

**ELAYNE CRISTINE SOARES DA SILVA**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ANTI-TUMORAL DE UMA  
NAFTOQUINONA SINTÉTICA EM TUMORES DE EHRLICH  
(ESTUDO IN VIVO)**

**RECIFE  
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**ELAYNE CRISTINE SOARES DA SILVA**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ANTI-TUMORAL DE UMA  
NAFTOQUINONA SINTÉTICA EM TUMORES DE EHRlich  
(ESTUDO IN VIVO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:  
Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior

RECIFE  
2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E ANTI-TUMORAL DE UMA  
NAFTOQUINONA SINTÉTICA EM TUMORES DE EHRLICH  
(ESTUDO IN VIVO)**

Dissertação de Mestrado elaborada por

**ELAYNE CRISTINE SOARES DA SILVA**

Aprovada em ...../...../.....

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof Dr. CELSO DE AMORIM CÂMARA  
Departamento de Química da UFRPE

---

Prof Dr. FREDERICO CELSO LYRA MAIA  
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

---

Prof. Pós-Dr<sup>a</sup>. IVONE ANTÔNIA DE SOUZA  
Departamento de Farmacologia da UFPE

---

Prof. Pós-Dr. JOAQUIM EVÊNCIO NETO  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

*Ao meu amado esposo Thiago, aos meus pais Gilson e Lourdes, ao meu irmão Tiago e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a **Deus**, ser supremo que sempre iluminou meus passos e sem Ele nada faz sentido.

Ao meu esposo, **Thiago Henrique**, pela paciência, ajuda e compreensão durante este período de estudo, em que me dividi entre trabalho, mestrado e nossa nova vida de casados. Espero sempre poder contar contigo, meu amor!

Aos meus **pais queridos e irmão**, que sempre incentivaram meus estudos, dando-me força em todos os momentos, compreendendo minhas ausências pela correria do dia-a-dia. Sei que vocês estão sempre torcendo por mim!

Ao meu orientador, **professor Valdemiro Júnior**, pela oportunidade já concedida desde a graduação, por sua compreensão, dedicação. Sempre presente, perseverante, com pensamentos positivos, arrumando “cartas na manga” para nos ajudar.

A **Sandra**, pessoa inigualável, amiga, prestativa, trabalhadora, organizada, sempre pude contar com sua companhia essencial em todo este trabalho. Agradeço a Deus por ter te colocado em meu caminho e que Ele te abençoe e te ajude a realizar seus objetivos, pois você merece! Obrigada por tudo, “Santa”!

A todos que também ajudaram em algum momento deste trabalho: **Paulo, Flávia, Mariana, Luciana, Yana, Flávio, Ana Luiza, Vinícius, Cristiane...**

Ao **professor George e a Ferreira** pela imensa ajuda na parte experimental e estatística, e pelo espaço e tempo cedido.

A **Marcelo, Juliana e demais colegas da Veterinária Harmonia**, por ajudar em minhas ausências. Em especial, a **Paola, Milena, Maria Luiza, Ana, Fábio Pina e Fabiane** pela amizade e incentivo.

A **Capex** pela ajuda financeira concedida.

## RESUMO

### **Avaliação toxicológica e anti-tumoral de uma naftoquinona sintética em tumores de Ehrlich (estudo in vivo)**

Quinonas são substâncias de ocorrência natural, com ação antibacteriana, antifúngica, antineoplásica, entre outras. A 2-N-glicina-1,4-naftoquinona, estruturalmente relacionada ao lapachol, foi avaliada quanto à toxicidade e atividade antitumoral. Para a análise toxicológica, foram utilizados camundongos *Mus musculus*, Albino Swiss, administrando-se por via oral a 2-N-glicina-1,4-naftoquinona nas concentrações de 120, 240, 1000 e 4000µg/Kg. A dose letal da droga foi superior a 4000µg/Kg. As doses de 1000 e 4000µg/Kg causaram lesões citotóxicas no coração, fígado e rins. A dose de 120µg/Kg produziu lesões e alterações comportamentais discretas em comparação às outras dosagens utilizadas. Na avaliação antitumoral foram utilizados camundongos *Mus musculus*, albino Swiss, para avaliar o efeito da referida substância, nas dosagens de 40, 60, 80 e 100µg/Kg, sobre tumores de Ehrlich implantados no tecido subcutâneo da região axilar direita, a partir de células deste tumor mantidas sob a forma ascítica. Os tratamentos foram iniciados no 3º dia após a implantação das células, sendo feitas avaliações biométricas diárias dos tumores, ao longo do tratamento. Após sete dias, realizou-se a eutanásia dos animais e coleta de sangue para hematócrito e leucograma. Ainda foram realizadas avaliações histopatológicas dos tumores e de órgãos como: pulmão, fígado, rim, baço e coração. Microesteatose e necrose de coagulação hepática, citotoxicidade de cardiomiócitos, glomerulonefrite proliferativa, espessamento da cápsula de Bowman e necrose tubular renal foram observadas, sendo intensificadas com maior dose. O grupo que apresentou melhor taxa de inibição tumoral média foi o tratado com 40µg/Kg. Considerando-se apenas o último dia de tratamento, a melhor taxa de inibição foi a de 100µg/Kg, seguido dos grupos 80 e 40µg/Kg, respectivamente. A droga utilizada não apresentou efeito anticancerígeno dose dependente, entretanto, verificaram-se reações tóxicas.

**Palavras-chave:** câncer, naftoquinonas, carcinoma de Ehrlich

## **ABSTRACT**

### **Toxicological and anti-tumoral evaluation of the synthetic naphthoquinone in Ehrlich's tumors**

Quinones are substances of natural occurrence, with antibacterial, antifungal and antineoplastic action, between others. The 2-N-glicine-1, 4-naftoquinone, structurally related with lapachol was evaluated with respect to toxicity and antitumor activity. To toxicological analyses were used mice, *Mus musculus*, variety, albinos Swiss, which received by orogastric way the 2-N-glicine-1,4-naftoquinone in the 120, 240, 1000 e 4000 $\mu$ g/Kg doses. The lethal doses were higher than 4000 $\mu$ g/Kg. The dosages of 1000 e 4000 $\mu$ g/Kg caused cytotoxic lesions on heart, liver and kidneys. The dose of 120 $\mu$ g/Kg produced discrete lesion and compartmental alteration when compared with other dosages that were utilized. In antitumor evaluation were used mice, *Mus musculus*, variety albino Swiss to test the effect of the referred substance, in the dosages of 40, 60, 80 e 100 $\mu$ g/Kg, under Ehrlich tumor implanted in subcutaneous tissue of right auxiliary region, from tumor cell maintained under ascitic form. Treatments were begun on 3<sup>th</sup> day before cell tumor implantation and daily biometric evaluation were made during treatment. Seven days before was realized euthanasia of the animals and was collected blood to leukocyte count and hematocrit. Yet, histopathological evaluations were realized about the tumor and organs how: lung, liver, kidney, spleen and heart. Microsteatosis and hepatic coagulate necrosis, Bowman's capsule thickening and renal tubule necrosis were more intensified with higher dose. The group that showed better rate of the tumor inhibition was the one treated with 40 $\mu$ g/Kg. Considering the last day of treatment, the better rate of inhibition was obtained by the group treated with 100 $\mu$ g/Kg followed by the groups that received 80 e 40 $\mu$ g/Kg, respectively. The drug evaluated did not have anti-cancer effect dose dependent, however were verified toxic reactions.

**Key word:** Cancer, naftoquinones, Ehrlich's carcinoma.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

**Figura 1:** Fórmula estrutural do lapachol e isômeros.

**Figura 2:** Molécula (quinona) básica e radical associados ao grupamento NHR ( $R=CH_2CO_2H$ ).

**Figura 3:** Estrutura química do derivado 2-N-glicina-1,4-naftoquinona.

**Figura 4:** Camundongos submetidos a implante de carcinoma de Ehrlich aos 45 dias de idade.

**Figuras 5, 6 e 7:** Alterações de comportamento no número de camundongos em decorrência do tempo em minutos sobre a análise do comportamento espontâneo em animais tratados com o derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona na concentração de 120  $\mu\text{g/Kg}$ .

**Figura 8:** Alterações de comportamento no número de camundongos em decorrência do tempo em minutos sobre a análise do comportamento espontâneo em animais tratados com o derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona na concentração de 240  $\mu\text{g/Kg}$ .

