

THIAGO AUGUSTO PEREIRA DE MORAES

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ANTITUMORAL DA AMINOQUINONA ETHYL 2-
(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATO EM
CAMUNDONGOS**

RECIFE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL (PPGBA)

THIAGO AUGUSTO PEREIRA DE MORAES

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ANTITUMORAL DA AMINOQUINONA ETHYL 2-
(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATO EM
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientador:

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior

RECIFE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ANTITUMORAL DA AMINOQUINONA ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATO EM CAMUNDONGOS

Tese de doutorado elaborado por

THIAGO AUGUSTO PEREIRA DE MORAES

Aprovado em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa

Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC

Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia

Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. George Chavez Jimenez

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

**A minha noiva e futura esposa
Kethylly, aos meus filhos Gustavo
e Lara, aos meus pais Gildo e
Tereza e a todos que torceram
por mim em mais uma conquista.**

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que por estar ao meu lado, sempre me abençoando, me protegendo e me conferindo condições para enfrentar os desafios da vida.

A minha noiva e futura esposa **Kethylly**, pela paciência e companheirismo durante este período tão importante de minha vida profissional, sempre ao meu lado nas diversas viagens de Maceió a Recife, sendo a pessoa que mais sabe das dificuldades que enfrentei e que mais me incentivou nesta importante jornada.

Aos meus filhos **Gustavo** e **Lara**, pois a existência deles também constituiu um dos fatores que mais me deram estímulo para a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais **Gildo** e **Tereza**, que sempre torceram por mim e me incentivaram nos estudos, além de sempre comemorarem juntos comigo as vitórias.

Ao meu irmão **Gustavo Henrique** (*in memoriam*), pois onde quer que esteja, sei que me concedeu luz e energia positiva, contribuindo para mais uma vitória.

Mais uma vez, ao meu orientador e amigo, **professor Valdemiro Júnior**, por ter me dado a oportunidade de entrar no “mundo da ciência”, através da iniciação científica (na graduação), continuando no Mestrado e seguindo no Doutorado. Todos esses ensinamentos e incentivos, desde o ano 2000, foram de fundamental importância para minha vida pessoal e profissional.

Ao **Professor George Chavez**, um competente profissional, sábio e grande figura humana. A contribuição dele foi essencial para que realizássemos estes experimentos, sobretudo com eficiência e tranquilidade.

A todos que também ajudaram neste trabalho: **Simone, Sandra, Vinicius, Paulo...**

Ao **Dr. Nader** e ao **Lanagro/Pernambuco**, por terem nos cedido os animais para os experimentos.

Aos amigos da vigilância sanitária de Maceió/AL, que me ajudaram muito em minhas ausências: **Geovane Pacífico, José Gonçalves, Ricardo Walker, Heriberto Teixeira...**

RESUMO

A citotoxicidade de 10 Amino-naftoquinonas (ANQ) foi avaliada nas linhagens celulares MDA-MB-435 (melanoma), SF-295 (cérebro) e HCT-8 (côlon), todas linhagens humanas. Dentre as amino-naftoquinonas testadas, cinco (2a, 9a, 6a, 5a e 7a) tiveram citotoxicidade nas linhagens celulares testadas. Dentre estas, a amostra 7a foi a mais ativa, evidenciando valores de IC_{50} de 1.84 $\mu\text{g/mL}$ para HCT-8, 1.33 $\mu\text{g/mL}$ para MDA-MB-435 e 1.80 $\mu\text{g/mL}$ na linhagem SF-295. O mesmo composto produziu inibição celular de 99.51 %, 100 % e 99.50 % para HCT-8, MDA-MB-435 e SF-295, respectivamente. No experimento seguinte objetivou-se determinar os efeitos tóxicos e o limiar de segurança da amino-naftoquinona sintética ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, administrada em dose única e diferentes concentrações. Com este propósito, 24 camundongos (*Mus musculus*, albinus Swiss) machos foram divididos de acordo com a dosagem: Grupo I (tratados com 100 $\mu\text{g/Kg}$ da aminoquinona (n = 6)); Grupo II (tratados com 200 $\mu\text{g/Kg}$ de aminoquinona (n = 6)); Grupo III (tratados com 300 $\mu\text{g/Kg}$ de aminoquinona (n = 6)); Grupo IV (tratados com 600 $\mu\text{g/Kg}$ de aminoquinona (n = 6)). Os animais foram mantidos em jejum alimentar de 6 horas e posteriormente tratados por via intraperitoneal com a amino-naftoquinona, de acordo com as doses estipuladas. Após administração das doses experimentais, os animais foram avaliados por 180 minutos ininterruptos, e posteriormente a cada 24 horas, afim de caracterizar o comportamento dos animais através dos sinais clínicos por 72 horas. Após avaliação toxicológica da aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE através da análise de atividade espontânea constatou-se efeito depressor sobre o SNC numa relação dose-resposta direta. O cálculo da DL_{50} para substância teste demonstrou baixos níveis de toxicidade em dosagens inferiores a $244,1125 \pm 23,2883 \text{ mg.Kg}^{-1}$. No experimento subsequente, 18 camundongos com carcinoma sólidos de Ehrlich foram divididos em grupo controle (n=6); tratado com metotrexato (n=6; 71.7 mg.kg^{-1}) e tratado com ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihidronaphthalen-2-ylamino) acetate (n=6; 20 mg.kg^{-1}). Quatro dias após as células do tumor ascítico de Erlich serem implantadas subcutaneamente os camundongos receberam metotrexato e a amino-naftoquinona em dose unica. No 8º dia, o metotrexato e a amino-naftoquinona inibiram 67% o crescimento do tumor em 58% e 67%, respectivamente em relação ao grupo controle. Nenhuma mudança substancial de parâmetros bioquímicos e achados histopatológicos foi observada no fígado e nos rins dos animais tratados com amino-naftoquinona. A amino-naftoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihidronaphthalen-2-ylamino) acetato pode ser considerada uma droga promissora na terapia contra o câncer. Contudo, estudos futuros devem ser realizados na determinação do mecanismo de ação desta substancia.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Aminonaftoquinonas; Comportamento espontâneo; Tumor de Erlich; Camundongos.

ABSTRACT

Cytotoxicity of 10 Amino-naphthoquinone (ANQ) was evaluated in cell lines MDA-MB-435 (melanoma), SF-295 (brain) and HCT-8 (colon), all human strains. Among the amino-naphthoquinones tested, five (2a, 9a, 6a, 5a and 7a) have cytotoxicity in cell lines tested. Among these, the sample was the seventh most active, showing IC₅₀ values of 1.84 mg / mL for HCT-8, 1:33 / mL for MDA-MB-435 and 1.80 g / ml in strain SF-295. The same compound produced inhibition of cellular 99.51%, 100.11% and 99.50% for HCT-8, MDA-MB-435 and SF-295, respectively. In the following experiment aimed to determine the toxic effects and the safety threshold of synthetic amino-naphthoquinone ETHYL 2 - (1,4-dioxo-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-ylamino) ACETATE, administered in a single dose and different concentrations. For this purpose twenty-four mice (*Mus musculus*, Swiss albinos) males were divided according to dosage: Group I (treated with the 100µg/Kg aminoquinone (n = 6)), Group II (treated with 200µg/Kg of aminoquinona (n = 6)), Group III (300µg/Kg of aminoquinone treated (n = 6)), Group IV (treated with 600µg/Kg of aminoquinona (n = 6)). The animals were food fasted 6 hours and then treated intraperitoneally with the amino-naphthoquinone according to the prescribed dose. After administration of the doses experimental animals were evaluated for 180 minutes uninterrupted, and then every 24 hours in order to characterize the behavior of the animals through clinical signs for 72 hours. After toxicological evaluation of aminoquinona ETHYL 2 - (1,4-dioxo-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-ylamino) ACETATE through analysis of spontaneous activity was found depressing effect on the CNS in a dose-response relationship directly. The calculation of the LD₅₀ test substance showed low levels of toxicity at doses less than 244.1125 ± 23.2883 mg.Kg⁻¹. In subsequent experiments, eighteen mice with solid Ehrlich carcinoma were divided into control group (n = 6) and treated with methotrexate (n = 6; 71.7mg.kg⁻¹) and treated with ethyl 2 - (1,4-dioxo-1,4-dihidronaphthalen-2-ylamino) acetate (n = 6; 20mg.kg⁻¹). Four days after the cells of Ehrlich ascites tumor were implanted subcutaneously and the mice receiving methotrexate amino-naphthoquinone in a single dose. On the 8th day, methotrexate and amino-naphthoquinone 67% inhibited tumor growth by 58% and 67%, respectively compared to the control group. No substantial change in the biochemical and histopathologic findings were observed in the liver and kidneys of animals treated with amino-naphthoquinone. The amino-naphthoquinone ethyl 2 - (1,4-dioxo-1,4-dihidronaphthalen-2-ylamino) acetate can be considered a promising drug in cancer therapy. However, future studies should be performed to determine the mechanism of action of this substance.

Keywords: Cytotoxicity; aminonaphthoquinones; spontaneous behavior; Erlich tumor; Mice

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

REVISÃO DE LITERATURA

Figura I - I) Lapachol (2-hidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)napftoquinona); II) α -lapachona (2,2-dimetil-2H-benzo cromeno-5,10-diona); III) β -lapachona (2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo coromeno-5,6-dione); IV) 3-hidroxi- β -n-lapachona.

CAPÍTULO I

Figura I – a) aminoácido, KOH (aq), NMP, r.t., 1-20h (2a-6a); b) aminoácido etil éster cloridrato, KOH (aq), MeOH-DMSO, r.t., 10min (7a-10a); c) LiOH, THF (aq), 1h, r.t., (11a).

CAPÍTULO II

Figura 1 - Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 100mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 2 - Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 100mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 3 - Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 100mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 4 - Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 100mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 5 - Ações sobre o SNA em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 100mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 6 - Outras ações em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE , na dose de 100mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 7 - Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate , na dose de 200mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 8 - Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino) acetate, na dose de 200mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 9 - Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE , na dose de 200mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 10 - Ações sobre o SNA em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE , na dose de 200mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 11 - Outras ações em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE , na dose de 200mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 12 - Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 300mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 13 - Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE , na dose de 300mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 14 - Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 300mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 15 - Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 300mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 16 - Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 300mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 17 - Ações sobre o SNA em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 300mg.kg-1 (ip), (n=8). (*), para a atividade de defecação o eixo assinala unidades fecais.

Figura 18 - Ações sobre o SNA em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 300mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 19 - Outras ações em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 300mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 20 - Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 600mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 21 - Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 600mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 22 - Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 600mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 23 - Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 600mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 24 - Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 600mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 25 - Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 600mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 26 - Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de 600mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 27 - Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 600mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 28 - Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 600mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 29 - Ações sobre o SNA em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 600mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 30 - Ações sobre o SNA em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 600mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 31 - Outras respostas comportamentais em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 600mg.kg-1 (ip), (n=8).

Figura 32 - Relação dose x % de efeito em ações estimulantes sobre o SNC em condição de atividade espontânea em camundongos estimulados com diferentes doses de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE .

Figura 33 - Relação dose x % de efeito em ações depressoras sobre o SNC em condição de atividade espontânea em camundongos estimulados com diferentes doses de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE .

Figura 34 - Relação dose x % de efeito em ações depressoras sobre o SNC em condição de atividade espontânea em camundongos estimulados com diferentes doses de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE .

Figura 35 - Relação dose x % de efeito em ações sobre o SNA em condição de atividade espontânea em camundongos estimulados com diferentes doses de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE .

Figura 36 - Relação dose x % de efeito em ações sobre a condição de atividade espontânea em camundongos estimulados com diferentes doses de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE .

Figura 37 - Relação linear entre probitos e log da Dose (mg.kg-1) de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE , para a determinação da DL₅₀.

CAPÍTULO III

Figura 1 - Variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato ($71,7 \text{ mg.kg}^{-1}$) e aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate (20mg.kg^{-1}).

ANEXO

Figura 2 - Parênquima hepático de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich controle, tratados com metotrexato ($71,7 \text{ mg.Kg}^{-1}$), aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate (20mg.Kg^{-1}).

Figura 3 - Parênquima renal de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich controle, tratados com metotrexato ($71,7 \text{ mg.kg}^{-1}$), aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate (20mg.Kg^{-1}).

Figura 4 - Tumor de Ehrlich de camundongos albinus Swiss controle, tratados com metotrexato ($71,7 \text{ mg.Kg}^{-1}$), aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate (20 mg.Kg^{-1}).

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais.

Tabela 2 - Citotoxicidade (CI₅₀) das amostras em três linhagens tumorais. Os valores são apresentados em µg/mL (micromolar) e respectivos intervalos de confiança.

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Total de respostas comportamentais observadas em camundongos estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, nas doses de 100mg.kg⁻¹, 200mg.kg⁻¹, 300mg.kg⁻¹ e 600mg.kg⁻¹, durante um período de 100 min contínuos, sob condição de atividade espontânea, considerando-se efeitos excitatórios e depressores sobre o SNC, sobre o SNA e outros efeitos.

Tabela 2 - Principais respostas comportamentais observadas em camundongos estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE, nas doses de 100mg.kg⁻¹, 200 mg.kg⁻¹, 300mg.kg⁻¹ e 600mg.kg⁻¹, durante um período de 100 min contínuos, sob condição de atividade espontânea. Destaque sobre os efeitos excitatórios e depressores do SNC, efeitos sobre o SNA e outros efeitos.

Tabela 3 - Respostas comportamentais exibidas por camundongos estimulados com diferentes doses de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE , submetidos ao teste de equilíbrio.

Tabela 4 - Relação dose - % de efeito de comportamentos exibidos por camundongos estimulados por diferentes dosagens de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE . Tomando-se como referência uma função linear do tipo $y = a \cdot x + b$, destacam-se os coeficientes angulares e lineares das funções obtidas além do coeficiente de determinação.

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Médias do volume do tumor de Ehrlich (cm³) em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato (71,7 mg.kg⁻¹) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20mg.kg⁻¹).

Tabela 2 - Médias dos parâmetros bioquímicos séricos (gamaglutamiltranspeptidase, fosfatase alcalina, ureia, creatinina) em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato (71,7 mg.kg⁻¹) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20 mg.kg⁻¹).

Tabela 3 - Peso do tumor, peso dos órgãos de camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato (71,7 mg.kg⁻¹) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20 mg.kg⁻¹).

TABELA 4 - Lesões hepáticas em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato (71,7 mg.kg⁻¹) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20 mg.kg⁻¹).

TABELA 5 - Lesões renais em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato (71,7 mg.kg⁻¹) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20 mg.kg⁻¹).

TABELA 6 - Lesões pulmonares em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato (71,7 mg.kg⁻¹) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20mg.kg⁻¹).

TABELA 7 - Lesões esplênicas em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato (71,7 mg.kg⁻¹) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20 mg.kg⁻¹).

TABELA 8 - Lesões cardíacas em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato (71,7 mg.kg⁻¹) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20 mg.kg⁻¹).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. O CÂNCER.....	19
2.2 A EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE O CÂNCER.....	20
2.3 O TUMOR DE ERLICH.....	24
2.4 AS PROPRIEDADES DAS NAFTOQUINONAS NO COMBATE AO CÂNCER.....	24
3 REFERÊNCIAS.....	30
CAPÍTULO I.....	36
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	39
1 INTRODUÇÃO.....	44
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4 RESULTADOS.....	46
5 DISCUSSÃO.....	47
6 AGRADECIMENTOS.....	46
7 REFERÊNCIAS.....	47
CAPÍTULO II.....	50
RESUMO.....	50
ABSTRACT.....	51.
1 INTRODUÇÃO.....	52
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4 CONCLUSÃO.....	95
5 REFERÊNCIAS.....	96
CAPÍTULO III.....	98
RESUMO.....	98
ABSTRACT.....	98
1 INTRODUÇÃO.....	99
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	101
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	103
4 CONCLUSÃO.....	116
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
6 ANEXO.....	121

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias são consideradas uma das mais importantes doenças e que mais acometem as espécies humana e domésticas, com registros de ocorrência em cerca de sete papiros egípcios datando de 16 séculos antes de Cristo, sendo que um deles, o “papiro de Edwin Smith”, relata a realização de uma mastectomia (GUTEMBERG, 2004). Na espécie humana, face ao aumento da média de vida proporcionada pelos avanços tecnológicos, do controle, prevenção e tratamento das principais doenças infecto-contagiosas e da melhoria das condições de vida em geral, a frequência relativa desta doença tem aumentado significativamente. O câncer, assim como as doenças cardiovasculares são indubitavelmente as duas maiores causas de morte em humanos, estimando-se 10 milhões de pessoas/ano (SANTOS, 1986; FARIA, 2003), sendo no Brasil 400.000 novos casos e 125.000 mortes anuais (GUTEMBERG, 2004). Em 2007, foram registrados 130 mil óbitos e estimados 470 mil novos casos de câncer no Brasil, volume maior do que o número de casos de AIDS acumulados em 24 anos (INCA, 2007).

As estimativas para 2008 apontam que, no Brasil, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os câncer de mama e de cólon do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INCA, 2008).

Embora as taxas de novos casos de câncer e de mortalidade por esta doença tenham diminuído com as diversas medidas de prevenção, espera-se que o número de pessoas com diagnóstico de câncer, duplique nas próximas décadas (EDWARDS et al, 2002).

Para se ter uma idéia acerca da relevância do problema, segundo o saudoso professor Jefferson Andrade dos Santos (1986), pesquisadores americanos admitiram que “o câncer costuma ser cruel não apenas em relação à vida do homem, mas à sua dignidade também”.

A doença caracteriza-se pelo crescimento anômalo e desordenado de células, sem finalidade e sem controle do organismo através do qual se nutre, e que persiste nesta prevalência, mesmo cessado o estímulo que determinou tal alteração (SANTOS, 1986).

Vários são os fatores envolvidos em sua etiologia, sendo que a transformação de uma célula normal em uma célula neoplásica pode ser causada por agentes químicos, físicos ou biológicos que alteram direta e irreversivelmente o genoma celular (JONES, 2000).

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia transplantável de origem epitelial maligna, espécie-específica e corresponde ao adenocarcinoma mamário do camundongo fêmea. Cresce em várias linhagens dessa espécie animal na forma ascítica, quando inoculado intraperitonealmente, e na forma sólida, quando inoculado no tecido subcutâneo (PALERMO-NETO et al, 2001).

Este tumor tem sido utilizado como modelo para vários estudos como os de verificar a influência do estresse sobre câncer (PALERMO-NETO et al, 2001; PALERMO-NETO et al, 2003) e a resposta imunológica do hospedeiro ao tumor (SEGURA et al, 2000; PINTO, 2003).

O câncer pode ser tratado por cirurgia, radiação, hormônios, imunoterapia e quimioterapia (American Cancer Society, 2006). A quimioterapia é realizada através da administração de medicamentos antineoplásicos. Estes podem ser agrupados nas seguintes categorias: agentes alquilantes polifuncionais, antimetabólicos, alcalóides vegetais, antibióticos antitumorais, hormônios, (KATZUNG, 2003).

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural. Nos últimos anos intensificou-se o interesse nestas substâncias, não só devido a sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que apresentam em variados estudos farmacológicos a seu respeito (BARREIRO, 1996).

Em estudos farmacológicos as quinonas tiveram diversas biodinamicidades, destacando-se, dentre muitas, as propriedades microbicidas, tripanossomicidas, antivirais e antitumorais. Além de aumentar o estresse oxidativo mitocondrial e a formação de espécies reativas de oxigênio endógeno, é atribuído as quinonas a inibição do complexo das topoisomerasas, ação que provoca o desencadeamento da apoptose celular. A interferência das quinonas na apoptose constitui-se hoje em pesquisa interdisciplinar de fronteira na química medicinal, existindo grande expectativa quanto á delineação de estratégias racionais visando o combate de neoplasias (MATÉS et al., 2000).

No tratamento para o câncer, a utilização de apenas um medicamento geralmente não é capaz de debelar completamente esta patologia, principalmente porque a resposta aos tratamentos pode ser diferente entre indivíduos da mesma espécie. Portanto, a associações de drogas em tratamentos antitumorais pode gerar expectativa de bons resultados no tratamento desta patologia. Dentre as drogas utilizadas como anti-neoplásicos podem-se citar as quinonas e seus derivados, obtidas de fontes naturais ou sintetizados em laboratório (TORRES et al., 2007). As fontes naturais mais freqüentes são plantas superiores, artrópodes, fungos, líquens, bactérias, algas e vírus (CAMARA et al, 2007).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CÂNCER

As neoplasias são consideradas uma das mais importantes doenças e que mais acometem humanos e espécies domésticas, principalmente cadelas, com registros de ocorrência em cerca de sete papiros egípcios datando de 16 séculos antes de Cristo, sendo que um deles, o “papiro de Edwin Smith”, relata a realização de uma mastectomia (GUTEMBERG, 2004). Na espécie humana, face ao aumento da média de vida proporcionada pelos avanços tecnológicos, do controle, prevenção e tratamento das principais doenças infecto-contagiosas e da melhoria das condições de vida em geral, a frequência relativa desta doença tem aumentado significativamente. Pois, a longevidade como sabemos, é um fator muito importante no aparecimento desta doença e à medida que a humanidade torna-se mais idosa, sua incidência aumenta (SANTOS, 1986).

O câncer caracteriza-se pelo crescimento anômalo e desordenado de células, sem finalidade e sem controle do organismo através do qual se nutre, e que persiste nesta prevalência, mesmo cessado o estímulo que determinou tal alteração (SANTOS, 1986). Vários são os fatores envolvidos em sua etiologia, sendo que a transformação de uma célula normal em uma célula neoplásica pode ser causada por agentes químicos, físicos ou biológicos que alteram direta e irreversivelmente o genoma celular (JONES et al., 2000).

Existem muitas diferenças morfológicas, moleculares e funcionais entre uma célula cancerosa e uma célula normal. Uma característica marcante é o polimorfismo das células tumorais, ou seja, as células diferem muito em forma e tamanho num mesmo tumor. Como se multiplicam muito (mitoses intensas), as células cancerosas geralmente têm o citoplasma basófilico, devido à riqueza em ribossomos, o que acontece com todas as células em proliferação. A maioria das células normais apresenta um sistema molecular de superfície favorecendo, durante o desenvolvimento embrionário, que a célula reconheça seu microambiente e fixe suas moléculas de adesão às de outras ou à matriz extracelular. Se a célula normal falha nesse sistema, ela automaticamente segue a via de morte celular programada (apoptose), sendo eliminada. Isso não acontece nas células cancerosas, onde o programa de auto-eliminação, em caso de erro grave, geralmente está desativado (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

A apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica, estimulada pela maioria dos agentes quimioterápicos. Esse processo, após o estímulo indutor trata-se de um fenômeno bastante rápido. Ela ocorre na organogênese normal e patológica, na hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na seleção positiva e negativa do sistema imune, na

atrofia de órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após injúria por agentes genotóxicos (BARCINSKI, 2004).

O reconhecimento e a eliminação de células tumorais acontecem frequentemente no organismo através da geração de uma imunidade tumoral. Esta resposta conta com a participação de diversos tipos celulares (linfócitos T CD⁸⁺ citotóxico, células NK, macrófagos) e moleculares que estão interconectados, sendo capazes de gerar tanto uma resposta celular quanto humoral. O estreito contato entre o sistema imune inato e adaptativo permite uma ação contra tumores em diferentes níveis, evitando o surgimento do câncer. Contudo, pode acontecer falhas do sistema imunológico no reconhecimento dessas células, pelos mecanismos de escape que as células tumorais podem desenvolver ou por uma imunodeficiência do organismo (BARCINSKI, 2004).

A metástase é uma das características comportamentais do câncer. Ela é a disseminação, por via vascular ou linfática, das células cancerosas de um órgão ou parte do corpo, para outra parte ou órgão não diretamente conectado com o primeiro sítio acometido. É um processo seletivo, não aleatório, pois nem todas as células tumorais são capazes de produzir metástase. Para que o processo metastático se complete de modo sucedido, as células neoplásicas devem ter a composição genética apropriada para proliferar no novo ambiente, criar rede vascular, evadir-se ao ataque imune do hospedeiro, e responder aos fatores órgão-específicos que influenciam seu crescimento (RICHARDSON et al., 1997).

Um dos grandes desafios no tratamento do câncer com as drogas convencionalmente utilizadas é o de se conseguir a destruição das células tumorais com mínimos efeitos colaterais sobre os tecidos e órgãos sadios. De maneira geral as drogas anticancerígenas em lide têm efeito citotóxico comprovado em decorrência do estresse oxidativo-peroxidativo promovido por sua utilização (SÁNCHEZ-BARCELÓ et al., 2003; ABD EL-AZIZ et al., 2005).

2.2. A EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE O CÂNCER

Alterações na expressão gênica é uma das principais respostas do tecido tumoral. Entre os vários genes moduladores da apoptose, a família do gene bcl-2 desempenha importante função. O gene bcl-2 está situado no cromossomo 18 e codifica duas proteínas homônimas, uma de 26KDa (bcl2- α), e outra de 21KDa (bcl2- β), diferenciando-se uma da outra apenas pelo terminal carboxílico. Essas proteínas são encontradas na membrana interna da mitocôndria, no envelope nuclear e no retículo endoplasmático. Sua expressão exacerbada age inibindo a apoptose e contribui prolongando a vida da célula neoplásica, favorecendo sua expansão clonal e o aumento adicional de

mutações (DELFINO et al., 1997; MONTENEGRO & FRANCO, 1999; POLVERINI & NÖR, 1999).

O bcl-2 é o protótipo de uma família com uma série de outros genes de seqüências homólogas à dele e intimamente relacionados. Consistem basicamente de dois grupos: os antagonistas da morte celular, ou seja, inibidores da apoptose (bcl-2, bcl-x_L, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1 e A-1), e os agonistas ou indutores da apoptose (bax, bak, bcl-x_S, bad, bik e hrk). A expressão da proteína bcl-2 é bastante diversificada e tem diferentes significados na dependência da neoplasia maligna avaliada. A interpretação de sua expressão pode variar de acordo com a lesão, e na mesma lesão, de acordo com a localização. Como por exemplo, o gene p53 foi apontado como possível regulador da expressão genética do bcl-2 em carcinoma de células transicionais da bexiga (LU et al., 1997) e em carcinoma de ovários (SATO et al., 1999). Entretanto, nem os resultados de Lu et al. (1997) nem os de Sato et al. (1999) conseguiram comprovar tal relação, sugerindo que o caminho seguido pelo bcl-2 na inibição da apoptose independe da regulação superior do gene p53. O estudo do comportamento biológico diversificado desse marcador pode contribuir para seu entendimento e suas relações com as diferentes patologias.

O gene p53 é considerado um supressor de tumor e sua perda de expressão foi freqüentemente relatada em vários tipos de tumores humanos sugerindo que este evento tenha importante relação com o desenvolvimento e progressão tumoral (HOLLSTEIN et al., 1991).

A proteína do gene p53 tem um papel central no controle do dano do DNA. Quando a célula se submete a um dano ionizante, ou de outra natureza mutagênica, reconhece e repara o dano ou encaminha a célula para apoptose quando este dano é irreversível. Em alguns modelos experimentais a perda de expressão do p53 confere às células resistência à terapia antineoplásica e perda da competência apoptótica (MOLL & SCHRAMM, 1998).

A proteína P53 atua no ciclo celular nos pontos de controle G1 / S e G2 / M levando a uma parada nestes pontos e permitindo o reparo de danos no DNA. Desta forma é evitada a replicação de DNA contendo alterações genéticas. A parada no ciclo celular em G1 após a ativação da p53 envolve a transcrição do gene codificante da proteína p21/WAF inibidora de cinases dependentes de ciclinas (CDKs). Mutações na p53 podem levar a carcinogênese, uma vez que o gene p53 é indicado como um regulador do p21 (ALBRECHTSEN et al., 1999).

Os mecanismos responsáveis pela inativação do p53 podem estar relacionados com deleção do gene, mutações somáticas e pontuais na sua seqüência e/ou superexpressão do mdm2 (dominante inibidor do p53). Sabe-se que o produto do gene p53 é capaz de inibir a expressão do gene bcl-2 que, por sua vez, é capaz de inibir apoptose e permitir a perpetuação de mutações presentes na célula (MIYASHITA et al., 1994).

A proteína mdm2 (Murine Doble Minute 2) é um regulador negativo do gene p53 ligando-se ao terminal amina do domínio trans-ativado de sua proteína. Sua superexpressão foi detectada em uma variedade de tumores malignos humanos sugerindo que este oncogêneo desempenhe uma importante função na carcinogênese (JUVEN-GERSHON, 1999; LOZANO et al., 1998).

Muitos estudos relatam que o p53 e o mdm2 são marcadores específicos para identificar a atividade proliferativa e agressividade tumoral de determinadas lesões incluindo os tumores e cistos odontogênicos (CARVALHAIS et al., 1999).

O gene WAF1, localizado no cromossomo 6p é responsável pela codificação da proteína conhecida como p21. A proteína p21 H-Ras é uma proteína "G" transdutora de sinais extracelulares, que funciona através da membrana plasmática e endomembranas, transmitindo assim sinalizações e informações ao núcleo. Alterações em nucleotídeos dessa proteína resultam em mutações pontuais e essas formas mutadas são sempre ativas e expressas em diferentes tipos de câncer (FIGUEIREDO et al., 2003).

O efeito imediato da indução da p21 é a inibição da atividade da proteína do retinoblastoma (pRB). A pRB na fase G1 encontra-se hipofosforilada e ligada a fatores de transcrição da família E2F; quando a pRB é fosforilada por cinases dependente de ciclinas, tais fatores são liberados, resultando na transcrição de genes da fase S do ciclo celular. Esta via, a p21 inibe o complexo de CDKs, resultando no acúmulo de pRB hipofosforilada, complexada a E2F parando o ciclo celular em G1. Em resumo esta proteína inibe a progressão do ciclo celular da fase G1 para a G2. Esta parada é de fundamental importância para permitir o reparo do DNA danificado antes que ocorra sua duplicação na fase S (ALBRECHTSEN et al., 1999).

Nas últimas duas décadas, numerosos estudos clínicos, experimentais e epidemiológicos têm ligado o desenvolvimento e progressão das neoplasias com a presença da COX-2 nas células tumorais humanas (BEAM et al., 2003).

Estudos sugerem que a COX-2 inibe a apoptose por indução da expressão do Bcl proto-oncogênese. Esta ação anti-apoptose pode prolongar a sobrevivência de células anormais, permitindo assim maior tempo para o acúmulo de mutações genéticas, resultando em transformações neoplásicas (SURH et al., 2001; BOL et al., 2002; CAO & PRESCOTT, 2002). Estudos com inibidores de COX levam a redução da expressão de Bcl-2 e indução a apoptose (CAO & PRESCOTT, 2002; WANG & DUBOIS, 2004).

A COX-2 possui papel vital na regulação da angiogênese associada com a proliferação das células neoplásicas (TSUJII et al., 1998; QUEIROGA et al., 2005). O aumento na expressão de COX-2 está relacionado à produção do fator de crescimento endotelial, determinando a habilidade para estimular o desenvolvimento de células endoteliais e promover a angiogênese. A maioria dos

tumores sólidos necessita de novos vasos sanguíneos para prover os nutrientes necessários para garantir seu crescimento e sobrevivência. A provisão da angiogênese é também crucial para determinar a ocorrência de metástases (WANG & DUBOIS, 2004). A partir disto, os inibidores para a COX-2 podem bloquear o crescimento dos vasos sanguíneos relacionados com o desenvolvimento tumoral (TSUJII et al., 1998; WOLFESBERGER et al., 2006).

O uso de antiinflamatórios inibidores específicos da COX-2, em camundongos com células tumorais positivas para COX-2, diminuiu a angiogênese e o crescimento do tumor. No entanto, quando células negativas para COX-2 foram tratadas com esses mesmos inibidores, não houve nenhum efeito no volume ou no índice de angiogênese. Essas pesquisas comprovam o papel da COX-2 na patogênese do câncer e assim sugerem que sua inibição programada, com o uso de antiinflamatórios inibidores seletivos de COX-2, pode ser efetiva na quimioprevenção e tratamento do câncer (PRESCOTT, 2000; WILLIAMS et al., 2000).

O Ki-67 é uma proteína não histônica, com peso molecular aparente de 345 a 349 Kd presente em todas as fases do ciclo de divisão celular (exceto no início da fase G₁ e na fase G₀), sua expressão aumenta na segunda metade da fase S, alcançando sua maior expressão em G₂ e M. (RABENHORST, 1994; ABADIE et al., 1999; BARBOSA et al., 2003).

A expressão do Ki-67 tem sido estudada em tecidos normais e tumorais em humanos. A porcentagem de células imunorreativas para esse anticorpo correlaciona bem com as características morfológicas de proliferação celular, particularmente índice mitótico e grau de diferenciação do tumor. Diante da presença de neoplasias indiferenciadas, o Ki-67 é o melhor marcador de proliferação celular atualmente disponível, permite estabelecer uma relação direta com o prognóstico (ABADIE et al. 1999; BARBOSA et al., 2003).

De acordo com Pena et al. (1998), valores aumentados de Ki-67 têm correlação positiva com metástase, morte pela neoplasia e menor tempo de sobrevida. Estudos correlacionam sua imunorreatividade com o tamanho tumoral e envolvimento de linfonodos (VERONESE & GAMBACORTA, 1992). Assim, anticorpos específicos para a proteína Ki-67 abrem caminho para a pesquisa imunohistoquímica da proliferação celular, particularmente útil em numerosos estudos de valor prognóstico do crescimento celular em neoplasias humanas e de cães (BOUZUBAR et al., 1989).

Inúmeras são as perspectivas a respeito dos tratamentos para o câncer, entretanto cada vez mais se percebe a tendência dos cientistas em admitirem que jamais existirá um remédio único capaz de matar ou destruir todo e qualquer tipo de câncer. Esta certeza vem de outra certeza, qual seja, que o câncer não é uma doença única, são muitas. Cada tipo é um tipo e reagirá de forma diferente. As maiores expectativas, no entanto, estão sendo depositadas em associações de

medicamentos, com drogas diferentes, de efeitos diferentes, mas que produzam bons resultados (FOLGUEIRA & BRENTANI, 2004).

2.3 O TUMOR DE ERLICH

Um grande avanço no estudo dos tumores consiste em utilizar métodos experimentais, onde são usados tumores transplantáveis ou transmissíveis. Esses são tumores de animais, mantidos em laboratório, pelo transplante de células tumorais a hospedeiros susceptíveis, como por exemplo, o tumor de Ehrlich (OLIVEIRA, 2005; ASSIS, 2007). Este tem sido utilizado no estudo da ação de componentes químicos, físicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, imunologia, citogenética e terapêutica de células tumorais (SILVA et al., 2006).

O tumor de Ehrlich é uma neoplasia experimental transplantável de origem epitelial maligna, espécie-específica, sendo correspondente ao adenocarcinoma mamário de camundongo fêmea, transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich, em 1906. Originalmente, de crescimento sólido foi convertido na forma ascítica por Loewenthal and Jahn (1932), e desde então é estudado na forma sólida, quando as células são inoculadas no tecido subcutâneo, ou na forma ascítica, quando inoculado na cavidade peritoneal. (SILVA et al., 2006; ASSIS, 2007). A avaliação histológica do tumor de Ehrlich na forma sólida pode ser descrita como: células com alto grau de atipias (anaplasia), caracterizadas por nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo-citoplasma maior que a das células normais. O estroma é constituído por fibras colágenas e delicados capilares (ASSIS, 2007).

A vantagem da utilização de neoplasias transplantáveis, em comparação às demais, recai sobre o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e sobre o desenvolvimento rápido da neoplasia, que restringe o tempo de estudo (SILVA et al., 2006).

2.4 AS PROPRIEDADES DAS NAFTOQUINONAS NO COMBATE AO CÂNCER

Dentre as drogas utilizadas como anti-neoplásicos encontram-se as quinonas e seus derivados, que são substâncias de ocorrência natural ou sintetizadas em laboratório (TORRES et al., 2007). Suas fontes naturais mais frequentes são plantas superiores, artrópodes, fungos, líquens, bactérias, algas e vírus, com funções biológicas múltiplas em ciclos metabólicos os mais diversos destes organismos (CAMARA et al, 2007; GOODMAN & GILMAN'S, 1996).

As quinonas são classificadas de acordo com o sistema aromático presente em sua estrutura, tendo as naftoquinonas um anel naftalênico característico. Vários estudos têm relatado a importância da atividade antitumoral das naftoquinonas. Sendo responsáveis por uma significativa redução do crescimento celular em linhagens tumorais quando conjugadas a outros agentes, como o Tiosemicarbazone (NTQS) e seus complexos formados com metais (ARÊAS, 2007).

Atualmente, a procura por novos agentes antitumorais tem se tornado cada vez mais necessária, visando sua maior eficácia e menor efeito citotóxico em tecidos normais. Na última década, quimioterápicos derivados de bactérias (Adriamicina), plantas (Lapachol, Taxol), organismos e microorganismos marinhos, entre outros, têm apresentado resultados bastante satisfatórios. O tratamento de várias doenças utilizando como base produtos naturais é observado há muitos anos na medicina popular. Partindo desta tradição a utilização de medicamentos produzidos a partir de plantas no tratamento do câncer tornou-se uma constante, confirmada pelo fato de cerca de 62% de drogas comercializadas para o tratamento do câncer entre 1983 e 1994 serem de origem natural (ARÊAS, 2007).

No Brasil, o estudo de algumas espécies vegetais como as do gênero *Tabebuia* (família: Bignoniaceae), muito usadas, historicamente, pelas populações da região amazônica para o tratamento de diversas doenças como sífilis, febres, malária, infecções cutâneas e distúrbios estomacais, foi muito difundido a partir da década de 60 após a descoberta da eficácia dos extratos da casca destas plantas no tratamento do câncer (PISSINATE, 2006).

Os principais compostos isolados da espécie (*Tabebuia heptaphylla*), popularmente conhecido como ipê roxo, foram o lapachol, outras naftoquinonas e antraquinonas. Contém ainda lapachenol, quercetina, ácido *orto*- e *para*-hidroxibenzóico. No gênero da *Tabebuia* estão presentes os compostos filoquinona (vitamina K) e manadiona (vitamina K3), além de várias quinonas, benzenóides e flavonóides. As substâncias mais estudadas nesta espécie são: o lapachol, os dois isômeros, α -lapachona e β -lapachona, e a xiloidona (desidro- α - lapachona), (Figura 1) todos biologicamente ativos (FERREIRA, 2005)

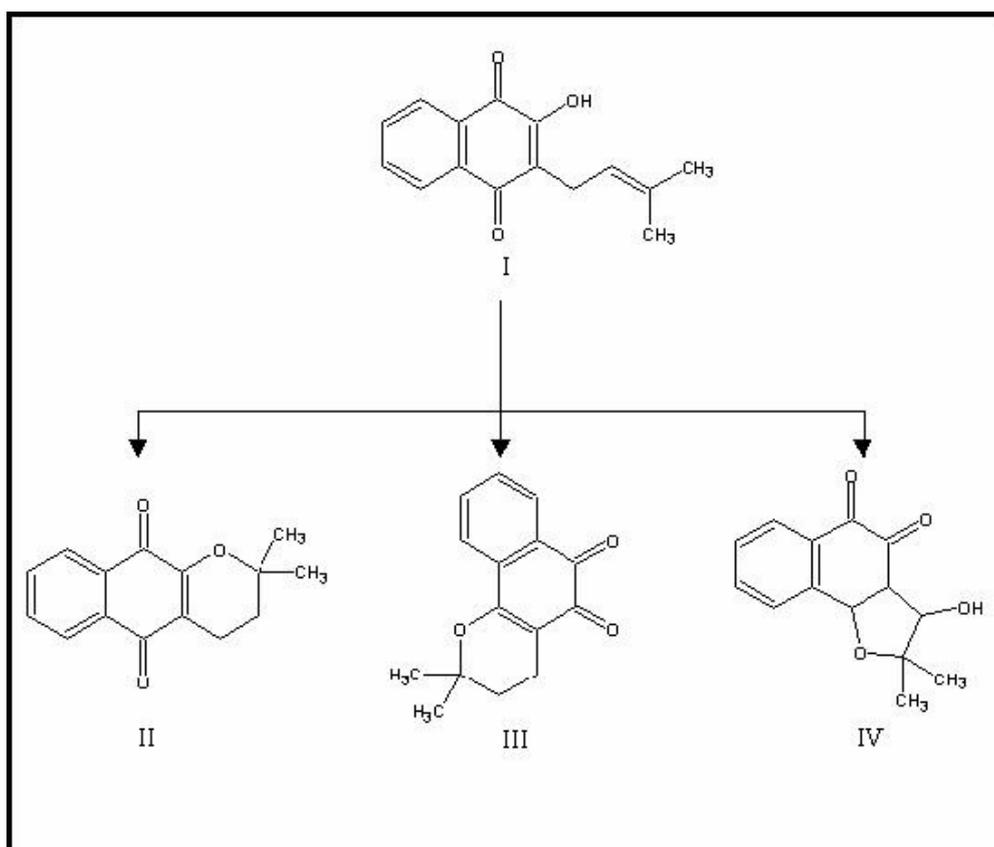


Figura 1:

- I) Lapachol (2-hidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)napftoquinona);
- II) α -lapachona (2,2-dimetil-2H-benzo cromeno-5,10-diona);
- III) β -lapachona (2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo coromeno-5,6-dione);
- IV) 3-hidroxi- β -n-lapachona

O lapachol (2-hidroxi-3-(3-metilbutenil)-1,4-naftoquinona) é uma naftoquinona encontrada na casca e lenho da *Tabebuia sp* e *Tecoma sp*. Na casca ocorre em quantidades inferiores às do lenho. Tem atividades antiinflamatória, analgésica, antimalárica, esquistossomicida, antiviral, tripanocida, leishmanicida, antifúngica, antiulcerantes e antineoplásica (SILVA et al., 2003, FERREIRA, 2005, SILVA, 2005).

