(4):368-76.
- ARTHUR, G., e R. BITTMAN. "The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether lipids." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998: 85-102.
- AWAPARA, J. "Related Articles, Link Alamine and taurine formation from injected cysteine in the rat." *Nature*, 1950: 14:16576.
- BAGLEY, R.G., L. KURTZBERG, C. ROULEAU, M. YAO, e B.A. TEICHER. "Erufosine, an alkylphosphocholine, with differential toxicity to human cancer cells and bone marrow cells." *Cancer Chemother Pharmacol.*, 2011: 68(6):1537-46.

- BAKOVIC, M., M. FULLERTON, e MICHEL. "Metabolic and molecular aspects of ethanolamine phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2)." *Biochem. J*, 2007: 85:283-200.
- BARRATT G, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM. "Cellular transport and lipid interactions of miltefosine." *Curr Drug Metab*, 2009: 10:247-255.
- BARREIRO, E.J., e C.A. FRAGA. "A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos PORNFAR." *Revista Química Nova*, 2005: v.28, suplemento S56-S63.
- BERDEL, W.E., U. FINK, e J. RASTETTER. "Clinical phase I pilot study of the alkyl lysophospholipid derivative ET-18-OCH₃." *Lipids*, 1987: 22(11): 967-969.
- BERKOVIC D, Wernicke JH, Fleer EA. "Effects of etherlipid analogs on cell membrane functions." *J Exp Ther Onco*, 2003: 3:185-193.
- BERKOVIC, D. "Cytotoxic etherphospholipid analogues." *Gen Pharmacol.*, 1998: 31(4):511-7.
- BONASSA, E.M., e T.R. SANTANA. "Toxicidade hematológica." *Enfermagem em terapêutica oncológica*, 2005: 89-100.
- BONASSA, EMA. *Enfermagem em quimioterapia*. São Paulo: Atheneu, 1992.
- BRYDER, D., D. ROSSI, e I. WEISSMAN. "Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell." *American Journal of Pathology*, 2006: 338–346.
- BURTIS, C. A., ASHWOOD, E. R., e D. BRUNS. *Fundamentos de química Clínica*. Amsterdam: Elsevier, 2008.
- BUSTO, J.V., E. DEL CANTO-JAÑEZ, F.M. GOÑI, F. MOLLINEDO, e A. ALONSO. "Combination of the anti-tumour cell ether lipid edelfosine with sterols abolishes haemolytic side effects of the drug." *J Chem Biol.*, 2008: 1(1-4):89-94.
- CALIXTO, J.B., e J.M. SIQUEIRA JÚNIOR. "Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios." *Gazeta Médica da Bahia*, 2008: 98-106.
- CAMPBELLI, R. "Positively-charged liposomes for targeting tumor vasculature." *Nanotechnology for cancer therapy*, 2007 : 613–627.
- CARMELIET, P., e R. K. Jain. "Angiogenesis in cancer and other diseases." *Nature* , 2000: 249-57.

- CHAMPMAN, K. "The value of acute toxicity studies to support the clinical management of overdose and poisoning: A cross-discipline consensus." *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2010: 354-359.
- CHOY, W. N. "Genotoxic and non-genotoxic mechanisms of carcinogenesis." *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*, 2001: 93-113.
- CORAZZI, L. "Ethanolamine base- exchange rat brain microsomal subfractions." *J. Neurochem*, 1986: 46:202-207.
- COTRAN, RAMZI, S., VINAY KUMAR, e T. COLLINS. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*. 6. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000.
- DALTON, R. N. "Creatinina sérica e taxa de filtração glomerular: percepção e realidade." *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 2011: vol.47.
- DUMMER, R., M. KRASOVEC, J. RÖGER, H. SINDERMANN, e G. BURG. "Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study." *J Am Acad Dermatol.*, 1993: 29(6):963-70.
- EDWARDS, K. A., e A. J. BAEUMNER. "Liposomes in analyses." *Talanta*, 2006: 1432-1441.
- EIBL, H., D. ARNOLD, H. WELTZIEN, e O. WESTPHAL. "On the synthesis of alpha and beta lecithins and their ether analogs." *Justus Liebigs Ann Chem.*, 1967: 709:226-30.
- EICHHORN, M., S. Strieth, S. Krasnici, e B. Sauer. "Protamine enhances uptake of cationic liposomes in angiogenic microvessels of solid tumours." *Angiogenesis*, 2004: 133–141.
- ELLISON, D., M. BEAL, e J. MARTIN. "Phosphoethanolamine and ethanolamine are decreased in Alzheimer's disease and Huntington's disease." *Brain Res*, 1987: 417:189-92.
- FERREIRA, A., R. MENEGUELO, S. NETO, G. CHIERICE, e D. MARIA. "Synthetic Phosphoethanolamine Induces Apoptosis Through Caspase-3 Pathway by Decreasing Expression of Bax/Bad Protein and Changes Cell Cycle in Melanoma." *Journal of Cancer Science and and Therapy*, 2011: v.3, n.1, p.53-59.
- FERREIRA, A.K., B.A. SANTANA, E.M REGO, O.M.R. FILHO, G.O. Chierice, e D.A. MARIA. "Synthetic phosphoethanolamine has in vitro and in vivo anti-leukemia effects." *British Journal of Cancer*, 2013: 2819–2828.