**Figura 9:** Alterações de comportamento no número de camundongos em decorrência do tempo em minutos sobre a análise do comportamento espontâneo em animais tratados com o derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona na concentração de 1000  $\mu\text{g/Kg}$ .

**Figura 10:** Alterações de comportamento no número de camundongos em decorrência do tempo em minutos sobre a análise do comportamento espontâneo em animais tratados com o derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona na concentração de 4000  $\mu\text{g/Kg}$ .

**Figura 11:** Análise do comportamento de agitação em decorrência do tempo em minutos sobre a análise do comportamento espontâneo nos camundongos tratados com o derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona nas quatro dosagens testes.

**Figura 12:** Análise do comportamento de movimento circular dos camundongos em decorrência do tempo em minutos sobre a análise do comportamento espontâneo em animais tratados com o derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona nas quatro dosagens testes.

**Figura 13:** Análise do coeficiente angular do comportamento de agitação dos camundongos em decorrência das concentrações testadas do derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona.

**Figura 14:** Análise do coeficiente angular do comportamento de movimento circular dos camundongos em decorrência das concentrações testadas do derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona.



**Figura 15:** Fotomicrografias de órgãos vitais de camundongos Swiss, tratados com a dosagem 120µg/Kg da droga 2-N-glicina-1,4naftoquinona.

**Figura 16:** Fotomicrografias de órgãos vitais de camundongos Swiss, tratados com a dosagem 240µg/Kg da droga 2-N-glicina-1,4naftoquinona.

**Figura 17:** Fotomicrografias de órgãos vitais de camundongos Swiss, tratados com a dosagem 1000µg/Kg da droga 2-N-glicina-1,4naftoquinona.

**Figura 18:** Fotomicrografias de órgãos vitais de camundongos Swiss, tratados com a dosagem 4000µg/Kg da droga 2-N-glicina-1,4naftoquinona.

**Figura 19:** Desenvolvimento ponderal do peso (g) corporal de camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

**Figura 20:** Representação gráfica da variação da evolução, ao longo do período experimental, do peso tumoral (mg) de camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

**Figura 21:** Variação do peso (g) de órgãos de camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

**Figura 22:** Fotomicrografias de tumor e órgãos vitais de camundongos Swiss dos grupos controle e tratados com a 2-N-glicina-1,4naftoquinona nas dosagens de 40, 60, 80 e 100µg/Kg, durante 8 dias.

**Figura 23:** Curvas polinomiais da taxa de inibição tumoral diária ao longo do período de tratamento em camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Atividade farmacológica sobre os parâmetros comportamentais observados no ensaio de toxicidade aguda em camundongos machos Swiss tratados com 2-N-glicina-1,4-naftoquinona na concentração de 120, 240, 1000 e 4000 $\mu$ g//Kg aos 60 dias de idade.

**Tabela 2:** Médias e desvios padrão do peso (g) corporal de camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N- glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

**Tabela 3:** Médias e desvios padrão da evolução, ao longo do período experimental, da massa tumoral (mg) de camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

**Tabela 4:** Médias e desvios padrão do peso (g) de órgãos de camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

**Tabela 5:** Valores hematológicos de camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

**Tabela 6:** Taxa de inibição tumoral diária (%) ao longo do período de tratamento, média e desvio padrão da inibição tumoral em camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1. O câncer.....	13
2.2. O tumor de Ehrlich.....	15
2.3. Naftoquinonas/Lapachol.....	15
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1. Droga teste.....	20
3.2. Toxicológico.....	21
3.3. Manutenção da linhagem de células tumorais.....	22
3.4. Contagem e viabilidade de células tumorais.....	22
3.5. Animais e alojamento.....	23
3.5.1 Grupos experimentais.....	23
3.6. Inoculação/Desenvolvimento.....	24
3.7. Análise Histopatológica.....	24
3.8. Provas hematológicas.....	25
3.8.1. Coleta de sangue e processamento.....	25
3.9. Análise estatística.....	25
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
4.1. Toxicologia.....	25
4.2. Peso corporal e evolução tumoral.....	32
4.3. Análise hematológica.....	33
4.4. Histopatologia.....	34
4.5. Inibição.....	37
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>44</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer representa aproximadamente 16 a 24% das causas de morte ou de eutanásia em animais de companhia. Alguns fatores como idade, raça, sexo, castração e ambiente influenciam as frequências e os riscos relativos a esta patologia (RICHARD, 2004). 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).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma (115.010 casos novos), serão os cânceres de próstata (49.530 casos novos) e de pulmão (17.810 casos novos), no sexo masculino, e os cânceres de mama (49.400 casos novos) e de colo do útero (18.680), no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (INCA, 2008).

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 diferentemente entre indivíduos da mesma espécie. Portanto, as associações de drogas em tratamentos antitumorais podem gerar expectativas de bons resultados no tratamento desta patologia. Dentre as drogas utilizadas como antineoplásicos podem-se citar as quinonas e seus derivados, obtidas de fontes naturais ou sintetizadas em laboratório (TORRES et al., 2007). As fontes naturais mais frequentes são plantas superiores, artrópodes, fungos, líquens, bactérias, algas e vírus (CAMARA et al, 2008).

Pinto et al. (1978) descreve a naftoquinona – lapachol encontrada naturalmente na espécie *Tabebuia serratifolia*, como uma substância com atividades biológicas sobre o câncer, vírus, microrganismos, potencial analgésico, anti-inflamatório, ação malaricida, cercaricida, esquistossomicida e tripanomicida.

Assim, propõe-se com este trabalho verificar os efeitos tóxicos e antitumorais, bem como determinar a dose terapêutica com menor efeito colateral de uma naftoquinona, estruturalmente relacionada ao lapachol, sobre o carcinoma de Ehrlich em camundongos.

## 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 (mitose intensa), as células cancerosas geralmente têm o citoplasma basófilo, 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 imunidade tumoral. Esta resposta conta com a participação de diversos tipos celulares (linfócitos T CD<sup>8+</sup> citotóxico, células NK, macrófagos) e moleculares que estão interconectados, sendo capazes de gerar tanto resposta celular quanto humoral. O estreito contato entre o sistema imune inato e adaptativo permite ações 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 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 saudáveis. 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; PADMAVATHI et al., 2006).

## **2.2. O TUMOR DE EHRLICH**

Um grande avanço no estudo dos tumores tem sido 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 tem sido 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).

## **2.3. NAFTOQUINONAS/LAPACHOL**

Dentre as drogas utilizadas como antineoplásicos 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 (BRUNTON et al., 1996; CAMARA et al, 2008).

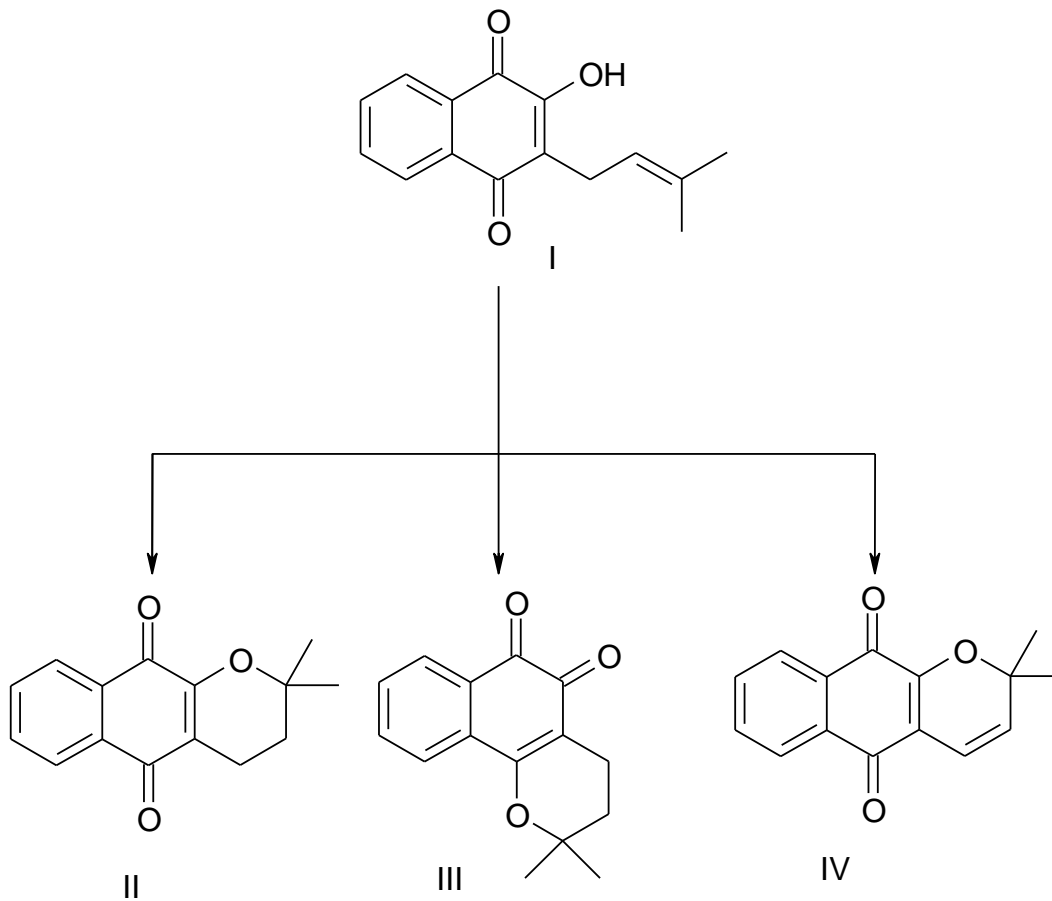
As quinonas são classificadas de acordo com o sistema aromático presente em sua estrutura, tendo as naftoquinonas um anel naftalênico característico. Vários estudos têm relatado a importância da atividade antitumoral das naftoquinonas. Sendo responsáveis por uma significativa redução do crescimento celular 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 aproximadamente 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,  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona (Figura 1) e a xiloidona (desidro-  $\alpha$ -lapachona), todos biologicamente ativos (FERRARI, 2005, TWARDOWSCHY, 2007).