Em tratamentos de carcinoma de Walker-256 e do sarcoma de Yoshida, o lapachol, embora tenha promovido a regressão definitiva de neoplasias em aproximadamente 30% dos portadores destas patologias, além de agir como analgésico, os ensaios clínicos o desaprovam em decorrência de efeitos colaterais que, em muito, agravam o quadro clínico de pacientes com câncer: anemia, aumento do tempo de coagulação e problemas gastrintestinais (SILVA et al., 2003). Ainda apresentou atividade anticonceptiva em ratas, causando 100% de mortalidade fetal/embrião, sem

causar efeitos tóxicos às mães. A possibilidade de haver os mesmos efeitos em seres humanos não pode ser ignorada. (SILVA et al., 2003, FERREIRA, 2005).

O principal interesse no lapachol reside em sua capacidade de induzir o estresse oxidativo através da formação intracelular de espécies reativas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion-radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila (HO^{\bullet}). Estas espécies podem danificar alguns componentes celulares importantes, tanto de células normais como de malignas. Esta interferência xenobiótica altera o balanço natural de sinais que interferem na divisão celular em pontos específicos da evolução morfogênica natural (“checkpoint” ou ponto de checagem). A alteração da normalidade pode induzir a apoptose, como alternativa, caso não se consiga eliminar por completo o estresse oxidativo (SILVA et al., 2003).

Calcula-se que o estresse oxidativo seja o responsável pela metade dos cânceres humanos. O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, leva a um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares que podem provocar a morte celular. Em sistemas onde ocorre uma persistência do ciclo redox, ou então faltam mecanismos de proteção, há aumento intracelular dos oxidantes $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , promovendo a danificação de componentes celulares vitais como as membranas, através da peroxidação dos lipídios e a diminuição da capacidade antioxidante celular. (SILVA et al., 2003).

A β -lapachona, uma orto-naftoquinona, tem sido amplamente estudada principalmente por apresentar efeitos seletivos em linhagens tumorais quando comparados a linhagens normais. Vários mecanismos de ação das naftoquinonas se apresentam de forma dose e tempo-dependente. A inibição do crescimento celular observada, pode ocorrer em função da indução da apoptose, inibição da topoisomerase II ou estresse oxidativo, entre outros (ARÊAS, 2007). A ação inibitória sobre a α -polimerase do DNA, revelou-se específica, pois comparada com outros inibidores, a β -lapachona apresentou características distintas e ineditismo no seu modo de ação, o que confere a esta quinona um grande potencial como droga de valor para a quimioterapia de câncer, particularmente no câncer de próstata (CAMARA et al., 2007).

Lee e colaboradores (2005), demonstraram que a β -lapachona, presente na *T. avellanadae*, foi capaz de diminuir a expressão da proteína e RNAm da COX-2 de maneira dependente da concentração. Além disso, a β -lapachona também inibiu a produção de PGE2 em células DU145 (linhagem celular de carcinoma prostático humano). Os autores sugeriram baseados nesses resultados, que a inibição da produção de PGE2 e expressão de COX-2 confirmam os resultados

que a β -lapachona inibe o crescimento e induz a apoptose nessa linhagem celular de carcinoma prostático.

Apesar do seu largo espectro de atividade biológica, seu mecanismo de ação não é totalmente conhecido. Inicialmente, os estudos indicam que a β -lapachona é ativada ao nível da topoisomerase I do DNA. O complexo das topoisomerasas é atualmente um dos alvos mais importantes na quimioterapia do câncer. A topoisomerase I é uma enzima nuclear que está relacionada à estrutura topológica do DNA. Sua ação temporal em abrir o DNA é crítica para os processos de transcrição, replicação e estruturação do cromossomo. Células morrem se a topoisomerase for inibida. Foi observado que a incubação direta da β -lapachona com a topoisomerase I antes da adição de DNA-substrato inibe drasticamente a ação desta enzima. Este resultado sugere a interação direta da β -lapachona com a topoisomerase I, diferenciando-se no seu mecanismo da ação do alcalóide camptotecina, outro inibidor de topoisomerase I. A camptotecina, por sua vez, destrói o complexo DNA-topoisomerase (SILVA et al., 2003).

Nos organismos mais simples, quando em ação reparadora, as topoisomerase I ligam-se a uma ou duas fitas do DNA, mas introduzem um só corte numa das fitas do DNA. Organismos superiores possuem, além da topoisomerase I, a topoisomerase II, que se complexam com duas fitas do DNA e induzem dois cortes durante o processo de reparação. As enzimas topoisomerase I e II têm funções recíprocas reversas, ou seja, uma é expressa quando a outra é inibida. Ambas cortam o DNA por ataque a pontos de unidade tirosínica, na ligação fosfodiéster do DNA e são críticas para o bom funcionamento celular. Qualquer alteração no balanço entre estas enzimas é suficiente para induzir a apoptose (SILVA et al., 2003).

Em um estudo sobre o mecanismo de ação da β -lapachona na atividade contra células e topoisomerasas de DNA, observou-se que esta substância é citotóxica contra várias células tumorais sensíveis e resistentes, incluindo-se células tumorais resistentes à ação da camptotecina. Este estudo revelou que a β -lapachona também age contra a topoisomerase II- α , via uma rota bioquímica independente de ATP, pelo aparecimento de formas reversíveis de complexos clivados (CAMARA et al., 2007). A β -lapachona pode induzir apoptose em células do câncer de pulmão, próstata, colorretal, câncer de mama e células leucêmicas (SILVA et al., 2003).

De todo modo, não se deve considerar a toxicidade elevada das quinonas como um fator limitante ao uso clínico. Novas expectativas colocam-se nos estudos futuros da relação atividade biológica *versus* estrutura química, uma área de atuação aberta à química medicinal, que pode levar à solução de problemas de toxicidade (SILVA et al., 2003). Com isso, este trabalho propõe a testar

uma série sintética de aminoácidos associada a uma naftoquinona no tratamento do câncer visando reduzir o tempo de tratamento.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIE, J. J.; AMARDEILH, M. A.; DELVERDIER, M. E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.215, p. 1629-1633, 1999.

ABD EL AZIZ, M.A. et al. The biochemical and morphological alterations following administration of melanin, retinoic acid and nigella sativa in mammary carcinoma: an animal model. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford. v.86, p.383-396, 2005.

ALBRECHTSEN et al. Maintenance of genomic integrity by p53. **Oncogene**, 18:7706-7716, 1999.

ARÊAS, P.C.F. Avaliação da atividade antitumoral de naftoquinonas. Dissertação de mestrado apresentada ao **Programa de Neuroimunologia da Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro**, 2007.

ASSIS, F.A. **Efeito do selênio orgânico e da vitamina E no crescimento tumoral e na resposta imunológica ao tumor experimental de Ehrlich**. 2007, 109f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BARBOSA, T. V.; ROSAS, M. P.; COSTA, A. C.; RAPOPORT, A. Valor prognóstico do Ki-67 no carcinoma indiferenciado de grandes células de glândula salivar maior : estudo de 11 casos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.69, n. 5, p.629-634, 2003.

BARCINSKI, M.A. Morte Celular. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. P.57-63.

BARREIRO, E. J.; da SILVA, J. E. M.; FRAGA, C. A. M.; **Quimica Nova** **1996**, *19*, 641.

BEAM, S. L.; RASSNICK, K. M.; MOORE, A. S.; McDONOUGH, S. P. An immunohistochemical study of ciclooxigenase-2 expression in various feline neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 40, p.496-500, 2003.

BOL, D. K.; ROWLEY, B.; HO, C. P.; PILZ, B.; SWERDEL, M.; KIGUCH, K.; MUGA, S.; KLEIN, R.; FISCHER, M. Cyclooxygenase 2 overexpression in the skin of transgenic mice results in suppression of tumor development. **Cancer Research**, v.62, p.2516-2521, 2002.

BOUZUBAR, N.; WALKER, K. J.; GRIFFITHS, K.; ELLIS, I. O.; ELSTON, C. W.; ROVERTSON, J. F. R.; BLAMEY, R.W.; NICHOLSON, R.I. Ki-67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. **British Journal of Cancer**, v. 59, p. 943-947, 1989.

CAO, Y.; PRESCOTT, S. M.; Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. **Journal of Cell Physiology**, v. 190, n. 3, p. 279-286, 2002.

CAMARA, C.A. ; SILVA, T.M.S. ; BARBOSA, T. P. ; SILVA, T. G. ; MARTINS, R. M. ; VARGAS, M. D. ; PINTO, A. C. . Molluscicidal Activity of 2-hidroxy-[1,4-]naphthoquinone and derivatives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, p. 329-334, 2008. Fator de Impacto: 0,895 (JCR-2007).

CARVALHAIS JN, et al. P53 and MDM2 expression in odontogenic cysts and tumors. **Oral Disease**, 1999;5:218-22.

DELFINO, A. B. M. et al. O envolvimento de genes e proteínas na regulação da apoptose-carcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 43, n.3, p. 173-186, 1997.

EDWARDS, B.K.; HOWE, H.L.; RIES, L.A.; ROSEMBERG, H.M.; FEIGAL, E.G. et al. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. **Journal of the National Cancer Institute** v.94. p.2766-92, 2002.

FARIA, J. L. e Col. Patologia Geral – **Fundamentos das doenças, com aplicações clínicas**. Editora Guanabara Koogan, 2003. 298p.

FERREIRA, A. M. M. S. Estudo da toxicidade aguda e atividade antineoplásica da *Vernônia condensata* Baker (Asteracea). Recife, 40p. 2005. Monografia. Curso de Graduação em Biomedicina, **Universidade Federal de Pernambuco**.

FIGUEIREDO, L.C. et al. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 49(03):179-183, 2003.

FOLGUEIRA, M.A.A.K.; BRENTANI, M.M. Câncer de mama. In: FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004.

GOODMAN & GILMAN'S. "The Pharmacological Basis of Therapeutics". Ninth Edition McGraw-Hill, (1996).

GUTEMBERG, T. Câncer, a humanidade contra-ataca. **Revista Superinteressante**. Editora Abril, edição 206, p. 44-53, 2004.

HOLLSTEIN M, et al. P53 mutations in human cancers. **Science**. 1991 Jul 5;253(5015):49-53.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativas 2008: **Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: **INCA**; 2007.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 3.ed. ver. Rio de Janeiro: **INCA**; 2008.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6 ed. São Paulo. Manole. 2000. 1415 p.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 8 ed. São Paulo:Guanabara Kooogan, 2005. P.288-297.

JUVEN-GERSHON T, OREN M. MDM2: the ups and downs. **Molecular Medicine**, 1999; 5:71-83.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. Rio de Janeiro, 2003.

LEE, Y.R.; CHOI, J.H.; TRINH, D.T.L.; KIM, N.W. Efficient one-pot trans-dihydroxylation of 2 H-pyrans using dimethyldioxirane (DMD): synthesis of trans-3,4-dihydroxy-3,4-dihydro-O-methyloctandreolones, orixalone D, and trans-3,4-dyhydroxy-3,4-dihydromullugin natural products, **Shyntesis**. p.3026, 2005.

LOZANO G, MONTES DE OCA, LUNA R. MDM2 function. **Biochimica et Biophysica Acta** 1998; 1377:M55-99.

LU, Q-L et al. Expression of bcl-2 in bladder neoplasms in a cell lineage associated and p53-independent event. **Journal of Clinical Pathology- Molecular Pathology**, v. 50, p. 28-33, 1997.

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. M.; **The *Internacional Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2000, 32, 157**

MIYASHITA T, et al. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. **Cancer Research**, 1994;54:3131-35.

MOLL UM, SCHRAMM LM. p53--an acrobat in tumorigenesis. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**. 1998;9(1):23-37.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 319p.

OLIVEIRA, A.P.A. **Potencial metastático e reconhecimento da E-selectina em culturas e em tecidos colonizados pelo tumor ascítico de Ehrlich**. 2005. 81f. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C.A.; FAVARE, R.C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Erlich tumor growth. **Neurotoxicology and Teratology**, v.23, p.497-507, 2001.

PALERMO-NETO J.; MASSOCO, C.O.; SOUZA, W.R. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Erlich tumor growth. **Brain Behavior and Immunity**, v.17, p.43-54, 2003.

PINTO, F.C.H. **Possíveis mecanismos envolvidos na supressão do tumor de Erlich em camundongos com alergia alimentar**. Belo Horizonte: Escola de Medicina – UFMG, 2003. 91p. Tese de Doutorado (Área – Patologia).

PISSINATE, K. **Atividade citotóxica de *Piper Nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos**. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, 2006.110P.Dissertação de Mestrado.

POLVERINI, P. J.; NÖR, J. E. Apoptosis and predisposition to oral cancer. **Critical Reviews Oral Biology and Medicine**, v. 10, n.2, p. 139-152, 1999.

PRESCOTT, S. M. Is cyclooxygenase-2 the alpha and the omega in the cancer? **The Journal of Clinical Investigation**, v.105, n. 11, p. 1511-1513, 2000.

QUEIROGA, F. L.; PEREZ-ALENZA, M. D.; SILVAN, G.; PENA, L.; LOPES, C.; ILLERA, J. C. Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. **Anticancer Research**, v. 25, n. 6B, p. 4269-4275, 2005.

RABENHORST, S. H. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 40, n. 2, p. 141-147, 1994.

RICHARD, W. Epidemiologia, etiologia e saúde pública. In: ROSENTHAL, R.C. **Segredos em oncologia veterinária**. Porto Alegre: Artmed, p. 17-20, 2004.

RICHARDSON, R.C.; et al. Biologia dos Tumores. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina interna veterinária**. 4 ed. São Paulo: Manole, 1997. v.1, p.665-675.

SÀNCHEZ-BARCELÓ, E.J. et al. Melatonin and mammary câncer: a short review. **Endocrine-related cancer**. [S.l.], v.10, p.153-159, 2003.

SANTOS, J. A. **Patologia geral dos animais domésticos (Mamíferos e Aves)**. Interamericana, Rio de Janeiro, 1986. 409 p.

SATO, S. et al. Chemosensitivity and p53-dependent apoptosis in epithelial ovarian carcinoma. **Cancer**, v.86, n. 7, p. 1307-1313, 1999.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química nova**. v.29, p.407-413, 2003.

SILVA, T.M.; CAMARA, C.A.; BARBOSA, T.P.; SOARES, A.Z.; DA CUNHA, L.C.; PINTO, A.C.; VARGAS, M.D. Molluscicidal activity of syntethic lapachol amino and hidrogenated derivatives. **Bioorganic and Medicine Chemistry**, v.13, p.193-196, 2005.

SURH, Y. J.; CHUN, K. S.; CHA, H. H.; HAN, S. S.; KEUM, S. Y. ; PARK, K. K.; LEE. S. S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of antiinflammatory phytochemicals?

Down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. **Mutation Research**, v. 480-481, p. 243-268, 2001.

TORRES, S.M.; SILVA, E.C.S.; JIMENEZ, G.C.; SILVA NETO, J.F.; MAIA, F.C.L.; CÂMARA, C.A.; SILVA JÚNIOR, V.A. Avaliação de substâncias derivadas de quinonas em dosagem de aplicação única sobre inibição tumoral em Carcinoma de Ehrlich implantados em camundongos. In: **III Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana**, 2007.

TSUJII, M.; KAWANO, S.; TSUJI, S.; SAWAOKA, H.; HORI, M.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell**. V. 93, p. 705-716, 1998.

VERONESE, S. M.; GAMBACORTA, M. Detection of Ki-67 proliferation rate in breast cancer – correlation with clinical and pathologic features. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 95, p. 30-34, 1992.

WANG, W.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase-2 derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United State of America**, v. 101, n. 2, p. 415-416, 2004.

WILLIAMS, C. S.; TSUJII, M.; REESE, J.; DEY, S. D.; DUBOIS, R. N. Host cyclooxygenase 2 modulates carcinoma growth. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 11, p. 1589-1594, 2000.

WOLFESBERGER, B.; WALTER, I.; HOELZL, C.; THALHAMMER, J. G.; EGERBACHER, M. Antineoplastic effect of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on canine osteosarcoma cells. **Research in Veterinary Science**, n v. 80, n. 3, p. 308-316, 2006.

CAPÍTULO I

SÍNTESE E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE NOVAS AMINONAFTOQUINONAS

T A Pereira de Moraes³, M J Sarmiento Filha¹; C Amorim Camara¹; T M Sarmiento Silva¹; B Marques Soares²; I da Silva Bomfim²; C Pessoa², G Chaves Jimenez³; V A da Silva Junior³.

¹Departamento de Ciências Moleculares – UFRPE;

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC;

³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal-UFRPE

Autor para correspondência: Valdemiro Amaro da Silva Junior (vajunior@dmfa.ufrpe.br).

Palavras-chave: Aminoquinones; Naphthoquinones; Amino-acids; Cytotoxicity; Cancer cells; In vitro.

RESUMO

A citotoxicidade de 10 Amino-naftoquinonas (ANQ) foi avaliada nas linhagens celulares MDA-MB-435 (melanoma), SF-295 (cérebro) e HCT-8 (cólon), em todas as linhagens celulares de câncer humano, após 72 horas de incubação. Apenas as substâncias estudadas 2a, 9a, 6a, 5a e 7a tiveram citotoxicidade nas linhagens celulares testadas. Dentre estas, a amostra 7a foi a mais responsiva, evidenciando valores de IC₅₀ de 1.84 µg/mL para HCT-8, 1.33 µg/mL para MDA-MB-435 e 1.80 µg/mL na linhagem SF-295. Os mesmos compostos produziram uma inibição celular de 99.51 %, 100 % e 99.50 % para HCT-8, MDA-MB-435 e SF-295, respectivamente.

Palavras-chave: citotoxicidade; linhagens ; aminonaftoquinonas; *in vitro*

ABSTRACT

The cytotoxicity of ten amine-naphthoquinones (ANQ) was assayed against MDA-MB-435 (melanoma), SF-295 (brain) and HCT-8 (colon), all human cancer cell lines, as representatives of normal cells, after 72 h of incubation. Only the samples 2a, 9a, 6a, 5a and 7a showed cytotoxicity against cells lines tested. Between them, the 7a was the most active compound, showing IC₅₀ values in the range of 1.84 µg/mL to HCT-8, 1.33 µg/mL to MDA-MB-435 and 1.80 µg/mL in SF-295. The same compound produced a cellular inhibition range of 99.51 %, 100.11 % and 99.50 % against HCT-8, MDA-MB-435 and SF-295, respectively.

Key-words: Citotoxicity; lines; amine-naphtoquinones; *in vitro*

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as estimativas para os anos de 2012/2013 apontam que ocorrerão 518.510 novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, que é o tipo mais incidente para ambos os sexos (134 mil casos novos), seguido de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (1).

As quinonas e seus derivados são substâncias de ocorrência natural ou sintetizadas em laboratório (2). Suas fontes naturais mais frequentes são plantas superiores, artrópodes, fungos, líquens, bactérias, algas e vírus, com funções biológicas múltiplas em ciclos metabólicos os mais diversos destes organismos (3,4). Estas são classificadas de acordo com o sistema aromático presente em sua estrutura, tendo as naftoquinonas um anel naftalênico característico. Vários estudos têm relatado a importância da atividade antitumoral das naftoquinonas. Sendo responsáveis por uma significativa redução do crescimento celular em linhagens tumorais quando conjugadas a outros agentes (5).

O lapachol (2-hidroxi-3-(3-metilbutenil)-1,4-naftoquinona) é uma naftoquinona encontrada na casca e lenho da *Tabebuia sp* e *Tecoma sp*. Na casca ocorre em quantidades inferiores às do lenho. Tem atividades anti-inflamatória, analgésica, antimalárica, esquistossomicida, antiviral, tripanocida, leishmanicida, antifúngica, antiulcerantes e antineoplásica (6,7,8).

A β-lapachona, uma orto-naftoquinona, tem sido amplamente estudada principalmente por apresentar efeitos seletivos em linhagens tumorais quando comparados a linhagens normais. Vários mecanismos de ação das naftoquinonas se apresentam de forma dose e tempo-dependente. A

inibição do crescimento celular observada, pode ocorrer em função da indução da apoptose, inibição da topoisomerase II ou estresse oxidativo, entre outros (5). A ação inibitória sobre a α -polimerase do DNA, revelou-se específica, pois comparada com outros inibidores, a β -lapachona apresentou características distintas e ineditismo no seu modo de ação, o que confere a esta quinona um grande potencial como droga de valor para a quimioterapia de câncer, particularmente no câncer de próstata (3). Lee e colaboradores (9), demonstraram que a β -lapachona, presente na *T. avellanae*, foi capaz de diminuir a expressão da proteína e RNAm da COX-2 de maneira dependente da concentração. Além disso, a β -lapachona também inibiu a produção de PGE2 em células DU145 (linhagem celular de carcinoma prostático humano). Os autores sugeriram baseados nesses resultados, que a inibição da produção de PGE2 e expressão de COX-2 confirmam os resultados que a β -lapachona inibe o crescimento e induz a apoptose nessa linhagem celular de carcinoma prostático. Em um estudo sobre o mecanismo de ação da β -lapachona na atividade contra células e topoisomerasas de DNA, observou-se que esta substância é citotóxica contra várias células tumorais sensíveis e resistentes, incluindo-se células tumorais resistentes à ação da camptotecina. Este estudo revelou que a β -lapachona também age contra a topoisomerase II- α , via uma rota bioquímica independente de ATP, pelo aparecimento de formas reversíveis de complexos clivados (3).

As naftoquinonas foram descritas como responsáveis por uma significativa redução do crescimento celular em linhagens tumorais quando conjugadas a outros agentes, como o Tiosemicarbazone (NTQS) e seus complexos formados com metais. A citotoxicidade do NTQS associada ao cobre, por exemplo, mostrou ser maior que a do Etoposídeo, quimioterápico usado na clínica em humanos (10).

Vários estudos têm relatado a importância da atividade antitumoral das naftoquinonas. A β Lapachona destaca-se neste âmbito e sua atividade biológica justifica a continuidade dos estudos com naftoquinonas e seus derivados, como a 2-fenil- β Lapachona e ésteres de naftoquinonas, agentes ativadores do estresse oxidativo e inibidores de topoisomerase II, respectivamente (11,12).

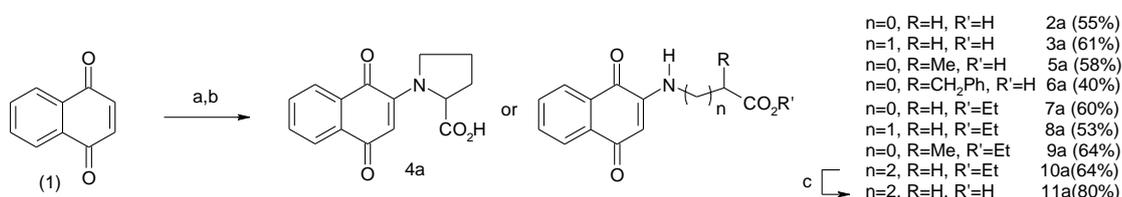
De todo modo, não se deve considerar a toxicidade elevada das quinonas como um fator limitante ao uso clínico. Novas expectativas colocam-se nos estudos futuros da relação atividade biológicas *versus* estrutura química, uma área de atuação aberta à química medicinal, que pode levar à solução de problemas de toxicidade (6).

A elevada incidência de câncer tem atingido diversos segmentos da sociedade, este fato pode estar correlacionado com as transformações sócio-econômicas e culturais observadas nos últimos anos. O câncer tem sido causa de elevado número de mortes, além de mutilações e incapacitações,

afetando consideravelmente a população (1). Com isso, este trabalho se propôs a testar uma série sintética de aminoácidos associada a uma naftoquinona no tratamento do câncer visando reduzir o tempo de tratamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os compostos foram obtidos através da 1,4-naphthoquinona comercialmente disponível (1) utilizando alfa-aminoácidos adequados num único recipiente através de processo Michael nucleofílico (Esquema 1) (13,14,15). Assim, os compostos 2-11a foram obtidos a partir do deslocamento direto com ester etílico do aminoácido adequado na presença de uma base, em solventes próticos e apróticos polares à temperatura ambiente (ver detalhes no experimento). Os rendimentos totais dos produtos obtidos variaram de 30-64%. Todos os compostos foram completamente identificados utilizando-se procedimentos convencionais de espectroscopia.



Scheme 1 - a) aminoacid, KOH(aq), NMP, r.t., 1-20h (2a-6a); b) amino acid ethyl ester hydrochloride, KOH (aq), MeOH-DMSO, r.t., 10 min (7a-10a) ; c) LiOH, THF(aq), 1h, r.t. (11a)

2.1 Experimento

Os espectros de NMR ¹H e ¹³C foram realizados num aparelho Varian Mercury-200, 300 and 400 MHz com solventes deutерados disponíveis comercialmente (Aldrich and LIC). Os valores dos desvios químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Os espectros no infravermelho (FT-IR) foram obtidos em um aparelho Bomem série MB-100 e espectrofotômetro Varian 640-IR. Os valores para as absorções são apresentados em números de onda, utilizando-se como unidade os centímetros recíprocos (cm⁻¹). O ponto de fusão foi levado, a cabo, a um aparelho Bio San PFM e não corrigido. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna de adsorção, utilizando gel de sílica 60 (230-400 mesh ASTM - Merck) como fase estacionária e solventes comerciais (Dynamic, Tedia) como fase móvel. A cromatografia analítica em camada fina (TLC) foi realizada utilizando sílica gel 60 placas (F254 - Merck). A visualização das substâncias foi feita em CCD com o auxílio da lâmpada de UV (254 and 365nm). As análises elementares foram realizadas em um analisador CA EA1110 CHNS-O.

2.1.1 Síntese

Procedimento geral para a preparação das estruturas moleculares 2a-6a.

Em um frasco de Erlenmeyer foi adicionado 14 mmol of 1,4-naftoquinona dissolvida em 20 ml of NMP e 15 mmol de aminoácido dissolvido em 10 ml de água a temperatura ambiente. O resultado da mistura foi imediatamente adicionado a uma solução agitada de 5 ml of 3N KOH. A mistura foi deixada sob agitação e a reação final inspecionada por TLC. Após filtrada em vácuo, a mistura foi acidificada através de solução de HCl (10%), e o precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com diclorometano pouco refrigerado.

2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetic acid 2a

Obtido como um sólido vermelho em 55% produz, mp¹ 168-170 °C IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3341, 1729, 1683, 1607, 1558, 1505, 1301; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): 12.43 (sl, 1H), 7.98 e 7.90 (dd, 2H, *J*=1.5/1.6 Hz), 7.82 (dd, 1H, *J*=1.2/7.5 Hz), 7.74 (dd, 1H, *J*= 1.5/7.5 Hz), 7.45 (t, 1H, N-H, *J*= 6.0 Hz), 5.62 (s, 1H), 3.98 (d, 2H, *J*= 6.0 Hz), ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): 181.7, 181.3, 170.2, 148.2, 134.9, 132.9, 132.4, 130.2, 125.9, 125.4, 100.7, 43.5.

Anal. Calcd. para C₁₂H₉NO₄: C, 62.34; H, 3.92; N, 6.02. Encontrado: C, 63.82; H, 5.44; N, 5.38.

3-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)propanoic acid 3a

Obtido como um sólido laranja em 61 % produz, mp 198-200 °C IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3446, 3390, 1718, 1670, 1592, 1560, 1512, 1251; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz) 12.43 (sl, 1H), 7.90 (dd, 2H *J*=7.5/7.2 Hz), 7.77 e 7.67 (dd, 2H *J*=7.5/7.5 Hz), 7.43 (t, 1H, N-H, *J*=5.7 Hz), 5.67 (s, 1H), 3.37 (m, 2H), 2.59 (t, 2H, *J*=6.9 Hz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): 181.4, 172.8, 148.3, 134.8, 133.1, 13.2, 130.3, 125.9, 125.4, 99.7, 37.9, 32.2.

Anal. Calcd. para C₁₃H₁₁NO₄ (H₂O): C, 63.67; H, 4.52; N, 5.71. Encontrado: C, 58.89; H, 5.37; N, 5.28.

1-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)pyrrolidine-2-carboxylic acid 4a

Obtido como um sólido laranja em 58 % produz, mp 164-167°C. IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1724, 1678, 1590, 1541, 1475. 1296; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): 12.43 (sl, 1H), 7.90 (d, 2H, *J*=6.6 Hz), 7.71 (dd, 1H, *J*=7.6/7.2 Hz) , 7.80 (dd, 1H, *J*=7.6/7.2 Hz), 5.74 (s, 1H), 4.98 (m, 1H), 3.34 (m, 2H),

2.27 (m, 1H), 2.0 (m, 1H), 1.95 (m, 1H), 1.88 (m, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): 182.6, 181.1, 173.3, 148.7, 134.3, 132.3, 132.2, 131.2, 126.1, 124.7, 104.8, 62.4, 50.9, 30.9, 21.8.

Anal. Calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_4$: C, 66.41; H, 4.83; N, 5.16. Encontrado: C, 66.14; H, 4.85; N, 5.35.

2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)propanoic acid 5a

Obtido como um sólido laranja em 58 % produz, mp 148-150°C. IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3356, 1722, 1681, 1604, 1556, 1450, 1302; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) 13.14 (s, 1H), 7.98 (dd, 2H $J=7.5/7.2$ Hz), 7.90 (dd, 2H $J=7.5/7.2$ Hz), 7.81 (dd, 2H $J=7.5/7.2$ Hz), 7.72 (dd, 2H $J=7.5/7.2$ Hz), 7.27 (d, 1H, N-H, $J=7.5$ Hz), 5.65 (s, 1H), 4.21 (q, 1H $J=7.2$ Hz), 1.45 (d, 3H $J=7.2$ Hz); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) 181.7, 181.3, 173.1, 147.4, 134.9, 132.7, 132.4, 130.2, 126.0, 125.4, 100.9, 50.1, 16.7.

Anal. Calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_4$: C, 63.67; H, 4.52; N, 5.71. Encontrado: C, 61.75; H, 4.70; N, 5.70.

2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)-3-phenylpropanoic acid 6a

Obtido como um sólido laranja em 60 % produz, mp 128-130 ° C, IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3338, 3066, 3032, 1722, 1681, 1598, 1556, 1503, 1305; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) 7.93 (m, 1H), 7.79 (m, 1H), 7.69 (m, 1H), 7.23 (m, 2H), 7.16 (m, 2H), 7.05 (d 1H, N-H, $J=6.3$ Hz), 5.72 (s, 1H), 3.21 (m), 4.48 (q, 1H, $J=7.2$ Hz); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) 181.7, 181.1, 171.7, 147.3, 136.8, 134.9, 132.6, 132.4, 130.0, 129.2, 128.2, 126.6, 125.9, 125.3, 101.1, 55.5, 35.7.

Procedimento geral para a preparação das estruturas moleculares 7a-10a.

Em um frasco de Erlenmeyer foi adicionado 14 mmol of 1,4-naftoquinona dissolvida em 20 ml de DMSO e 15 mmol de ethyl ester amino acid hydrochloride dissolvido em 10 ml de água em temperatura ambiente. O resultado da mistura foi imediatamente adicionado a uma solução agitada de 5 ml of 3N KOH. A mistura foi deixada sob agitação e a reação final inspecionada por TLC. Após filtrada em vácuo, a mistura foi acidificada através de solução de HCl (10%), e o precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com água pouco refrigerada.

ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate 7a

Obtida como amarelo sólido em 30 % produz, mp 93-95°C IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3391, 3050, 2924, 1732, 1673, 1643, 1611, 1222; ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): 8.04 (m, 2H), 7.69 (dd, 1H $J=1.4/7.5$ Hz), 7.59 (dd, 1H $J=1.2/7.5$ Hz), 6.37 (s, 1H N-H), 5.62 (q, 2H), 3.90 (d, 2H $J=5.0$ Hz), 4.20 (q, 2H $J=7.0$ Hz), 1.30 (t, 3H $J=7.0$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) 183.1, 181.1, 168.2, 147.1, 134.7, 133.2, 132.2, 130.3, 129.2, 126.3, 126.1, 102.0, 62.0, 43.8, 14.1.

Anal. Calcd. for C₁₄H₁₃NO₄: C, 64.86; H, 5.05; N, 5.40. Encontrado: C, 63.77; H, 5.21; N, 4.15.

ethyl 3-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)propanoate 8a

Obtida como um sólido laranja em 53 % produz, mp 65-68°C. IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3374, 3355, 3062, 2999, 1730, 1680, 1629, 1607, 1221; ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) 8.04 (m, 2H), 7.69 (dd, 1H, *J*=1.4/7.5 Hz), 7.59 (dd, 1H *J*=1.2/7.5 Hz), 6.30 (s, 1H, N-H), 4.22 (q, 2H *J*=7.2 Hz), 4.04 (t, 1H *J*=7.2 Hz), 1.48 (d, 2H *J*=6.8 Hz), 1.25 (t, 3H *J*=7.2 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) 183.1, 181.3, 171.5, 146.5, 134.6, 133.1, 132.1, 130.3, 126.3, 126.0, 101.8, 61.9, 50.4, 42.5, 17.4, 14.0.

Anal. Calcd. for C₁₅H₁₅NO₄: C, 65.92; H, 5.53; N, 5.13. Encontrado: C, 65.78; H, 5.76; N, 4.89.

ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)propanoate 9a.

Obtida como um sólido laranja em 64 % produz, mp 120-122°C. IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3340, 2921, 1728, 1670, 1624, 1598, 1467, 1188; ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) 8.02 (m, 2H), 7.69 (dd, 1H *J*=1.6/7.4 Hz), 7.57 (dd, 1H *J*=1.0/7.6 Hz), 6.22 (s, 1H, N-H), 4.15 (q, 2H *J*=7.0 Hz), 3.50 (q, 2H *J*=6.2 Hz), 2.64 (t, 3H *J*=6.4 Hz), 1.24 (t, 3H *J*=7.0 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): 182.9, 181.4, 171.1, 147.6, 134.7, 133.3, 132.0, 130.4, 126.3, 126.1, 100.7, 61.0, 37.9, 32.6, 14.1.

Anal. Calcd. for C₁₅H₁₅NO₄: C, 65.92; H, 5.53; N, 5.13. Encontrado: C, 65.32; H, 5.80; N, 4.89

ethyl 4-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)butanoate 10a

Obtida como um sólido laranja em 64 % produz, mp 120-122°C. IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3335, 2717, 2637, 1694, 1671, 1618, 1595, 1465; ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) 8.03 (m, 2H), 7.69 (dd, 1H *J*=1.6/7.4 Hz), 7.57 (dd, 1H *J*=1.6/7.6 Hz), 6.13 (s, 1H, N-H), 4.15 (q, 2H *J*=7.0 Hz), 3.24 (m, 2H), 2.41 (t, 2H *J*=7.2 Hz), 1.99 (quinteto, 2H, *J*=7.0 Hz); 1.23 (t, 3H, *J*=7.0 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz): 182.8, 181.6, 172.8, 148.0, 134.7, 133.4, 132.0, 130.3, 126.3, 126.1, 100.7, 60.7, 42.0, 31.6, 23.1, 14.1.

Anal. Calcd. for C₁₅H₁₅NO₄: C, 66.89; H, 5.96; N, 4.88. Encontrado: C, 65.71; H, 6.24; N, 4.77

4-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)butanoic acid 11a.

Para a mistura de 30 mg de LiOH, 2 mL de THF e 0.5ml de água foi adicionada 100 mg do éster **10a**. A mistura foi agitada em temperatura ambiente e inspecionados com TLC até o completo desaparecimento do éster **10a**. A mistura foi filtrada á vácuo, acidificada com 10% HCl e filtrada como um sólido laranja amorfo em 80% produz, mp 210-212 ° C, IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3335. 2717, 2637, 1694, 1671, 1618, 1595, 1296; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) 12.17 (sl, 1H), 7.94 (m, 2H), 7.8

(m, 1H), 7.67 (m, 1H), 5.7 (s, 1H), 3.2 (q, 2H $J=7.2$ Hz), 1.78 (quinteto, 2H $J=7.2$ Hz), 2.30 (t, 2H $J=7.2$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): 181.5, 181.3, 174.3, 148.6, 134.8, 133.2, 132.1, 130.4, 125.8, 125.3, 99.3, 41.2, 30.6, 22.6.

Anal. Calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ (H_2O): C, 64.86; H, 5.05; N, 5.40. Encontrado: C, 61.14; H, 5.63; N, 4.73

2.2 Citotoxicidade frente as células de linhagens cancerígenas

No presente experimento foi avaliada a citotoxicidade *in vitro* de substâncias contendo no núcleo principal a naftoquinona e diferentes associações com aminoácidos (aminoquinonas) em 3 linhagens de células tumorais. Essa análise faz parte de um *screening* inicial para determinação do potencial antitumoral destas amostras.

As linhagens tumorais utilizadas, SF-295 (glioblastoma - humano), MDAMB-435 (melanoma) e HCT-8 (colon) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . As diferentes amostras de aminoquinonas foram diluídas em DMSO puro estéril. As substâncias foram testadas na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para determinação da CI_{50} , as amostras foram testadas em concentrações crescentes em diluição seriada.

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (16). Foi descrita primeiramente por Mosman (17), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (18).

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para as linhagens SF-295 e MDA-MB435 e $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-8. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 μL da solução de MTT (sal de

tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 μ L de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

4. RESULTADOS

A atividade citotóxica das amostras está apresentada na **Tabela 1**, com seus respectivos percentuais de inibição.

Tabela 1 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais. Valores estão expressos em média \pm DPM.