- FERREIRA, A.K., et al. "Synthetic phosphoethanolamine a precursor of membrane phospholipids reduce tumor growth in mice bearing melanoma B16-F10 and in vitro induce apoptosis and arrest in G2/M phase." *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2012: 541–548.
- FERREIRA, et al. "Anticancer Effects of Synthetic Phosphoethanolamine on Ehrlich Ascites Tumor: An Experimental Study." *ANTICANCER RESEARCH*, 2012: 32: 95-104.
- FERREIRA, F.G., M. C. POLLI, Y. OSHIMA FRANCO, e L. F. FRACETO. "Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado." *Revista Eletrônica de Farmácia*, 2009: v.6, n.1, p.14-24.
- FERREIRA, F.G., M.C. POLLI, O.Y. FRANCO, e L.F. FRACETO. "Fármacos: do desenvolvimento à retirada do mercado." *Revista Eletrônica de Farmácia*, 2009: 14-24.
- FISHER, D.C., e W.P. PETERS. "Advances in the clinical use of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to intensify cancer chemotherapy." *Curr Opin Hematol*, 1994: 1(3):221-7.
- FOLSCH, G.O. "The apparent and ionization constants of some Ophosphorylate peptides and related compounds." *Biol Chem*, 1959: 234:2298-303.
- FREZARD, F. "Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines." *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1999: 181-189.
- FRÉZARD, F., D. A. SCHETTINI, O. G. F. ROCHA, e C. DEMICHELI. "Lipossomas: propriedades físicoquímicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio." *Quim. Nova, São Paulo*, 2005: 511- 518.
- FUJIWARA, K. et al. "Cytokinetic and morphologic differences in ovarian cancer cells treated with ET-18-OCH3 and the DNA-interacting agent, etoposide." *Anticancer Res.*, 1997: 17(3):2159-67.
- GALLAGHER, L. E., L. E. WILLIAMSON, e E. Y. CHAN. "Cells." *Advances in autophagy regulatory mechanisms.*, 2016: 5:E24.
- GAN, J., Y. Qu, J. LI, F. ZHAO, e D. MU. "An evaluation of the links between microRNA, autophagy, and epilepsy." *Rev. Neurosci.*, 2015: 26, 225–237.
- GEILEN CC, Wieder T, Haase A, Reutter W, Morré DM, Morré DJ. "Uptake, subcellular distribution and metabolism of the phospholipid analogue hexadecylphosphocholine in MDCK cells." *Biochim Biophys Acta*, 1994: 1211:14-22.