**Figura 1: Fórmula estrutural do lapachol e isômeros**

- I- Lapachol
- II- Alfa-lapachona
- III- Beta-lapachona
- IV- Alfa-xiloidona

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 (SILVA et al., 2003, FERRARI, 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 (GUERRA et al., 1999, FELÍCIO et al., 2002, SILVA et al., 2003, FERRARI, 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 danos aos componentes celulares vitais como as membranas, através da peroxidação dos lipídios e a diminuição da capacidade antioxidante celular (SILVA et al., 2003).

A  $\beta$ -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 (SUN et al., 2006, ARÊAS, 2007). A ação inibitória sobre a  $\alpha$ -polimerase do DNA, revelou-se específica, pois comparada com outros inibidores, a  $\beta$ -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 (ARÊAS, 2007).

Em trabalhos citados por Li et al.(2000), mostraram que a  $\beta$ -lapachona foi bem tolerada em cães, ratos, camundongos e galinhas. A dose máxima tolerada, administrada em 1 mês, foi 200mg/Kg em ratos e 100mg/Kg em cães. Altas doses causam gastrite ulcerativa e baixa de eritrócitos, mas não promove supressão medular.

Apesar do seu largo espectro de atividade biológica, seu mecanismo de ação não é totalmente conhecido (AREAS, 2007). Inicialmente, os estudos indicam que a  $\beta$ -lapachona atua 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  $\beta$ -lapachona com a topoisomerase I antes da adição de DNA-substrato inibe drasticamente a ação desta enzima. Este resultado sugere a interação direta da  $\beta$ -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 (BRUNTON et al., 1996; SILVA et al., 2003, VARGAS et al., 2005; SUN et al, 2006).

Nos organismos mais simples, quando em ação reparadora, a topoisomerase I liga-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  $\beta$ -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  $\beta$ -lapachona também age contra a topoisomerase II- $\alpha$ , via uma rota bioquímica independente de ATP, pelo aparecimento de formas reversíveis de complexos clivados (VARGAS et al., 2005). A  $\beta$ -lapachona pode induzir apoptose em células do câncer de

pulmão, próstata, colo-retal, câncer de mama e células leucêmicas (KRISHNAN & BASTOW, 2001, 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).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. DROGA TESTE

A droga testada é um derivado de quinona (Figura 2), estruturalmente relacionado ao núcleo básico do lapachol (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), sintetizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Celso de Amorim Câmara, Departamento de Química da UFRPE.

O derivado **2-N-glicina-1,4-naftoquinona** (Figura 3) foi obtido através de síntese a partir do 2-metoxi-1,4-naftoquinona, em uma reação de substituição nucleofílica com a glicina em metanol (P.A., VETEC), na presença de solução de KOH aquoso a 10%, em bom rendimento (CAMARA et al, 2008). Após neutralização, o derivado foi purificado através de técnicas cromatográficas, especialmente coluna flash em gel de sílica, sílica-gel-60 (230-400 Mesh, Fluka) utilizando diclorometano/metanol (P.A., VETEC) como eluente, e foi caracterizado através de métodos analíticos e espectroscópicos. O ponto de fusão foi obtido através do uso de um aparelho de ponto de fusão em bloco aquecido (Quimis) e comparado com o da literatura (BITTNER et al, 2002).

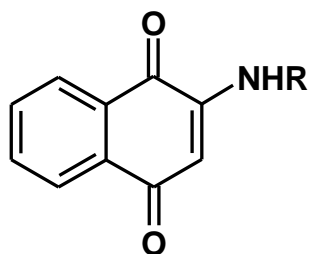


Figura 2. Molécula (quinona) básica e radical associados ao grupamento NHR (R=CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H).

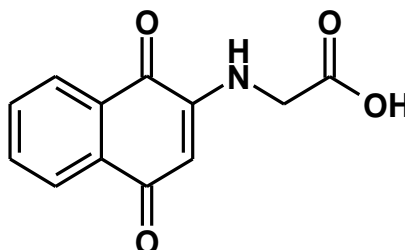


Figura 3. Estrutura química do derivado 2-N-glicina-1,4-naftoquinona.

### 3.2. TOXICOLÓGICO

Para se determinar a toxicidade aguda foi utilizado o método preconizado por Karber & Berhrens (1964), utilizando-se 20 camundongos (*Mus musculus*), variedade Albinos Swiss, machos, com oito semanas de idade, pesando entre 45-55g, provenientes do biotério do Instituto Ageu Magalhães, os quais foram avaliados e mantidos no biotério de Antibióticos no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. 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 (400 Lux) por 12 horas de escuridão; com acesso a água e ração (Labina para roedores-Purina), *ad libitum*.

Passado oito dias (período de adaptação), os animais foram divididos em quatro grupos experimentais para testar o potencial toxicológico da 2-N-glicina-1,4-naftoquinona. Os grupos experimentais respeitavam uma ordem crescente de doses, a fim de buscar a concentração que ocasionasse maiores lesões em órgãos vitais (fígado, rim, baço, coração e pulmão) dos animais. Para tal, respeitou-se a seguinte seqüência: Grupo I [toxicidade aguda em camundongos tratados com  $120\mu\text{g}/\text{Kg}$  ( $n = 5$ )]; Grupo II [toxicidade em camundongos tratados com  $240\mu\text{g}/\text{Kg}$  ( $n = 5$ )]; Grupo III [toxicidade em camundongos tratados com  $1000\mu\text{g}/\text{Kg}$  ( $n = 5$ )]; e Grupo IV [toxicidade em camundongos tratados com  $4000\mu\text{g}/\text{Kg}$  ( $n = 5$ )].

Para realização do ensaio da toxicidade aguda, os grupos experimentais foram deixados em jejum alimentar por seis horas e em seguida, administrou-se a droga teste, conforme cálculo da dose/peso. A aplicação ocorreu por gavagem, com o uso de seringa de 1ml acoplada a uma cânula oro-esofágica. Após administração da dose experimental, os animais foram colocados em gaiolas maiores, onde permaneceram por cinco minutos, para descartar qualquer estresse decorrente da manipulação e permitindo que o animal explorasse o novo ambiente. Passado este tempo, os animais ficaram sob observação inicialmente de 60 minutos ininterruptos. Posteriormente foram avaliados com 24, 48 e 72h pós-aplicação, a fim de caracterizar o comportamento dos mesmos através dos sinais clínicos expressos pelo efeito tóxico da substância química. Ao término da experimentação os animais foram submetidos aos procedimentos de eutanásia, utilizando dose letal de anestesia dissociativa, via intramuscular (cetamina  $80\text{mg}/\text{Kg}$  e xilazina  $60\text{mg}/\text{Kg}$ ) (MASSONE, 1999). Os órgãos vitais (fígado, rins, baço, coração e pulmão) foram coletados em formaldeído 10% (v/v) preparado em PBS 0,01M; pH 7,2.