Amostra		HCT-8	GI%	MDA-MB-435	GI%	SF-295	GI%
Nº	Identificação	média	SD	média	SD	média	SD
1	2 a	81.65%	3.15%	100%	0.06%	81.13%	3.26%
2	3 a	56.04%	0.54%	26.36%	33.11%	55.95%	0.15%
3	4 a	59.06%	57.01%	36.74%	70.56%	59.33%	56.49%
4	9 a	75.36%	0.15%	100%	0.22%	75.07%	0.20%
5	8 a	28.17%	17.64%	11.67%	53.27%	32.71%	17.12%
6	6 a	86.13%	2.41%	100%	0.09%	86.06%	2.60%
7	5 a	84.08%	1.18%	100%	0.12%	83.79%	1.12%
8	10 a	49.57%	7.03%	59.11%	12.59%	49.21%	6.52%
9	7 a	99.51%	1.28%	100%	0.15%	99.50%	1.22%
10	11 a	61.36%	8.94%	11.13%	36.74%	61.21%	8.61%

No que se refere a linhagem tumoral HCT-8 as amostras (**7 a**), (**6 a**), (**5 a**), (**2 a**) e (**9 a**) apresentaram os maiores percentuais médios de inibição de crescimento tumoral. Dentre estas amostras a (**7 a**) apresentou maior percentual médio (99,51%) de inibição de crescimento tumoral, sendo 13% mais eficiente do que a amostra (**6 a**), a qual apresentou um percentual médio de inibição tumoral de 86,13%, seguida da amostra (**5 a**) (84,08%) e (**9 a**) (75,36%). Dentre as dez

amostras analisadas a amostra (**8 a**) apresentou menor percentual médio de inibição de crescimento tumoral, sendo 50% inferior a amostra mais eficiente (**7 a**). Em se tratando da linhagem tumoral MDA-MB-435, as amostras (**2 a**), (**6 a**), (**5 a**), (**9 a**) e (**7 a**) foram as que apresentaram os maiores percentuais de inibição de crescimento tumoral. Por outro lado, a amostra (**8 a**) apresentou menor percentual médio de inibição de crescimento tumoral (11,13%).

No que diz respeito a linhagem de células tumorais SF-295, a amostra (**7 a**) apresentou um percentual médio de inibição de crescimento tumoral de 99,50%, sendo 13% mais eficiente do que a amostra (**6 a**), 16% mais eficiente do que a amostra (**5 a**), 18% mais eficiente do que a amostra (**2 a**) e 24% mais eficiente do que a amostra (**9 a**). Em contrapartida, a amostra (**8 a**) foi a que apresentou menor percentual médio de inibição de crescimento tumoral (32,71%).

A concentração inibitória de 50% das células (CI₅₀) das substâncias ativas está apresentada na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Citotoxicidade (CI₅₀) das amostras em três linhagens tumorais. Os valores são apresentados em µg/mL (micromolar) e respectivos intervalos de confiança.

Amostras	HCT-8	MDA-435	SF-295
2 a	0.89 (3.84) (0.81 a 0.99)	1.21 (5.23) (0.87 a 1.69)	2.36 (10.20) (1.48 a 3.73)
9 a	1.33 (4.86) (0.86 a 2.07)	1.18 (4.31) (0.88 a 1.60)	1.81 (6.62) (1.41 a 2.35)
6 a	1.59 (4.94) (1.19 a 2.14)	1.46 (4.54) (1.14 a 1.88)	2.37 (7.37) (1.60 a 3.48)
5 a	0.83 (3.38) (0.71 a 0.96)	0.49 (1.99) (0.42 a 0.58)	2.175 (8.86) (1.93 a 2.44)
7 a	1.84 (7.09) (1.64 a 2.06)	1.33 (5.12) (1.05 a 1.169)	1.80 (6.94) (1.39 a 2.33)

Baseado na linhagem tumoral HCT-8, a amostra (**7 a**) foi a que apresentou maior média de citotoxicidade (1,84 µg/mL), sendo 13% mais citotóxica do que a segunda amostra mais citotóxica para esta linhagem celular (**6 a**). Por outro lado, as amostras que apresentaram menor citotoxicidade para a referida linhagem tumoral foram a (**2 a**) (0,89µg/mL) e (**5 a**) (0,83µg/mL), sendo 51% e 54%, respectivamente, menos citotóxicas do que a amostra mais citotóxica (**7 a**).

5. DISCUSSÃO

Em um determinado experimento, a Biflorina, uma naftoquinona típica isolada da *Capraria biflora* L., inibiu a proliferação de cinco linhagens celulares, com maior intensidade em células tumorais HCT-8 (19). No que diz respeito a linhagem tumoral MD-435, as amostras (6 a) e (7 a) apresentaram maior citotoxicidade, com média de 1,46 e 1,33 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, enquanto que a amostra (5 a) apresentou-se menos citotóxica para esta linhagem tumoral. Montenegro (20) avaliou a atividade citotóxica de 9 naftoquinonas em cinco linhagens tumorais, obtendo uma variação de 3,8 a 28,7 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem MD-435. Baseado nos dados coletados, o IC₅₀ médio das amostras (6 a) (2,37 $\mu\text{g/mL}$) e (2 a) (2,36 $\mu\text{g/mL}$) apresentou-se mais elevado frente a linhagem tumoral SF-295. Por outro lado, a amostra (7 a) obteve um IC₅₀ que variou entre 1,39 a 2,33, sendo a menor média dentre as amostras analisadas (1,80 $\mu\text{g/mL}$). As cardioquinonas, isoladas das raízes da *Cordia polycephala*, foram submetidas a análise citotóxica frente a cinco linhagens de células cancerígenas, obtendo uma fraca atividade citotóxica frente as células cancerígenas SF-295 (15 $\mu\text{mol L}^{-1}$)[21]. Silva Jr. (22) demonstrou várias naftoquinonas com atividade fina (IC₅₀ inferior a 2 μM) em relação as mesmas linhagens celulares de câncer utilizadas neste estudo, incluindo alguns compostos a base de β -lapachona. Os nossos resultados demonstraram o potencial de 10 aminoácidos sintéticos associados a uma naftoquinona em células de linhagens cancerígenas humana. Somente 5 amostras (2a, 9a, 6a, 5a e 7a) mostrou citotoxicidade frente as células testadas. Entretanto, o mecanismo de ação de inibição de crescimento, juntamente com a relação estrutura-atividade de amino-naftoquinonas continua a ser o foco de nossas investigações.

6. AGRADECIMENTOS

O apoio financeiro da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Fundação de Amparo á Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, APQ 1232-1.06/10 PRONEM) e Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Tecnológico (CNPQ). Agradecemos também a Central Analítica da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CENAPESQ) e a Universidade Federal do Ceará.

7. REFERÊNCIAS

1. Paula CC de, Mutti CF, Padoin SMM et al. Palliative care in cancer: literature review article. **Journal of Nursing UFPE on line**. 2013; 7(1):246-61.
2. Kumagai Y, Shinkai Y, Miura T, Cho AK. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, 2012; 52:221–47.
3. Camara CA, Silva TMS, Barbosa TP, Silva TG, Martins RM, Vargas MD et al. Molluscicidal Activity of 2-hidroxy-[1,4]-naphthoquinone and derivatives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 2008; 80: 329-334.
4. Oliveira MF, Lemos TLG, de Mattos MC, Segundo TA, Santiago GMP, and Braz-Filho, R. New enamine derivatives of lapachol and biological activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2002; 74: 211-221
5. Li CJ, Li YZ, Pinto AV, and Pardee AB. Potent inhibition of tumor survival in vivo by b-lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A** 1999; 96:(23):13369–13374.
6. Silva MN, Ferreira VF, Souza M. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Quim Nova** 2003; 29: 407-413.
7. Li Y, Sun X, La Mont JT, Pardee AB, Chiang J.Li. Selective killing of cancer cells by β -lapachone: Direct checkpoint activation as a strategy against cancer Combining drugs imposes different artificial checkpoints. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A**, 2003; 100:(5): 2674–2678.
8. Silva TM, Camara CA, Barbosa TP, Soares AZ, Da Cunha LC, Pinto AC et. al. Molluscicidal activity of syntethic lapachol amino and hydrogenated derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2005;13: 193-196.

9. Lee YR, Choi JH, Trinh DTL, Kim, NW. Efficient one-pot trans-dihydroxylation of 2 H-pyrans using dimethyldioxirane (DMD): synthesis of trans-3,4-dihydroxy-3,4-dihydro-O-methyloctandreolones, orixalone D, and trans-3,4-dyhydroxy-3,4-dihydromullugin natural products. *Synthesis* 2005; 3026.
10. Chen J, Huang Y, Liu G, Afraziab Z, Sinn E, Padhye S et. al. The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004;197: 40-48.
11. Kongkathip N, Kongkathip B. Siripong P. Sangma C. Luangkamin S, Niyomdecha M et al. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2003; 11: 3179-3191.
12. Kongkathip N, Luangkamin S, Kongkathip B, Sangma C, Grigg R, Kongsaree P et al. Synthesis of novel rhinacanthins and related anticancer naphthoquinone esters. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004; 47 :4427-4438.
13. Bittner S, Gorohovsky S, Lozinsky E, Shames AI. **EPR study of anion radicals of various N-quinonyl amino acids.** *Amino Acids* 2000: 439-449.
14. Shresta-Dawadi PB, Bittner S, Fridkin M, Rahimipour S. On the Synthesis of Naphthoquinonyl Heterocyclic Amino Acids. *Synthesis* 1996; 16:1468-1472.
15. Bittner S, Gorohovsky S, Paz-Tal O, Becker JY. Synthesis, electrochemical and spectral properties of some omega-N-quinonyl amino acids. *Amino Acids* 2002; 22: 71-93.
16. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, P.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 1990; 82: 1107-1112.
17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 1983; 65: 55-63.

18. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 1996; 4: 14–19.
19. Vasconcelos MC, Montenegro RC, Militao GCG, Fonseca AM, Pessoa OD, Lemos TLG et al. Bioactivity of biflorin, a typical *O*-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*, *Zeitschrift für Naturforsch* 2005; 60: 394-398.
20. Montenegro RC, Araújo AJ, Molina MT, Marinho Filho JD, Rocha DD, López-Montero E et al. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative. *Chemico- Biological Interactions*, 2010: 439-448.
21. Freitas H P, Maia A I, Silveira E R, Marinho Filho J D., Moraes M O, Pessoa C, Costa Lotufo L V, Pessoa O D L. Cytotoxic Cordiaquinones from the Roots of *Cordia polycephala*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2012 23: 1558-1562.
22. Silva Jr. EN, Cavalcanti BC, Guimarães TT, Pinto MCFR, Pessoa C, Costa-Lotufo LV et al. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011: 399-410.

Capítulo II

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA AMINOQUINONA ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATO EM CAMUNDONGOS

T A Pereira de Moraes³, M J Sarmento Filha¹; C Amorim Camara¹; T M Sarmento Silva¹; C Pessoa², G Chaves Jimenez³; V A da Silva Junior³.

¹Departamento de Ciências Moleculares – UFRPE;

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC;

³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal-UFRPE

Autor para correspondência: Valdemiro Amaro da Silva Junior (vajunior@dmfa.ufrpe.br).

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo determinar os efeitos da toxicidade aguda e o limiar de segurança sobre o organismo do animal da amino-naftoquinona sintética ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, administrada em dose única e diferentes concentrações. 30 camundongos (*Mus musculus*, albinus Swiss) machos foram divididos de acordo com a dosagem: Grupo I (tratados com 100µg/Kg da aminoquinona (n = 8)); Grupo II (tratados com 200µg/Kg de aminoquinona (n = 8)); Grupo III (tratados com 300µg/Kg de aminoquinona (n = 8)); Grupo IV (tratados com 600µg/Kg de aminoquinona (n = 6)). Os animais foram mantidos em jejum alimentar de 6 horas e posteriormente tratados por via intraperitoneal com a amino-naftoquinona, de acordo com as doses estipuladas. Após administração das doses experimentais, os animais foram avaliados por 100 minutos ininterruptos, e posteriormente a cada 24 horas, afim de caracterizar o comportamento dos animais através dos sinais clínicos expressos. Após avaliação toxicológica da aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE através da análise de atividade espontânea constatou-se efeito depressor sobre o SNC numa relação dose-resposta direta. O cálculo da DL₅₀ para substância teste demonstrou baixos níveis de toxicidade em dosagens inferiores a 244,1125 ± 23,2883 mg.Kg⁻¹.

Palavras chaves: Toxicidade, amino-naftoquinonas, comportamento espontâneo, camundongos.

ABSTRACT

This study aimed to determine the toxic effects and the safety threshold on the organism of synthetic amino-naphthoquinone ETHYL 2 - (1,4-dioxo-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-ylamino) ACETATE, administered in a single dose and different concentrations. 30 mice (*Mus musculus*, Swiss albinos) males were divided according to dose: Group I (treated with the 100µg/Kg aminoquinona (n = 6)), Group II (treated with 200µg/Kg of aminoquinona (n = 6)), Group III (300µg/Kg of aminoquinona treated (n = 6)), Group IV (treated with 600µg/Kg of aminoquinona (n = 6)). The animals were food fasted 6 hours and then treated intraperitoneally with the amino-naphthoquinone according to the prescribed dose. After administration of the experimental doses, the animals were evaluated for 180 uninterrupted minutes, and then every 24 hours in order to characterize the behavior of animals through clinical signs expressed. After toxicological evaluation of aminoquinona ETHYL 2 - (1,4-dioxo-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-ylamino) ACETATE through analysis of spontaneous activity was found depressing effect on the CNS in a dose-response relationship directly. The calculation of the LD50 test substance showed low levels of toxicity at doses less than $244.1125 \pm 23.2883 \text{ mg.Kg}^{-1}$.

Keywords: Toxicity, amino-naphthoquinones, spontaneous behavior, mice.

1. INTRODUÇÃO

As quinonas e seus derivados são substâncias de ocorrência natural ou sintetizadas em laboratório (TORRES et al., 2007). Suas fontes naturais mais frequentes são plantas superiores, artrópodes, fungos, líquens, bactérias, algas e vírus, com funções biológicas múltiplas em ciclos metabólicos os mais diversos destes organismos (CAMARA et al, 2007). Estas são classificadas de acordo com o sistema aromático presente em sua estrutura, tendo as naftoquinonas um anel naftalênico característico. Vários estudos têm relatado a importância da atividade antitumoral das naftoquinonas. Sendo responsáveis por uma significativa redução do crescimento celular em linhagens tumorais quando conjugadas a outros agentes (ARÊAS, 2007).

As quinonas representam uma classe que pode causar uma variedade de efeitos perigosos *in vivo*, incluindo a citotoxicidade aguda, imunotoxicidade e carcinogênese. Os mecanismos pelos quais as quinonas causam esses efeitos são bastante complexos. As quinonas podem causar lesão celular por meio de alquilação de proteínas celulares ou de DNA. Alternativamente, as quinonas podem formar espécies de oxigênio reativo (ROS), incluindo superóxido, peróxido de hidrogênio e, finalmente, o radical hidroxila. A produção de ROS pode causar stress oxidativo dentro das células através da formação de macromoléculas oxidadas, incluindo lipídios, proteínas e DNA. A formação de bases oxidativamente danificadas, tais como 8-oxodeoxiguanosina tem sido associada com envelhecimento e carcinogênese (BOLTON et.al., 2000).

A toxicologia experimental desenvolve estudos para elucidação dos mecanismos de ação dos agentes tóxicos sobre sistemas biológicos e a avaliação dos efeitos decorrentes desta ação (OGA, 1996). Os estudos toxicológicos, aplicados em animais de laboratório e sob condições previamente estabelecidas, permitem determinar os possíveis efeitos de substâncias em humanos ou animais expostos às mesmas (BARROS e DAVINO, 1996).

Ensaio de avaliação toxicológica compreendem a execução de protocolos experimentais no intuito de antever eventuais efeitos tóxicos das substâncias químicas. Quanto maior o número de parâmetros orgânicos monitorados melhor será a avaliação no que diz respeito ao fornecimento de dados possibilitem maior segurança na utilização do fármaco (ALMEIDA, 2006).

A avaliação da atividade espontânea de animais submetidos a teste toxicológico é um recurso experimental importante para se avaliar o elenco de respostas possíveis em camundongos estimulados com substratos específicos. Praticamente para cada tipo de resposta obtida, pode-se associar pelo menos um sítio endógeno que pode estar sendo afetado por algum componente químico presente neste substrato (ANDREATINI et al., 2006).

Baseado nisso, este trabalho objetivou a caracterização dos efeitos tóxicos da associação de derivados sintéticos aminoquinona através do tratamento em dose única em diferentes concentrações, Determinar um limiar de segurança do agente químico sobre o organismo animal, bem como analisar macroscopicamente os sinais clínicos decorrentes da aplicação da droga, acompanhando-os por 72 h.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 TESTE TOXICOLÓGICO

Para se determinar a toxicidade aguda foram utilizados 30 camundongos (*Mus musculus*), variedade Albino swiss, machos, com oito semanas de idade, pesando entre 45-55g, provenientes do biotério do Lanagro (Laboratórios nacionais agropecuários) de Pernambuco, pertencente ao MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato, forradas com maravalha de pinus; mantidas em temperatura ambiente de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; expostos a fotoperíodo de 12 horas de luz (400Lux) por 12 horas de escuridão; com acesso a água e ração (Labina para roedores – Purina), *ad libitum*.

Foi realizado um estudo da toxicidade aguda a fim de observar as lesões ocasionadas pelo fármaco e definir as doses terapêuticas a testadas.

Os grupos experimentais respeitaram um arranjo logarítmico de doses ordem, a fim de buscar a concentração que provocou as maiores lesões sobre os órgãos vitais dos animais. Para tal, respeitou-se a seguinte seqüência: Grupo I (tratados com $100\mu\text{g}/\text{Kg}$ da aminoquinona ($n = 8$)); Grupo II (tratados com $200\mu\text{g}/\text{Kg}$ de aminoquinona ($n = 8$)); Grupo III (tratados com $300\mu\text{g}/\text{Kg}$ de aminoquinona ($n = 8$)); Grupo IV (tratados com $600\mu\text{g}/\text{Kg}$ de aminoquinona ($n = 6$)); de acordo Ishiki, et al (2004).

Os grupos experimentais foram deixados em jejum alimentar de 6 horas e, passado este período, os animais foram tratados por via intraperitoneal, de acordo com as doses estipuladas. Após administração da dose experimental, os animais foram colocados em gaiolas maiores, onde permaneceram por 5 minutos, para descartar qualquer estresse da manipulação e permitir a exploração do novo ambiente, passado este tempo os animais ficaram sob observação inicialmente de 180 minutos ininterruptos, e posteriormente com 24, 48 e às 72h da aplicação, a fim de caracterizar o comportamento dos animais através dos sinais clínicos expressos pelo efeito tóxico da substância química. Passado o tempo de experimentação os animais foram submetidos aos

procedimentos de eutanásia, utilizando dose letal de anestesia dissociativa via intramuscular (quetamina $80\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e xilazina $60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) (MASSONE, 2008)

2.2 AVALIAÇÃO DOS ACHADOS CLÍNICOS

Os animais foram avaliados, em atividade espontânea, quanto aos seguintes parâmetros comportamentais: abaixamento de membro posterior, agitação, apatia, tranquilidade, sibilos, coceira, congestão auricular, contorção, depressão, diurese, edema de focinho, ereção de cauda, excreção fecal, exoftalmia, fotofobia, isolamento, inversão de marcha, movimento circular, movimento estereotipado, movimento de vibrissas, ondulação de cauda, palidez, petéquias na cauda, pilo ereção, postura de ataque, postura em garra, postura estática, reação de fuga, refluxo, relaxamento do testículo, saltos, taquicardia, taquipnéia, e tremores finos. Os parâmetros foram categorizados em intensidade, distribuídos em tabela e avaliados estatisticamente. Foi também representado, em forma de gráfico, a relação dose/resposta através de uma curva sigmóide (OGA, 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 pode ser visualizado o total de respostas comportamentais espontâneas observadas em vários ensaios de 100 min de observação contínua, em camundongos estimulados com a substância sintética denominada de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, em diferentes doses, tomando-se como referência os descritores encontrados nos trabalhos de Malone (1983), Lapa (2005) e Almeida (2006). Nesta tabela pode-se verificar que a quantidade de respostas observadas tende a aumentar com o aumento da dose, embora em praticamente todas as dosagens empregadas a quantidade de respostas associadas aos efeitos excitatórios sobre o sistema nervoso central – SNC foi maior, embora também tenham sido observadas respostas depressoras sobre o SNC, principalmente com $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; como também respostas sobre o sistema nervoso autônomo – SNA e outras respostas não enquadradas no sistema classificatório empregado. Isto, de certa forma permite caracterizar esta substância, em termos gerais, como estimulante do SNC.

As principais respostas comportamentais podem ser visualizadas na tabela 2. Nesta tabela pode-se observar que algumas respostas comportamentais não são observadas nos animais com doses mais elevadas, como é o caso da vocalização exibida com o emprego de uma dose de $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, não sendo observado este comportamento com uma dose maior de $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. A sensibilidade ao

som ambiente também foi observada com a dose 300mg.kg^{-1} , mas numa dosagem maior de 600mg.kg^{-1} este comportamento não foi observado. A partir disto, se verifica como são complexas as respostas individualizadas de cada organismo mesmo quando submetido ao mesmo tipo de estímulo, sem considerar outros fatores como liderança no grupo, estado de maturação, competência metabólica.

Tabela 1. Total de respostas comportamentais observadas em camundongos estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, nas doses de 100mg.kg^{-1} , 200mg.kg^{-1} , 300mg.kg^{-1} e 600mg.kg^{-1} , durante um período de 100 min contínuos, sob condição de atividade espontânea, considerando-se efeitos excitatórios e depressores sobre o SNC, sobre o SNA e outros efeitos.

Efeitos	DOSES			
	100mg.kg^{-1}	200mg.kg^{-1}	300mg.kg^{-1}	600mg.kg^{-1}
Excitatórios sobre o SNC	8	5	14	18
Depressores sobre o SNC	6	6	9	15
Sobre o SNA	2	3	6	6
Outros	0	1	1	3
Total	16	15	30	42

Tabela 2. Principais respostas comportamentais observadas em camundongos estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE, nas doses de 100mg.kg^{-1} , 200mg.kg^{-1} , 300mg.kg^{-1} e 600mg.kg^{-1} , durante um período de 100 min contínuos, sob condição de atividade espontânea. Destaque sobre os efeitos excitatórios e depressores do SNC (Sistema Nervoso Central), efeitos sobre o SNA (Sistema Nervoso Autônomo) e outros efeitos.

	DOSES			
	100mg.kg^{-1}	200mg.kg^{-1}	300mg.kg^{-1}	600mg.kg^{-1}
ESTIMULATÓRIAS				
DO SNC				
Atividade exploratória	Atividade exploratória	Atividade exploratória	Atividade exploratória	Pavilhão auricular armado
Contração abdominal				
Espasmos	Espasmos	Espasmos	Espasmos	Espasmos
Tremores no corpo		Cauda paralela		Saltos

Lambendo a pata	Auto Limpeza	Coçando o focinho	Andando aos saltos
Vocalização		Lamber o local de aplicação	Cauda serpenteando
Postura em garra		Tremores finos Pavilhão auricular armado	Tremores de cabeça
		Farejar o ambiente	Cauda paralela Sensibilidade aumentada ao pinçamento
		Coceira na cabeça	Coçando o focinho
		Postura em garra	Coçando o pavilhão auricular
		Sensibilidade sonora	Contração do diafragma
		Coçar local de aplicação	Atividade exploratória
		Sensibilidade ao toque da cauda	Coçando a cabeça
			Coçou o membro anterior
			Tremores no corpo
			Movimento pavimento auricular
			Arrepios

100mg.kg⁻¹

200mg.kg⁻¹

300mg.kg⁻¹

600mg.kg⁻¹

**DEPRESSORAS
DO SNC**

Ptose 1	Analgesia na cauda	Recolhimento	Perda do equilíbrio postural
Ptose 0	Ptose 0	Caminhar arrastando a cauda	Recolhimento
Sedação	Ptose 1	Sedação	Ptose 1
Analgesia	Sedação	Caminhar com dorso erguido	Hipnose
Aglomerados		Caminhar arrastando o trem posterior	Caminhando com cauda arrastada
Andar rastejante		Cauda em Straub	Analgesia
		Ptose 0	Por pinçamento
		Ptose 1	Caminhando com dorso elevado
		Agrupamento	Ptose 0
			Deitando apoiando o corpo

Agrupamento
Desorientação
Tombando para a
esquerda
Cauda em Straub
Arriou o ter
posterior
Sedação

EFEITOS SOBRE SNA

Piloereção Solado hiperêmico	Ação mictória Piloereção	Taquipneia Defecação Pavilhão auricular hiperêmico Cauda hiperêmica Solado posterior hiperêmico	Aurícula hiperêmica Taquipneia
Micção	Taquipneia	Piloereção Cauda hiperêmica Solado posterior hiperêmico Piloereção	Piloereção Hipotermia de cauda Defecação Edemaciamento do focinho Micção

OUTRAS RESPOSTAS

Prurido	Lambendo a pata	Cauda hiperêmica (rosada)	Soluço
-	Andar Rastejante		Cabeça rosada
-	Aglomerados		Prurido
-	Prurido		

Tomando-se como referência os trabalhos de Malone (1983), Lapa (2000) e Almeida (2006), procurou-se acrescentar os respectivos significados aos comportamentos evidenciados nos bioensaios, na intenção de se descobrir quais setores orgânicos teriam sido afetados pela aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE 7A e os respectivos períodos de ocorrência destes efeitos.

Na figura 1 temos algumas respostas excitatórias sobre o SNC, em especial a contração abdominal com ponto máximo em cerca de 20 min., onde um razoável número de organismos se mostrou responsivos, caindo em seguida. Tomando-se como base a literatura citada acima, este tipo de resposta normalmente está associada à presença de drogas que apresentam um caráter ácido, irritante, com grandes potencialidades em estimular nociceptores em áreas adjacentes ao peritônio.

Na dosagem de 100mg.kg^{-1} verificou-se que este efeito perdurou por cerca de 15 min., desaparecendo em seguida. É possível que isto tenha ocorrido devido aos processos de biotransformação atuando sobre a aminoquinona.

É importante que se diga que este efeito acima assinalado não foi, bem provavelmente, decorrente do estresse gerado de manipulação, uma vez que se assim o fosse este deveria ter ocorrido nos primeiros minutos iniciais de observação. As demais ocorrências foram discretas, com apenas um único animal respondendo em cada caso.

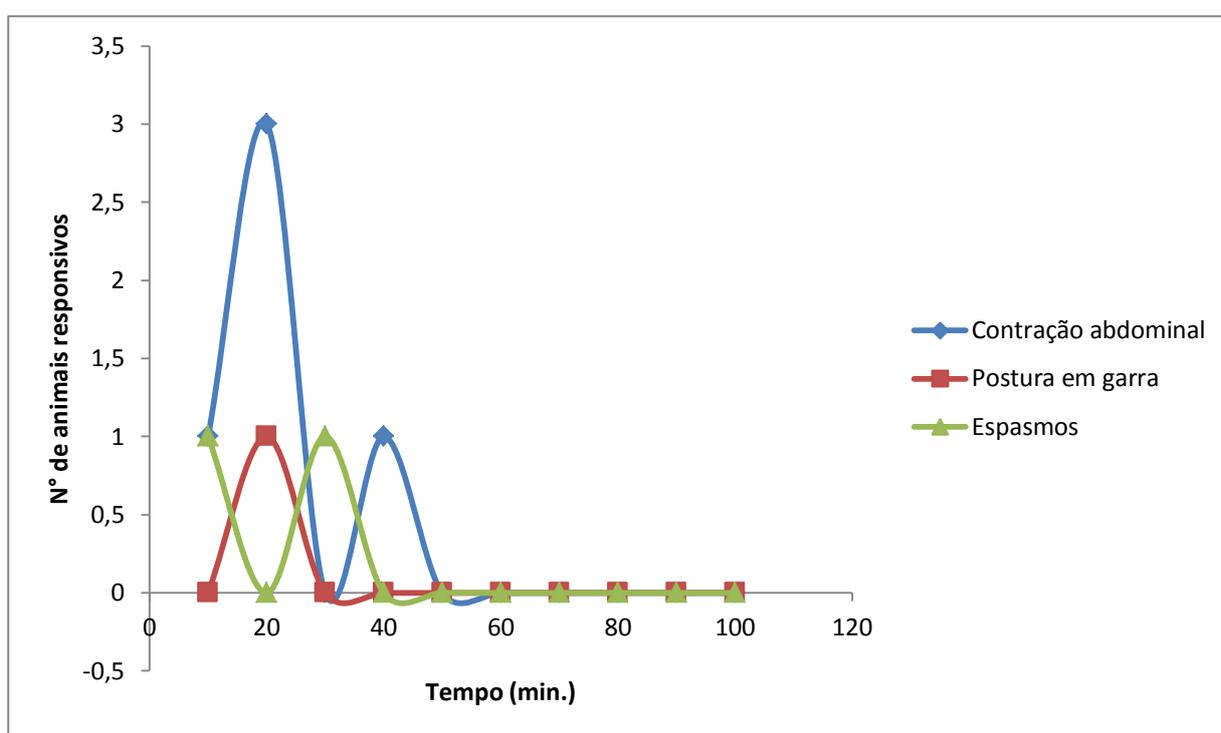


Figura 1. Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de 100mg.kg^{-1} (ip), (n=8).

Já na figura 2 temos um outro grupo de respostas comportamentais de atividade espontânea, onde se destaca a atividade exploratória com dois animais responsivos a partir dos minutos iniciais, decaindo por volta de 30 min. Este tipo de atividade, normalmente associa-se à um padrão de excitabilidade protaconizado pela estimulação simpática. A manipulação inicial dos animais contribui muito para isto. Apesar disto, apenas um quarto dos animais exibiram esta resposta, embora um destes a manteve até os 30 min. Apenas um único animal exibiu tremores no corpo

inteiro, no intervalo de 20 a 40 min. Os tremores, em princípio, estão relacionados com respostas excitatórias, mediadas por drogas que se assemelham a agonistas serotoninérgicos, que exercem forte impacto sobre a área neurológica de forte adensamento de neurônios serotoninérgicos localizada na base do cerebelo, núcleos rostrais e núcleos caudais serotoninérgicos, sendo o núcleo rostral de maior pertinência com as respostas cerebelares estrutura esta, por sua vez, responsável pela administração dos estímulos destinados à excitação motora (RANG, 1996).

É importante ainda assinalar que agonistas serotoninérgicos podem suscitar respostas sobre outros compartimentos endógenos, entre estes, aqueles responsáveis pela regulação do sono e vigília, motilidade intestinal, temperatura, musculo liso não vascular dos bronquios e hemostasia, vasoconstricção mediante a participação de plaquetas (ADAMS, 2003).

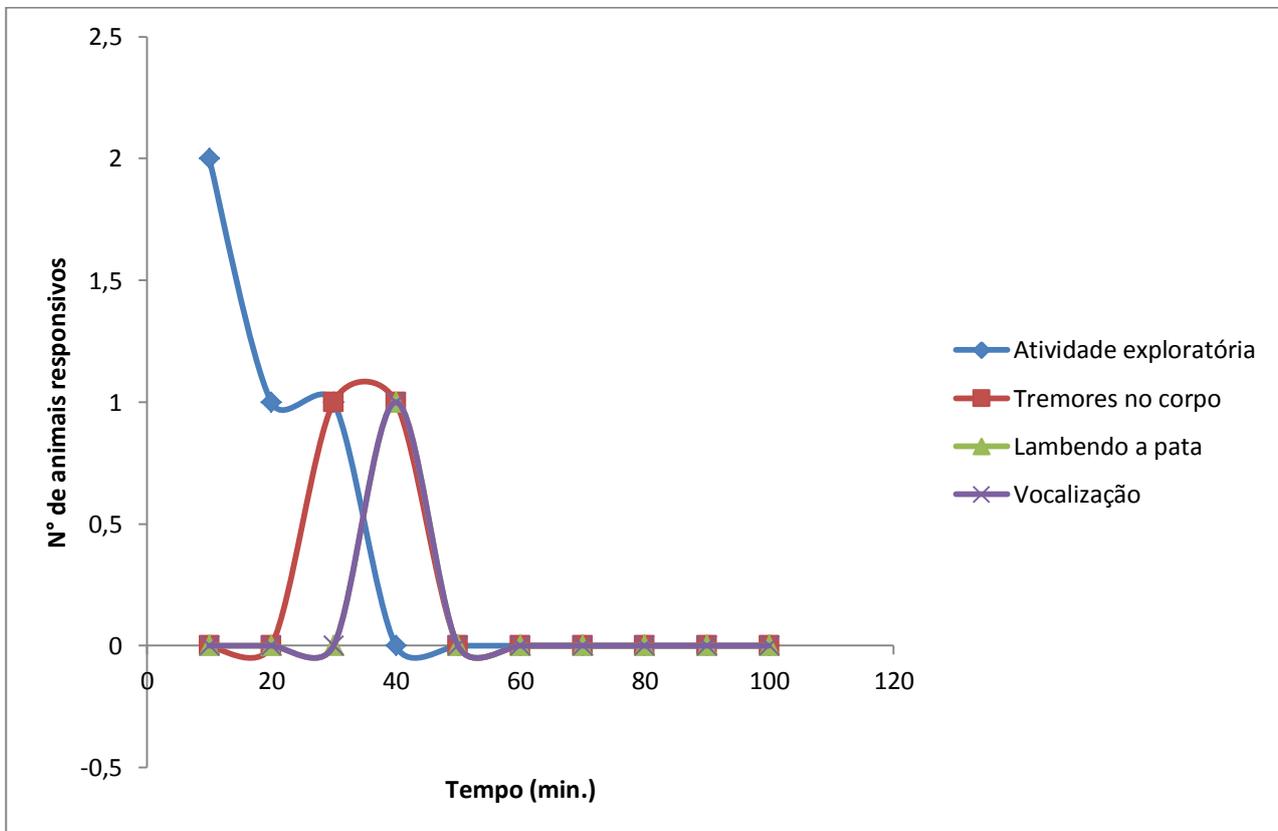


Figura 2. Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de 100mg.kg^{-1} (ip), (n=8).

Já na figura 3 temos ações depressoras sobre o SNC, destacando-se as respostas de ptose e de sedação. Graficamente é fácil verificar que o período de ocorrência destas respostas é complementar, tratando-se neste caso de ações sobre o sistema gabaérgico no sistema nervoso

central, potencializando-o. Entretanto, é importante salientar que estes animais são de hábitos noturnos, portanto devendo normalmente estar sedados no período em que foram realizados os experimentos, por volta das 14:00 horas. Portanto é possível que em decorrência da diminuição das ações estimulatórias endógenas decorrentes da ação da aminoquinona, na concentração empregada; provavelmente em decorrência da ação dos mecanismos de biotransformação, neste intervalo temporal sobressaíram-se os efeitos depressores.

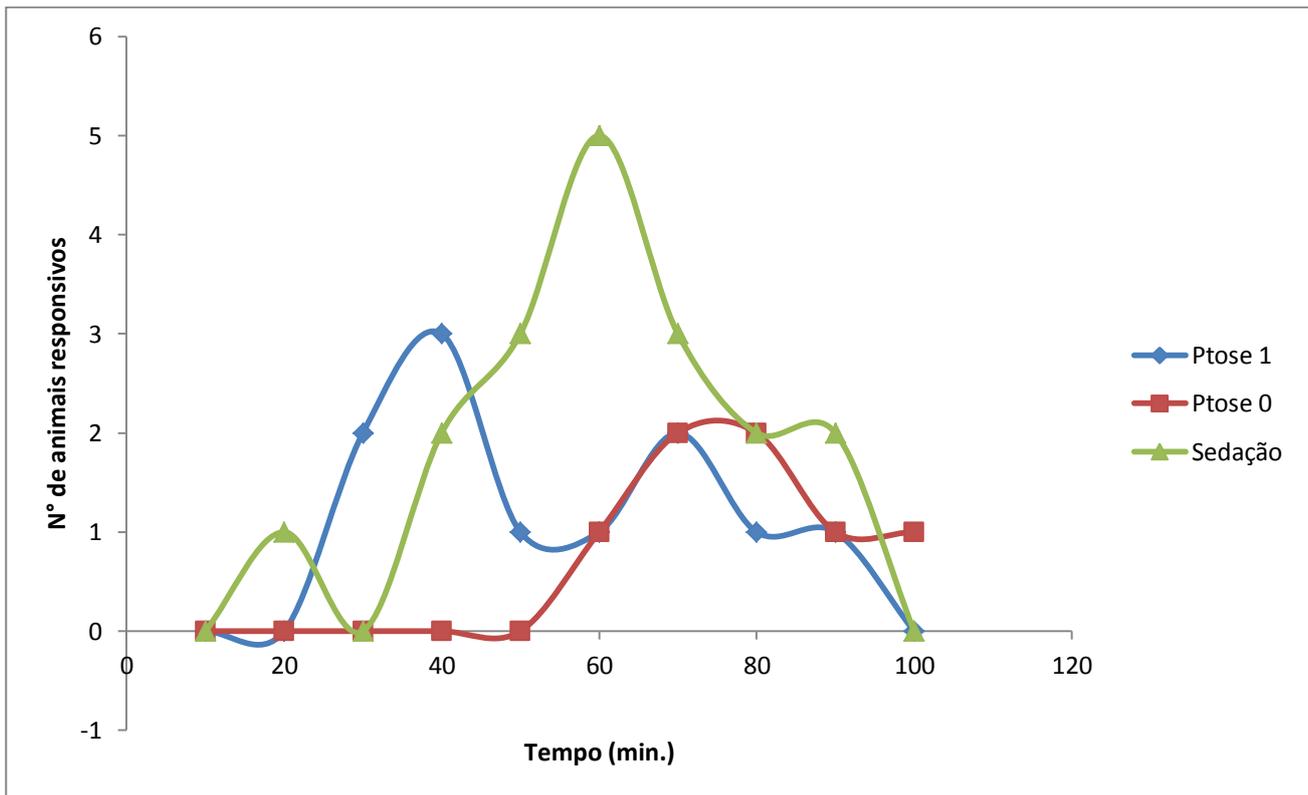


Figura 3. Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de 100mg.kg^{-1} (ip), (n=8).

Na figura 4 temos outras ações depressoras sobre o SNC, inicialmente um comportamento de andar rastejante, com pico máximo em 30 min. Com a superfície abdominal apoiada, bem provavelmente devido ao desenvolvimento de um estado de hipotonia da musculatura do trem posterior ou flacidez envolvendo os músculos chamados de antigravitacionais, as patas se abriram e o ventre dos animais afetados ficou prostrado ao chão. Isto denota, de certa forma, prejuízo neuronal nos núcleos pontinos, localizados no tronco cerebral. Este efeito, com a dose de 100mg.kg^{-1} , foi observado em apenas 20% dos animais do grupo. Em seguida foi observado um

atrelamento entre duas respostas, a de aglomeração e a de analgesia, com respostas importantes entre 40 e 50 min. e entre 80 e 90min.

A resposta de agrupamento pode ser uma consequência de uma potencialização dos efeitos sedativos protagonizados pelo aumento da resposta gabaérgica em compartimentos talâmicos do SNC. Já a resposta analgésica, bem provavelmente foi deflagrada por ações no periarqueduto mesencefálico, onde se localiza um importante regulador dos sistemas relacionados com a resposta analgésica. Aqui é importante assinalar que apesar de aglomerados, os animais não exibiram resposta de hipnose, tipicamente associada a uma ação do tipo gabaérgica, o que pode sugerir uma ação do tipo opióide nestes compartimentos centrais.