- GIBELLINI, F.S.T. "The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine." *IUBMB Life*, 2010: 62(6):414-28.
- HECZKOVA, B., e J.P. SLOTTE. "Effect of anti-tumor ether lipids on ordered domains in model membranes." *Febs Letter*, 2006: 2471-2476.
- INCA. 27 de 11 de 2015. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2> (acesso em 29 de 09 de 2017).—. *A situação do câncer no Brasil*. 2006. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/situacao_cancer_brasil.pdf.
- JIMÉNEZ-LÓPEZ, J.M., P. Ríos-Marco, C. Marco, J. L. Segovia, e M. P. Carrasco. "Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids." *Lipids in Health and Disease*, 2010: 9:33.
- KAMALESH, K., D. TRIVEDI, S. TOSCANO, S. SHARMA, S. KOLAY, e P. RAGHU. "Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase regulates early endosomal dynamics during clathrin-mediated endocytosis." *J Cell Sci*, 2017: pii: jcs.202259.
- KHADEMVAATAN, S., M.J. GHARAVI, F. RAHIM, e J. SAKI. "Miltefosine-induced apoptotic cell death on Leishmania major and L. tropica strains." *Korean J Parasitol.*, 2011: 49(1):17-23.
- KROEMER, GUIDO, G. MARIÑO, e B. LEVINE. "Autophagy and the integrated stress response." *Molecular cell*, 2010: 40(2), pp.280–93.
- LASIC, D.D. "Novel applications of liposomes." *Tibtech*, 1998: 307-320.
- LEHNINGER, A.L. *Princípios de bioquímica*, 4 ed. . São Paulo: Sarvier, 2006.
- LI, X., R. LUWOR, Y. LU, K. LIANG, e Z. FAN. "Enhancement of antitumor activity of the anti-EGF receptor monoclonal antibody cetuximab/c225 by perifosine in PTEN-deficient cancer cells." *Oncogene*, 2006: 525-535.
- LIMA, J.S., D.L. REZA, S. TEIXEIRA, e C. COSTA. "Pesquisa clínica: fundamentos, aspectos éticos e perspectivas." *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro*, 2003: 225-233.
- LIMA, L.M. "Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira." *Revista Química Nova*, 2007: 1456-1468.
- MACLACHLAN, N. J., e J. M. CULLEN. "Fígado, Sistema Biliar e Pâncreas exócrino." In: *Patologia Veterinária Especial*. 2.ed., por W.W., McGavin, M.D. Carlton, p.95-131. São Paulo: Artmed, 1998.

- MAGALHÃES, N.S.S. et al. "Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007: v.43, n.2.
- MAIRE, J.E. "Production from choline-containing phospholipids; a hypothetical role in Alzheimer's disease and aging." *Biol. Psychiatry*, 1984: 8:637-642.
- MARTINS, K.F, e J.B. FILHO. "Determinação da frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares em células da mucosa bucal de indivíduos não-fumantes e fumantes." *Rev Fac Ciênc Méd*, 2003: 43-53.
- MAXIE, M.G., NEWMAN, S.J. "The urinary system." In: *Palmer's Pathology of Domestic Animals.*, por Kennedy Jubb, p.425-522. Vol.2. 5th ed. Saunders Elsevier, St Louis: In: Maxie M.G. (Ed.), 2007.
- MENEGATTI, R., C.A.M. FRAGA, e E.J. BARREIRO. "A importância da síntese de fármacos." *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, 2001: n. 3, p. 16-22.
- MENEGUELO, R. *Biblioteca Digital USP*. 2007. www.teses.usp.br/teses/ (acesso em 14 de Agosto de 2015).
- MICHEL, C., G. VAN ECHTEN-DECKERT, J. ROTHER, K. SANDHOFF, E. & MERRILL, A. H. WANG, e JR. "Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide." *J Biol Chem.*, 1997: 272, 22432-7.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Pecuária e Abastecimento. *Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento*. 01 de 09 de 2016. <http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf> (acesso em 03 de 10 de 2017).
- MOLLINEDO, F., et al. "In vitro and In vivo selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts." *Clin Cancer Res*, 2010: 2046-2054.
- MOLLINEDO, F., J.L. FERNÁNDEZ-LUNA, C. GAJATE, B. MARTÍN-MARTÍN, A. BENITO, e E R. MARTÍNEZ-DALMAU. "Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): Molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and BclX(L)." *Cancer Res*, 1997: 57(7):1320-1328.