Os parâmetros de comportamento expressos pelos animais sofreram análise de categorização de acordo com o efeito estimulador e/ou depressivo no SNC. As observações do comportamento incluem: abaixamento de membro posterior, agitação, apatia, tranquilidade, prurido, congestão auricular, contorção, depressão, diúrese, edema de focinho, ereção de cauda, excreção fecal, exoftalmia, fotofobia, isolamento, inversão de marcha, movimento circular, comportamento exploratório, movimento de vibrissas, ondulação de cauda, palidez, petéquias na cauda, piloereção, postura de ataque, postura em garra, postura estática, prostração, reação de fuga, refluxo, relaxamento do músculo cremaster testicular, saltos, sibilos, taquicardia, taquipnéia, e tremores finos. Também foram construídos gráficos relacionando ao efeito de dose/resposta.

### **3.3. MANUTENÇÃO DA LINHAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS**

O carcinoma de Ehrlich foi mantido em camundongos adultos, através de passagens contínuas a cada sete dias. No protocolo do laboratório de Farmacologia do DMFA-UFRPE são mantidos dois camundongos com tumores ascíticos, os quais, após este período, são submetidos aos procedimentos de eutanásia e suas células tumorais puncionadas com seringa estéril. Após a punção do líquido ascítico,  $10^6$  células viáveis foram implantadas na cavidade abdominal de camundongos saudáveis para manutenção da linhagem (SUGIURA, 1965; FERON et al., 1999).

### **3.4. CONTAGEM E VIABILIDADE DAS CÉLULAS TUMORAIS**

Para a contagem de células tumorais, 1mL do fluido ascítico foi coletado da cavidade peritoneal dos animais com tumor ascítico de Ehrlich. Esta solução foi centrifugada durante cinco 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 acrescentou-se 1mL da solução de ringer ao precipitado e desta suspensão retirou-se 20  $\mu$ L que ficou diluído 100 vezes com solução de Azul de Trypan a 0,025%. Obteve-se o número de células tumorais viáveis 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 dividido por quatro, para obtenção da média. Esta média foi multiplicada por 16 para determinação do número de células em 10 µL. Posteriormente, o número de células foi utilizado na fórmula abaixo para obtenção do número de células por mL:

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

O total de células foi expresso em números de células tumorais/mL (GUERRA, 1983).

### 3.5. ANIMAIS E ALOJAMENTO

Toda a manipulação envolvendo os animais foi realizada de acordo com os princípios internacionais para pesquisa biomédica com animais, segundo normas do International Guiding Principles For Biomedical Research Involving Animals (CIOMS) – Genebra 1985 e todos os procedimentos foram realizados de acordo com o “Consensus Recommendations on Effective Institutional Animal Care and Use Committees – NIH and USDA – publicados pelo Laboratório de Ciência Animal, edição especial, Janeiro de 1987.

Foram utilizados 30 camundongos *Mus musculus*, variedade Albinos Swiss, machos, com seis semanas de idade, pesando entre 30-33g. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Farmacologia do DMFA, UFRPE, permanecendo em microambiente controlado (fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade  $55 \pm 10\%$ ), acondicionados em gaiolas de policarbonato, forradas com maravalha de pinus, havendo fornecimento de água e ração à vontade.

#### 3.5.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Grupo I – Animais controle com aplicação de solução fisiológica (n=6)

Grupo II - Animais tratados com 40µg/Kg da 2-N-glicina-1,4-naftoquinona (n = 6).

Grupo III- Animais tratados com 60µg/Kg da 2-N-glicina-1,4-naftoquinona (n = 6).

Grupo IV- Animais tratados com 80µg/Kg da 2-N-glicina-1,4-naftoquinona (n= 6).

Grupo V- Animais tratados com 100µg/Kg da 2-N-glicina-1,4-naftoquinona (n= 6).

### 3.6. INOCULAÇÃO/DESENVOLVIMENTO

Após coleta, centrifugação, lavagens, diluição e contagem de células viáveis/ml inoculou-se uma quantidade de células no intervalo de  $10^5$  e  $10^7$  células/mL, sendo aplicado um volume máximo de 200µL. A inoculação das células do carcinoma de Ehrlich ocorreu na região axilar direita (Figura 4A). Após o 3º dia de inoculação, os camundongos foram submetidos à pesagem, medições de comprimento e diâmetro dos tumores (Figura 4B) e aplicações da 2-N-glicina-1,4-naftoquinona em diferentes doses, com uso de seringa de insulina 1mL com 100 divisões, de acordo com o grupo experimental. Estas atividades realizaram-se diariamente até o 10º dia.

Ao final do período experimental (Figura 4C), submeteu-se os animais aos procedimentos de eutanásia, utilizando dose letal de anestesia dissociativa, via intra-muscular (cetamina 80mg/Kg e xilazina 60mg/Kg) (MASSONE, 1999). Após anestesia, realizou-se sangria total por punção cardíaca, sendo os tumores (Figura 4D), fígado, pulmão, coração, rins e baço coletados para pesagem e análise histopatológica.

O volume tumoral estimado foi calculado, através da fórmula de Steel (1987):

$$\text{Volume (mm}^3\text{)} = (D \times d^2)/2$$

Onde: “**D**” representa o maior diâmetro e “**d**” o menor diâmetro.

Calculou-se o percentual de inibição tumoral, no 10º dia após inoculação, pela equação formulada por Kim et al. (2001), onde: % Inibição Tumoral =  $(C - T)/C \times 100\%$ . C = peso médio dos tumores dos grupos controle; T= peso médio dos tumores dos grupos tratados com 2-N-glicina-1,4-naftoquinona.

### 3.7. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

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



### **3.8. PROVAS HEMATOLÓGICAS**

#### **3.8.1 COLETA DE SANGUE E PROCESSAMENTO**

De cada animal obteve-se amostras sanguíneas, por meio de punção cardíaca. O sangue obtido foi envasado em frascos tipo penicilina contendo anti-coagulante e posteriormente levado a centrifuga por cinco minutos a 3000rpm.

Realizou-se leucograma, segundo metodologia descrita por Coles (1984) e Jain (1993), sendo a contagem de leucócitos realizada em hemocítmetro de Neubauer. O volume globular foi estimado segundo o método do microhematócrito. A contagem diferencial dos leucócitos realizou-se através da confecção e esfregaços sanguíneos corados pelo método Panótico.

#### **3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos nos ensaios *in vivo* foram expressos através de medidas de centralidade e dispersão (média  $\pm$  desvio padrão). Utilizou-se o programa computacional Statistica 5.1 (StarSoft, Inc., 1998) para realização do teste de Shapiro-Wilk visando verificar a tendência de normalidade dos dados. Sendo confirmada, foi utilizado o programa GraphPad (Instat<sup>®</sup>, 2000) para realização do teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA), optando-se pelo post-hoc de Tukey para verificar quais grupos experimentais diferiram entre si. Caso os dados não seguissem uma tendência normal, realizar-se-ia o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com posterior teste post-hoc de Dunn. Em todas as análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5 %.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. TOXICOLOGIA**

Os resultados obtidos mostraram que na avaliação da toxicidade aguda, do derivado 2-N-glicina-1,4-naftoquinona, administrada por via oro-gástrica, em doses de até 4000 $\mu$ g/Kg, não foi

verificado óbito nos camundongos até o período de 72h de observação, impossibilitando dessa forma, a estimativa da DL50. Contudo, algumas reações comportamentais apresentadas pelos animais com intensidades e frequência, sugerem importantes efeitos sobre diferentes sistemas orgânicos. Entretanto, foram descartadas as observações correspondentes aos cinco minutos iniciais, pós-administração da droga, com a finalidade de não haver alterações causadas por estresse de manipulação.

A 2-N-glicina 1,4-naftoquinona em dosagens de 120µg/Kg produziu lesões microscópicas e alterações comportamentais discretas em comparação às outras dosagens. As dosagens mais altas de 1000 e 4000µg/Kg possuem efeito hepatotóxico, nefrotóxico e cardiotoxico. As lesões mais comumente observadas foram degeneração hidrópica, necrose de coagulação em cardiomiócitos e células tubulares renais. Nos hepatócitos as lesões evoluíram entre macro e microesteatose para necrose de coagulação. Não se observou figura de apoptose nestes órgãos, exceto no baço, onde havia discretas áreas de polpa branca e zona marginal com linfócitos apoptóticos.