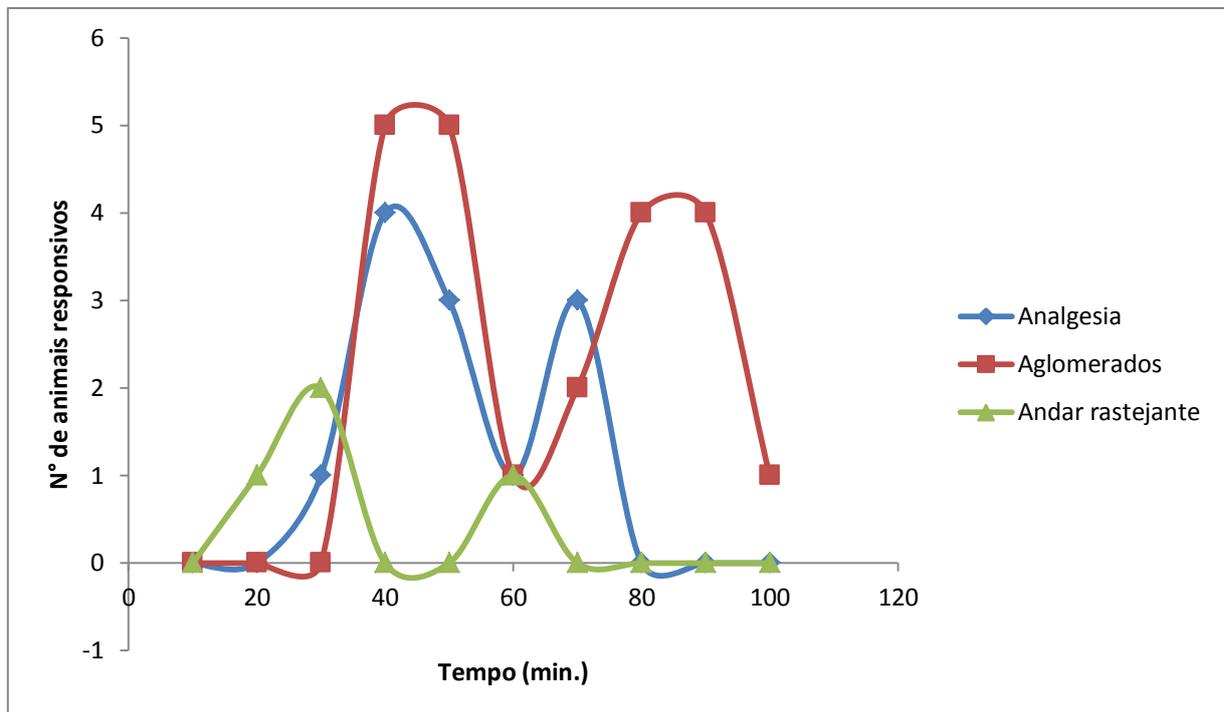


Figura 4. Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de 100mg.kg^{-1} (ip), (n=8).

Na figura 5 encontramos respostas associadas às manifestações de componentes do sistema nervoso autonômico – SNA, em especial resposta de piloereção e solado hiperêmico. A piloereção manifestou-se ritmicamente a partir de 40 min. Esta resposta assim manifestada pode estar associada a uma mudança de sensibilidade periférica em decorrência da manifestação de uma ação tóxica endógena, aumentando a sua manifestação com o passar do tempo. Já com relação ao solado hiperêmico, verificou-se que este comportamento manifestou-se em dois animais, sinalizando uma

alteração na resposta vascular destes organismos, provavelmente associada à um aumento da pressão arterial.

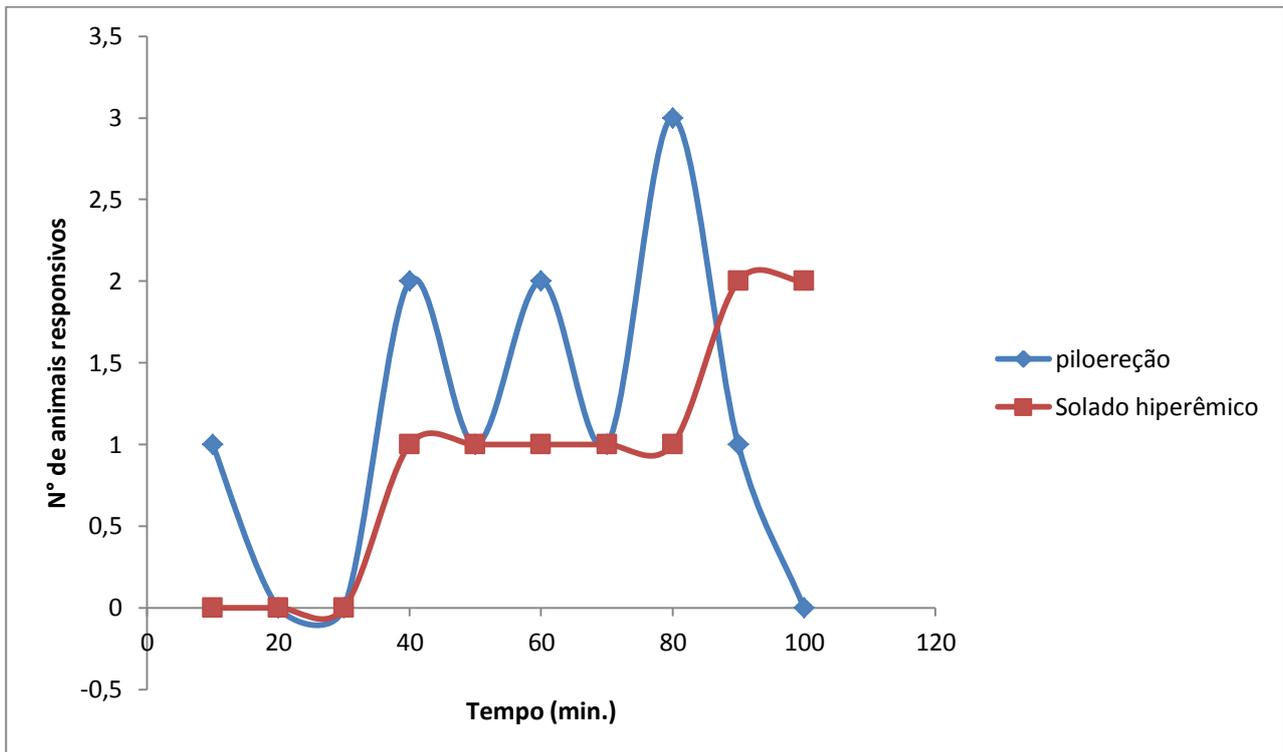


Figura 5. Ações sobre o SNA em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de 100mg.kg^{-1} (ip), (n=8).

Na figura 6 observa-se uma resposta ao prurido, onde os animais manifestavam ações de coceira generalizada por todo o corpo no período assinalado, com maior expressão aos 30 min, decaindo a seguir. Esse decaimento pode estar associado à ações de biotransformação sobre a droga, diminuindo a sua concentração plasmática, diminuindo a sua ação sobre os tecidos periféricos, provavelmente envolvendo a participação de células residentes tais como macrófagos e mastócitos acionando respostas à substratos como a cascata molecular das cininas.

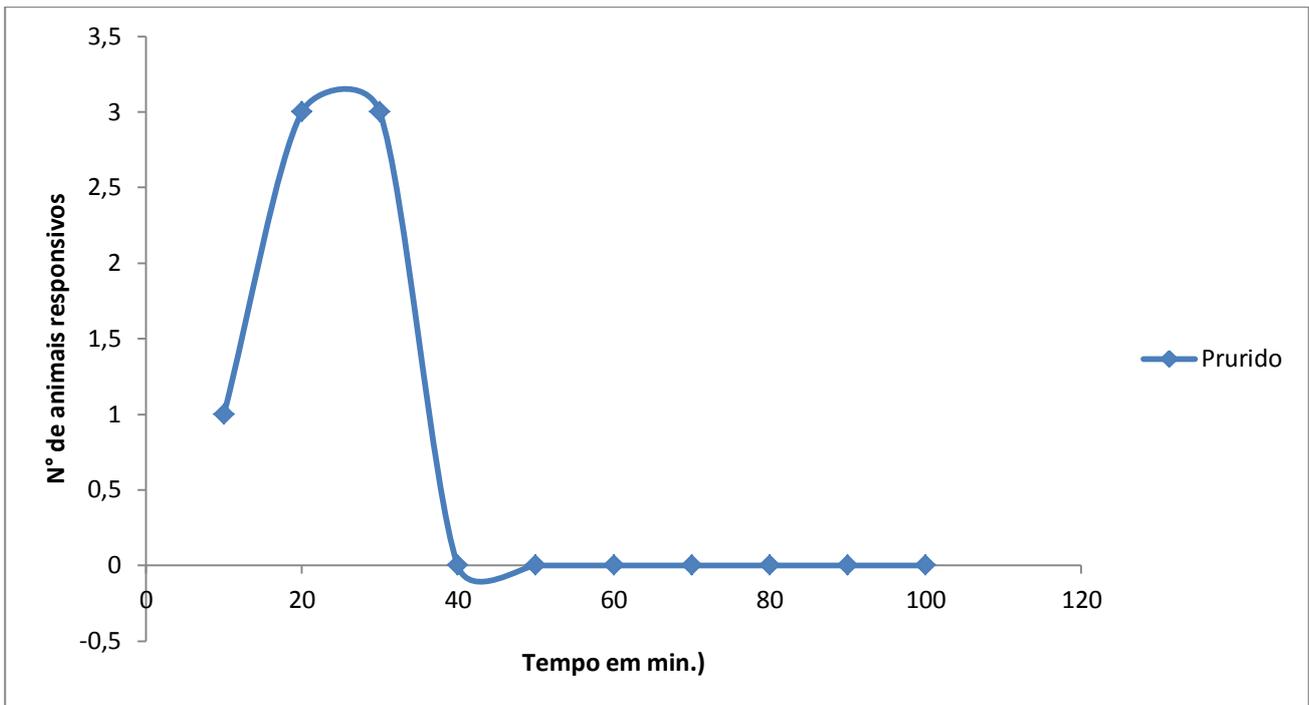


Figura 6. Outras ações em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ip), (n=8).

Na figura 7 estão assinaladas respostas excitatórias sobre o SNC obtidas à partir de uma dose de $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Comparando-se as respostas obtidas com aquelas assinaladas nas figuras 1 e 2, verificou-se que com o aumento da dose administrada, as contrações abdominais foram visualizadas num numero maior de animais e extensíveis num intervalo temporal maior, assim como os espasmos. Observou-se também o surgimento em alguns animais, do comportamento de aulo-limpeza denotando aumento da atividade motora ou ansiólise, comportamento este não observado numa dose menor.

Os tremores no corpo, não foram observados com o emprego de dosagem maior de aminoquinona nos animais sob experimentação. É possível que maiores doses de aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino) acetate estejam relacionadas com o despertar de ações sobre diferentes dimensões metabólicas nos sistemas orgânicos, que priorizam as suas respostas, sobrepujando as demais.

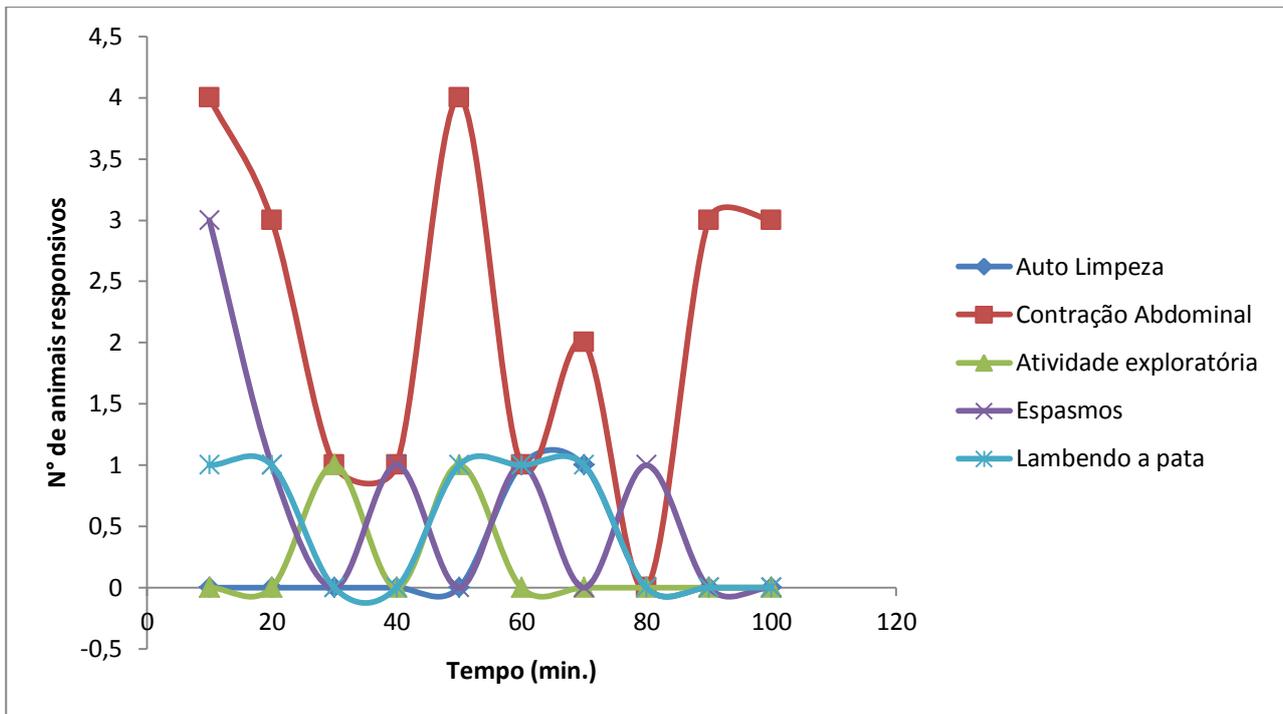


Figura 7. Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino) acetate , na dose de 200mg.kg^{-1} (ip), (n=8).

Quanto as ações depressoras, mediante a aplicação de uma dose de 200mg.kg^{-1} nos animais, verificou-se que as respostas de ptose, analgesia e sedação foram potencializadas em termos de numero de animais afetados, como também com relação ao tempo de resposta, como mostram os dados da figura 8. É possível que a resposta de analgesia, por exemplo, seja do tipo dose-dependente, como será avaliado mais pormenorizadamente adiante.

Seja como for, é importante destacar que com apenas uma única dose aplicada nos animais, conseguiu-se verificar este efeito de analgesia, que aumentou gradativamente de intensidade até o 100° min., sem que os animais manifestassem respostas de hipnose, o que sugere um efeito diferente daqueles protagonizados pela via gabaérgica.

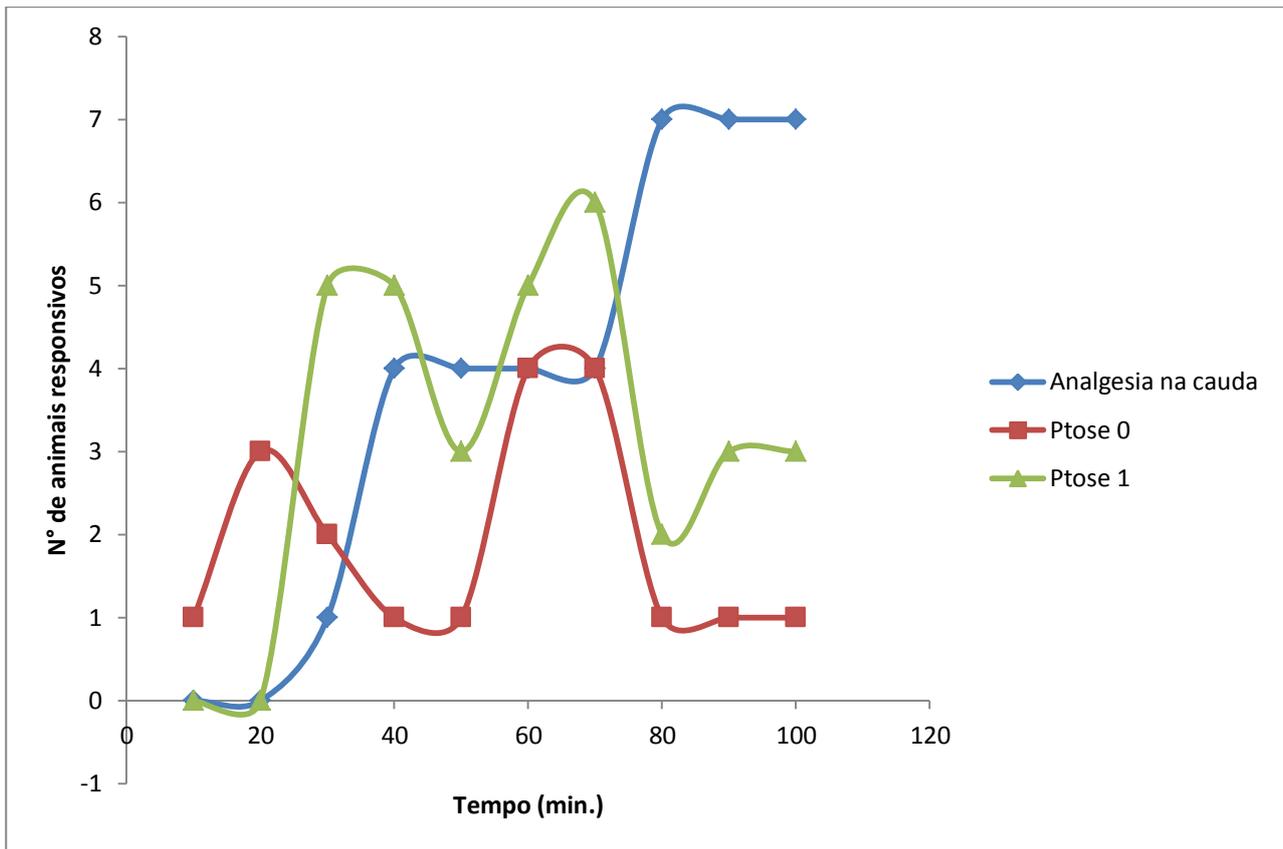


Figura 8. Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino) acetate, na dose de 200mg.kg⁻¹ (ip), (n=8).

Na figura 9 temos outras respostas depressoras sobre o SNC com a dose de 200mg.kg⁻¹, onde se verificou que os efeitos obtidos foram em maior intensidade em relação com o aumento da dose.

Com relação ao comportamento de aglomerar-se, observou-se que este tem o período de resposta máxima em 40 min. não coincidindo com o período de resposta máxima das respostas de sedação e de andar rastejante.

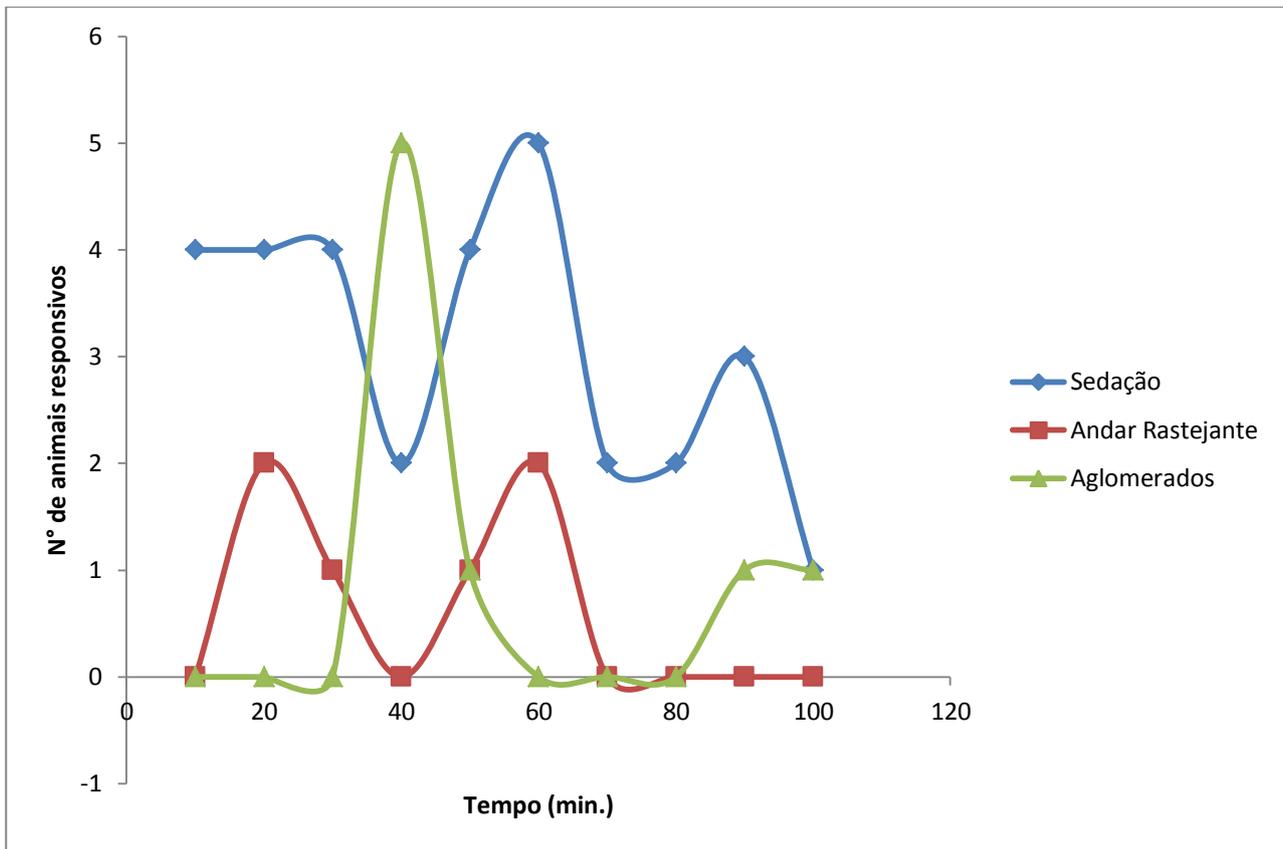


Figura 9. Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 200mg.kg^{-1} (ip), (n=8).

Já com relação aos efeitos sobre o sistema nervoso autonômico – SNA, verificou-se que a aplicação de doses maiores de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE , de 200mg.kg^{-1} , os animais exibiram uma resposta de piloereção envolvendo um número maior de animais, mas que ao longo do tempo de 100 min. de observação tendeu a diminuir, como mostram os dados da figura 10. Mas, em compensação uma importante taquipneia foi observada num número expressivo de animais, extendendo-se por todo período de observação. Esta taquipneia pode estar associada à um aumento da atividade simpática sobre o SNC ou mesmo em decorrência de ações conflituosas em áreas que comandam a ventilação pulmonar, envolvendo outros sitios mediadores, como pode ocorrer nas respostas associadas ao estresse.

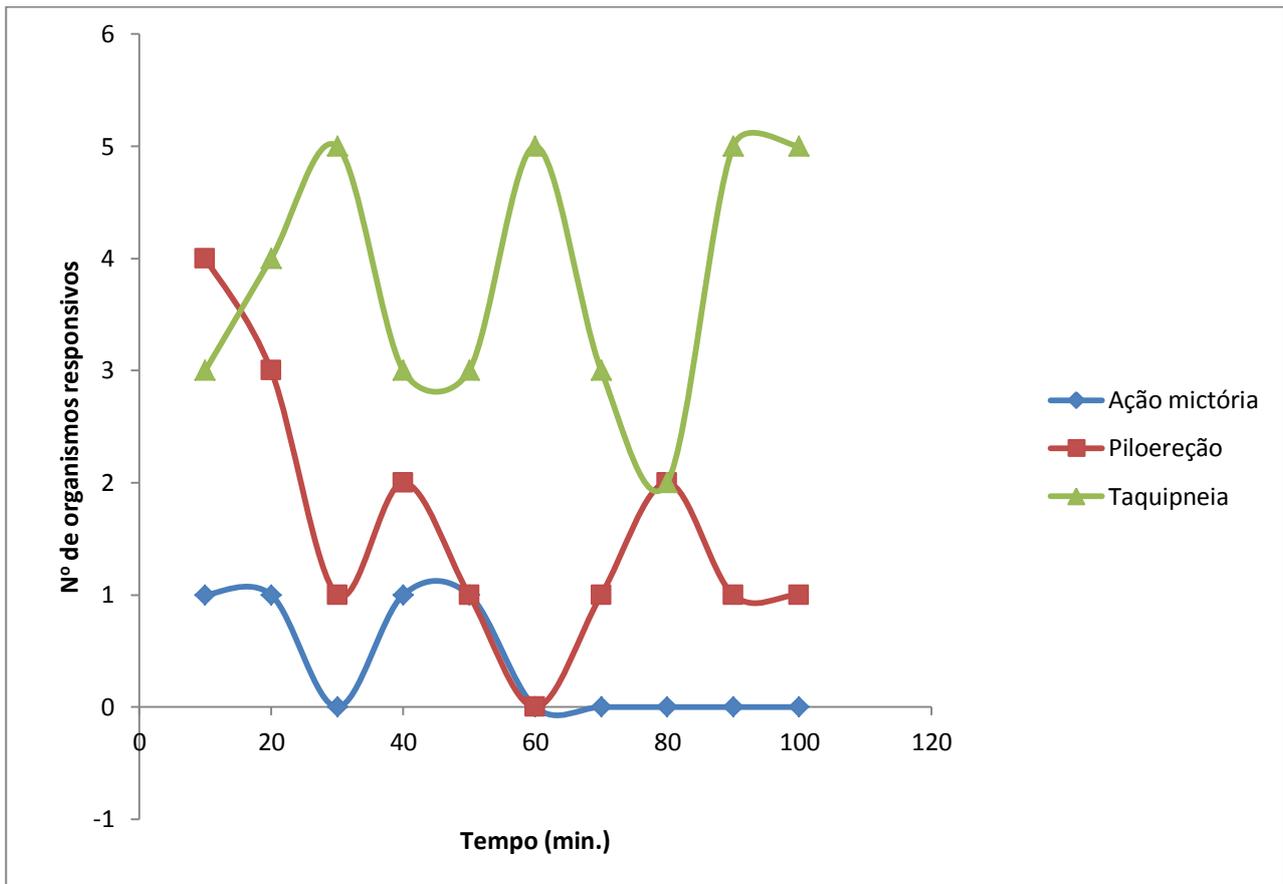


Figura 10. Ações sobre o SNA em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de 200mg.kg^{-1} (ip), (n=8).

As respostas ao prurido também foram intensificadas com o aumento da dose para 200mg.kg^{-1} de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, como mostram os dados da figura 11. Aqui é importante assinalar que a resposta ao prurido está associada à excitabilidade periférica associada à respostas nociceptivas decorrentes da estimulação de quimiorreceptores específicos. Assim, verificou-se que a resposta analgésica obtida não afetou esta dimensão da resposta nociceptiva.

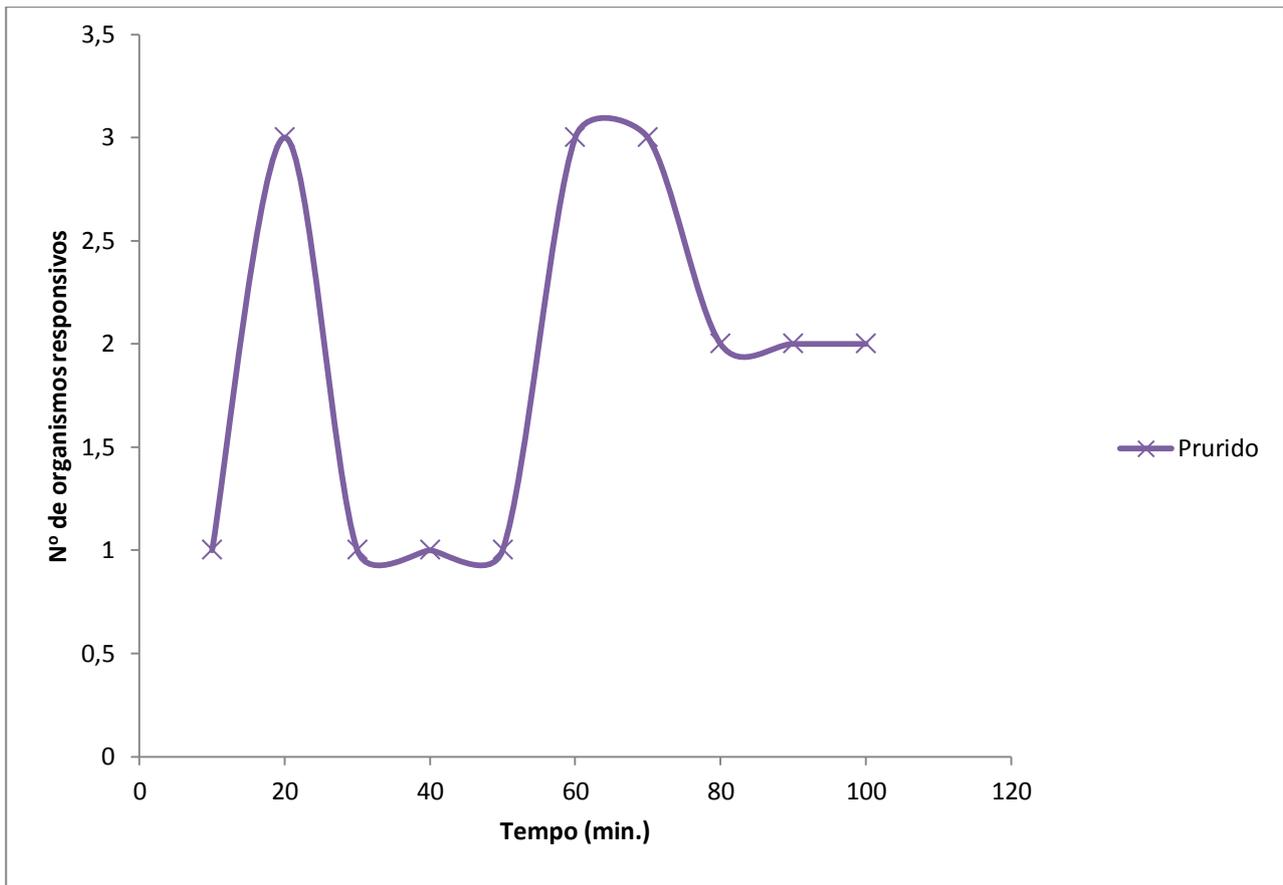


Figura 11. Outras ações em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ip), (n=8).

Com o aumento da dose de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE para $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ nos bioensaios, observou-se que as contrações abdominais foram mais intensas na fase inicial do ensaio, diminuindo a seguir, embora tenham aumentado a ocorrência de espasmos, como mostram os dados da figura 12. Uma curiosa, mas importante resposta com pico máximo aos 60 min. foi observada, relacionada à atividade exploratória como também ao em relação aos animais caminharem com cauda paralela. Estas últimas respostas estão associadas a uma manifestação de estimulação simpática bastante acentuada, denunciada principalmente pelo fato de os animais caminharem a com cauda paralela à superfície de apoio; uma resposta tipicamente associada à estimulação do sistema nervoso autônomo, com anuências ao sistema periférico.

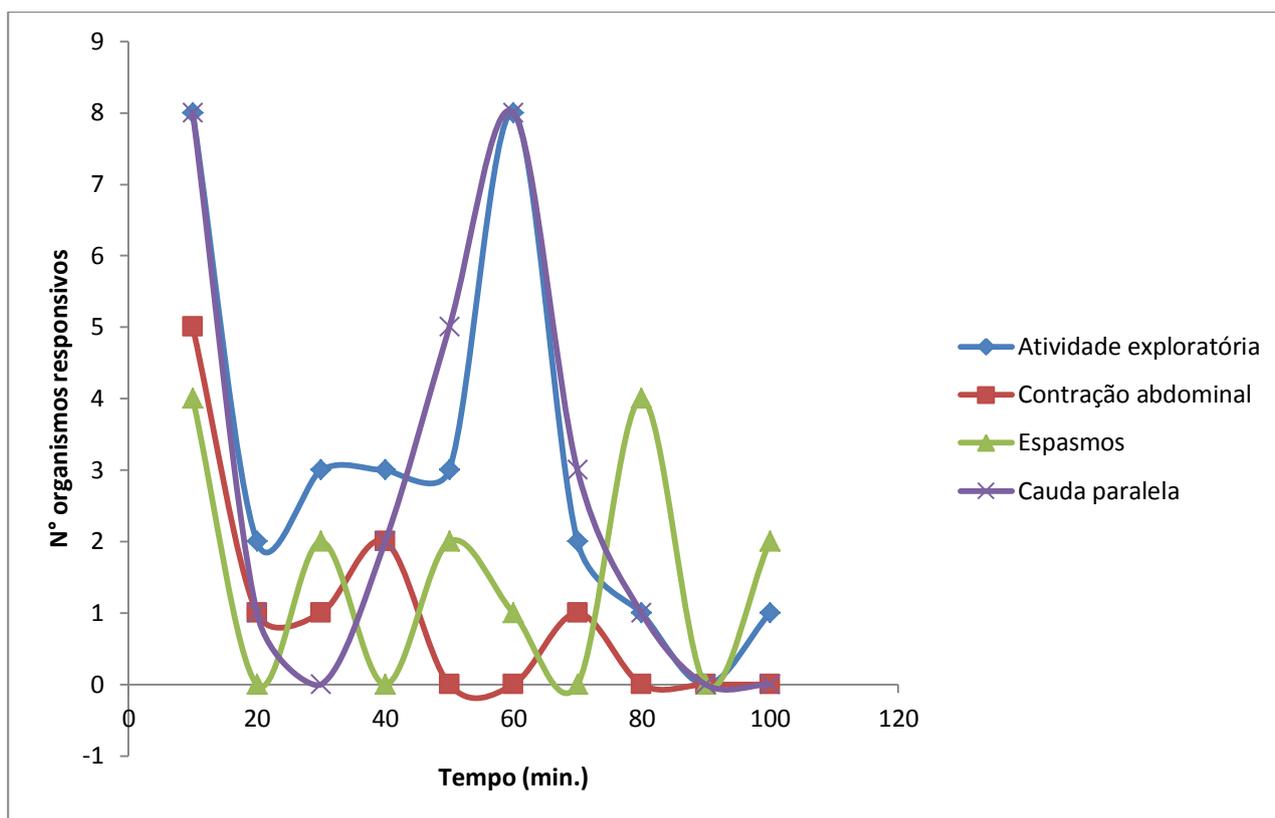


Figura 12. Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ip), (n=8).

Ainda com relação às ações excitatórias sobre o SNC antagonizadas por doses de $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE, observou-se pelo menos três novas respostas não manifestadas com doses menores, coçar o focinho, farejar o ambiente e pavilhão auricular armado, como assinalam os dados da figura 13. O período de maior atividade destas respostas foi de 30min. bem provavelmente associadas à um mesmo tipo de ação estimulatória. A ação de coçar o focinho denuncia a presença de uma espécie de prurido na região, provavelmente associado à reações pró-inflamatórias locais. As transformações vasculares induzidas por este processo pode culminar na diminuição da capacidade olfatória destes organismos, neste período, talvez justificando o fato de que estes animais exibiram o comportamento de farejar o ambiente, no mesmo intervalo.

A armação do pavilhão auricular pode estar relacionada com a necessidade de se aumentar a captura de estímulos ambientais, uma vez que os estímulos olfatórios ficaram deficientes neste período. Vale lembrar que roedores apóiam-se na atividade olfatória para reconhecer vários tipos de estímulos do ambiente, incluindo-se a identificação dos membros do próprio grupo.

Verificou-se também a ocorrência de respostas comportamentais como tremores finos em apenas um único animal, provavelmente associadas à alterações neurais nas imediações cerebelares por excitação aumentadas em vias serotoninérgicas. Já o comportamento de lamber o local de aplicação da droga esta relacionado com reações de irritação locais protagonizadas pela administração da aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE .

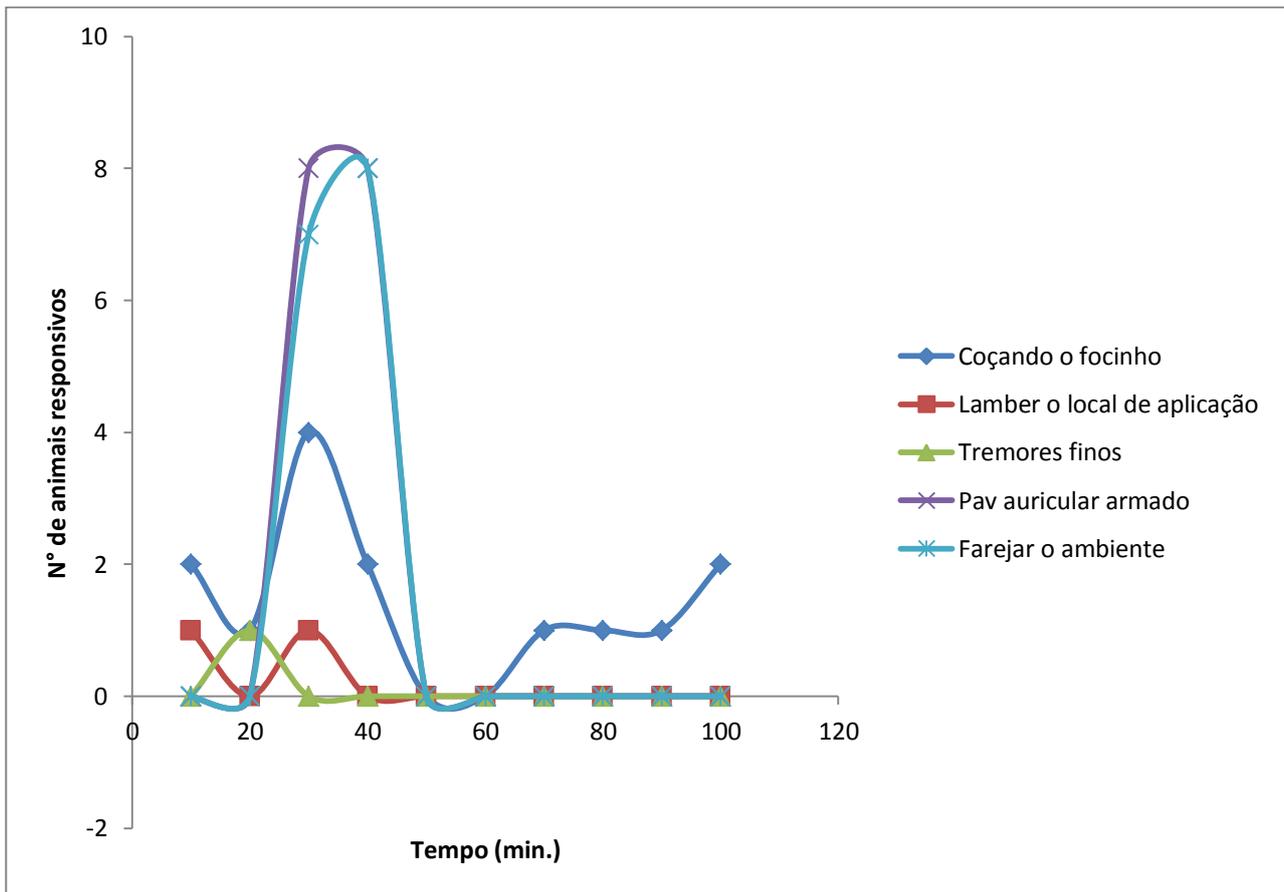


Figura 13. Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 300mg.kg^{-1} (ip), (n=8).

Os resultados observados na figura 14, destacando-se a presença de uma sensibilidade anormal ao toque da cauda em dois momentos do período de observação; um aos 30min e outro aos 70min. É interessante observar que com a dose de 300mg.kg^{-1} de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE não foi observada a resposta de analgesia, mas uma outra resposta de hipersensibilização das vias nociceptivas, provavelmente relacionadas às associações medulares das fibras α e δ .

Outras respostas de menor expressão também foram observadas, dentre estas a postura em garra e a sensibilidade sonora parecem ser as mais interessantes. A postura em garra denuncia agressividade, provavelmente devido à ações estimulantes sobre os núcleos amidalóides. Já a sensibilidade sonora aumentada, denuncia alterações importantes nos sistemas auditivos, afetando, de sobre maneira, os sistemas de equilíbrio dos animais envolvidos.