- MU, L., e S. FENG. "A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS." *J. Control. Rel*, 2003: 33-48.
- MÜLLER-SIEBURG, C.E. "The stromal cells: guide to the stem cell universe." *Stem Cells*, 1995: 477-486.
- MUNDER, P.G., MODOLEL, L. M., R. ANDREESSEN, H.U. WELTZIEN, e O. WESTPHAL. "Lysophosphatidylcholine (lysolecithin) and its synthetic analogues. Immunomodulating and other biologic effects." *Springer Seminars in Immunopathology*, 1979: 2: 187-203.
- MUNDER, PG., e M. MODOLELL. "Adjuvant induced formation of lysophosphatides and their role in the immune response." *Int Arch Allergy Appl Immunol.*, 1973: 45(1):133-5.
- MURRAY, M., A. HRAIKI, M. BEBAWY, C. PAZDERKA, e T. RAWLING. "Anti-tumor activities of lipids and lipid analogues and their development as potential anticancer drugs." *Pharmacology & Therapeutics*, 2015: 109–128.
- MURRAY, M., H.E. DYARI, S.E. ALLISON, e T. RAWLING. "Lipid analogues as potential drugs for the regulation of mitochondrial cell death." *British Journal of Pharmacology*, 2014: 171 2051–2066.
- NEWELL, D.R., J. SILVESTER, C. MCDOWELL, e S.S. BURTLES. "The Cancer Research UK experience of pré-clinical toxicology studies to support early clinical trials whit novel cancer therapies." *European Journal of Cancer*, 2004: v.40, p. 899-906.
- NEWMAN, S.J., A.W. CONFER, R.J. PANCIERA. "Sistema urinário." In: *Bases de Patologia em Veterinária*, por McGavin M.D. & Zachary J.F., p.613- 691. Rio de Janeiro: 4ª ed. Elsevier,, 2009.
- OBERLE, C., U. MASSING, e H.F. KRUG. "On the machanism of alkylphosphocoline (APC)-induced apoptosis in tumor cells." *Biological Chemistry*, 2005: 237-245.
- OECD. *Draft consultant's proposal*. November de 2008. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/41753317.pdf> (acesso em 20 de Agosto de 2015).
- OLIVEIRA, L.C., E.J.F. TAVEIRA, L.G. SOUZA, R.N. MARRETO, E.M. LIMA, e S. F. TAVEIRA. "Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura." *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2012: 58(4): 695-701.

- OLSON, H., et al. "Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. ." *Regulatory Toxicology and Pharmacology* , 2000: 56-67.
- OMS. *Nações Unidas no Brasil*. 03 de 02 de 2017. <https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo/> (acesso em 29 de 09 de 2017).
- OUTHOUSE, E. "Related articles, Links Amino-ethyl phosphoric ester from tumours." *Biochem J*, 1936: 30:197-201.
- PACHIONI, J.A., et al. "Alkylphospholipids – A Promising Class of Chemotherapeutic Agents with a Broad Pharmacological Spectrum." *J Pharm Pharm Sci*, 2013: 16(5) 742 - 759.
- PAPAYANNOPOULOU, T., e D. SCADDEN. "Stem-cell ecology and stem cells in motion." *Blood*, 2008: v. 111, p. 3923-3930.
- PAPAZAFIRI, P., et al. "Structure-activity relationships of antineoplastic ring-substituted ether phospholipid derivates." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2005: 261-270 .
- Perrone, R.D., Madias N.E., e A.S. Levey. " Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts." *Clin Chem*, 1992: 38:1933-53.
- PERRY, T. "Regional distribution of amino acids in human brain obtained at autopsy." *J Neurochem*, 1971: 18:513-9.
- PETIT, P.X. "Flow Cytometric Analysis of Rhodamine 123 Fluorescence during Modulation of the Membrane potential in Plant Mitochondria." *Plant Physiology*, 1992: p.279-286.
- PINTALUBA, A.S.A. "Lipidol." *ANDRÉS PINTALUBA*, S.A. 10 de Janeiro de 2016. <http://www.pintaluba.com/lipidol/>.
- POSADAS, E. M., et al. "A phase II study of perifosine in androgen independent prostate cancer." *Cancer Biol. Ther.*, 2005: 1133–113.
- RANG, H.P., M.M. DALE, e J.M. RITTER. "Efeitos nocivos das drogas." In: *Farmacologia* , por H. P., DALE, M. M., & RITTER, J. M. RANG, 639-640. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2001.
- RÍOS-MARCO, P., M. Martín-Fernández, I. Soria-Bretones, A. Ríos, M. P. Carrasco, e C. Marco. "Alkylphospholipids deregulate cholesterol metabolism and induce cell-cycle arrest and autophagy in U-87 MG glioblastoma cells." *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013: 1322-1334.