Na tabela 1 verificam-se os efeitos comportamentais espontâneos dos camundongos sob diferentes condições de dosagens (120, 240, 1000 e 4000µg/Kg), do derivado 2-N-glicina-1,4-naftoquinona constituindo o protocolo experimental para a determinação da toxicidade aguda. De acordo com os resultados, foram observadas algumas respostas sugestivas de ação central, com tempos de ocorrência e intensidades características ao longo dos 60 minutos iniciais de observação. As análises destes resultados foram construídas agrupando-se convenientemente, algumas destas respostas, em função dos respectivos tempos de ocorrência, podem ser observadas nas figuras de 5 a 14.

Na figura 5, foi possível verificar as seguintes reações comportamentais: movimentos circulares, agitação e movimento de vibrissas, na dose de 120 µg/Kg. Estas reações foram mais expressivas nos primeiros 20 min. Em seguida reduziram de forma significativa até o período final de 60 minutos de observação. Quanto o comportamento exploratório apresentado pelos animais nesta dose, verificou-se que a resposta máxima ocorreu próxima dos 30 minutos, decaindo em seguida, embora não de forma contundente como as duas respostas verificadas anteriormente. Os movimentos de vibrissas foram verificados em todos os animais, e se manteve por 40 minutos após a aplicação da droga, declinando em seguida. Provavelmente estes comportamentos estão associados a processos excitatórios devido à presença da 2-N-glicina-1,4

naftoquinona e na medida em que a concentração da mesma diminui, talvez devido a processos de excreção ou biotransformação, os efeitos correspondentes diminuam gradativamente. Alguns destes efeitos podem estar relacionados com o componente simpático do sistema nervoso autonômico, tais como a agitação e o comportamento exploratório observado nos animais, a exemplo do que sugerem Carlini (1972) e Mattei et al. (2006), e também efeito estimulante mediado pelo possível aumento da liberação e/ou mudanças nos mecanismos de captação de neurotransmissores excitatórios.

As alterações importantes associadas ao sistema colinérgico podem promover, em circunstâncias especiais, processos excitatórios (OVERALL, 1994; SIMPSON & SIMPSON, 1996). É importante destacar que o movimento de estereotipia e distúrbios de humor, movimentos de vibrissas e movimentos circulares, podem ser decorrentes da ação dopaminérgica ou noradrenérgica em áreas específicas do SNC (OVERALL, 1994; MATTEI et al., 2006);

Na figura 6, podem ser observados os seguintes comportamentos: postura de ataque, postura em garra, petéquias na cauda e edema de focinho. Os dois primeiros comportamentos apresentaram a sua expressão máxima até os 20 minutos iniciais, declinando-se em seguida, até aos 60 minutos finais de observação. Estes dois tipos de comportamentos podem ser visualizados em animais estimulados por drogas que atuam sobre o sistema simpático, embora possam também ser expressos em animais que tenham sofrido ações específicas sobre áreas importantes do sistema nervoso central, como o núcleo amigdalóide, tálamo, hipotálamo (KLEMM, 1996) ou outros setores associados ao paleocórtex. Segundo Overall (1994) verifica-se que o comportamento de agressividade pode vir acompanhado de alterações centrais envolvendo neurônios excitatórios associados à presença do glutamato como neurotransmissor principal; embora a resposta serotoninérgica possa, em muitos casos, estar associada (SHAIKH et al., 1997), bem como a noradrenalina (BOOTHE, 2003).

Possíveis ações sobre o sistema límbico podem ser esperadas, em associação com o SNA, considerando-se a possibilidade de resposta a estimulação de áreas, as quais promoveram nos animais manifestações clínicas de aumento de excreção fecal, aumento de libido e comportamento de luta e fuga (KLEMM, 1996), observadas com maior intensidade nos camundongos do grupo de 4000µg/Kg.

Já a presença de petéquias na cauda dos animais e a presença de edema de focinho, que se mantiveram expressas por 60 minutos ininterruptamente, assinalam importantes alterações

vasculares, que poderiam de certa forma, ser acionadas por estimulação simpática, mas também requerem a ação de outros componentes endógenos, como por exemplo, a participação de elementos da cascata dos processos pró-inflamatórios. É importante lembrar que o SNA é um importante componente de regulação de parâmetros vasculares, como calibre dos vasos, ondas de pulso, débito cardíaco e volume sanguíneo (IRIGOYEN et al., 2001), como também o sistema imunológico, em suas diferentes dimensões podem ter efeitos importantes sobre diferentes tecidos, inclusive o vascular, podendo estar por trás das respostas de hipersensibilidade (JONES et al., 2000).

Vale salientar que, mediante avaliação histopatológica, a hipertensão arterial pode ser relacionada ao aparecimento de petéquias na cauda, edema de focinho e congestão pulmonar intensa, como foi verificado neste trabalho. Mediante mesmo recurso, foi possível descartar a reação de hipersensibilidade imediata devido à ausência de muco nas amostras de tecidos provenientes das vias aéreas (brônquios e bronquíolos), como também a presença de edema perivascular ou intersticial pulmonar e infiltrado eosinofílico.

Na figura 7 observamos os seguintes comportamentos: prostração, fotofobia e agrupamento. Comparando estes efeitos com o de comportamento exploratório, já discutido anteriormente, verifica-se que as reações de prostração e de agrupamento ocorreram no sentido inverso, a partir dos 10 minutos, em relação ao exploratório, conseqüentemente aumentando a sua expressividade na fase final dos 60 minutos de observação. Considerando-se que os animais sob experimentação têm hábitos noturnos, e os experimentos foram realizados no período vespertino, é possível que estas alterações tenham sido expressas desta forma, uma vez que ações estimulantes importantes tenham sido verificadas pela droga nas fases iniciais do experimento. À medida que as concentrações dos derivados da droga foram diminuídas, as respostas espontâneas se manifestaram de forma mais livre. Quanto à resposta de fotofobia, cuja expressão máxima ocorreu por volta dos 15 minutos iniciais, com declinação, sugerindo influência de componentes importantes do sistema nervoso central. Estes foram acionados, juntamente com ação da droga, sensibilizando a área da retina quando em presença do estímulo luminoso, o que levou ao comportamento de recolhimento.

Nas figuras 8, 9 e 10 foram observados movimentos circulares, agitação, movimento de vibrissas e comportamento exploratório, com as doses de 240 $\mu$ g/Kg, 1000 $\mu$ g/Kg e 4000 $\mu$ g/Kg. Observou-se ainda que estes comportamentos foram mais intensos com o aumento das doses,

sugerindo-se um efeito farmacológico dose dependente. Portanto, os comportamentos de movimento circular e de agitação como modelos e evidências relacionadas entre a intensidade de resposta e a dosagem.

Mais especificamente na figura 11, verificou-se que a relação entre a intensidade de resposta de agitação em relação ao tempo para cada dose empregada foi do tipo linear, obtendo-se para cada caso um coeficiente de determinação de  $r^2 = 0,93$  (120 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ),  $r^2 = 0,77$  (240 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ),  $r^2 = 0,84$  (1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ). Quanto à dose de 4000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , a relação entre intensidade de resposta e ocorrência temporal, não foi descrita por uma função linear, uma vez que  $r^2 = 0$ . Uma observação atenta aos coeficientes angulares de cada função linear,  $b_{120} = -0,0714$ ;  $b_{240} = -0,0257$ ;  $b_{1000} = -0,04$  verificou-se que todos foram negativos, ou seja, estas respostas tenderam a diminuir ao longo do tempo, o que foi compatível com a condição de que a medida em que a concentração da droga diminuía no organismo, o seu potencial de efeito de agitação baixa proporcionalmente. Verificou-se também que com o aumento da dosagem a inclinação das curvas diminuiu, embora esta diminuição tenha sido com a dose de 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , como aquela que proporcionou maior efeito, uma vez que um maior número de animais exibiu o comportamento de agitação por mais tempo. Este achado sinalizou uma importante relação de dose-resposta para este tipo de comportamento. Para uma dosagem de 4000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , verificou-se que a resposta máxima baixou, sendo que a relação entre o número de animais que responderam e o tempo de resposta foi constante, apresentando um coeficiente angular de  $b_{4000} = 0$  ( $n=5$ ).