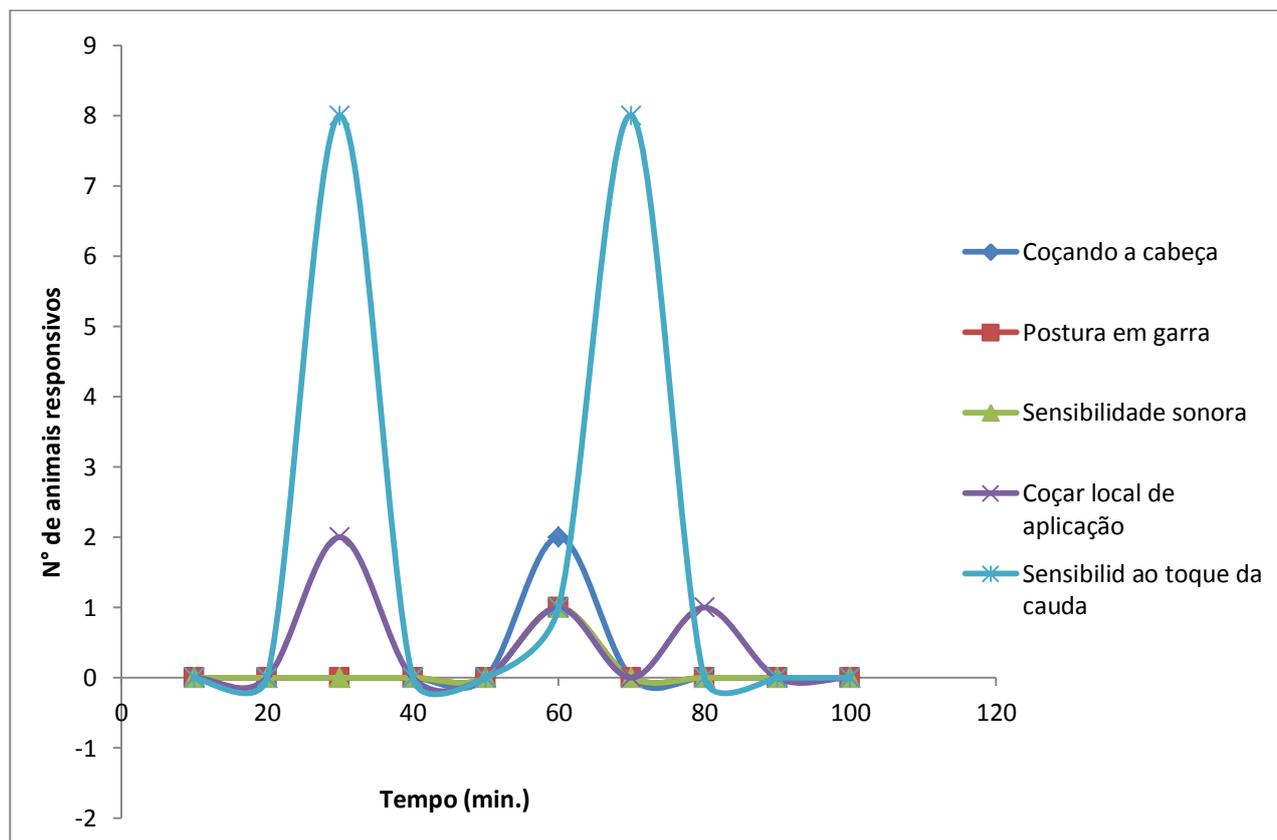


Figura 14. Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ip), (n=8).

Na figura 15 temos respostas depressoras sobre o SNC, a partir da administração de $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE, sendo a principal resposta associada ao recolhimento dos animais principalmente no período de 30 a 70 min. A interrupção deste período de recolhimento ocorre justamente quando alguns organismos manifestam importante excitabilidade simpática, como já assinalado na figura 12.

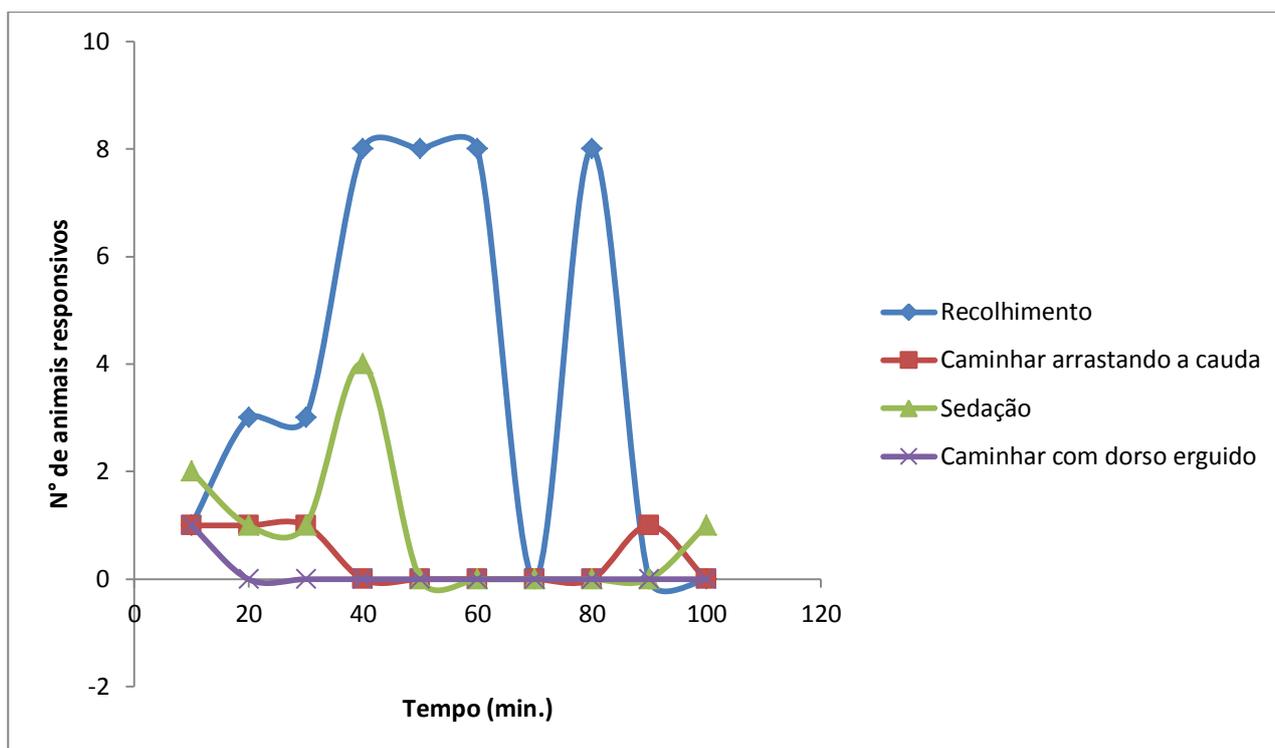


Figura 15. Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ip), (n=8).

Outras ações depressoras com esta dosagem também foram observadas, conforme se pode verificar na figura 16, tais como as ptoses, o agrupamento o caminhar arrastando o trem posterior e a cauda em Straub. Com relação às ptoses 0 e 1, foram aumentadas com o aumento da dose. O comportamento de agrupamento acompanha praticamente a mesma extensão do comportamento de recolhimento, destacando que neste último as necessidades táteis de contato são bem menores.

O comportamento de arrastar o trem posterior está associado à um efeito de hipotonia da musculatura do trem posterior, como já assinalado anteriormente.

Já a cauda em Straub denuncia efeitos sobre o sistema opióide periférico ou serotoninérgico em algumas áreas centrais relacionadas ao controle motor, como assinala Almeida (2006).

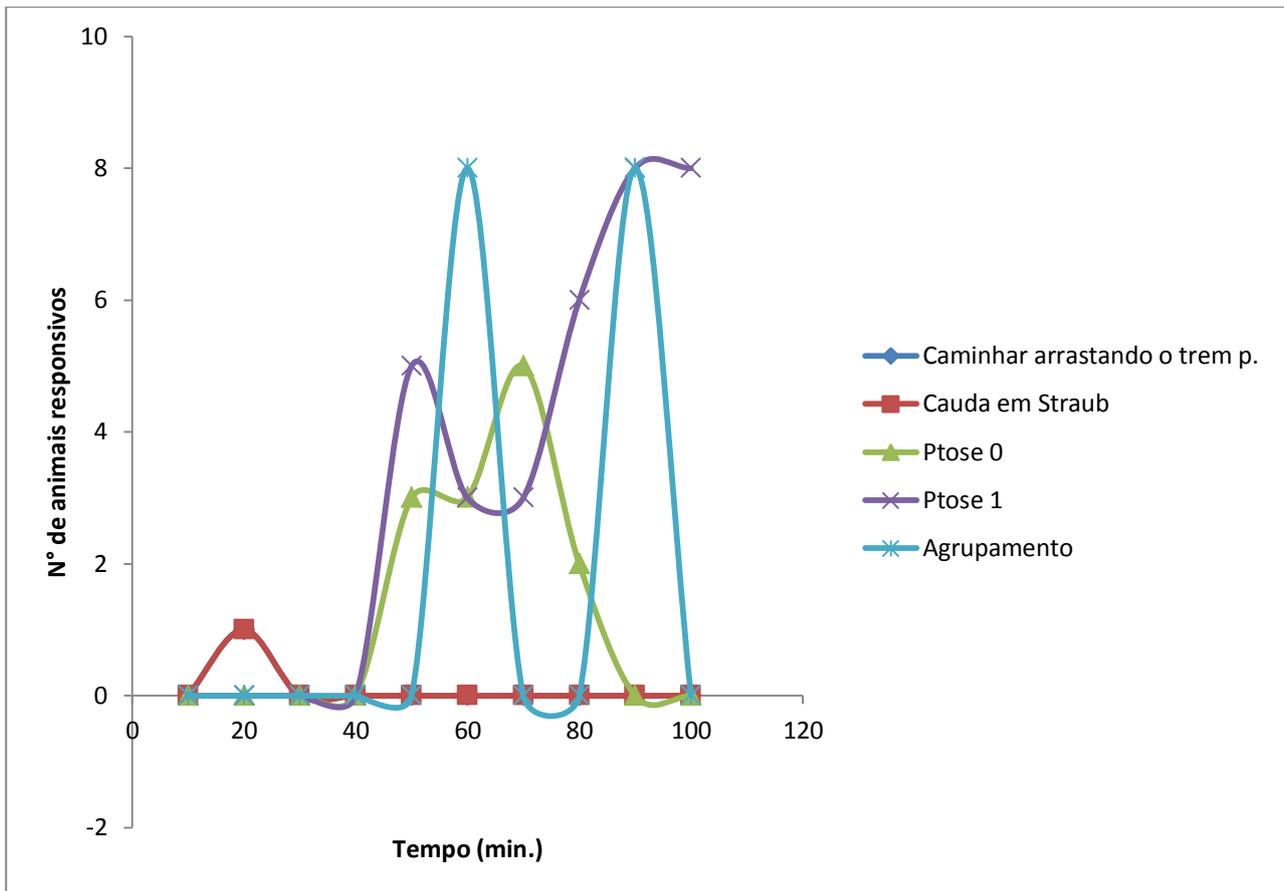


Figura 16. Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de 300mg.kg^{-1} (ip), (n=8).

Sobre o SNA, com a elevação da dose para 300mg.kg^{-1} nos bioensaios de atividade espontânea, observou-se uma baixa resposta de taquipneia, mas também que todos os animais exibiram pavilhão auricular hiperêmico no intervalo de 20 a 50 min., denunciando um aumento da pressão arterial, provavelmente associado à um aumento da estimulação simpática no período, como mostram os dados da figura 17.

Ainda na figura 17, pode-se observar uma importante ação sobre o SNA associado sistema gastroentérico, onde os animais exibiram um aumento progressivo da atividade de defecação ao longo de 100 min. de observação.

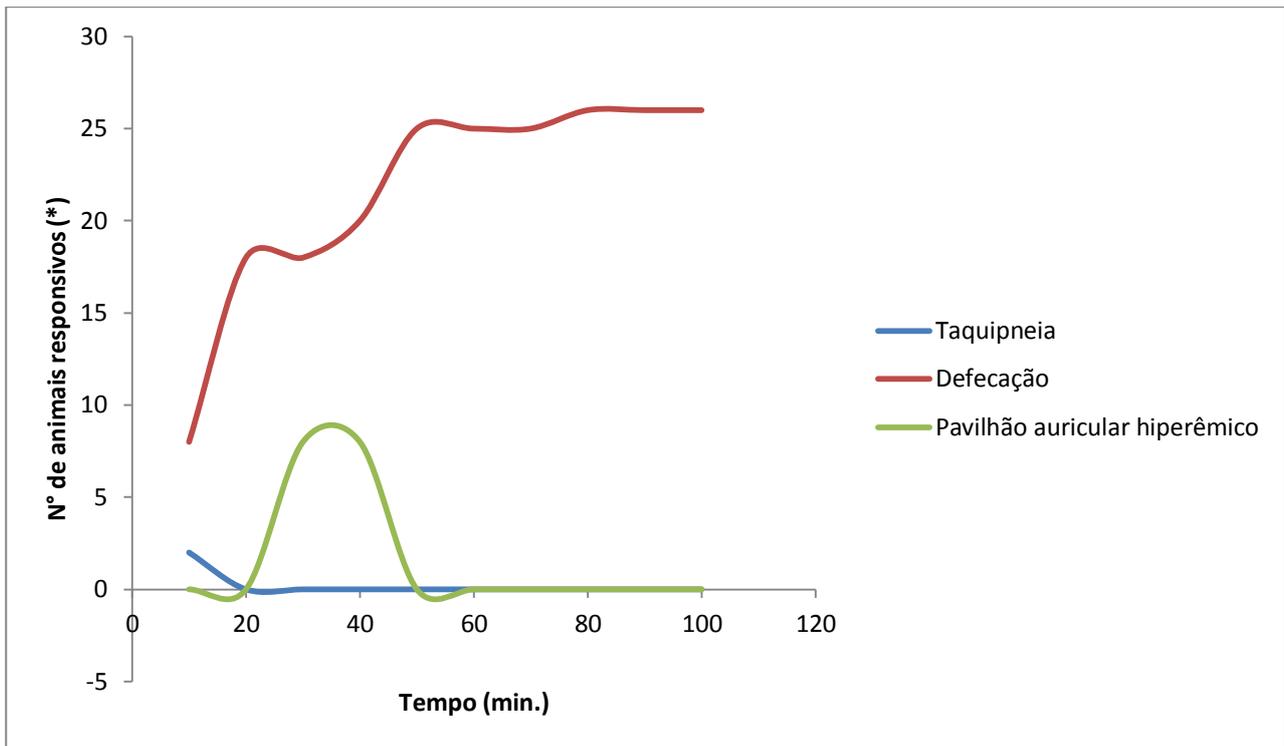


Figura 17. Ações sobre o SNA em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ip), (n=8). (*), para a atividade de defecação o eixo assinala unidades fecais.

Na figura 18 verificam-se outras respostas sobre o SNA em função da aplicação de $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE nos bioensaios, destacando-se as respostas de piloereção, cauda e solado posterior hiperêmicos. A piloereção, como já assinalado acima, pode neste caso relacionar-se à mudanças na sensibilidade devido a presença de um efeito tóxico. Já com relação às respostas de hiperemia tanto na cauda como no solado correlacionam-se com efeitos sobre o sistema nervoso autonômico, em especial a excitabilidade simpática no intervalo, culminando com elevação na pressão arterial.

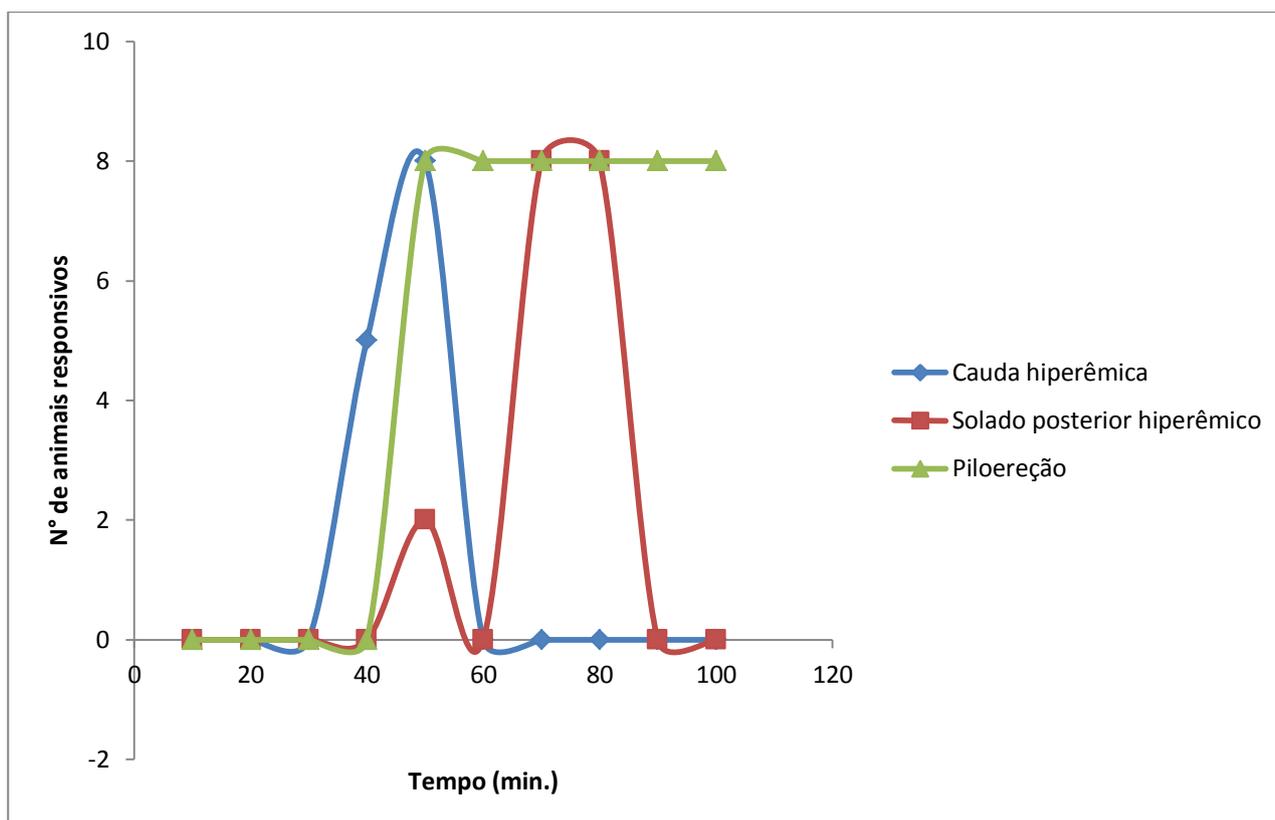


Figura 18. Ações sobre o SNA em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de 300mg.kg^{-1} (ip), (n=8).

Uma resposta curiosa obtida com relação aos animais estimulados com 300mg.kg^{-1} de ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE foi o surgimento de uma resposta vascular diferente, onde a cauda assumia uma coloração rosada, como se tivesse ocorrido no intervalo uma mudança de permeabilidade vascular periférica, do tipo que se observa em reações pró-inflamatórias, como mostra a figura 19. É possível que estas respostas estejam coordenadas por ações locais mediadas por células residentes como macrófagos e mastócitos. O pico máximo desta resposta foi em torno de 90 min., relativamente coincidente com o período de aumento da pressão arterial observada na cauda e no solado da pata dos animais observados.

Outro achado interessante relaciona-se com a presença de urina alaranjada na gaiola, provavelmente denunciando a possível eliminação de parte da droga injetada por volta dos 80 min. Se os organismos eliminaram este composto sem danificação dos tecidos renais, estes dados mostram que o organismo pode eliminar parte desta droga a partir de 80 min. É claro que ensaios mais específicos para esta determinação devam ser realizados afim de determinação do tempo de meia vida de eliminação e o tempo de meia vida biológico da droga.

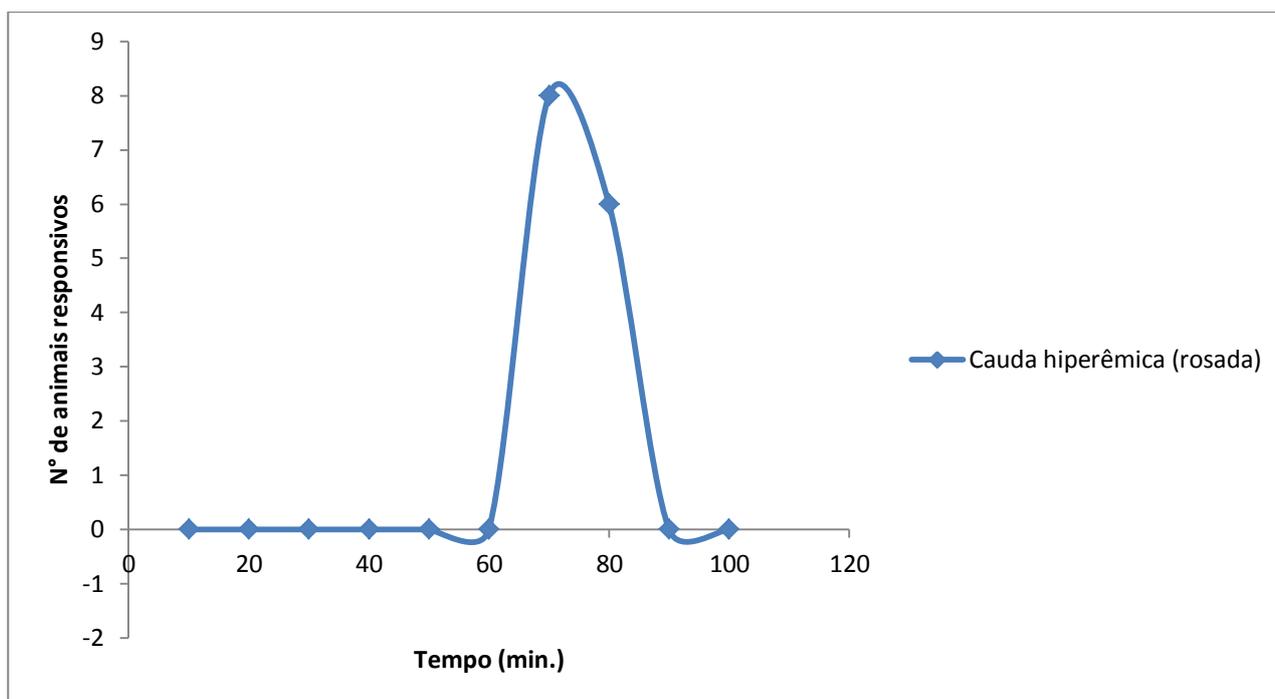


Figura 19. Outras ações em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ip), (n=8).

Finalmente nos bioensaios com emprego de doses de $600\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE , verificou-se a potencialização de alguns dos efeitos excitatórios já assinalados, com o surgimento de novos comportamentos, como a presença de saltos, que denuncia excitabilidade excessiva sobre o SNC (figura 20), assim como o serpenteamento da cauda (figura 21), associado ao mesmo tipo de estímulo excitatório, provavelmente relacionado à estimulação excessiva de determinados circuitos neurológicos adentrados à região cerebelar.

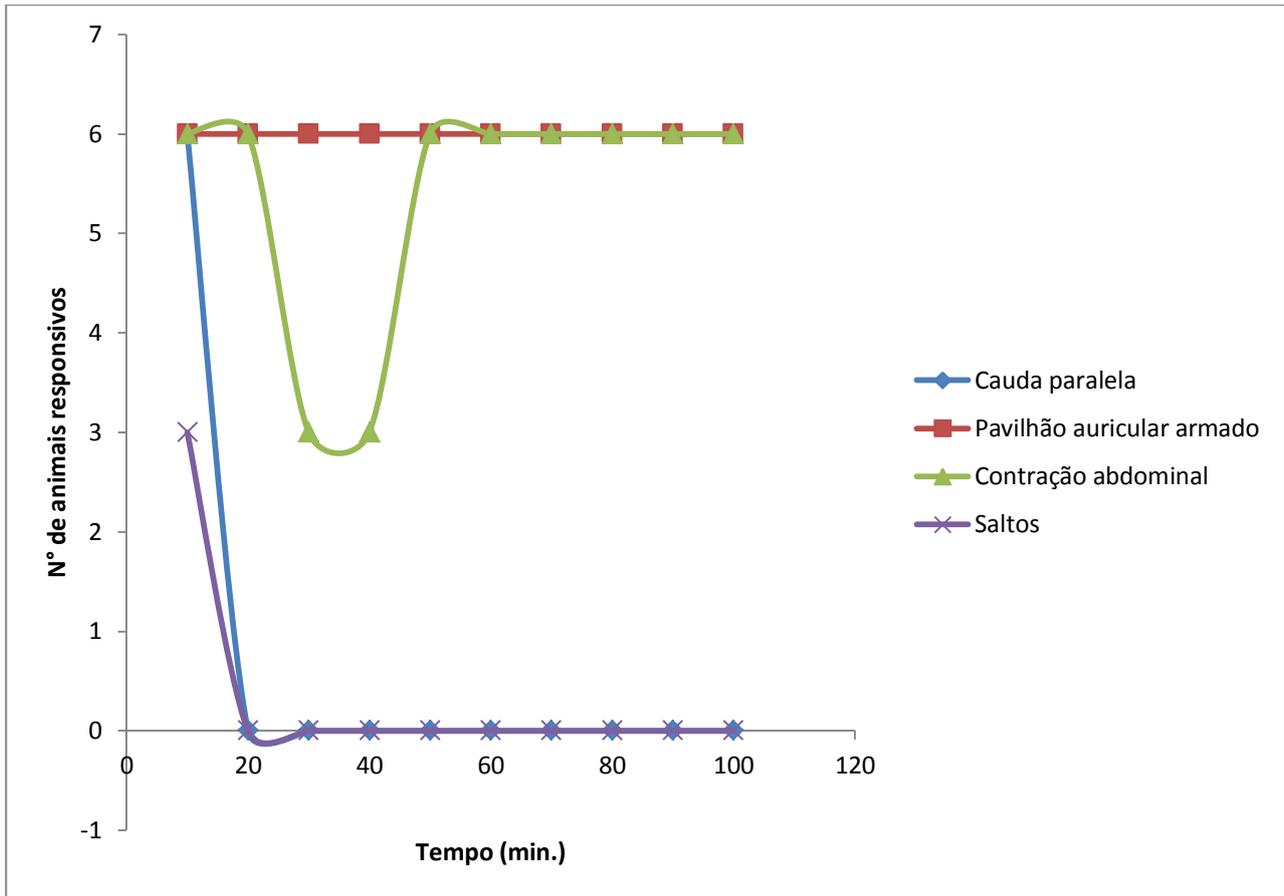


Figura 20. Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de $600\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ip), (n=6).

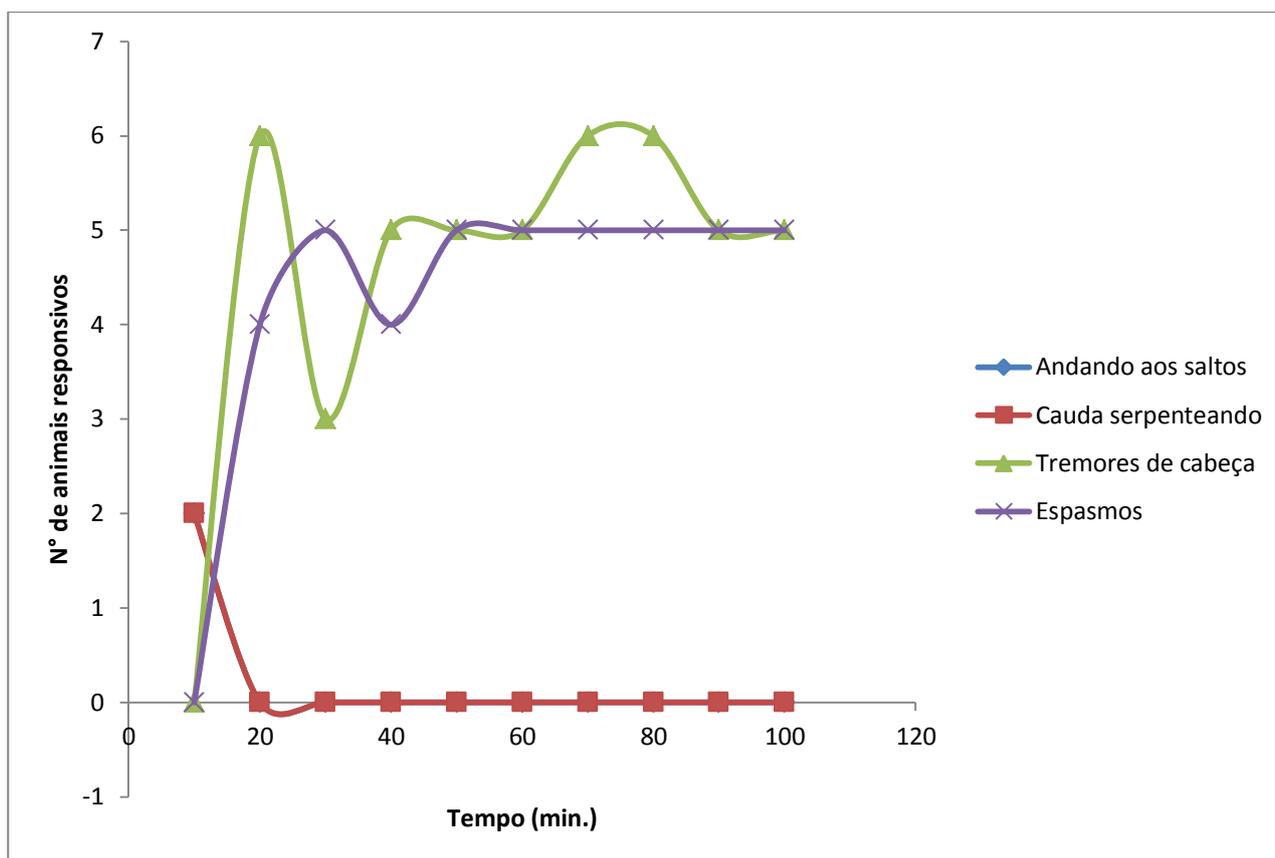


Figura 21. Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de 600mg.kg^{-1} (ip), (n=6).

Ainda relacionado com os efeitos excitatórios sobre o SNC verifica-se na figura 22 respostas relacionadas à excessiva sensibilização das extremidades como focinho e pavilhão auricular, assim como dois períodos de aumento da sensibilidade ao pinçamento mecânico da cauda, um aos 30 min. e outro aos 80min., períodos estes quase que similares aos encontrados quando os animais foram estimulados com 300mg.kg^{-1} de ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATE, com intensidades equivalentes, lembrando que para os bioensaios de atividade espontânea com 600mg.kg^{-1} foram empregados somente seis animais no grupo.

Uma outra resposta curiosa encontrada foi uma intensa contração diafragmática, onde os animais afetados exibiam uma evidente dificuldade respiratória, que persistiu até o fim do período de observação.

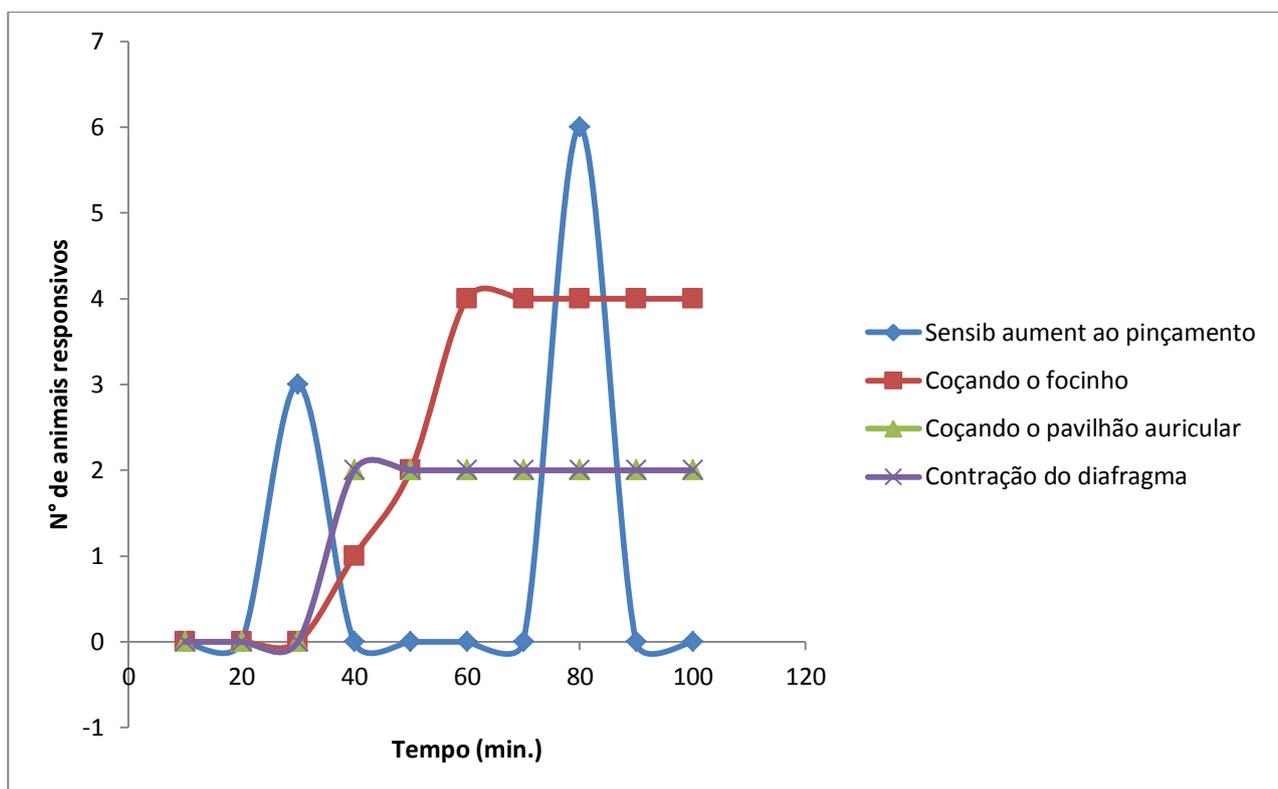


Figura 22. Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de $600\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ip), (n=6).

Na figura 23 ainda podem ser observadas respostas excitatórias sobre o SNC, destacando-se a atividade exploratoria intermitente em todos os animais à partir dos 40 min., e a presença de tremores no corpo aos 80 min., denunciando excesso de excitabilidade de forma semelhante a ação de agonistas serotoninérgicos. A presença de arrepios intermitentes a partir dos 80 min. talvez possam estar correlacionados aos mesmos tipos de estímulos, conforme mostra a figura 24.

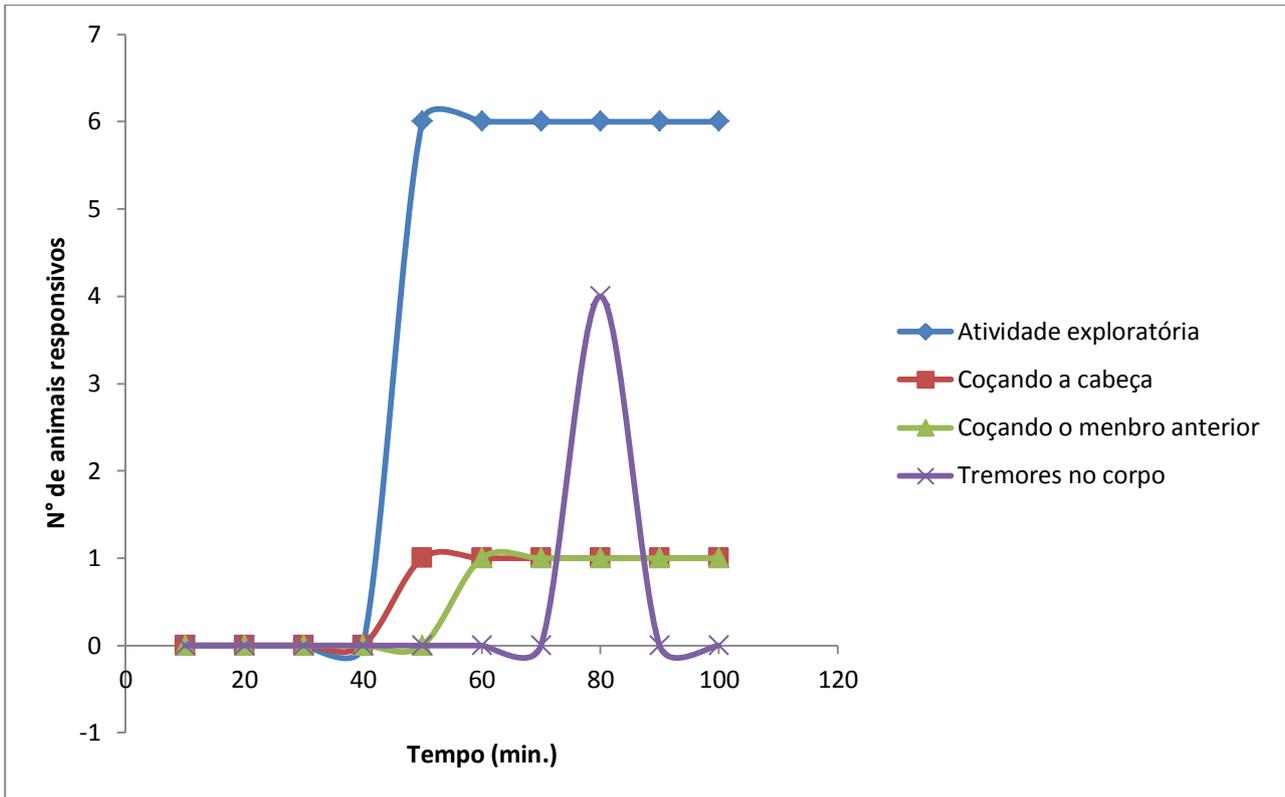


Figura 23. Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de $600\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ip), (n=6).

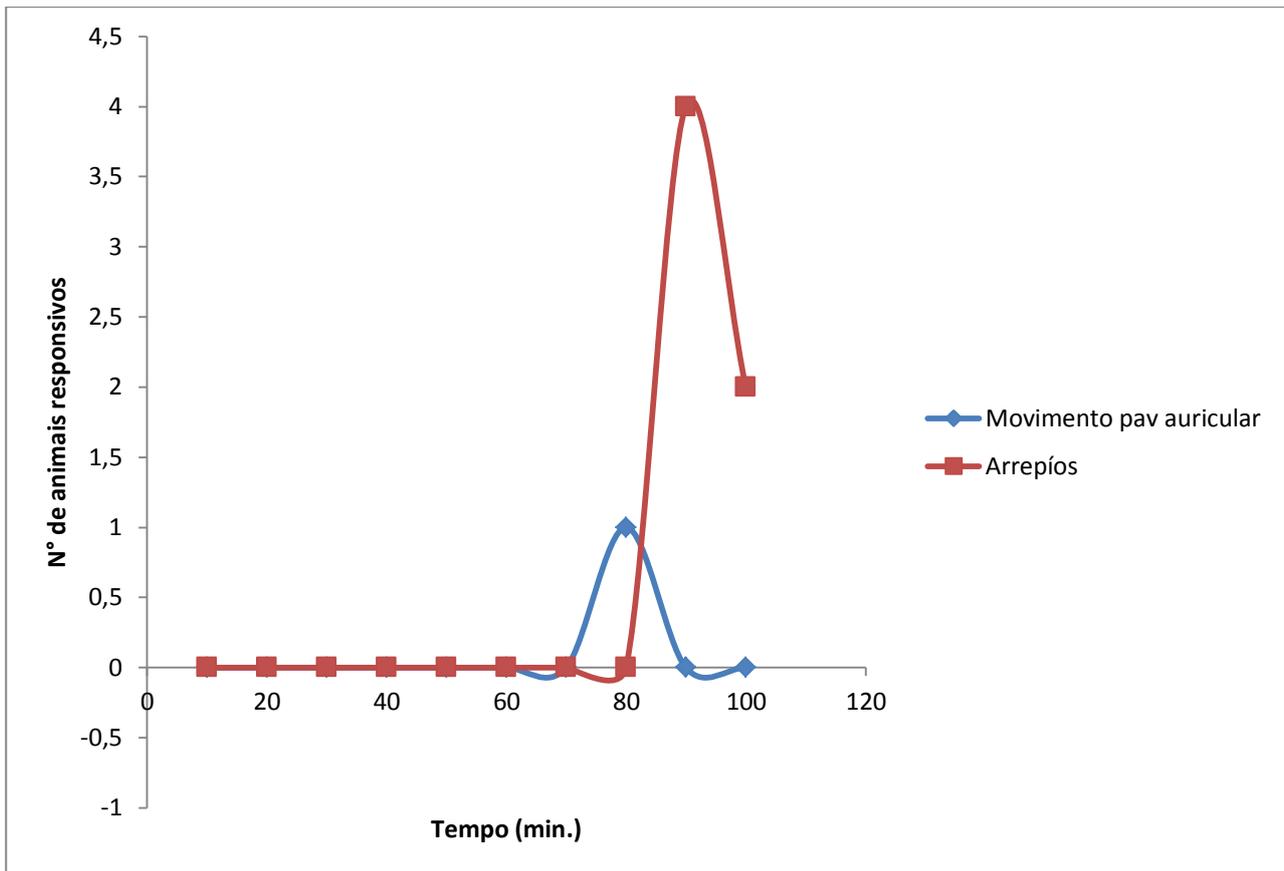


Figura 24. Ações excitatórias sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de 600mg.kg^{-1} (ip), (n=6).