- RUITER, G.A., ZERP, S.F., H. BARTELINK, W.J. VAN BLITTERSWIJK, e E.M. VERHEIJ. "Alkyllysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis." *Cancer Res*, 1999: 59(10): 2457-2463.
- RUNGE, M.H., R. ANDREESSEN, A. PFLEIDERER, e P.G. MUNDER. "Destruction of human solid tumors by alkyl lysophospholipids." *J Natl Cancer Inst*, 1980: 64(6): 1301-1306.
- SCHERF, H.R., B. SCHULER, M.R. BERGER, e D. SCHMÄHL. "Therapeutic activity of ET-18-OCH₃ and hexadecylphosphocholine against mammary tumors in BD-VI rats." *Lipids*, 1987: 22(11): 927- 929.
- SINGH, R., et al. "Autophagy regulates lipid metabolism." *Nature* 458, 2009: 1131–1135.
- SMITH, H. W. "The kidney: structure and function in health and disease." *New York: Oxford University Press*, 1951: 63-6.
- SOTO, J., e P. SOTO. "Oral miltefosine to treat leishmaniasis." *Biomedica*, 2006: 207–217.
- STAYCOVA M, Holmes D, Read C, Stone H. "Mechanics of surface area regulation in cells examined with confined lipid membranes." *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011: 108(22):9084–9088.
- TENNANT, B.C. "Hepatic function." In: *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.ed., por J.J. KANEKO e J.W. HARVEY, p.327-352. San Diego: Academic Press, 1997.
- TOKER, A. "Signaling through Protein Kinase C." *Front. Biosci.*, 1998: 1134- 1147.
- TORCHILIN, V.P. "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier." *Nature Rev. Drug Disc.*, 2005: p. 145-160.
- TRAGANOS, F., e Z. DARZYNKIEWICZ. "Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations." *Methods Cell Biol.*, 1994: 41:185-194.
- VAN BLITTERSWIJK, W.J., e M. VERHEIJ. "Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids." *Biochim Biophys Acta*, 2013: 1831:663-674.
- VAN BLITTERSWIJK, WJ, Verheij M. "Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects." *Curr Pharm Des*, 2008: 14:2061-2074.
- VAN MEER G, VOELKER DR, FEIGENSON GW. "Membrane lipids: where they are and how they behave." *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2008: 9(2):112-24.

- VEMURI, S., e C. T. RHODES. "Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review." *Pharm. Acta Helvetica, Berne*, 1995: 95-111.
- VINK, S.R., A.H. VANDERLUIT, J.B. KLARENBECK, M. VERHEIJ, e W.J. VAN BLITTERSWIJK. "Lipid rafts and metabolic energy differentially determine uptake of anti-cancer alkylphospholipids in lymphoma versus carcinoma cells." *Biochemical Pharmacology*, 2007: 1456-1465.
- WATERBEEMD, H, e E. GIFFORD. "ADMET in silico modeling: towards prediction paradise?" *Nature publishing group*, 2003: v.2.
- WHETTON, A.D. "Homing and mobilization in the stem cell niche." *Trends in Cell Biology*, 1999: 233-238.
- WOODLOCK, T.J., e LOUGHNER. J.E. "Oncologia prática: cuidados com o paciente." In: *Farmacologia clínica dos agentes antineoplásicos*, por Carignan JR, Smith BD Rosenthal S, 41-64. Rio de Janeiro: Revinter, 1995.
- Wu RQ, Xu YX, Song XH, Chen LJ, Meng XJ. "Relationship between cytokine Mrna expression and organ damage following cecal ligation and puncture." *J Gastroenterol*, 2002: 8:131-4.
- WU, H., WANG M.C., e D. BOHMANN. "JNK protects Drosophila from oxidative stress by transcriptionally activating autophagy." *Mechanisms of development*, 2009: 624-37.
- YEH, M. M. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*, in: Saxena, R., *Practical Hepatic Pathology. A Diagnostic Approach*. Philadelphia: Elsevier, 2011.
- ZAMBRANO, M., TARGA, H., & RABELLO-GAY, M. "Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleus and metaphase slide preparations ." *Stain Tech*, 1982: p 48-49.