Na figura 12 observou-se a relação entre o número de animais com resposta e o tempo de ocorrência do comportamento de movimentos circulares exibido em diferentes condições de dosagens. As relações observadas foram do tipo linear para todas as dosagens, conforme assinalam os respectivos coeficientes de determinação:  $r^2 = 0,8816$  (120 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ),  $r^2 = 0,8521$  (240 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ),  $r^2 = 0,8521$  (1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) e  $r^2 = 0,7143$  (4000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ),  $n=5$ . Uma avaliação atenta aos coeficientes angulares das funções lineares,  $b_{120} = -0,0686$ ;  $b_{240} = -0,0371$ ;  $b_{1000} = -0,0371$  e  $b_{4000} = -0,0286$ , pode-se verificar que para as doses maiores que 120 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , os coeficientes angulares foram similares estatisticamente, para um valor de  $p < 0,01$ ;  $n = 5$ . Isto se deduz que para o comportamento de movimento circular o aumento de dosagem acima de 240 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , não afeta a resposta máxima observada para este tipo de comportamento.

Nas figuras 13 e 14, tentou-se descrever uma função matemática que permitisse estabelecer uma relação entre a variação dos comportamentos de agitação e de movimento

circular em função do aumento da dose. Para o primeiro caso (Figura 11), verificou-se que esta relação é do tipo 2º grau [ $Dose = -5e-07(Ca)^2 + 0,0005 (Ca) - 0,1302$ ] para um valor do coeficiente de determinação de  $r = 1$  (n=5). Já para o comportamento de movimento circular, esta relação foi do tipo logarítmica [ $Dose = 0,0091 \text{ Ln} (Ca) - 0,1007$ ], para um valor de  $r^2 = 0,6441$  (n=5). Em ambos os casos “Ca” representa o coeficiente angular, ou seja, a taxa de variação da quantidade de resposta em função do tempo de ocorrência temporal da mesma.

Órgãos vitais dos animais tratados com doses crescentes de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona (fígado, rins, baço, coração e pulmão) foram analisados histopatologicamente para determinar frequência e intensidade das lesões celulares e teciduais.

No fígado (Figuras 15A e B) do grupo tratado com 120 µg/Kg, observou-se discreta congestão dos capilares sinusóides, veias centro lobular e vasos do espaço porta. Discreta microesteatose centro lobular difusa e necrose de coagulação em áreas multifocais foram observadas, porém a intensidade das lesões foi discreta. Próximo às áreas portais constatou-se a presença de hepatócitos reativos. Estas células são caracterizadas basicamente pelo aumento do volume citoplasmático e nuclear, além da presença de mais de um nucléolo cercado por cromatina frouxa (eucromatina). Hepatócitos binucleados também foram observados, além do aparecimento de figuras de mitose no parênquima hepático próximo às áreas portais.

No pulmão desse mesmo grupo (Figuras 15C e D), apenas discreta congestão foi observada. No coração foram constatadas congestão intensa, degeneração hidrópica, perda do padrão de estriação transversal, eosinofilia celular e necrose de coagulação de cardiomiócitos, porém em grau discreto e em pequena intensidade no miocárdio (Figuras 15E e F). O baço também apresentou leve congestão de polpa vermelha (Figura 15G). Já nos rins dos animais tratados com 120µg/Kg (Figuras 15H, I e J) foram observadas glomerulite proliferativa, congestão cortico-medular, degeneração hidrópica, necrose tubular e de néfron (nefrose).

No fígado do grupo de 240µg/Kg ,constatou-se congestão intensa de capilares sinusóides, veia centro lobular e vasos do espaço porta (Figuras 16A, B e C). Macro e microesteatose centro lobular e necrose de coagulação próxima ao espaço porta foram observadas no parênquima hepático sendo o grau de lesão categorizada entre moderada a intensa.

No baço do grupo de 240 µg/Kg, além da congestão de polpa vermelha foi possível notar início de vacuolização e necrose de megacariócito assim como, discreto acúmulo de hemossiderina em macrófagos. Na polpa branca evidenciou-se hiperplasia de centro germinativo,

presença de figuras de mitose em linfócitos e fusão de nódulos linfóides. Na zona marginal da polpa branca foram notadas necrose e apoptose de linfócitos (Figuras 16D e E).

No pulmão dos animais tratados com 240 $\mu$ g/Kg, o achado mais comum foi congestão pulmonar sendo que alguns animais ainda apresentaram discreto edema intersticial, perivascular, infiltrado inflamatório, hemorragia intersticial focal e espessamento de parede vascular arterial e desprendimento endotelial (Figuras 16F e G). Nas artérias bronquiais e pulmonares, o desprendimento e vacuolização do endotélio como também o espessamento da túnica muscular podem estar relacionados à estimulação da função cardíaca pela droga como também pela sua ação tóxica local.

No grupo tratado com 240 $\mu$ g/Kg (Figuras 16H e I) observou-se congestão renal cortico-medular difusa, espessamento de cápsula de Bowman, atrofia de glomérulo, glomerulonefrite proliferativa e membranosa, início de esclerose glomerular, degeneração hidrópica de túbulos contorcidos proximal e distal (maior intensidades das lesões), necrose de túbulos contorcidos, presença de cilindros protéicos no lume de alguns túbulos renais.

No miocárdio dos animais tratados com 240 $\mu$ g/Kg detectou-se congestão, degeneração hidrópica e vacuolização de cardiomiócitos. Necrose de coagulação difusa de cardiomiócitos também foi detectada sendo esta caracterizada pela perda do padrão das estriações transversais e aumento da eosinofilia celular (Figuras 16J).

De acordo com os resultados histopatológicos, as lesões observadas no miocárdio dos animais que receberam as dosagens mais elevadas da droga testada não são compatíveis com lesão isquêmica, muito embora a vacuolização e necrose celular observadas pode estar relacionada com isquemia. Entretanto, devido à congestão observada no órgão e as áreas de necrose e vacuolização se apresentarem discretas e difusas no órgão é bastante provável que a lesão tenha ocorrido por ação tóxica sobre cardiomiócitos.

Nas dosagens de 1000 $\mu$ g/Kg (Figura 17) e 4000 $\mu$ g/Kg (Figura 18) foram congestão renal, glomerulite proliferativa, atrofia de glomérulo, degeneração hidrópica tubular, cilindros protéicos no lúmen tubular e necrose de túbulos coletores multifocal.

Necrose de túbulos contorcidos e glomerulonefrite proliferativa foram os achados microscópicos mais evidentes do parênquima renal encontrados nos animais deste experimento, tratados com as dose mais elevadas. Agentes tóxicos afetam regiões específicas do néfron, causando danos a glomérulos, túbulos contorcidos proximais e distais, alça de Henle e ductos

coletores, sendo mais evidente os prejuízos nos túbulos contorcidos proximais (MIDDENDORF & WILLIAMS, 2000).

No parênquima hepático dos grupos que receberam as maiores dosagens da naftoquinona foi possível observar congestão intensa em toda rede vascular, macro e micro esteatose difusa em menor intensidade. Por outro lado, necrose de coagulação dos hepatócitos foi o achado mais contundente, pois foi encontrado de forma intensa e difusa no parênquima hepático.

Nas dosagens mais baixas a principal lesão observada foi a microesteatose centro lobular de hepatócitos. Necrose de coagulação foi o achado microscópico mais evidente no parênquima hepático dos camundongos tratados com as doses mais elevadas.

No parênquima esplênico notou-se congestão de polpa vermelha, hiperplasia de polpa branca com ativação de centros germinativos e fusão dos nódulos linfóides.

As lesões miocárdicas nessas dosagens foram compostas por congestão, vacuolização e degeneração hidrópica de cardiomiócitos. Além de necrose de coagulação difusa, observou-se intensa eosinofilia das células cardíacas com perda do padrão típico das estriações transversais.

No pulmão, além da congestão e discreto edema perivascular, alguns animais tratados com a dose máxima testada visibilizou-se hemorragia, áreas de proliferação de macrófagos entre os septos alveolares, fibrose e enfisema pulmonar.

Com base neste estudo toxicológico, optou-se pelas dosagens de 40, 60, 80 e 100µg/Kg da 2-N-glicina 1,4 naftoquinona, para formação de grupos experimentais e análise da sua provável ação anticancerígena. Durante o experimento avaliou-se o peso corporal médio dos camundongos, o acompanhamento da evolução da massa tumoral média, peso de órgãos e possíveis alterações hematológicas e histopatológicas após eutanásia dos animais.