Quanto às ações depressoras, verificou-se na figura 25 uma potencialização dos principais efeitos assinalados anteriormente para menores doses, destacando-se uma resposta de hipnose, verificada em apenas um organismo nas imediações dos 20 min., diminuindo em seguida, assim como respostas de perda de equilíbrio postural, onde os animais afetados exibiam tombamento lateral, não conseguindo manter a postura de equilíbrio normal. Este último resultado assinala um forte comprometimento do sistema de equilíbrio destes animais, resultado confirmado pelos testes de equilíbrio postural efetuados ao final dos experimentos. Estes efeitos foram mais importantes aos 20 e 80min.

Na figura 26 pode-se observar uma potencialização da resposta de ptose 0, como também o retorno da resposta analgésica por pinçamento do cauda em alguns animais.

Na figura 27 visualiza-se uma forte resposta de agrupamento, sendo que aos 80 min. os animais exibiram uma resposta de apoio do corpo inteiro à superfície denunciando um efeito de hipotonia na musculatura esquelética. Alguns animais exibiram desorientação e tombamento lateral para a esquerda nas tentativas de realizarem movimentos de ambulação, este efeito se confirma pelo

que assinala na figura 28, onde praticamente todos os animais exibiram uma resposta de arreio do trem posterior.

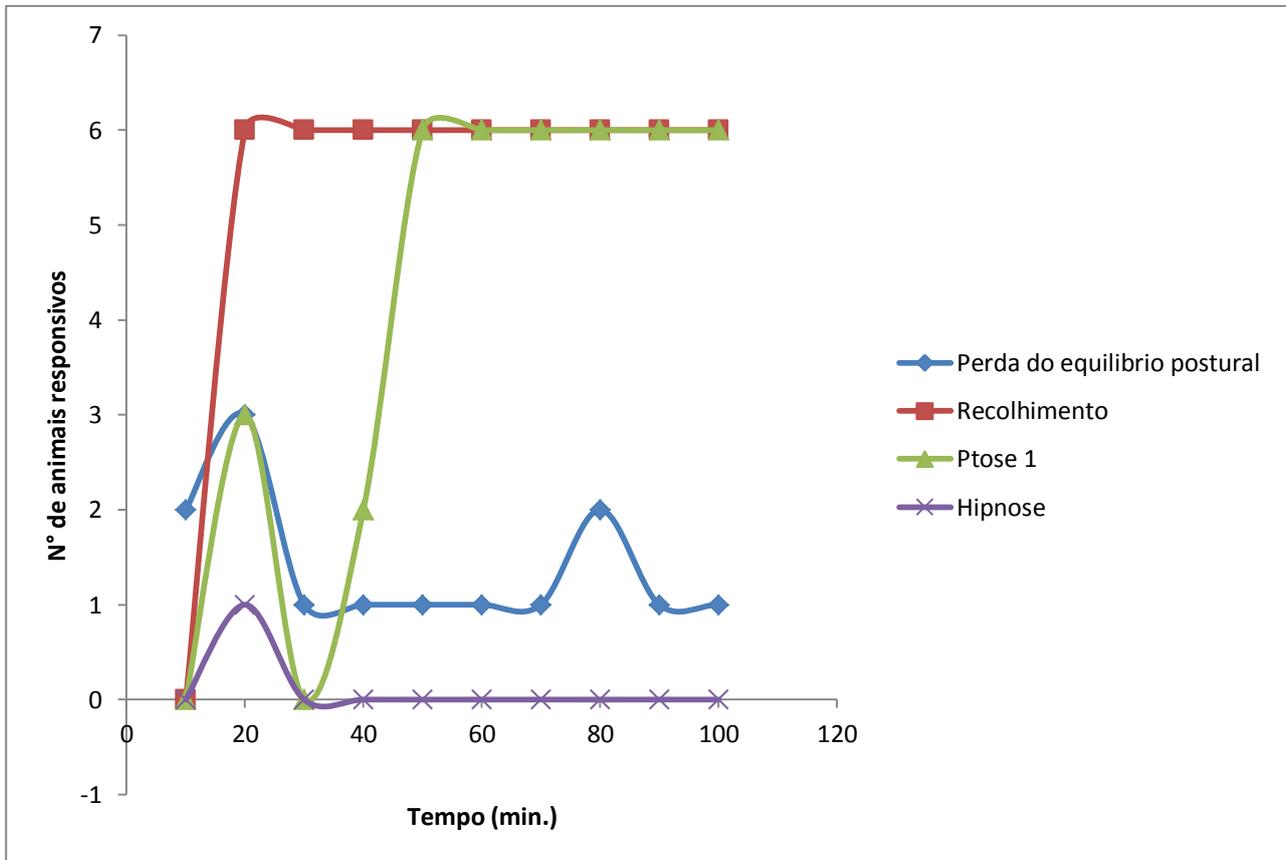


Figura 25. Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , na dose de $600\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ip), (n=6).

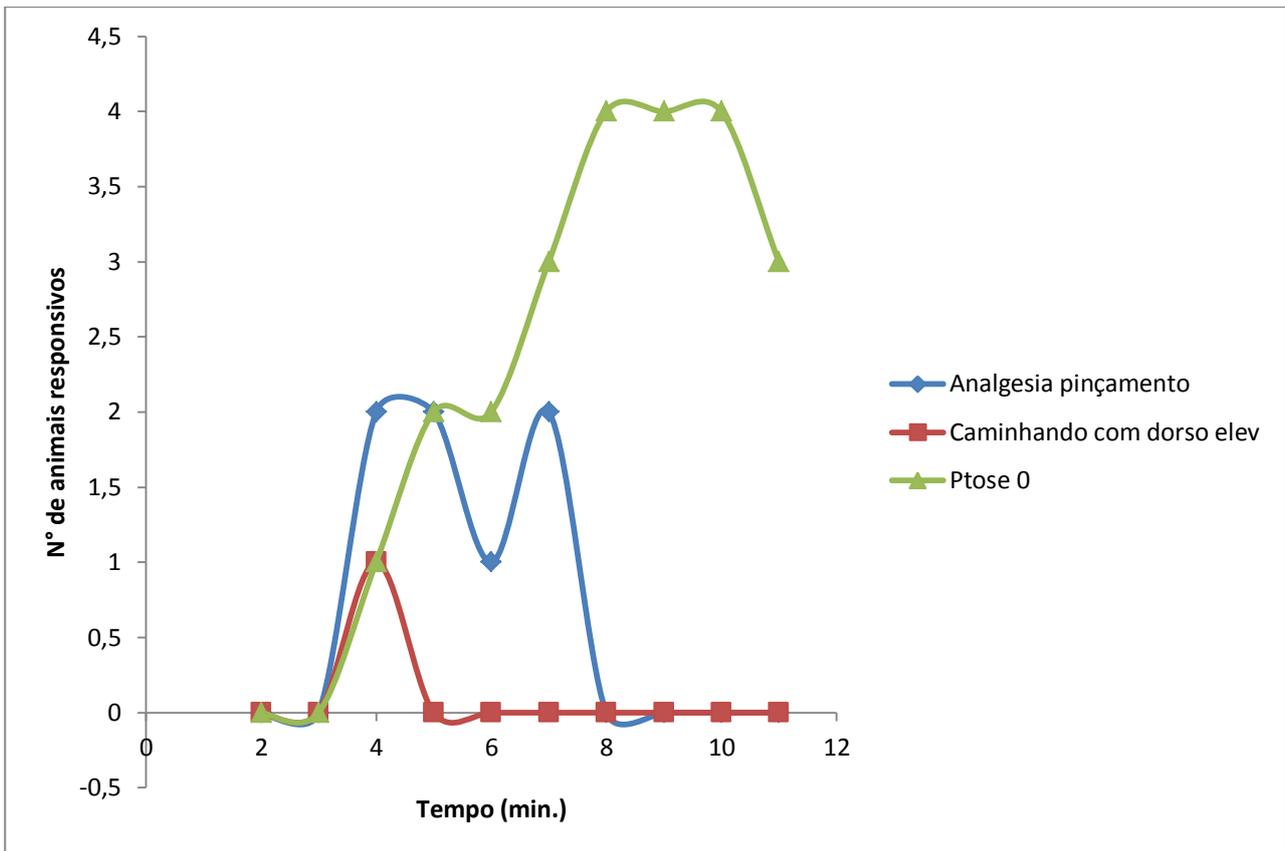


Figura 26. Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de $600\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ip), (n=6).

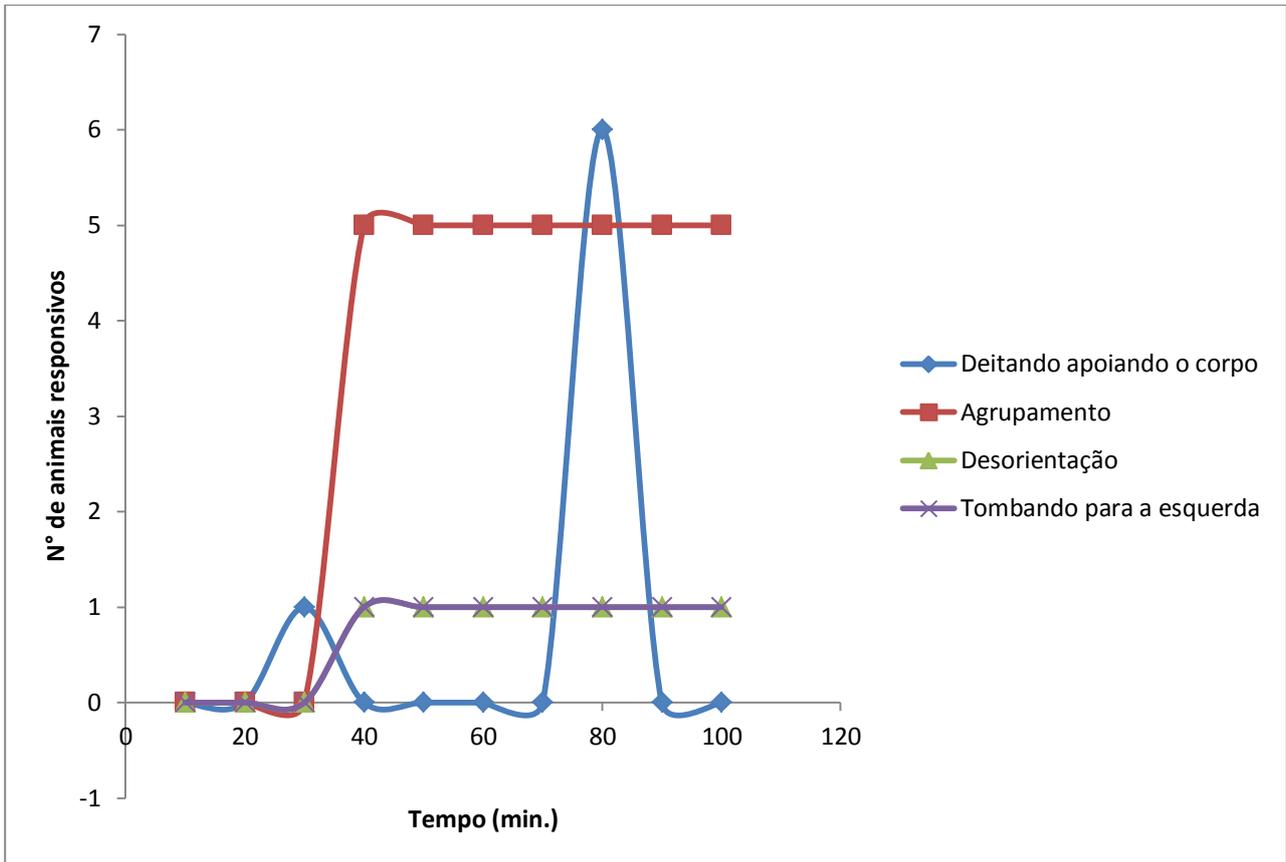


Figura 27. Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de $600\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ip), (n=6).

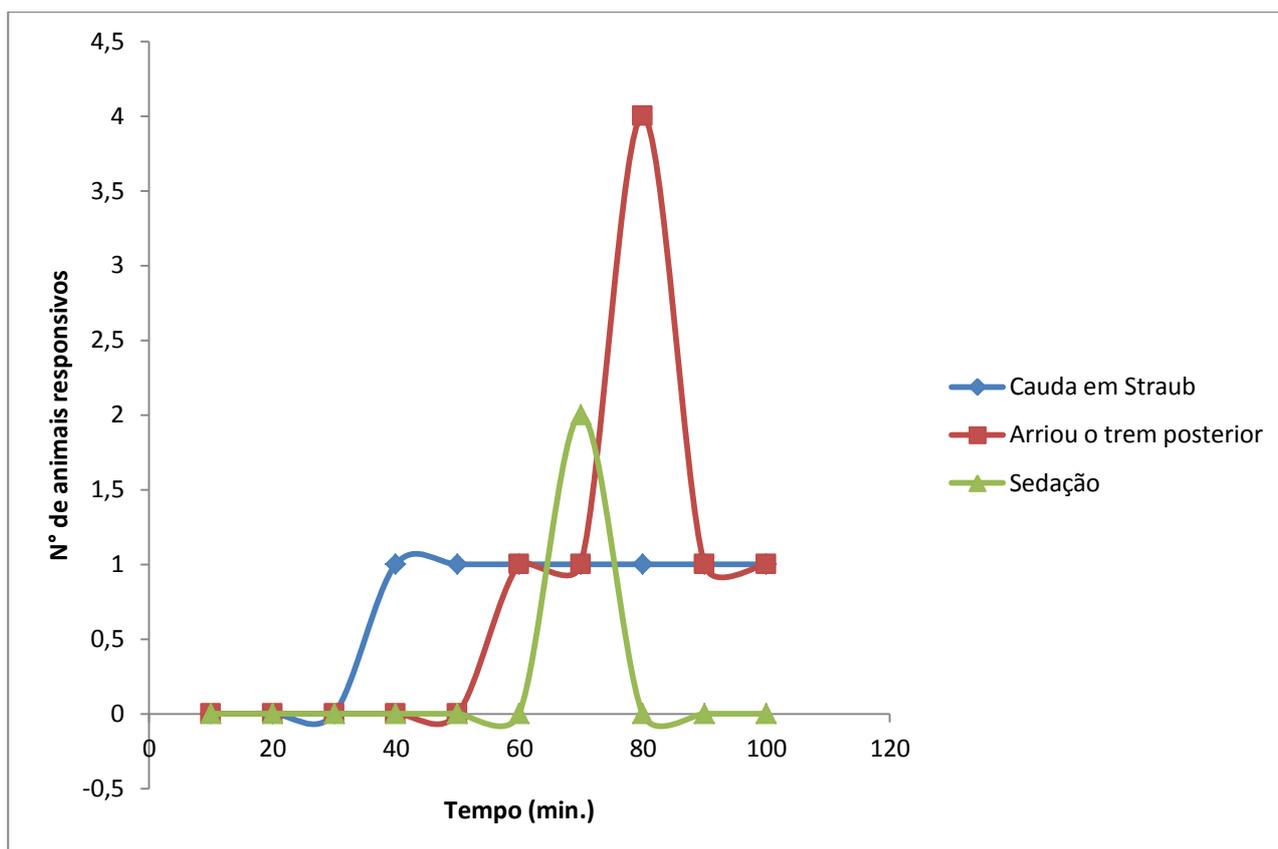


Figura 28. Ações depressoras sobre o SNC em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de 600mg.kg^{-1} (ip), (n=6).

Sobre o SNA, com o aumento da dose para 600mg.kg^{-1} , verificou-se uma resposta de taquipneia intermitente, assim como hiperemia das aurículas, possivelmente decorrentes de um aumento da excitabilidade simpática, como mostram os dados da figura 29. Na figura 30 verificou-se um edemaciamento de focinho intermitente, assim como hipotermia de cauda, também intermitente, e uma discreta ação sobre o sistema gastroentérico onde três animais defecavam intermitentemente.

A hipotermia assinalada acima se relaciona, bem provavelmente, a um efeito de diminuição das porções anabólicas e catabólicas em decorrência de um quadro de intoxicação, associada à incompetência de tecidos depuradores como o fígado de interferirem na ação biotransformadora de drogas e substâncias estranhas ao organismo.

O edemaciamento do focinho, denuncia uma ação pró-inflamatória acionada pela participação dos tecidos locais em promoverem, junto às células residentes transformações na dinâmica circulatória local, redundando edemaciamento e conseqüentemente dificuldade de apreensão do ar e identificação olfativa de substratos.

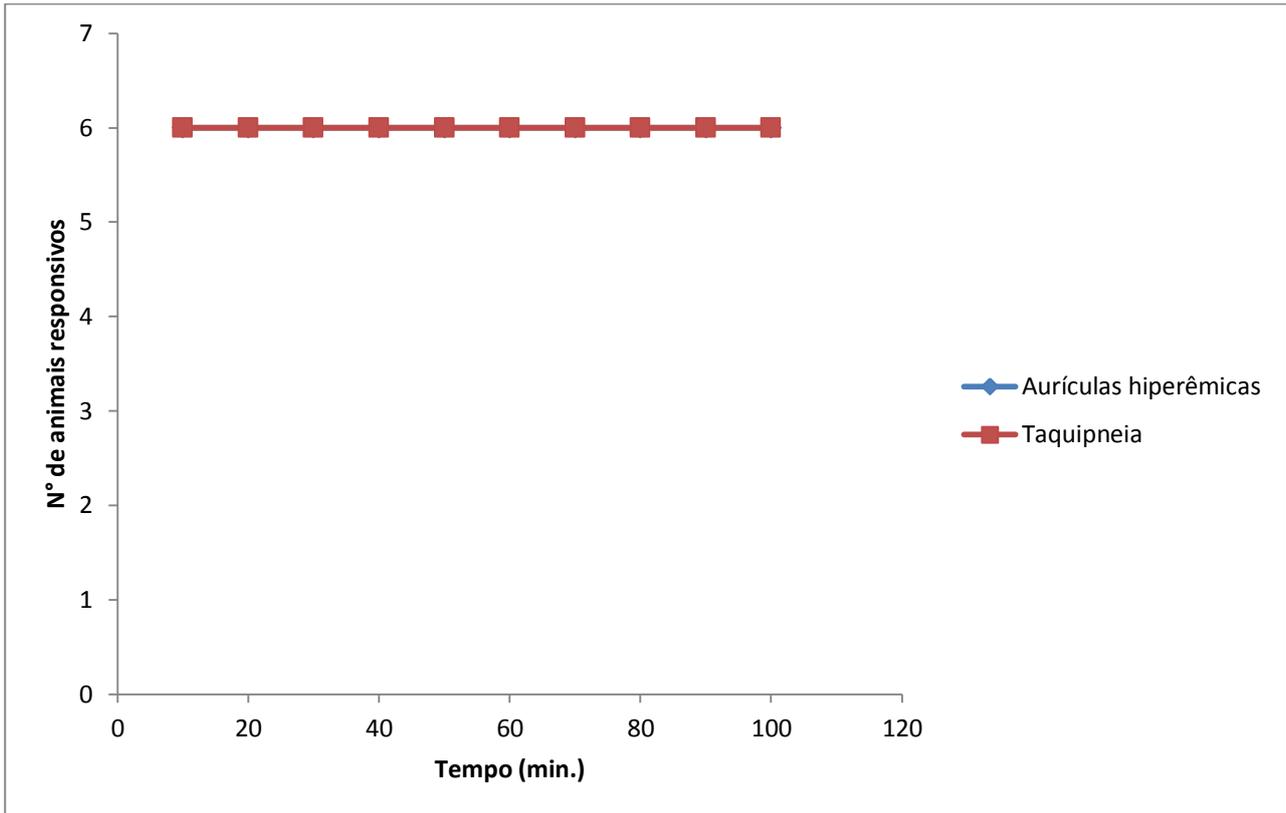


Figura 29. Ações sobre o SNA em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de $600\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ip), (n=6).

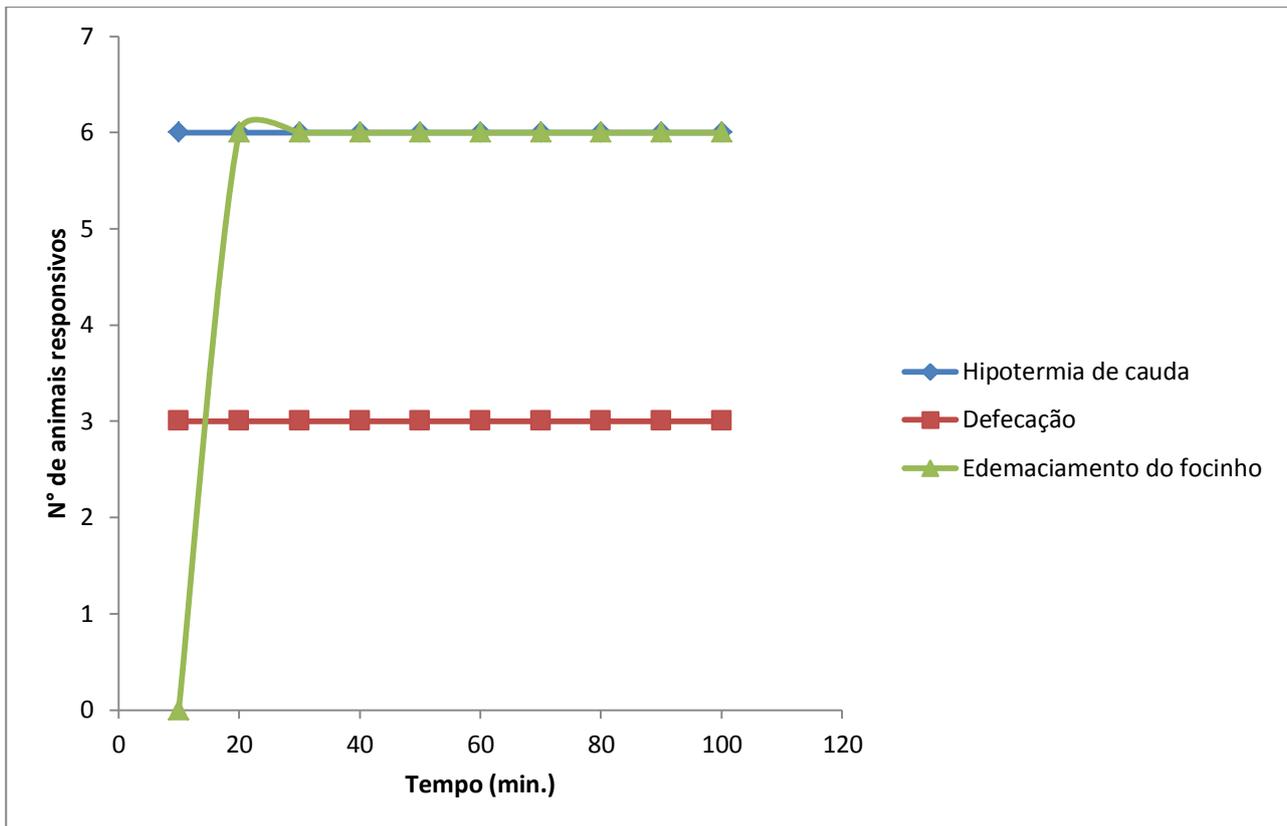


Figura 30. Ações sobre o SNA em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de $600\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (ip), (n=6).

Como outras respostas observadas, foram registrados reflexo do soluço em dois animais, por volta de 80 min., além de uma modificação na coloração da cabeça dos animais, assumindo uma coloração rosada, denunciando transformações vasculares importantes neste compartimento, talvez em decorrência de uma forte ação pró-inflamatória, conforme mostram os dados da figura 31. O reflexo do soluço pode estar associado a mudanças nos padrões de contração diafragmático, em decorrência de conflitos neurológicos nas imediações dos centros reguladores da ventilação pulmonar.

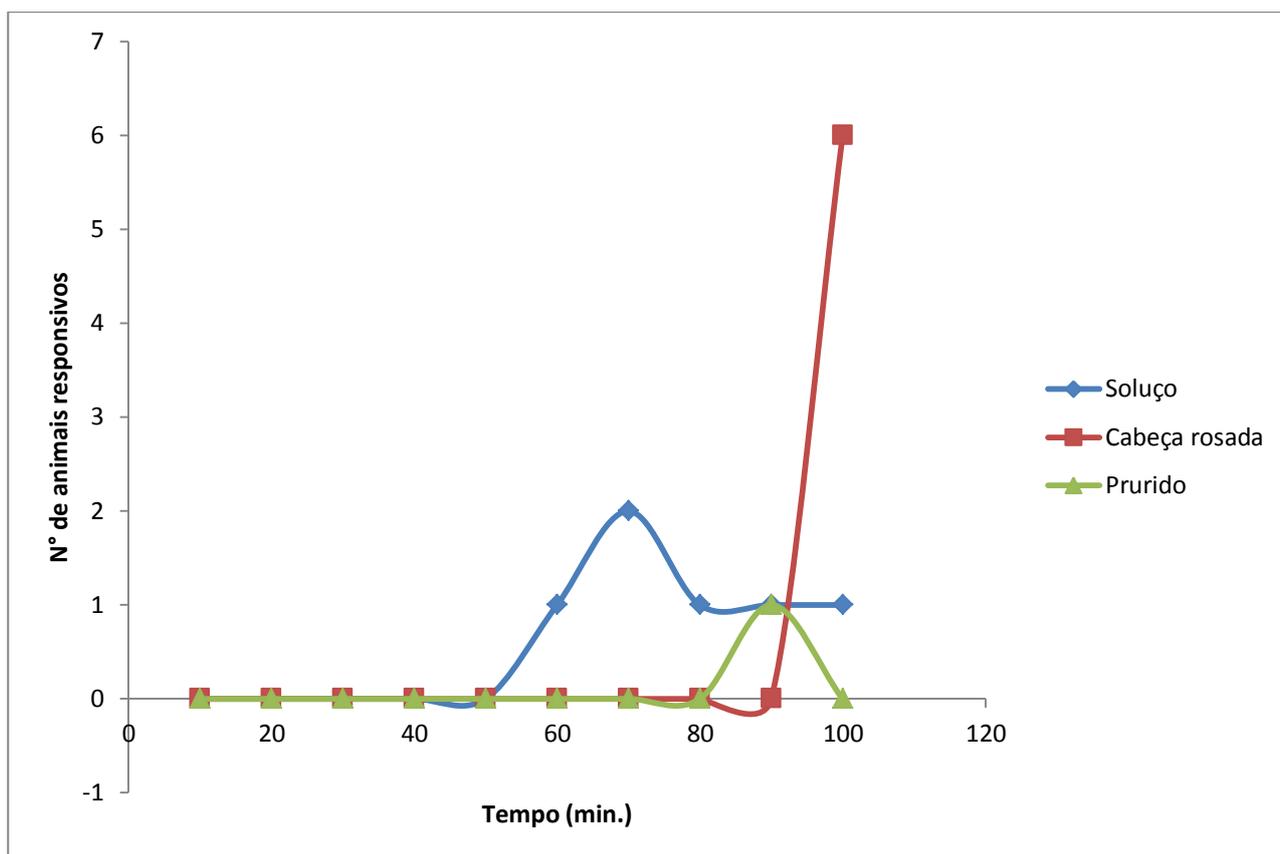


Figura 31. Outras respostas comportamentais em camundongos *Mus musculus* albino suíço em atividade espontânea, estimulados com aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, na dose de 600mg.kg^{-1} (ip), (n=6).

Finalmente, com a aplicação do teste de equilíbrio, que consiste em submeter cada animal por 10s a movimentos rotatórios, verificou-se que com o aumento da dose de ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE, os animais exibiam dificuldades crescentes em recuperar as condições de equilíbrio, embora não tenham sido observadas respostas de atividade convulsiva, conforme mostram os dados da tabela 3. Estes resultados assinalam uma importante ação desta aminoquinona sobre certos componentes do SNC relacionados com os sistemas que definem as bases operacionais do equilíbrio destes animais, conforme a dose aplicada.

Disto tudo, verifica-se a necessidade de novos ensaios que visem o aprofundamento destas respostas acima assinaladas, no sentido de se identificar melhor os possíveis mecanismos de ação relacionados.

Tabela 3. Respostas comportamentais exibidas por camundongos estimulados com diferentes doses de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE , submetidos ao teste de equilíbrio.

DOSES			
100mg.kg⁻¹	200mg.kg⁻¹	300mg.kg⁻¹	600mg.kg⁻¹
Respostas normais após submissão aos movimentos rotatórios por 10 s (n = 8).	Dois camundongos apresentaram dificuldade para sair do local. Cinco camundongos não conseguiram locomover-se. Apenas um camundongo exibiu comportamento normal (n = 8).	Cinco animais exibiram dificuldades em sair do local Três camundongos apresentaram a cauda em Straub (n = 8).	Cinco camundongos apresentaram a cauda em Straub com perda do equilíbrio lateral, com tombamento para a esquerda. destes, quatro ficaram completamente desorientados. Apenas um camundongo apresentou somente desorientação sem cauda em Straub (n = 6).

De acordo com os resultados acima, verificou-se a ocorrência de efeitos do tipo dose-resposta, conforme mostram os dados da tabela 4. As respostas associadas aos efeitos depressores sobre o SNC parecer ter maior reciprocidade quanto à dose do que as respostas excitatórias sobre o SNC. As melhores relações do tipo dose-respostas foram aquelas que melhor apresentaram o coeficiente de determinação para uma função linear que relacione as duas variáveis. Nas figuras 32 a 36 podem ser visualizadas graficamente estas relações. As relações que apresentam o coeficiente angular positivo denotam uma relação positiva crescente entre dose e % de efeito. Já as relações que

apresentam um coeficiente angular negativo denotam uma relação entre dose e % de efeito negativo, ou seja, decrescente; quanto maior a dose, menor o efeito.

Tabela 4. Relação dose - % de efeito de comportamentos exibidos por camundongos estimulados por diferentes dosagens de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATO . Tomando-se como referência uma função linear do tipo $y = a \cdot x + b$, destacam-se os coeficientes angulares e lineares das funções obtidas além do coeficiente de determinação.

Efeitos	C. angular	C. linear	R²
EXCITATÓRIOS SOBRE O SNC			
Atividade exploratória	0,122	-10,43	0,882
Contração abdominal	0,185	-28,57	0,908
Espasmos	0,144	-17,64	0,973
Tremores no corpo	0,012	-1,564	0,68
DEPRESSORES SOBRE O SNC			
Ptose 1	0,98	11,36	0,906
Ptose 0	0,061	0,163	0,973
Sedação	-0,052	34,76	0,548
Analgesia em condição de pinçamento	-0,03	27,64	0,103
Ambulação apoiada no trem posterior	0,117	-19,21	0,814
Agrupamento	0,071	10,03	0,713
SOBRE O SNA			
Piloereção	0,18	-5,669	0,947
Taquipneia	0,18	-16,60	0,686

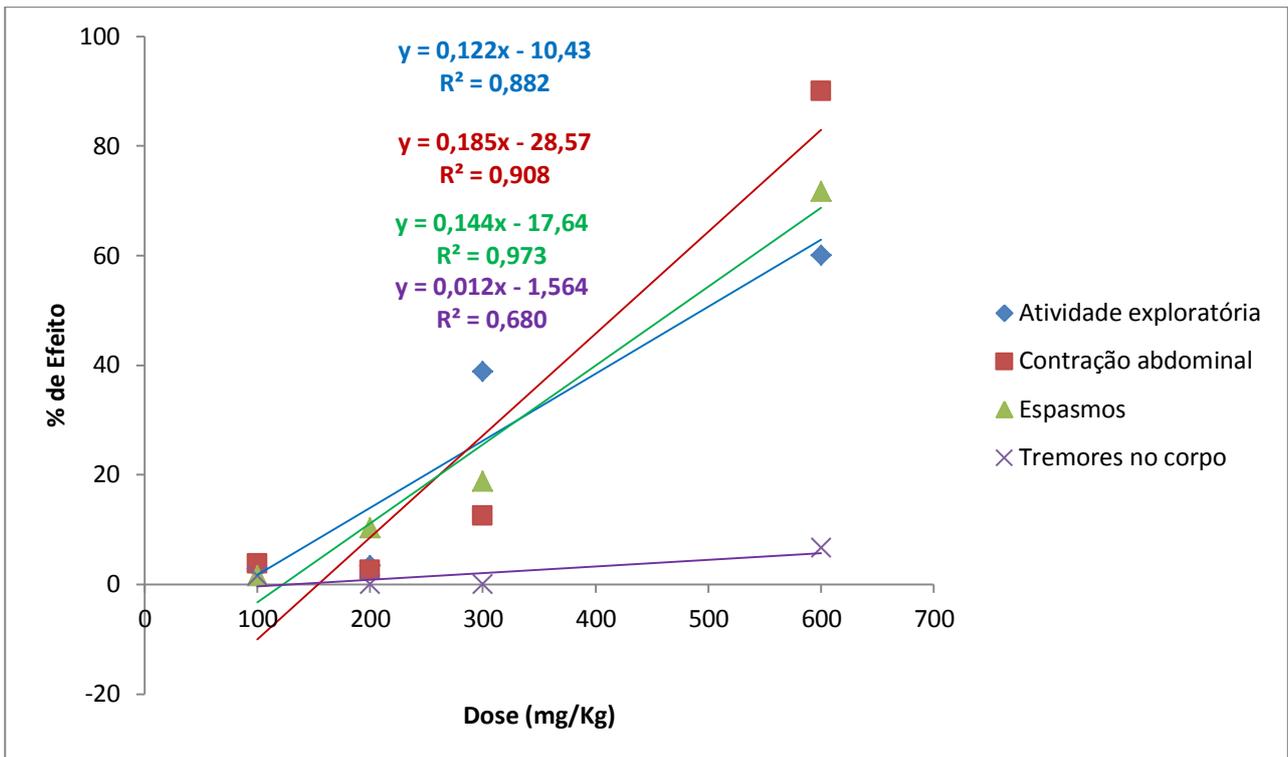


Figura 32. Relação dose x % de efeito em ações estimulantes sobre o SNC em condição de atividade espontânea em camundongos estimulados com diferentes doses de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATO .

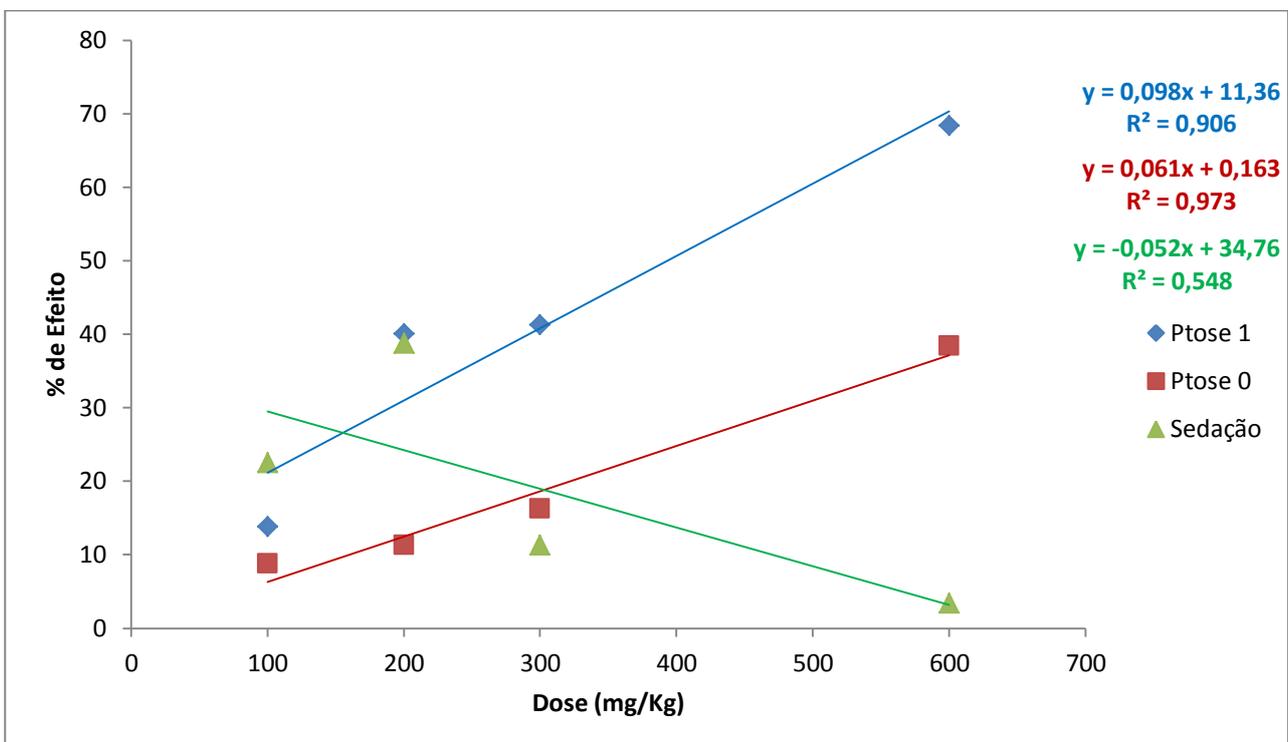


Figura 33. Relação dose x % de efeito em ações depressoras sobre o SNC em condição de atividade espontânea em camundongos estimulados com diferentes doses de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATO .

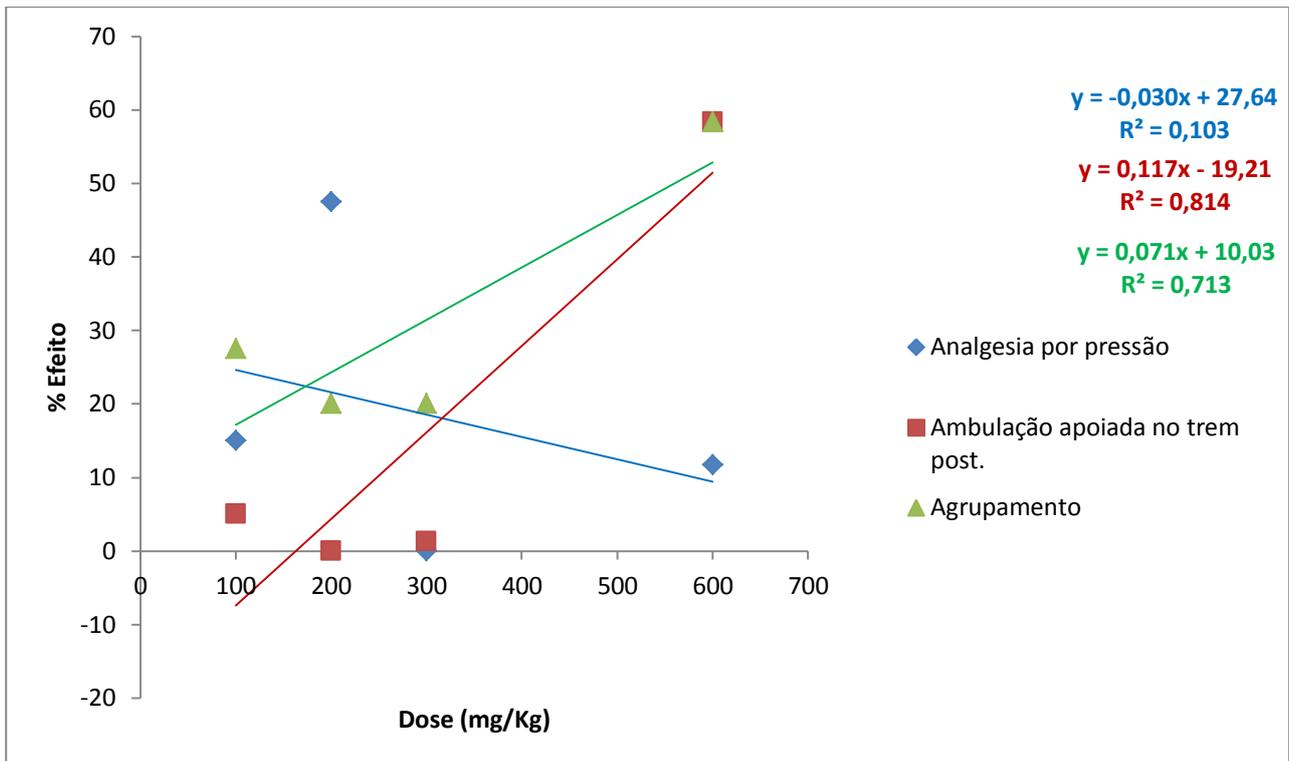


Figura 34. Relação dose x % de efeito em ações depressoras sobre o SNC em condição de atividade espontânea em camundongos estimulados com diferentes doses de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATO .

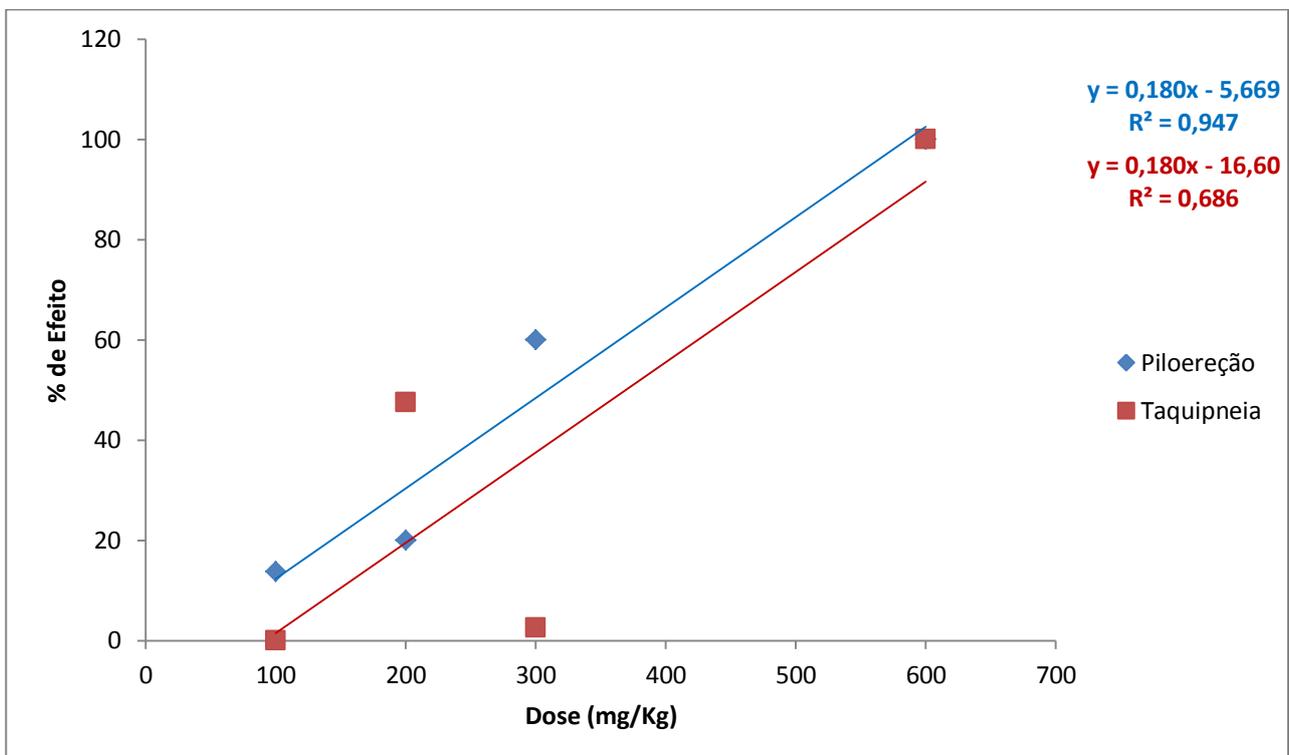


Figura 35. Relação dose x % de efeito em ações sobre o SNA em condição de atividade espontânea em camundongos estimulados com diferentes doses de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATO .

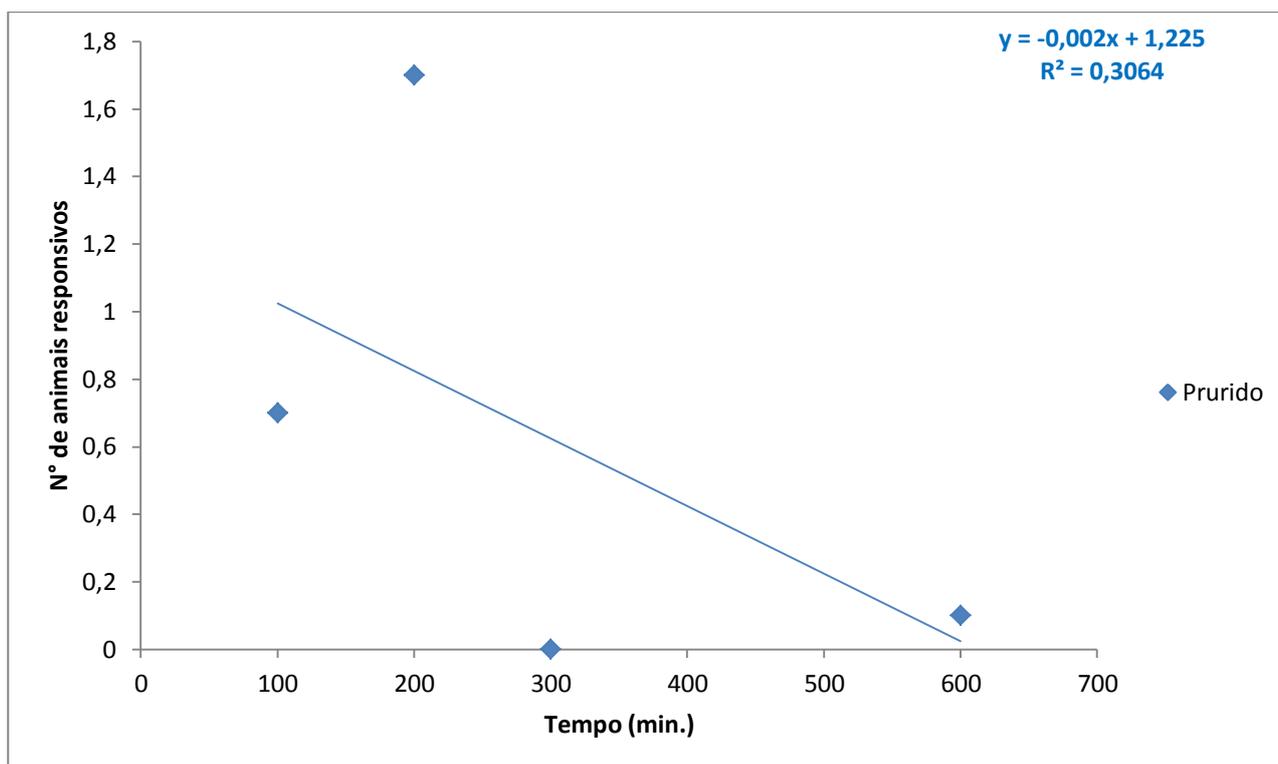


Figura 36. Relação dose x % de efeito em ações sobre a condição de atividade espontânea em camundongos estimulados com diferentes doses de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATO .

Quanto à determinação da DL_{50} mediante o emprego do método gráfico, relacionando n° de probitos e dose, mediante a expressão matemática $P = 2,9846 D - 2,126$ sendo P o número de probitos e D o log da dose em $mg.kg^{-1}$, para um coeficiente de determinação de 0,942; verificou-se que a $DL_{50} = 244,1125 \pm 23,2883 mg.Kg^{-1}$, conforme mostram os dados da figura 37. O total de óbitos obtidos em cada grupo foi aferido após os ensaios de atividade espontânea onde os animais ficavam sob observação por 48 horas.

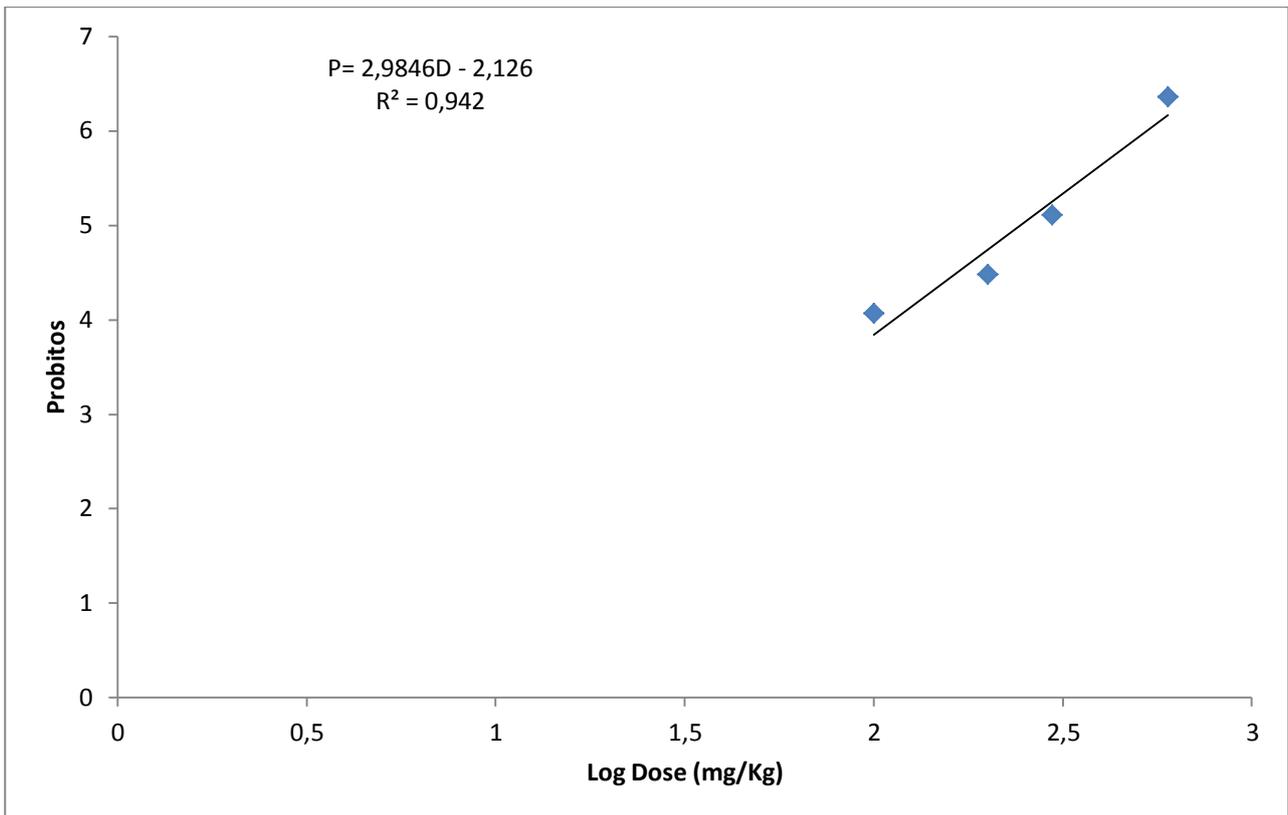


Figura 37. Relação linear entre probitos e log da Dose (mg.kg⁻¹) de aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO)ACETATO , para a determinação da DL₅₀

Em qualquer terapia medicamentosa o bom senso sinaliza para a questão central que é a observação do IT da droga. A substância testada neste experimento assim como o lapachol, pode ser considerada de moderado a alto IT, se comparado a outros agentes antineoplásicos (SIEBER, 1976).

O lapachol possui uma toxicidade aguda com níveis de DL₅₀ em 1.600 mg.kg⁻¹ de peso, via intraperitoneal, em ratos, enquanto a β-lapachona, tem dose letal em torno de 80 mg.kg⁻¹ (GUERRA et al., 2001). Isto nos remete ao fato de que manipulações sintéticas na molécula base das quinonas podem ampliar ou reduzir o grau de toxicidade. No caso da aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATO a DL₅₀ (244,1125 ± 23,2883 mg.Kg⁻¹) associação com aminoácido parece ter reduzido o nível de toxicidade.

No presente experimento efeitos depressores sobre o SNC da aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATO tiveram relação direta com dose. O mesmo não foi observado nas respostas excitatórias sobre o SNC com relação a atividade exploratória, contração abdominal, espasmos e tremores no corpo. Segundo Araujo et al., (2002), os principais sinais observados com doses altas de lapachol foram: depressão do SNC, exaustão

física, dificuldade respiratória e epistaxis¹. A substância testada apresentou similaridades quanto à depressão da atividade do SNC e alterações respiratórias. Nos animais estudados no presente experimento, a taquipnéia observada também teve efeito dose-resposta da substância testada devido a efeito estimulador do SNA.

4. CONCLUSÃO

A aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHYDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATO possui efeito depressor sobre o SNC numa relação dose-resposta direta, O cálculo da DL₅₀ para substância teste demonstrou baixos níveis de toxicidade nas dosagens inferiores a $244,1125 \pm 23,2883 \text{ mg.Kg}^{-1}$.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S.V.; DEFELICE, L.J. Ionic Currents in the Human Serotonin Transporter Reveal Inconsistencies in the Alternating Access Hypothesis. **Biophysical Journal**. V.85, p.1548-1559, 2003.

ALMEIDA, L.C.B. **Synthesis of new Phytogrowth-inhibitory substituted Aryl-p-Benzoquinones**. V.3, p.553-567, 2006.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; VITAL, M.A.B.F. Modelos animais em psicofarmacologia. In: ALMEIDA, R.N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.53-61.

ARAÚJO, E.; ALENCAR, J.R.B.; ROLIM NETO, P.J. Lapachol; Segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2002, vol.12, suppl.1, pp. 57-59. ISSN 0102-695X.

ARÊAS, P.C.F. Avaliação da atividade antitumoral de naftoquinonas. Dissertação de mestrado apresentada ao **Programa de Neuroimunologia da Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro**, 2007.

BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p.61-70.

BOLTON, J.L.; TRUSH, M.A.; PENNING, T.M.; DRYHURST, D.; MONKS, T.J. Role of Quinones in Toxicology. **Chemical Research Toxicology**. V.13, n.3, p.135-160, 2000.

CAMARA, C.A. ; SILVA, T.M.S. ; BARBOSA, T. P. ; SILVA, T. G. ; MARTINS, R. M. ; VARGAS, M. D. ; PINTO, A. C. . Molluscicidal Activity of 2-hidroxy-[1,4-]naphthoquinone and derivatives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, p. 329-334, 2008. Fator de Impacto: 0,895 (JCR-2007).

GUERRA, M. de O. et al. **Toxicology of Lapachol in rats: embryolethality**. *Rev. Bras. Biol.*, Feb 2001, vol.61, no.1, p.171-174. ISSN 0034-7108

ISHIKI, N.; ONISHI, H.; MASHIDA, Y. Evaluation of antitumor and toxic side effects of mitomycin C–estradiol conjugates. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 279, p.81-93, 2004.

LAPA, A.J. et.al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et. Al. (Ed). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 200.p.181-196.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. The Pharmacological Evaluation of Natural Products – General and Specific Approaches to Screening Ethnopharmaceuticals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.8, p.127-147, 1983.

MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária: farmacologia e técnicas**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.17-32; p.391-393. 2008.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2ª Ed. São Paulo: Ed. Atheneu. p.696, (2003).

RANG, H.P.; DALE, M.M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 703p.

SIEBER, S. M; MEAD, J.A. R. ADAMSON, R. H. **Pharmacology of antitumor agents from higher plants cancer treatment reports** 60 (8): 1127 – 1139. Aug, 1976.

TORRES, S.M.; SILVA, E.C.S.; JIMENEZ, G.C.; SILVA NETO, J.F.; MAIA, F.C.L.; CÂMARA, C.A.; SILVA JÚNIOR, V.A. Avaliação de substâncias derivadas de quinonas em dosagem de aplicação única sobre inibição tumoral em Carcinoma de Ehrlich implantados em camundongos. In: **III Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana**, 2007.

Capítulo III

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO TUMORAL DA AMINOQUINONA ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHDIRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATO SOBRE O CARCINOMA DE ERLICH EM CAMUNDONGOS ALBINUS SWISS

T A Pereira de Moraes³, M J Sarmiento Filha¹; C Amorim Camara¹; T M Sarmiento Silva¹; C Pessoa², G Chaves Jimenez³; V A da Silva Junior³.

¹Departamento de Ciências Moleculares – UFRPE;

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC;

³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal-UFRPE

Autor para correspondência: Valdemiro Amaro da Silva Junior (vajunior@dmfa.ufrpe.br).

RESUMO

Quinonas e seus derivados são substâncias de origem natural ou sintetizadas artificialmente. A aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihidronaphthalen-2-ylamino) acetate foi previamente escolhida em teste de triagem comparativa e usada contra o carcinoma de Erlich sólido em modelo murino. Dezoito camundongos foram divididos em grupo controle (n=6); tratado com metotrexato (n=6; 71.7mg.kg⁻¹) e tratado com ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihidronaphthalen-2-ylamino) acetate (n=6; 84.56 mg.kg⁻¹). Quatro dias após as células do tumor ascítico de Erlich serem implantadas subcutaneamente nos camundongos, foi usada dose única de metotrexato e aminoquinona. No 8º dia, a aminoquinona inibiu 67% do crescimento do tumor contra 58% do metotrexato. Nenhuma mudança substancial de parâmetros bioquímicos e achados histopatológicos foi observada no fígado e nos rins dos animais tratados com aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihidronaphthalen-2-ylamino) acetato é uma droga promissora que pode ser utilizada na terapia contra o câncer.

Palavras-chave: Aminoquinona, tumor de Ehrlich, camundongo.

ABSTRACT

Quinones and its derivates are substances of the natural occurrence or synthesized artificially. The aminoquinone ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihidronaphthalen-2-ylamino) acetate was previously chosen in the comparative screening test and used against solid Ehrlich carcinoma in murine model. Eighteen mice were divided in control group (n=6); treated with methotrexate (n=6; 71.7mg.kg⁻¹) and treated with ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihidronaphthalen-2-ylamino) acetate (n=6; 20mg.kg⁻¹). Four days after the Ehrlich tumor ascitic cell had been implanted subcutaneously in mice, only one dose of methotrexate and aminoquinone was used. In the 8th day, aminoquinone inhibited 67% of the tumor growth against 58% of methotrexate. None substantial change of biochemical parameters and histopathologic findings was noted in liver and kidneys of animals treated with aminoquinone. The aminoquinone ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihidronaphthalen-2-ylamino) acetate is promising drug that can be used in cancer therapy.

Key words: Aminoquinone, Ehrlich tumor, mouse.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as estimativas para os anos de 2012/2013 apontam que ocorrerão 518.510 novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, que é o tipo mais incidente para ambos os sexos (134 mil casos novos), seguido de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (PAULA et al., 2013).

As quinonas e seus derivados são substâncias de ocorrência natural ou sintetizadas em laboratório (TORRES et al., 2007). Suas fontes naturais mais frequentes são plantas superiores, artrópodes, fungos, líquens, bactérias, algas e vírus, com funções biológicas múltiplas em ciclos metabólicos os mais diversos destes organismos (CAMARA et al, 2007; BOLTON et al., 2000). Estas são classificadas de acordo com o sistema aromático presente em sua estrutura, tendo as naftoquinonas um anel naftalênico característico. Vários estudos têm relatado a importância da atividade antitumoral das naftoquinonas. Sendo responsáveis por uma significativa redução do crescimento celular em linhagens tumorais quando conjugadas a outros agentes (ARÊAS, 2007).

O lapachol (2-hidroxi-3-(3-metilbutenil)-1-4-naftoquinona) é uma naftoquinona encontrada na casca e lenho da *Tabebuia sp* e *Tecoma sp*. Na casca ocorre em quantidades inferiores às do lenho. Tem atividades antiinflamatória, analgésica, antimalárica, esquistossomicida, antiviral, tripanocida, leishmanicida, antifúngica, antiulcerantes e antineoplásica (SILVA et al., 2003, FERREIRA, 2005, SILVA, 2005).

A β -lapachona, uma orto-naftoquinona, tem sido amplamente estudada principalmente por apresentar efeitos seletivos em linhagens tumorais quando comparados a linhagens normais. Vários mecanismos de ação das naftoquinonas se apresentam de forma dose e tempo-dependente. A inibição do crescimento celular observada, pode ocorrer em função da indução da apoptose, inibição da topoisomerase II ou estresse oxidativo, entre outros (ARÊAS, 2007). A ação inibitória sobre a α -polimerase do DNA, revelou-se específica, pois comparada com outros inibidores, a β -lapachona apresentou características distintas e ineditismo no seu modo de ação, o que confere a esta quinona um grande potencial como droga de valor para a quimioterapia de câncer, particularmente no câncer de próstata (CAMARA et al., 2007).

Lee e colaboradores (2005), demonstraram que a β -lapachona, presente na *T. avellanadae*, foi capaz de diminuir a expressão da proteína e RNAm da COX-2 de maneira dependente da concentração. Além disso, a β -lapachona também inibiu a produção de PGE2 em células DU145 (linhagem celular de carcinoma prostático humano). Os autores sugeriram baseados nesses

resultados, que a inibição da produção de PGE2 e expressão de COX-2 confirmam os resultados que a β -lapachona inibe o crescimento e induz a apoptose nessa linhagem celular de carcinoma prostático. Em um estudo sobre o mecanismo de ação da β -lapachona na atividade contra células e topoisomerasas de DNA, observou-se que esta substância é citotóxica contra várias células tumorais sensíveis e resistentes, incluindo-se células tumorais resistentes à ação da camptotecina. Este estudo revelou que a β -lapachona também age contra a topoisomerase II- α , via uma rota bioquímica independente de ATP, pelo aparecimento de formas reversíveis de complexos clivados (CAMARA et al., 2007).

As naftoquinonas foram descritas como responsáveis por uma significativa redução do crescimento celular em linhagens tumorais quando conjugadas a outros agentes, como o Tiosemicarbazone (NTQS) e seus complexos formados com metais. A citotoxicidade do NTQS associada ao cobre, por exemplo, mostrou ser maior que a do Etoposídeo, quimioterápico usado na clínica (CHEN et al., 2004).

Vários estudos têm relatado a importância da atividade antitumoral das naftoquinonas. A β -Lapachona destaca-se neste âmbito e sua atividade biológica justifica a continuidade dos estudos com naftoquinonas e seus derivados, como a 2-fenil- β -lapachona e ésteres de naftoquinonas, agentes ativadores do estresse oxidativo e inibidores de topoisomerase II, respectivamente (KONGKATHIP et al., 2003).

Recentes experimentos demonstraram que a aminoquinona 7-aminoisoquinolina -5,8-quinona apresenta atividade antitumoral severa em diversas linhagens celulares. A análise QSAR revela parte do potencial desta aminoquinona como um importante parâmetro de determinação de atividade antitumoral em linhagens celulares de adenocarcinoma gástrico AGS e carcinoma de bexiga J82. Estes resultados sugerem que os derivados aminoquinonas podem possuir atividade antitumorais (VALDERRAMA et al., 2009).

De todo modo, não se deve considerar a toxicidade elevada das quinonas como um fator limitante ao uso clínico. Novas expectativas colocam-se nos estudos futuros da relação atividade biológicas *versus* estrutura química, uma área de atuação aberta à química medicinal, que pode levar à solução de problemas de toxicidade (SILVA, 2003).

A elevada incidência de câncer tem atingido diversos segmentos da sociedade, este fato pode estar correlacionado com as transformações sócio-econômicas e culturais observadas nos últimos anos. O câncer tem sido causa de elevado número de mortes, além de mutilações e incapacitações, afetando consideravelmente a população (VISENTIM, 2008). O objetivo deste trabalho foi de avaliar uma série sintética de aminoácidos em associação com as naftoquinonas na inibição do carcinoma de Ehrlich em camundongos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 TUMOR DE EHRLICH

2.1.1 MANUTENÇÃO DA LINHAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS

O tumor de Ehrlich ocorre na forma ascítica na cavidade abdominal de camundongos. Os animais apresentam o abdômen distendido a partir do sexto dia de desenvolvimento do tumor, sobrevivendo aproximadamente 15 dias. Esta linhagem celular foi mantida em camundongos albino *swiss* através de passagens contínuas a cada 7 dias onde, após esse período, os animais foram eutanasiados e suas células puncionadas com seringa esterilizada, para posterior contagem e inoculação nos animais de manutenção.

2.1.2 ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

2.1.2.1 CONTAGEM E VIABILIDADE DAS CÉLULAS TUMORAIS

As células do tumor de Ehrlich mantidas na cavidade peritoneal de camundongos *swiss* foram utilizadas no ensaio *in vivo*. Após o sétimo dia de inoculação, o fluido ascítico foi coletado e o camundongo submetido aos procedimentos de eutanásia.

Para a contagem de células tumorais, 1mL do fluido ascítico foram coletados da cavidade peritoneal dos animais com tumor ascítico de Ehrlich. Esta solução foi centrifugada durante 5 minutos a 3000rpm. O sobrenadante descartado e o precipitado, contendo células tumorais foi lavado três vezes com solução de ringer, e centrifugado novamente. Após a última lavagem foi acrescentado 1mL da solução de ringer ao precipitado e desta suspensão retirou-se 10 μ L que ficou diluída 100 vezes com solução de Azul de Trypan a 0,025%. O número de células tumorais viáveis foi obtido através de contagem direta na câmara de Neubauer, usando objetiva de 40X.

A contagem das células viáveis ocorreu nos quatro quadrantes na diagonal da câmara. O número total de células contadas foi igual à soma das contagens dos quatro quadrantes externo superiores e dos quatro inferiores dividido por dois. O número de células por mL foi obtido usando a fórmula:

$$N^{\circ} \text{ células/mL} = \frac{(n^{\circ} \text{ cél. contadas} \times \text{diluição} \times 10^4)}{4}$$

O total de células foi expresso em números de células tumorais/mL (GUERRA, 1983). Após a contagem das células viáveis, o fluido ascítico foi diluído em NaCl 150mM de modo a obter a concentração de células de $5,0 \times 10^6$ /mL e 100 μ L. Esta solução foi inoculada, por via subcutânea, na região dorso-lateral direita em camundongos saudáveis para indução do tumor.

2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS PARA TESTE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

Decorridos 3 dias após o implante, o volume da massa tumoral foi aferido diariamente durante 7 dias, bem como o peso de cada animal. Foram utilizados 18 camundongos subdivididos nos seguintes grupos experimentais: grupo controle (n=6), os quais foram submetidos à administração de solução veículo (Sol. Fisiológica), via intraperitoneal; grupo tratado com metotrexato (n=6), os quais receberam 71,7mg/kg da referida substância, via intraperitoneal e o grupo tratado com a aminoquinona ETHYL 2-(1,4-DIOXO-1,4-DIHDRONAPHTHALEN-2-YLAMINO) ACETATE (n=6), sendo administrados 20mg/kg da substância, via intraperitoneal. Antes da aplicação as substâncias teste foram previamente diluídas em solução de água/dmsso/tween80.

2.3 – PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Amostras de órgãos vitais (fígado, rins, coração, pulmão e baço) foram coletadas e fixadas em formaldeído 10% (v/v) preparado em PBS 0,01M; pH 7,2. Os fragmentos foram submetidos à clivagem, sendo em seguida processados de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina, cortados em micrótomo rotativo 4 micrômetros e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (H.E.) segundo metodologia descrita por Behmer et al. (1976).

2.4 - PROVAS BIOQUÍMICAS

2.4.1 COLETA DE SANGUE E PROCESSAMENTO

De cada animal foram obtidas amostras sanguíneas, por meio de punção cardíaca. O sangue obtido foi armazenado em tubos de ensaio contendo anti-coagulante e posteriormente foi levado a centrifuga por cinco minutos a 3000rpm. Após a precipitação das células sanguíneas, o soro sobrenadante foi colhido por micropipetas, armazenado em ependoff e guardado em freezer até a realização das dosagens séricas. O soro foi destinado à dosagem de uréia, creatinina, fosfatase alcalina gamaglutamiltranspeptidase (GGT) (KERR, 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 VOLUME E INIBIÇÃO TUMORAL

Na avaliação da evolução do volume tumoral médio (Tabela 1), pode se observar redução significativa do grupo tratado com metotrexato e no grupo tratado com a aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihidronaphthalen-2-ylamino) acetate em relação ao grupo controle tumorado, no dia 5. No dia 6 não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. No Dia 7, novamente não se notou diferença significativa entre os grupos. A redução significativa do volume tumoral no dia 8 de utilização do metotrexato e da aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihidronaphthalen-2-ylamino) acetate foi de 33% e 42%, respectivamente.

Tabela 1 – Médias do volume do tumor de Ehrlich (cm³) em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato (71,7 mg.kg⁻¹) e aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihidronaphthalen-2-ylamino)acetate (20mg.kg⁻¹).

	Controle (n=6)	Metotrexato (n=6)	Aminoquinona (n=6)	p
Dia 5	0,013±0,009a	0,004±0,005b	0,001±0,001b	0,0086
Dia 6	0,012±0,004a	0,007±0,009a	0,003±0,004a	0,0665
Dia 7	0,093±0,103a	0,112±0,017a	0,156±0,060a	0,2981
Dia 8	1,754±0,983a	0,738±0,523b	0,584±0,302b	0,0164

No 5º dia após o implante do tumor e 1º dia de tratamento, os animais tratados com a aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino) acetate apresentaram uma redução muito significativa de 91,6% no volume tumoral em relação ao grupo controle ($p < 0,01$). Tal redução foi superior a dos animais tratados com metotrexato, os quais apresentaram uma inibição tumoral significativa de 71,7% quando comparados aos animais do grupo controle ($p < 0,05$). Por outro lado, não houve diferença significativa entre o volume tumoral dos animais tratados com a aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate e os animais tratados com metotrexato.

Na avaliação da inibição tumoral (Figura 1) constatou-se que no 6º e 7º dia após o implante do tumor, 2º e 3º dia de tratamento, respectivamente, não houve diferença no volume tumoral médio entre os grupos. Por outro lado, no 8º dia após o implante e 4º dia de tratamento, os animais tratados com a aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino) acetate apresentaram uma redução significativa no volume tumoral de 66,73% em relação aos animais do grupo controle ($p < 0,05$). Já os animais tratados com metotrexato apresentaram uma redução significativa de 57,90% no volume tumoral quando comparados com os animais do grupo controle ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferença significativa no volume tumoral entre os animais tratados com a aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino) acetate e os animais tratados com metotrexato.

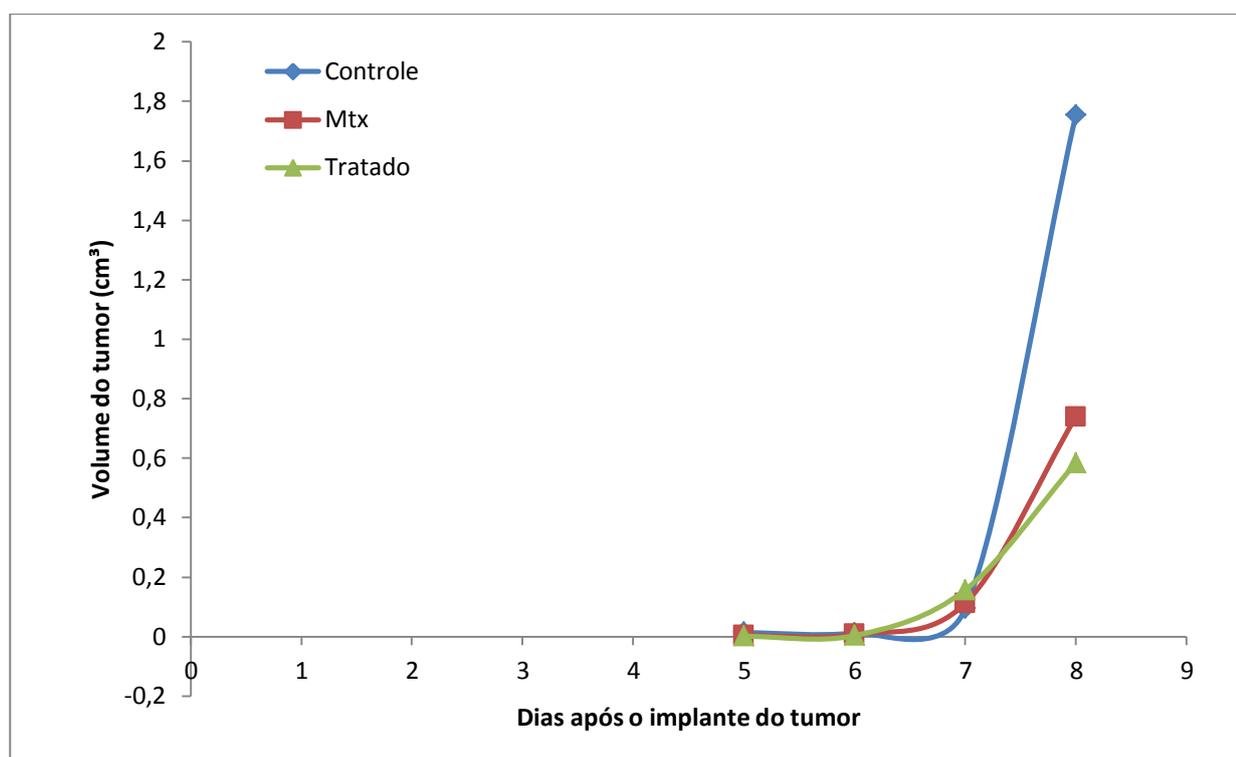


Figura 1. Variação temporal do volume do tumor de Ehrlich em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato ($71,7 \text{ mg.kg}^{-1}$) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20 mg.kg^{-1}).

3.2 BIOQUÍMICA SÉRICA

A tabela 2 evidencia as médias dos valores das principais enzimas hepáticas e renais em camundongos controle e tratados com metotrexato e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20 mg.kg^{-1}).

Tabela 2 Médias dos parâmetros bioquímicos séricos (gamaglutamiltranspeptidase, fosfatase alcalina, ureia, creatinina) em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato ($71,7 \text{ mg.kg}^{-1}$) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20 mg.kg^{-1}).

	Controle (n=6)	Metotrexato (n=6)	Aminoquinona (n=6)	P
GGT (ng/dL)	$8,92 \pm 5,1a$	$10,77 \pm 9,3a$	$28,67 \pm 24,3a$	0,1735
Fosft. Alcalina (ng/dL)	$65,83 \pm 58,29a$	$73,55 \pm 59,16a$	$40,57 \pm 31,17a$	0,6584
Uréia (ng/dL)	$39,76 \pm 9,74a$	$29,42 \pm 4,51a$	$29,60 \pm 7,60a$	0,1924
Creatinina (ng/dL)	$0,61 \pm 0,16a$	$0,58 \pm 0,15a$	$0,66 \pm 0,16a$	0,7292

No que diz respeito às referidas enzimas (GGT, Fosfatase. Alcalina, Uréia e creatinina), não houve diferença significativa entre os grupos. Entretanto, em se tratando da enzima GGT, houve uma tendência de aumento dos animais do grupo tratado com a aminoquinona em relação ao grupo controle. Diversos estudos demonstram que elevações dos níveis plasmáticos da enzima hepática GGT estão relacionadas como aumento da taxa metabólica do fígado indicando toxicidade hepática, principalmente quando expostos a drogas, agentes virais ou bacterianos (BJORNSSON, 2006).

Com relação à enzima fosfatase alcalina, houve uma tendência de diminuição no grupo tratado com aminoquinona em comparação com o grupo controle. A fosfatase alcalina é uma enzima fosfohidrolase, encontrada em vários tecidos, com maiores concentrações no fígado, no epitélio do trato biliar e nos ossos. No fígado, esta enzima é secretada pelos hepatócitos e pelas células da mucosa do trato biliar. Geralmente qualquer hepatopatia ativa pode aumentar os valores da referida enzima, mas as maiores elevações nos níveis desta ocorrem nos casos de obstrução do trato biliar. Nos casos de drogas hepatotóxicas, as elevações da enzima são menores (MILLER, 1999).

3.3 PESO TUMORAL E DOS ÓRGÃOS

Na tabela 3 podemos observar o peso corporal, dos tumores e de órgãos coletados após a finalização do período experimental de camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato ($71,7 \text{ mg.kg}^{-1}$) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20 mg.Kg^{-1}).

Tabela 3 – Peso do tumor, peso dos órgãos de camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato ($71,7 \text{ mg.kg}^{-1}$) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20 mg.kg^{-1}).

	Controle (n=6)	Metotrexato (n=6)	Aminoquinona (n=6)	P
Corporal	36,18 ± 2,39a	34,50 ± 0,86a	36,90 ± 3,55a	0,2730
Tumor	1,92 ± 0,41ab	1,31 ± 0,25a	1,16 ± 0,52b	0,0132
Fígado	1,92 ± 0,59ab	2,49 ± 0,27a	1,82 ± 0,35b	0,0328
Baço	0,19 ± 0,03a	0,19 ± 0,06a	0,14 ± 0,026a	0,0897
Rim direito	0,29 ± 0,04a	0,32 ± 0,04a	0,27 ± 0,03a	0,1259
Rim esquerdo	0,27 ± 0,03ab	0,31 ± 0,03a	0,26 ± 0,02b	0,0140
Pulmão	0,31 ± 0,09a	0,28 ± 0,04a	0,28 ± 0,08a	0,7398
Coração	0,11 ± 0,02a	0,14 ± 0,01b	0,12 ± 0,01ab	0,0181

Com relação ao peso de órgãos coletados após eutanásia o baço, rim direito, pulmão e peso corporal não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais. O peso do tumor dos animais tratados com metotrexato não apresentou diferença significativa ($p=0,0132$) quando comparados ao grupo controle, assim como o peso do tumor dos animais tratados com aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino) acetate em relação ao grupo controle. O peso do fígado dos animais tratados com metotrexato apresentou um aumento significativo ($p=0,0328$) em relação aos animais tratados com a aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino) acetate. Entretanto, nenhum destes dois grupos apresentou diferença significativa em comparação com os animais do grupo controle. No que diz respeito ao rim esquerdo, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com metotrexato e o grupo controle, assim como entre o grupo tratado com a aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino) acetate e o grupo controle. Por outro lado, o peso do rim esquerdo dos animais tratados com a aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino) acetate foi significativamente inferior ($p=0,0140$) ao peso dos rins esquerdos dos animais tratados com metotrexato. Em relação ao peso do coração, os animais tratados com metotrexato apresentaram-se significativamente maior ($p=0,0181$) em comparação com o grupo controle. No entanto, não houve diferença significativa entre os animais tratados com a aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino) acetate e o grupo controle.

3.4 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

3.4.1 FÍGADO

Na tabela 4 e figura 2 (anexo) podemos observar as lesões hepáticas mais frequentemente observadas nos 3 grupos experimentais.

Nos animais tratados com metotrexato constatou-se esteatose difusa, em grau moderado (++) numa frequência de 33,3% (2/6). Neste mesmo grupo, hepatite periportal e congestão foram discretas (+) e de frequência relativa baixa (16,6%, 1/6). Além das lesões descritas anteriormente, os focos metastáticos foram intensos (+++) e presentes em 50% (3/6) dos animais estudados. Por outro lado, nos infiltrados de células metastáticas a intensidade de mitose (+) e a frequência (16,6%, 1/6) foram baixas.

No grupo controle tumorado os animais tiveram lesões hepáticas tais como: esteatose difusa, em grau intenso (+++) e frequência de 66,6% dos animais (5/6). Neste mesmo grupo foi observada

hepatite periportal discreta (+) de baixa frequência. Contudo, congestão ocorreu em 100% dos animais (6/6), porém de grau leve (+). As metástases foram intensas (+++) em 66,6% dos animais. A ativação das células de Kupffer foi moderada (++) e presente na maioria dos animais (83,3%, 5/6).

A aplicação da substância experimental ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate nos camundongos Albinus swiss tumorados produziram lesões hepáticas tais como: esteatose difusa em grau leve (+) todavia, com frequência de 100% nos animais avaliados (6/6). Neste mesmo grupo foi observada hepatite periportal moderada (++) com frequência de 33,3% nos animais estudados. A congestão ocorreu em 83,3% dos animais (5/6), porém de grau leve (+). As metástases neste grupo foram discretas (+) em 50% dos animais. Contudo, é importante resaltar que não se observou figuras de mitose nos focos metastáticos. A ativação das células de Kupffer foi moderada (++) na maioria dos animais (83,3%, 5/6).