## **4.2. PESO CORPORAL E EVOLUÇÃO TUMORAL**

O peso corporal dos camundongos tratados com a 2-N-glicina 1,4-naftoquinona (Tabela 2/ Figura 19), não apresentou diferença significativa entre os grupos, mantendo certa homogeneidade entre os mesmos.

Na avaliação da evolução da massa tumoral média (Tabela 3), não se observou diferença significativa entre os grupos no 1º dia de tratamento. No 2º dia pode se observar redução significativa da massa tumoral do grupo tratado com 40µg/Kg em relação ao grupo controle como



também em relação ao grupo no qual se empregou a dose de 80µg/Kg. No 3º dia, novamente notou-se redução no crescimento da massa tumoral no grupo que recebeu 40µg/Kg em relação ao controle. Redução significativa da massa tumoral ocorreu no 4º dia de utilização da 2-N-glicina 1,4 naftoquinona na dose 40µg/Kg em relação ao grupo controle e tratado com 60µg/Kg. No 5º dia, a relação de significância e redução de massa tumoral entre os grupos controle e tratado com 40µg/Kg foi a mesma observada anteriormente. No 6º dia observou-se redução na massa tumoral nos animais tratados com 40µg/Kg em relação ao grupo controle e tratado com 60µg/Kg. No 7º dia a redução da massa tumoral foi significativa nos animais tratados com 40µg/Kg em relação ao grupo de 60µg/Kg e controle. No último dia de tratamento não houve redução da massa tumoral entre os grupos.

Na figura 20 procurou-se demonstrar a relação entre o crescimento da massa tumoral em relação ao tempo para cada dose empregada foi do tipo exponencial, obtendo-se para cada caso um coeficiente de determinação de  $r^2 = 0,866$  (controle),  $r^2 = 0,855$  (40µg/Kg),  $r^2 = 0,913$  (60µg/Kg),  $r^2 = 0,98$  (80 e 100µg/Kg). Ao colocarmos todas as curvas exponenciais em um mesmo gráfico foi possível observar que a dose de 40µg/Kg foi a mais eficiente na redução da massa tumoral ao longo do tempo com um grau de confiabilidade de 86%.

Com relação ao peso de órgãos coletados, após eutanásia, apenas no baço constatou-se redução significativa ( $P > 0,008$ ) do grupo tratado com 100 µg/Kg, comparado ao tratado com 60µg/Kg (Tabela 4 /Figura 21). Esta redução de peso pode ter ocorrido devido à hipoplasia de polpa branca provocada pelos vários focos de linfócitos apoptóticos nos centros germinativos. Os animais tratados com 80µg/Kg apresentaram uma tendência de redução do peso esplênico na mesma ordem de grandeza da que foi observada no grupo tratado com a maior dose, inclusive os achados histopatológicos do baço para esta dosagem.

### **4.3. ANÁLISE HEMATOLÓGICA**

Do ponto de vista hematológico (Tabela 5), foi constatada redução significativa no valor médio do hematócrito entre os grupos controle e o tratado com 60µg/Kg. Não foi observada anemia nos animais tratados, diferente do que foi afirmado por Silva et al. (2003), em que nos 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, promoveu efeitos colaterais como anemia, aumento do tempo de coagulação e problemas gastrintestinais. Esse último, também não foi observado com esta droga.

Nos resultados referentes ao leucograma, não se observou diferença significativa entre os grupos. Entretanto, vale ressaltar, uma tendência de aumento do número absoluto de leucócitos, em todos os grupos tratados comparados ao controle. Da mesma forma, houve tendência de aumento do valor relativo médio dos bastonetes, segmentados, com exceção do grupo tratado com 100µg/Kg. Quanto aos linfócitos, os grupos 40, 60 e 80µg/Kg, apresentaram tendência a diminuição quando os valores foram comparados ao controle. Todos os grupos tratados demonstraram tendência a diminuição do valor relativo médio de monócitos, comparado ao controle. Entretanto, nenhum dos resultados foi estatisticamente significativo entre os grupos de tratamento.

#### **4.4. HISTOPATOLOGIA**

Nos achados histopatológicos, o fígado de todos os grupos, inclusive o controle apresentou microesteatose, ativação de células de Kupffer, congestão de capilares sinusóides e focos metastáticos (Figuras 22A e B).

Os animais tratados com a menor dose de 2-N-glicina-1,4naftoquinona tiveram lesões hepáticas tais como: microesteatose difusa discreta, necrose de coagulação pericentrolobular discreta e hepatite periportal leve. O grupo que recebeu a dose de 60µg/Kg apresentou no fígado microesteatose difusa discreta, necrose de coagulação moderada e difusa, células de Kupffer (macrófagos hepáticos do sistema APC – células apresentadoras de antígenos) muito ativas, macrófagos ativos dentro dos capilares sinusóides, linfócitos disseminados pelo parênquima e hepatite periportal focal leve. Nos animais tratados com 80µg/Kg foi possível observar esteatonecrose e necrose de coagulação difusa variando de moderada a intensa no parênquima hepático. Nos animais submetidos à maior dose, além das lesões citadas anteriormente, porém com maior intensidade e difundidos pelo parênquima hepático, constatou-se presença de infiltrados do tipo mononuclear-linfocitário ao redor dos focos metastáticos. Estes focos também foram observados em áreas subcapsulares.

A microesteatose, assim como citado por Swartz (1995); Fromenty et al. (1997) e 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 Comporti (1985) e Brasileiro Filho et al. (1994). 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 cobaios submetidos a estudos toxicológicos pré-clínicos é comumente encontrada, segundo Cushman et al. (1989); Nyska et al. (1992) e Parker & Gibson, (1995), o qual é sugestivo de interferência por congestão centrolobular dificultando a perfusão dos vasos.

Os efeitos citotóxicos da  $\beta$ -lapachona, assim como de outras naftoquinonas, em células tumorais, já foram citados por Vargas e outros autores (2006). 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; SUN et al., 2006, ARÊAS, 2007).

O tumor, em todos os grupos, caracterizou-se histologicamente por áreas de necrose (área central principalmente), células ativas entremeadas por células necróticas, extensa formação vascular nas áreas de células ativas (Figuras 22C e D). No grupo controle observou-se ainda calcificação distrófica, polimorfonucleares em grande quantidade, células ativas próximas a musculatura da tela subcutânea. Nos animais tratados com 40 $\mu$ g/Kg, os tumores possuíam muitas células necrosadas em áreas periféricas e células tumorais ativas entremeadas por células necróticas, formando vários focos no tumor subcutâneo sólido. No grupo tratado com 60 e 80 $\mu$ g/Kg, notou-se área necrótica central, células ativas na periferia, apoptose, poucas mitoses por campo, polimorfonucleares entre células tumorais.

A necrose observada nas células tumorais foi do tipo coagulação e geralmente foi feita observação de polimorfonucleares neutrófilos entre as células tumorais necróticas. A presença de células inflamatórias deste tipo é muito comum quando a morte celular é por necrose, muito embora, quando ocorrem extensas áreas de apoptose este fenômeno também pode ocorrer levando-se em consideração a presença de macrófagos (KUMAR et al., 2008). Em todos os grupos a necrose pode caracterizar-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).

A histopatologia do baço apresentou alterações nos grupos 80 e 100µg/Kg, tais como congestão de polpa vermelha, hipoplasia de polpa branca com vários focos linfócitos apoptóticos nos centros germinativos e também na zona marginal.

O coração do grupo controle apresentou histologicamente congestão e necrose de cardiomiócitos, porém em grau leve em relação aos achados dos grupos tratados. Nestes grupos observou-se congestão do miocárdio, cardiomiócitos com vacuolização, perda do padrão de estriação transversal, áreas multifocais com necrose de coagulação variando de leve a moderada (Figuras 22E e F). De acordo com os resultados histopatológicos, as lesões observadas no miocárdio dos animais que receberam as dosagens mais elevadas da droga podem ser relacionadas à ação tóxica sobre cardiomiócitos.

No pulmão foi possível observar congestão discreta a moderada, ativação de pneumócitos II, pneumonia intersticial crônica, espessamento de parede alveolar e enfisema em todos os grupos (Figuras 22G e H). Congestão 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 relacionadas com a associação de drogas 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 muito 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. Focos metastáticos foram observados nos grupos 40 e 100µg/Kg.