De acordo com os achados histopatológicos descritos anteriormente foi possível constatar que os animais tumorados tratados com 20 mg.kg⁻¹ de aminoquinona, em dosagem única, tiveram baixo grau toxicidade hepática. Isto pode ser atribuído ao fato, a principal lesão relacionada à toxicidade neste órgão, a esteatose ou esteatonecrose, foram discretas em 100% dos animais.

TABELA 4. Lesões hepáticas em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato (71,7 mg.kg⁻¹) e aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate (20 mg.kg⁻¹).

FÍGADO	Grupos Experimentais		
	Controle (n=6)	Metotrexato (n=6)	Aminoquinona (n=6)
Lesões			
Metástase	+++ (5) 66,6%	+++ (3) 50%	+ (3) 50%
Esteatose	+ (3) 50%	++ (2) 33,3%	+ (6) 100%
Hepatite	+ (1) 16,6	+ (1) 16,6%	++ (2) 33,3%
Congestão	+ (6) 100%	+ (1) 16,6%	+ (5) 83,3%
Figuras de mitose de células metastáticas	-	+ (1) 16,6%	-
Ativação de macrófagos	++ (5) 83,3%	-	++ (5) 83,3%

A microesteatose, assim como citado por Fromenty et al. (1997); Swartz (1995); Williams et al. (2000); é uma lesão compatível com sérias disfunções ou toxicidade hepática e se caracteriza

pelo preenchimento citoplasmático do hepatócito por pequenas gotículas de gordura, concedendo a este tipo celular uma aparência espumosa. Ela não possui o seu mecanismo totalmente esclarecido, entretanto é bastante provável que a inibição da síntese de lipoproteínas, diminuição da conjugação de triglicerídeos com lipoproteínas, interferência com transferência de VLDL, oxidação prejudicada de lipídeos por mitocôndrias, aumento na síntese de ácidos graxos, dano ao DNA ou a outros elementos mitocondriais podem estar relacionados a esta condição.

A agressão tóxica sofrida pelo fígado, promovendo a necrose de coagulação, foi descrita por Brasileiro Filho et al. (1994) e Comporti (1985). Em casos de administração de drogas e químicos, o fígado sofre isquemia resultante do déficit no gradiente de concentração do oxigênio. Isto ocorre devido à riqueza de enzimas biotransformadoras utilizadas no metabolismo de drogas e metabólitos reativos, os quais interferem diretamente sobre as organelas vitais ou indiretamente promovendo a peroxidação de lipídios sobre ácidos graxos insaturados da membrana. A necrose de coagulação no fígado de ratos e cobaias submetidos a estudos toxicológicos pré-clínicos é comumente encontrada, segundo Cushman et al. (1995); Nyska et al. (1992); Parker & Gibson, (1995), o qual é sugestivo de interferência por congestão centrolobular dificultando a perfusão dos vasos.

Os efeitos citotóxicos da β -lapachona, assim como de outras naftoquinonas, em células tumorais, já foram citados por Vargas (2005). Substâncias com a presença do radical quinona são metabolizadas através do ciclo oxirredução mitocondrial, o qual induz a formação de inúmeras espécies de oxigênio reativo de alto poder tóxico. Estes radicais podem ser responsáveis pela morte celular por necrose e/ou apoptose (SILVA et al., 2003; ARÊAS, 2007).

3.4.2 RIM

Na tabela 5 e figura 3 (anexo) podemos observar as lesões renais mais frequentemente observadas nos 3 grupos experimentais.

TABELA 5. Lesões renais em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato (71,7 mg.kg⁻¹) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20 mg.kg⁻¹).

RINS Lesões	Grupos Experimentais		
	Controle (n=6)	Metotrexato (n=6)	Aminoquinona (n=6)
Congestão	+++ (6) 100%	+++ (5) 83,3%	+++ (6) 100%
Nefrite focal	+++ (5) 83,3%	+++ (4) 66,6%	+++ (3) 50%
Glomerulite	+++ (2) 33,3%	+++ (4) 66,6%	+++ (3) 50%
Atrofia glomerular	+++ (5) 83,3%	+++ (3) 50%	+++ (5) 83,3%
Glomerulonefrite	+++ (1) 16,6%	-	-
Necrose tubular	++ (2) 33,3%	++ (1) 16,6%	-

Nos animais tratados com metotrexato a congestão cortico-medular foi intensa em 83,3% dos animais estudados. Por sua vez, nefrite focal e a glomerulite foi um achado observado em 66,6% dos animais em grau intenso. A atrofia glomerular, por sua vez, foi intensa e observada em 50% dos animais tratados em dose única com metotrexato. A necrose tubular foi moderada e pouco frequente (16,6%; 1/6) nos animais estudados neste grupo experimental.

No grupo controle também se evidenciou congestão cortico-medular intensa (+++) em todos os animais estudados (100%; 6/6). Nefrite focal intensa (+++) foi um achado observado em 83,3% (5/6) dos animais deste grupo. Posteriormente, se observou glomerulite intensa (+++) com frequência de 33,3% (2/6) nos animais avaliados do grupo controle. A atrofia glomerular intensa (+++) foi uma lesão observada em 83,3% dos animais (5/6) sendo a glomérulo nefrite associada à lesão anteriormente descrita categorizada como intensa (+++) e observada em 16,6% (1/6). Necrose tubular moderada (++) e com frequência de 33,3% (2/6) foi observada nos animais estudados neste grupo experimental.

Os animais tumorados tratados com a substância experimental *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)* continham lesões renais tais como: congestão cortico-medular intensa (+++) em 100% dos animais estudados. Nestes mesmos animais, o padrão de comportamento da nefrite focal e glomerulite seguiram a mesma intensidade (+++) e frequência (50%; 3/6). Contudo, a atrofia glomerular foi intensa (+++) e frequente (83,3%; 5/6) na maioria dos animais estudados.

Os rins são órgãos responsáveis pela excreção de resíduos metabólicos e controle da homeostase, que por sua vez, consiste em regular o volume extracelular, metabolismo do cálcio, balanço eletrolítico e controle do balanço ácido-básico. Lesões severas nestes órgãos promovem hipotensão e falência irreversíveis (MIDDENDORF, 2000). A lesão mais observada no parênquima renal foi à congestão a qual poderia ser relacionada à utilização das drogas anticancerígenas ou consequências da implantação do tumor. Outro achado microscópico relevante seria a necrose tubular que teria a mesma relação descrita anteriormente. As demais lesões não devem ser relacionadas ao presente experimento uma vez que, se tratam de lesões de caráter crônico. Em experimento anterior utilizando 2-Nglicina-1,4-naftoquinona em quatro concentrações diferentes ($120 \mu\text{g.kg}^{-1}$, $240 \mu\text{g.kg}^{-1}$, $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $4000 \mu\text{g.kg}^{-1}$) congestão cortico-medular também foi a lesão mais observada. Contudo, nas dosagens acima de $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ além da congestão foram observadas necrose e presença de cilindros proteicos nos túbulos renais (SILVA, 2010). A aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* na dosagem 20 mg.kg^{-1} teve menor toxicidade renal em relação a 2-Nglicina-1,4-naftoquinona visto que, não se observou necrose tubular.

3.4.3 PULMÃO

Após avaliação histopatológica do parênquima pulmonar dos animais estudados no presente experimento, as principais lesões observadas foram: pneumonia, pneumonite, bronquite intersticial, congestão, enfisema, edema e metástase. As mesmas estão alocadas na tabela 6.

TABELA 6. Lesões pulmonares em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato (71,7 mg.kg⁻¹) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20mg.kg⁻¹).

PULMÃO Lesões	Grupos Experimentais		
	Controle (n=6)	Metotrexato (n=6)	Aminoquinona (n=6)
Pneumonia	++ (4) 66,6%	++ (2) 33,3%	++ (4) 66,6%
Infiltrado Inflamatório	-	-	+++ (3) 50%
Bronquite	++ (2) 33,3%	-	+ (1) 16,6%
Metástase	++ (1) 16,6%	-	-
Congestão	+ (1) 16,6%	++ (2) 33,3%	++ (4) 83,3%
Enfisema	++ (5) 83,3%	+ (1) 16,6%	++ (6) 100%
Edema	+ (4)	-	-

Os animais tumorados que receberam metotrexato possuíam pneumonia moderada em 33,3% (2/6). Entretanto lesões como edema, pneumonite, bronquite intersticial e metástase não foram observadas nestes animais. Por outro lado, constatou-se congestão moderada (33,3%; 2/6) e enfisema discreto (16,6%; 1/6) nos animais estudados.

Animais do grupo controle tumorado possuíam pneumonia moderada em 66,6% (4/6), entretanto não apresentaram pneumonite. Contudo, congestão (16,6%) e edema (66,6%) foram lesões discretas com frequência variável nos animais estudados. Nos animais do presente grupo, bronquite intersticial foi uma lesão moderada (++) em 33,3% (2/6) nos animais avaliados.

Os camundongos *Albinus swiss* tumorados tratados com a aminoquinona, *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate*, possuíam lesões pulmonares tais como: pneumonia moderada (66,5%), pneumonite crônica intensa (50%), bronquite intersticial discreta (16%), congestão moderada (83,3%) e enfisema moderado em 100% dos animais estudados.

Congestão, edema e hemorragia são os achados mais frequentes no pulmão de animais de laboratório, os quais podem estar relacionados a certas formas de morte. Estas alterações circulatórias também podem estar associadas com a utilização de drogas e substâncias químicas com efeitos adversos sobre a função cardíaca ou sobre o sistema de coagulação (WARD et al., 1979). Outras lesões citadas, observadas independente do grupo experimental, não devem ser relacionadas ao efeito da droga, pois provavelmente os animais já apresentavam estas lesões antes da aplicação da substância testada, já que as mesmas decorrem de agressões de caráter crônico no pulmão.

3.4.4 BAÇO

No baço as alterações mais comumente observadas foram: ativação de polpa branca, ativação de macrófagos, apoptose de centro germinativo e metástase. As mesmas podem ser observadas na tabela 7.

TABELA 7. Lesões esplênicas em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato ($71,7 \text{ mg.kg}^{-1}$) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20 mg.kg^{-1}).

Baço Lesões	Grupos Experimentais		
	Controle (n=6)	Metotrexato (n=6)	Aminoquinona (n=6)
Ativação de polpa branca	-	+ (1) 16,6%	++ (6) 100%
Metástase	++ (3) 50%	-	++ (1) 16,6%
-Apoptose de centro germinativo	+++ (3) 50%	-	++ (1) 16,6%
Ativação de macrófagos	-	-	+ (1) 16,6%

O baço dos animais tumorados que receberam metotrexato possuíam ativação de polpa branca discreta em 16,6% (1/6). Entretanto, achados como ativação de macrófagos, apoptose no centro germinativo e metástase não foram observados nestes animais. Todavia, no grupo controle se evidenciou apoptose de centro germinativo de grau intenso (+++) em 50% dos animais. Neste mesmo grupo, a metástase foi classificada como moderada em 50% dos animais.

Os camundongos *Albinus swiss* tumorados tratados com a substância *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* continham ativação de macrófagos discreta (+) em 16,6% dos animais estudados. A ativação de polpa branca moderada também foi encontrada em 100% (6/6) dos animais estudados neste grupo. Por conseguinte, a apoptose de centro germinativo e metástase foram moderadas e ocorreu em 16,6% dos animais.

3.4.5 CORAÇÃO

As principais lesões observadas no coração foram miocardite, miocardiose, endocardite, vacuolização e necrose de cardiomiócito. As mesmas podem ser evidenciadas na tabela 8.

TABELA 8. Lesões cardíacas em camundongos controle e tratados com dose única de metotrexato (71,7 mg.kg⁻¹) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20 mg.kg⁻¹).

Coração Lesões	Grupos Experimentais		
	Controle (n=6)	Metotrexato (n=6)	Aminoquinona (n=6)
Miocardite	+ (5) 83,3%	+ (2) 33,3%	++ (6) 100%
Vacuolização de cardiomiócito	+ (2) 33,3%	-	+ (2) 33,3%
Miocardiose	+ (1) 16,6%	-	-
Endocardite	-	-	+ (1) 16,6%
Necrose de cardiomiócito	-	-	+ (1) 16,6%

Os animais tratados com metotrexato tiveram miocardite discreta em 33,3% dos animais deste grupo (2/6). Entretanto, lesões cardíacas tais como miocardiose, endocardite, vacuolização e necrose de cardiomiócitos não foram identificadas.

No grupo controle os animais tiveram lesões cardíacas tais como: miocardite, em grau discreto (+) em 83,3% dos animais (5/6). Neste mesmo grupo foi observada miocardiose discreta (+) de baixa frequência e vacuolização de cardiomiócitos discreta em 33,3% (2/6) dos animais. Contudo não houve endocardite e necrose de cardiomiócitos no referido grupo experimental.

A aplicação da substância experimental *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* nos camundongos *Albinus swiss* produziram lesões cardíacas tais como: miocardite em grau moderado (++) em 100% nos animais avaliados (6/6). Neste mesmo grupo foram observadas endocardite e necrose de cardiomiócitos, ambas discretas (+) e com frequência 16,6% nos animais estudados. A vacuolização de cardiomiócitos ocorreu em 33,3% dos animais (2/6), porém de grau leve (+). Todavia, não se constatou miocardiose neste grupo.

Segundo Lewis e Shibamoto (1989), a *S. obtusifolia* é uma planta cujos princípios tóxicos são várias antraquinonas e um princípio catártico. O componente miotóxico parece ser uma mistura de nove antraquinonas e três antronas. As lesões no miocárdio são pouco frequentes nas intoxicações naturais por *S. obtusifolia* (MCCORMACK e NEISLER, 1980) e *S. occidentalis* (CARMO et. al, 2011). Nos casos descritos, os principais achados foram vacuolização moderada das células musculares cardíacas e fibrose focal (CARMO et al, 2011). No entanto, em intoxicações experimentais, alterações como pequenos vacúolos entre as miofibrilas com diferentes intensidades

(BARROS et al, 1990) e áreas de necrose do miocárdio principalmente no ventrículo esquerdo foram observadas. Além disso, uma pesquisa realizada *in vitro* expondo o tecido muscular cardíaco de bovino ao extrato de *S. obtusifolia* confirmou que ocorre lesão na mitocôndria (LEWIS e SHIBAMOTO, 1989).

Os tumores implantados nos camundongos *Albinus swiss* foram avaliados histopatologicamente quanto à presença de áreas de necrose (área central principalmente), células ativas entremeadas por células necróticas, extensa formação vascular nas áreas de células ativas, infiltrado de células tumorais em tela subcutânea, avaliação qualitativa de mitoses por campo.

Os animais tratados com metotrexato não possuíam crescimento tumoral exuberante no 4º dia de tratamento, o que ficou caracterizado por um maior número de áreas necróticas e hemorrágicas no centro do tecido tumoral. Alguns infiltrados de células tumorais foram observados adjacentes à tela subcutânea e tecido muscular. Por outro lado, os animais do grupo controle possuíam crescimento exuberante do tumor no tecido subcutâneo. Além disso, áreas tumorais ativas foram mais observadas em detrimento de áreas tumorais necróticas infiltradas no tecido subcutâneo, formando vários focos do tumor subcutâneo sólido.

A utilização da aminoquinona, *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* nos camundongos tumorados produziu maior proporção de área necrótica e infiltrado de polimorfonucleares entre células tumorais. Na figura 4 podemos comparar o número de mitoses em aumento de 400X entre os grupos controle e tratados com dose única de metotrexato ($71,7 \text{ mg.kg}^{-1}$) e aminoquinona *ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate* (20 mg.kg^{-1}). Notou-se um menor número de mitoses nos animais tratados em relação ao grupo controle, além de predominância de morte celular por necrose e apoptose assim como, formação de grandes vacúolos entre as células tumorais (Figura 4 em anexo).

É bastante provável que o principal mecanismo relacionado à inibição tumoral seja a apoptose, uma vez que, ela pode ocorrer como alternativa, caso não se consiga eliminar por completo o estresse oxidativo nas células, promovido pela naftoquinona, conforme citado por Silva et.al. (2003). Sun et al. (2006) e Arêas (2007) também afirmam que a inibição do crescimento celular observada, pode ocorrer em função da indução da apoptose, inibição da topoisomerase II ou estresse oxidativo.

A necrose tão enfatizada em todos os grupos caracteriza-se por alterações resultantes da degradação enzimática do núcleo e citoplasma, que definem a morte celular. Os radicais livres são capazes de causar lesões irreversíveis na célula, em consequência do influxo de água, eletrólitos e cálcio ao citosol; a célula termina tornando-se necrótica (JONES et.al., 2000).

4. CONCLUSÃO

A aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino) acetate em dose única inibiu em o crescimento tumoral e não alterou de forma considerável a função hepática e renal dos camundongos tumorados com carcinoma de Erlich sólido. Diante dos resultados obtidos, é uma droga promissora que pode ser utilizada na terapia contra o câncer. Contudo mais estudos devem ser realizados na elucidação do mecanismo de ação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARÊAS, P.C.F. Avaliação da atividade antitumoral de naftoquinonas. Dissertação de mestrado apresentada ao **Programa de Neuroimunologia da Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2007.**

BARROS, C.S.L.; PILATI, C.; ANDUJAR, M.B. et al. 1990. Intoxicação por *Cassia occidentalis* (leg. Cães) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 10 (3/4): 47-58.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** São Paulo: Edart - São Paulo Livraria Editora Ltda. cap. 1-9, p.27-80, 1976.

BJORNSSON, E. Drug-induced liver injury: Hy's rule revisited. **Clinical Pharmacology and Therapeutic**, 2006, Jun; 79 (6): 521-8.

BOLTON, J.L.; TRUSH, M.A.; PENNING, T.M.; DRYHURST, G.; MONKS, T.J. Role of quinones in Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v.13, p.135-60, 2000.

BRASILEIRO FILHO, G. et al. **Bogliolo Patologia.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

CAMARA, C.A. ; SILVA, T.M.S. ; BARBOSA, T. P. ; SILVA, T. G. ; MARTINS, R. M. ; VARGAS, M. D. ; PINTO, A. C. . Molluscicidal Activity of 2-hidroxy-[1,4-]naphthoquinone and derivatives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, p. 329-334, 2008. Fator de Impacto: 0,895 (JCR-2007).

CARMO, P.M.S.; IRIGOYEN, L.F.; LUCENA, R.B. et al. 2011. Spontaneous coffee Senna poisoning in cattle: report on 16 outbreaks. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 31 (2):139-146.

CHEN, J.; HUANG, Y.; LIU, G.; AFRAZIAB, Z.; SINN, E.; PADHYE, S.; MA, Y. The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 197, p.40-48, 2004.

COMPORATI, M. Biology of disease. Lipidic peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. **Laboratory investigations**, Baltimore, n.53, p.599-623, 1985.

CUSHMAN, M.; CORNELL, E.; HOWARD, P. et al. Laboratory Methods and quality assurance I the cardiovascular Health Study. **Clinic Chemical**. V.41, p.264-270, 1995.

FERREIRA, A. M. M. S. Estudo da toxicidade aguda e atividade antineoplásica da *Vernônia condensata* Baker (Asteracea). Recife, 40p. 2005. Monografia. Curso de Graduação em Biomedicina, **Universidade Federal de Pernambuco**.

FROMENTY, B.; BERSON, A.; PASSAYRE, D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis : role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. **Journal of Hepatology**. v.26, p.13-22, 1997.

GUERRA, J.L. **Aspecto do processo inflamatório em camundongos portadores de tumor de Ehrlich**. São Paulo, 1983. 79p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo.

JONES, D.P.; CARLSON, J.L.; MODY, V.C.; CAI, J.; LYNN, M.; STERINBERG, P. Redox state of glutathione in human plasma. **Free Radical Biology and Medicine**, v.28, p.625-635, 2000.

KERR, M.G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária**. Bioquímica e hematologia, 2 ed, Roca, 2003.

KONGKATHIP, N.; KONGKATHIP, B.; SIRIPONG, P.; SANGMA, C.; LUANGKAMIN, S.; NIYOMDECHA, M.; PATTANAPA, S. et al. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2003, v.11, p.3179-3191.

LEWIS, D.C.; SHIBAMOTO, T. **Toxicology**, v.27, n.5, p.519-29, 1989.

MCCORMACK, J.E.; NEISLER, W.E. *Cassia obtusifolia* (sicklepod) toxicity in a dairy herd. **Veterinary Medicine/Small Animal Clinician**, v.75, p.1849-1851, 1980.

MIDDENDORF, P.J.; WILLIAMS, P.L. Nephrotoxicity: Toxic response of the Kidney. In: WILLIAMS, P.L.; JAMES, R.C.; ROBERTS, S.M. **Principles of toxicology: environmental and industrial applications**. 2 ed. New York: Wiley-Interscience Publication, p.120-125, 2000.

MILLER, O.; GONÇALVES, R.R. 1999. **Laboratório para o clínico**. 8ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, p.607.

NYSKA, A.; MARONPOT, R.R.; LONG, P.H. et al. Disseminated Thrombosis and Bone Infarction in Female Rats Following inhalation Exposure to 2-Butoxyethanol. **Toxicologic Pathology**, v.27, p.287, 1999.

PARKER, G.A.; GIBSON, W.B. Liver lesions in rats associated with wrapping of the torso. **Toxicology Pathology**. [S.1], n.23, p.507-512, 1995.

PAULA, C.C.; MUTTI, C.F.; PADOIN, S.M.M.; et al. Palliative Care in Câncer: Literature Review Article. **Journal of Nursing**. v.7(1), p.246-261, 2013.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química nova**, v.29, p.407-413, 2003.

SILVA, T.M.; CAMARA, C.A.; BARBOSA, T.P.; SOARES, A.Z.; DA CUNHA, L.C.; PINTO, A.C.; VARGAS, M.D. Molluscicidal activity of syntethic lapachol amino and hidrogenated derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.13, p.193-196, 2005.

SILVA, E.C.S. Avaliação do potencial antitumoral de uma naftoquinona sintética, estruturalmente relacionada ao lapachol, em tumores de ehrlich implantados em camundongos. Recife, 2010, Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal Rural de Pernambuco**.

SWARTZ, M. Mitochondrial Toxicity. **The New England Journal of Medicine**. V.333, p.1146-1148, 1995.

TORRES, S.M.; SILVA, E.C.S.; JIMENEZ, G.C.; SILVA NETO, J.F.; MAIA, F.C.L.; CÂMARA, C.A.; SILVA JÚNIOR, V.A. Avaliação de substâncias derivadas de quinonas em dosagem de aplicação única sobre inibição tumoral em Carcinoma de Ehrlich implantados em camundongos. In: **III Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana**, 2007.

VALDERRAMA, J.A.; IBACACHE, J.A.; MANCIBIA, V.; RODRIGUEZ, J. THEODULOZ, C. Studies on quinones. Part.45: novel 7-aminoisoquinolina-5,8-quinone derivatives with antitumor properties on cancer cell lines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, V.17, p.2894-2901, 2009.

VARGAS, M.D.; PINTO, A.C.; CAMARA, C.A.; CARVALHO, C.A.; KOHN, L.K. **Síntese de naftoquinonas naturais e semi-sintéticas parcialmente hidrogenadas derivadas do lapachol com atividade citotóxica e antitumoral**. PATENTE: PI0502766-7, (22), 20/06/2005.

VISENTIM, A. **O itinerário terapêutico: História oral de idosos com câncer.** 147f. Dissertação (Mestrado) – Setor em Ciências da saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

WARD, P. Immune Complex Injury of the Lung. **The American Journal Of Pathology**, v. 97, p.85-92, 1979.

6. ANEXO

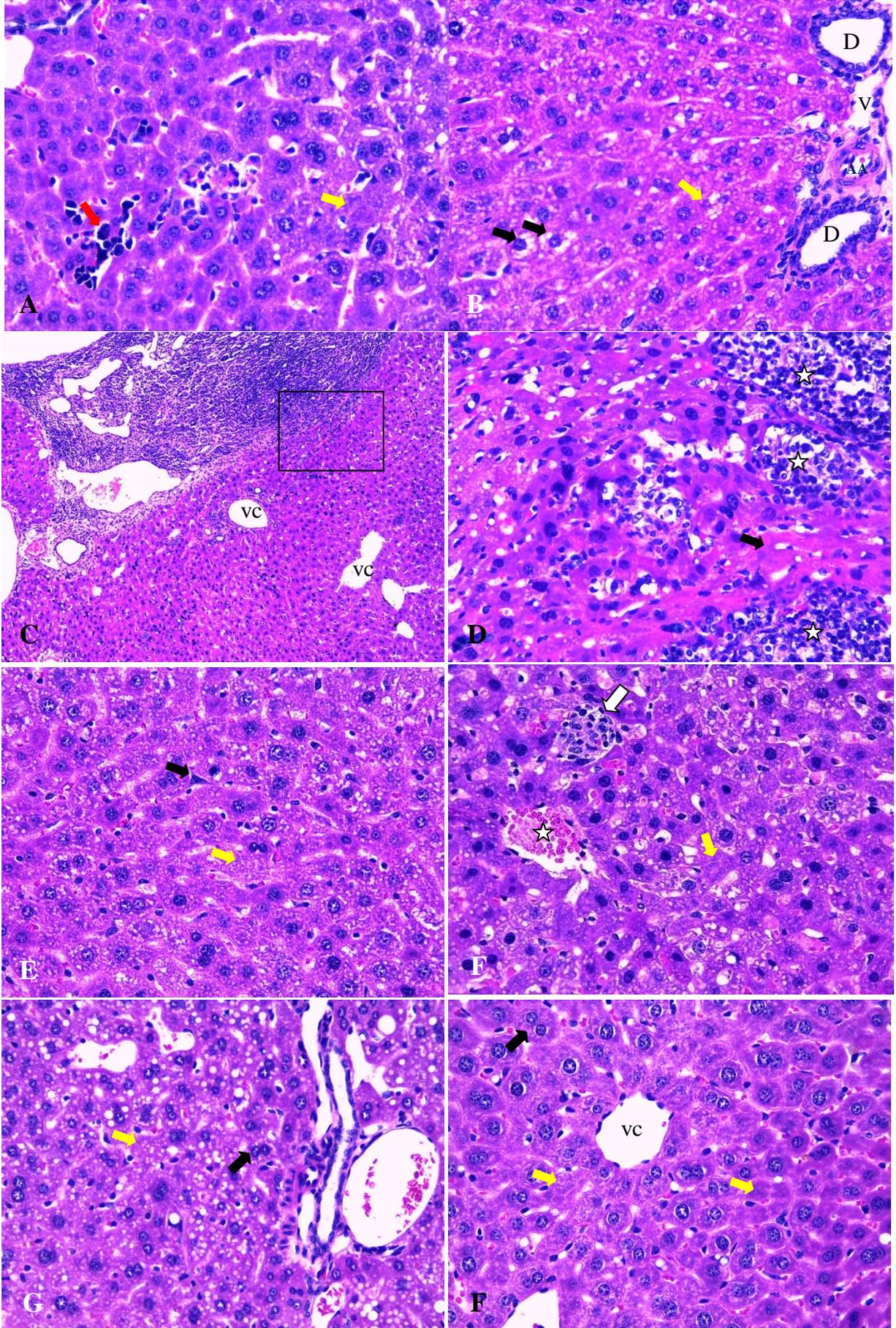


Figura 2. Parênquima hepático de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich controle, tratados com metotrexato ($71,7 \text{ mg.Kg}^{-1}$), aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate (20mg.Kg^{-1}).

Figura 2a – Parênquima hepático de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich tratados com metotrexato. Notar a presença de células metastáticas nos capilares sinusóides (seta vermelha) e hepatócitos em necrose de coagulação.

Figura 2b – Parênquima hepático de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich tratados com metotrexato. Observar esteatose difusa (seta preta) e hepatócitos com esteatonecrose e presença de discreta hepatite mononuclear periportal. D=ducto bilífero; V=veia porta; AA= arteríola hepática.

Figura 2c – Parênquima hepático de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich. Notar hepatite subcapsular (estrela) e cordões de hepatócitos com maior acidofilia rodeando veias centrolobulares (vc).

Figura 2d - Parênquima hepático de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich. Notar intensa hepatite intersticial mononuclear linfocitária (estrela) e cordões de hepatócitos com necrose de coagulação (seta).

Figura 2e - Parênquima hepático de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich. Notar presença de célula de Kupffer ativada (seta) e cordões de hepatócitos com necrose de coagulação (seta amarela).

Figura 2f - Parênquima hepático de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich. Observa foco metastático de células carcinomatosas (seta), congestão em veia centro lobular (VC), cordões de hepatócitos com necrose de coagulação (seta amarela) e intensa congestão de sinusóides.

Figura 2g - Parênquima hepático de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich tratados com aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate (20mg.Kg^{-1}). Notar esteatose difusa, hepatócitos com esteatonecrose (seta amarela) e hepatócitos binucleados (seta).

Figura 2h. Parênquima hepático de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich tratados com aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate (20mg.Kg^{-1}). Notar discreto número de hepatócitos binucleados (seta) e necrose de coagulação em cordões de hepatócitos (seta amarela)

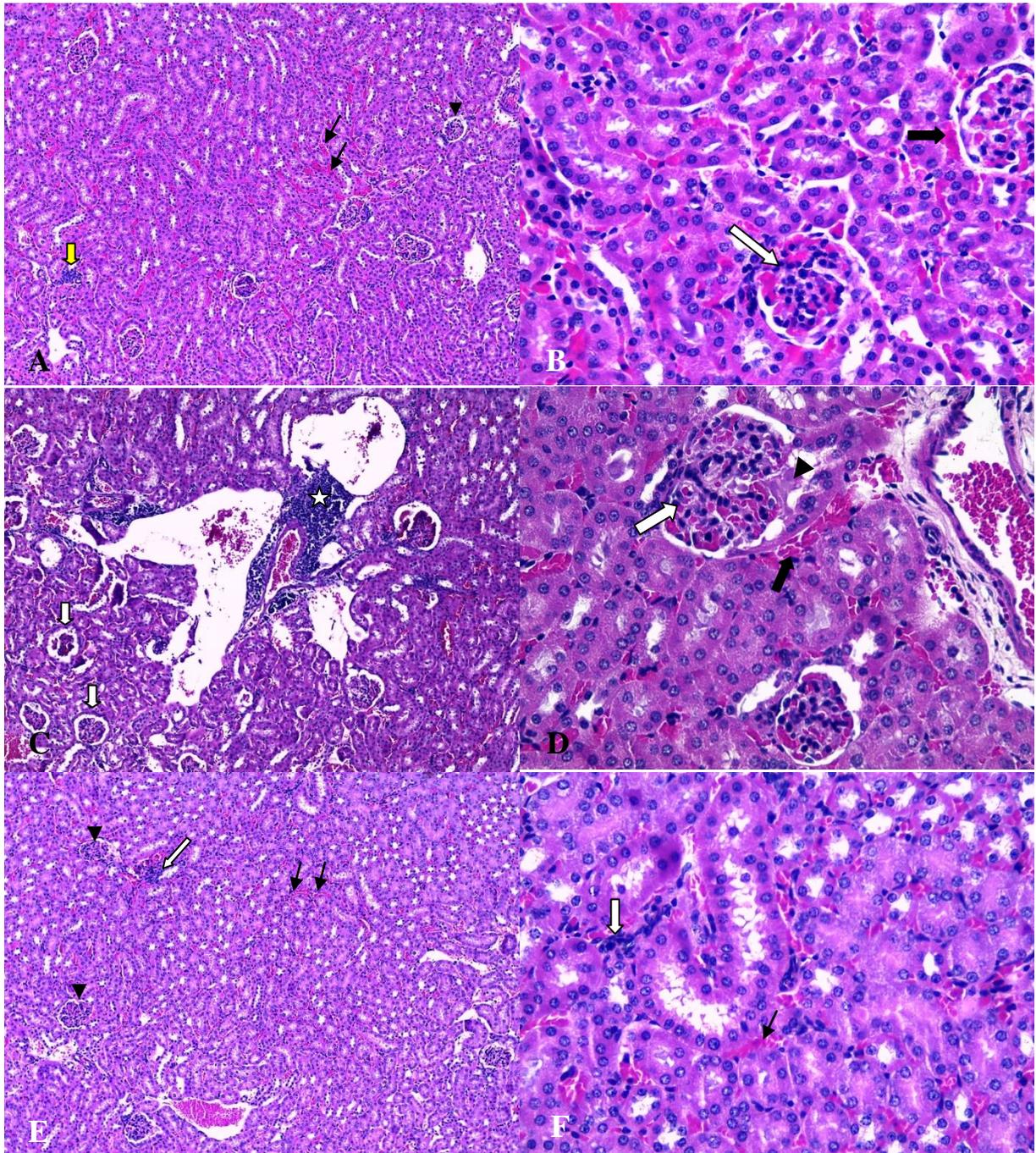


Figura 3. Parênquima renal de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich controle, tratados com metotrexato ($71,7 \text{ mg.kg}^{-1}$), aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate (20mg.Kg^{-1}).

Figura 3a – Parênquima renal de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich tratados com metotrexato. Observar congestão cortical intensa (seta), atrofia glomerular e nefrite focal.

Figura 3b – Parênquima renal de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich tratados com metotrexato. Notar congestão intersticial (seta preta) e atrofia glomerular com glomérulo nefrite proliferativa (seta branca).

Figura 3c – Parênquima renal de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich. Notar nefrite intersticial intensa focal (estrela) com congestão cortico-medular intensa e atrofia glomerular (seta).

Figura 3d - Parênquima renal de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich. Notar presença de glomérulo nefrite proliferativa (seta branca) e material proteináceo acidófilo subcapsular (cabeça de seta). Próximo a capsula de Bowman notar congestão vascular intensa (seta). Atrofia glomerular (estrela) também pode ser observada.

Figura 3e - Parênquima renal de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich tratados com aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate (20mg.Kg^{-1}). Observar congestão cortico-medular intensa (seta), nefrite focal (seta branca) e atrofia glomerular (cabeça de seta).

Figura 3f. Parênquima renal de camundongos albinus Swiss tumorados com carcinoma de Ehrlich tratados com aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate (20mg.Kg^{-1}). Em detalhe notar a congestão intertubular (seta preta) e discreta nefrite intertubular.

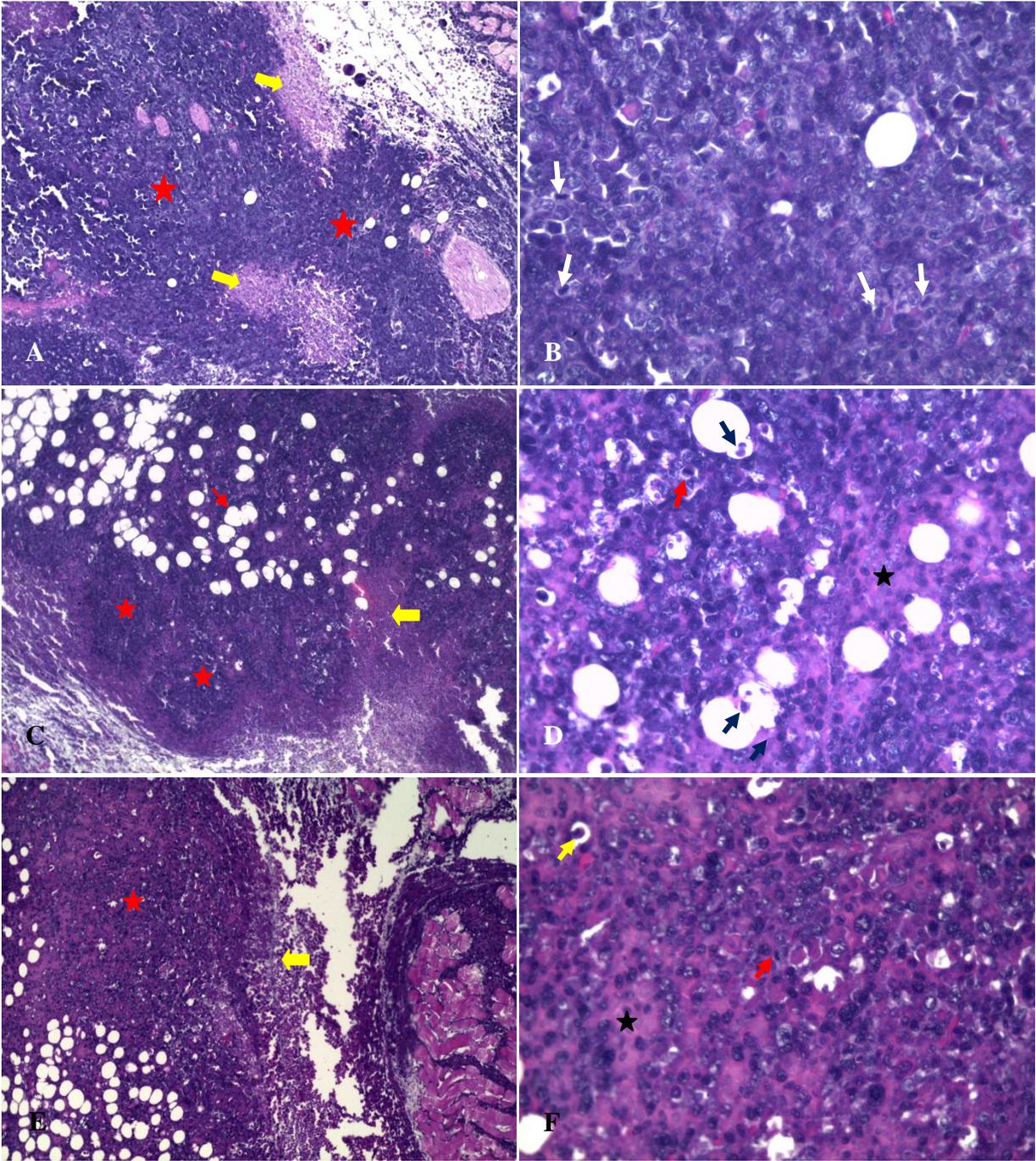


Figura 4. Tumor de Ehrlich de camundongos albinus Swiss controle, tratados com metotrexato ($71,7 \text{ mg.Kg}^{-1}$), aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate (20 mg.Kg^{-1}).

Figura 4A- Tumor de Ehrlich de camundongos albinus Swiss do grupo controle. Notar maior presença de áreas basofílicas (estrela) correspondentes às células do carcinoma de Ehrlich ativas. Observar área de células necróticas (seta amarela) entre as células ativas ou próximas a tela subcutânea. X40.

Figura 4B - Tumor de Ehrlich de camundongos albinus Swiss do grupo controle. Em detalhe notar maior presença de células mitóticas do carcinoma de Ehrlich (seta). X400.

Figura 4C - Tumor de Ehrlich de camundongos albinus Swiss do grupo tratado com aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate (20 mg.Kg^{-1}). Observar presença de áreas basofílicas (estrela) correspondentes às células do carcinoma de Ehrlich ativas circundadas por células necróticas (seta amarela) e entremeadas por vacúolos (seta vermelha). X40.

Figura 4D - Tumor de Ehrlich de camundongos albinus Swiss do grupo tratado com aminoquinona ethyl 2-(1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-ylamino)acetate (20 mg.Kg^{-1}). Em detalhe notar maior acidofilia de células do carcinoma de Ehrlich (estrela), baixo número de mitoses (seta vermelha) e vacúolos contendo corpos apoptóticos ou células necróticas (seta preta). X400.

Figura 4E - Tumor de Ehrlich de camundongos albinus Swiss tratado com metotrexato ($71,7 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Notar áreas basofílicas (estrela) correspondentes às células do carcinoma de Ehrlich ativas circundadas por células necróticas (seta amarela). X40.

Figura 4F - Tumor de Ehrlich de camundongos albinus Swiss tratado com metotrexato ($71,7 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Em detalhe notar maior acidofilia de células do carcinoma de Ehrlich (estrela), baixo número de mitoses (seta vermelha) e vacúolos contendo corpos apoptóticos ou células necróticas (seta amarela). X400.