Na avaliação histológica renal, observou-se congestão córtico-medular nos grupos tratados, sendo intensificada no grupo tratado com 100µg/Kg. Glomerulonefrite proliferativa,

espessamento da cápsula de Bowman, pequena área de necrose tubular focal foi observada nos animais que receberam a menor dosagem. Por outro lado, as lesões se intensificaram nos grupos tratados com as doses maiores. Com isso pode se observar atrofia glomerular, glomerulonefrite proliferativa, presença de cilindros protéicos no lúmen dos túbulos contorcidos proximais, degeneração hidrópica e necrose tubular discreta (Figuras 22 I e J).

A necrose tubular observada nas dosagens mais altas também pode estar associada à interação de diversos fatores, tais como: presença de proteínas no lume tubular, refluxo do filtrado devido à formação intra-luminal de cristais da droga, inchaço celular (degeneração hidrópica), retorno de substâncias tóxicas dos túbulos, retenção do fluxo sanguíneo regional como resultado de dano endotelial, trombose, liberação de mediadores humorais ou ativação de reflexos neurais (MacDONALD et al., 1987). De acordo com os achados histopatológicos é bastante provável que as alterações renais advenham de danos associados à ativação do sistema nervoso autônomo porção simpática. Isto justificaria o quadro de degeneração hidrópica, necrose tubular, atrofia glomerular, glomerulonefrite proliferativa e intensa congestão nas dosagens mais altas administradas.

#### 4.5. INIBIÇÃO

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). Outros autores, como 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.

Calculou-se a taxa de inibição tumoral diária de cada grupo (Tabela 6), com base na equação formulada por Kim et al. (2001), onde: % Inibição Tumoral =  $(C - T)/C \times 100\%$ . C = peso médio dos tumores do grupo controle; T= peso médio dos tumores dos grupos tratados com 2-N-glicina-1,4-naftoquinona. Através desse cálculo foi possível verificar que a dose de 40µg/Kg foi a que apresentou maior taxa de inibição média ao longo do tratamento, seguida das doses 80 e 100µg/Kg. O grupo tratado com 60µg/Kg teve a menor inibição média, por isso o maior peso tumoral comparado aos demais grupos.

Na figura 23, procurou-se demonstrar a relação entre inibição tumoral em relação ao tempo para cada dose empregada, sendo do tipo polinomial, obtendo-se para cada caso um coeficiente de determinação de  $r^2 = 0,78$  (inibição controle/40 $\mu$ g/Kg),  $r^2 = 1$  (inibição controle/60 $\mu$ g/Kg),  $r^2 = 0,91$  (inibição controle/80 $\mu$ g/Kg),  $r^2 = 0,79$  (inibição controle/100 $\mu$ g/Kg). Ao analisarmos todas as curvas polinomiais foi possível observar que a dose de 40 $\mu$ g/Kg foi a mais eficiente na promoção da inibição tumoral ao longo do tempo com grau de confiabilidade de 78%.

Considerando-se apenas o último dia de tratamento para o cálculo da inibição tumoral, teríamos a melhor taxa de inibição para o grupo de 100 $\mu$ g/Kg, seguido dos grupos 80 e 40 $\mu$ g/Kg, respectivamente. O grupo de 60 $\mu$ g/Kg, assumiria um valor negativo, não havendo assim inibição.

Se utilizássemos uma dose maior do que 100 $\mu$ g/Kg e diminuíssemos a duração do tratamento, talvez pudéssemos obter um melhor efeito inibitório para a droga, sem causar tantos efeitos tóxicos. Ou, se realizássemos associação desta com substâncias que promovam redução na formação de radicais livres, ou com capacidade de redução metastática, é bastante aceitável a possibilidade de obtenção de melhores resultados na atividade anticancerígena da 2-N-glicina-1,4 naftoquinona. Corroborando com o que foi citado por Hardman & Limbird (2005), os agentes antineoplásicos são atualmente utilizados de forma combinada atuando em processos metabólicos diferentes e aumentando a probabilidade de erradicação das células cancerosas, além de apresentarem menor toxicidade, já que são utilizados em uma dosagem menor quando comparados ao seu uso separadamente.

O mecanismo de morte celular desencadeado pela droga, provavelmente está relacionado à formação de radicais livres, dano mitocondrial e incapacidade de manutenção do equilíbrio osmótico celular. Espera-se com os resultados obtidos, poder contribuir nas pesquisas destinadas à busca de um tratamento eficiente e que produza menores efeitos colaterais, relacionados ao tratamento “curativo” do câncer.

## 5. CONCLUSÃO

A 2-N-glicina-1,4-naftoquinona não influenciou no índice de massa corporal nos camundongos.

Do ponto de vista hematológico notou-se alteração do hematócrito, entretanto, sem relevância clínica.

Com relação à inibição tumoral média, a 2-N-glicina-1,4-naftoquinona não exerceu seu efeito de maneira dose dependente. Entretanto, o mesmo não ocorreu quanto ao seu efeito tóxico, principalmente em órgãos como fígado, rins e coração. Sendo a melhor inibição tumoral média obtida com a dosagem de 40µg/Kg, além de um menor efeito tóxico sob órgãos vitais.

Levando-se em consideração a massa tumoral final a melhor taxa de inibição foi obtida com a dose de 100µg/Kg da 2-N-glicina-1,4-naftoquinona, porém com o aumento da dose, intensificaram-se as lesões tóxicas.

## 6. REFERÊNCIAS

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.

ARÊAS, P. C. F. **Avaliação da atividade antitumoral de naftoquinonas**. 2007, 77f. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

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.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart , 1976. p.1-257.

BITTNER, S. et al. Synthesis, electrochemical and spectral properties of some 2 -N-quinonyl amino acids. **Amino Acids**, USA, v.22, n.1, p.71-93, 2002.

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

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

BOOTHE, D. M. Drogas que afetam o comportamento animal. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e Terapêutica Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 318-329.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th. Ed. [S.1.]: McGraw-Hill, 1996.

CAMARA, C. A et al. Molluscicidal Activity of 2-hidroxy-[1,4]-naphthoquinone and derivatives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, p. 329-334, 2008.

CARLINI, E. A. **Farmacologia prática sem aparelhagem**. São Paulo: Sarvier, 1972.

COLES, G. H. **Patologia clínica veterinária**. 3ed. São Paulo: Manole, 1984. 561p.

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

CUSHMAN, J. R.; RICHTER, W. R.; DUKE, J. T. Effects of skin sensitization test wrapping on guinea pigs. **Contact Dermatitis**. n 21, 279-80, 1989.

FARIA, J. L. **Patologia Geral: Fundamentos das doenças, com aplicações clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 298p.

FELICIO, A. C. et al. Fetal growth in rats treated with lapachol. **Contraception**, Stoneham, v. 66, 289–293p. 2002.

FERON, V. J et al. **Long and medium term carcinogenicity studies in animals and short term genotoxicity testes**. [S.1]: IARC Science Publication, 1999. p. 103 – 129.

FERRARI, M. D. **Avaliação das atividades tripanocida e leishmanicida dos extratos hidroalcoólicos brutos da casca, folhas e flores de *Tabebuia avellanedae* (Ipê roxo)**. São Paulo: 2005. 99f. Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde) – Universidade de Franca, São Paulo.

FROMENTY, B.; BERSON, A.; PESSAYRE, D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. **Journal of Hepatology**. Oxfordshire, v.26, n.1, p. 13-22, 1997. Supplement.

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

GUERRA, M. O. et al. Interceptive Effect of lapachol in rats. **Contraception**. Stoneham, v. 60, p. 305-307, 1999.



GUO, J. et al. Enhanced chemosensitivity to irinotecan by RNA interference-mediated down-regulation of the nuclear factor-kB p65 subunit. **Clinical Cancer Research**. [S.l.], v. 10, pag 3333–3341, 2004.

GUTEMBERG, T. Câncer, a humanidade contra-ataca. **Revista Superinteressante**, São Paulo, v.206, p. 44-53, nov. 2004.

HARDMAN, J. G, LIMBIRD, L. **As bases farmacológicas da terapêutica**. [S.l];s.n.], 2005.

INCA. **Incidência de Câncer no Brasil: Estimativa 2008**. [S.l.], 2008. 96p.

IRIGOYEN, M. C. et al. Cardiovascular control: role of the sympathetic nervous system. **Revista Brasileira Hipertensao**, São Paulo, v.8, n.1, p.55-62, 2001.

JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 1221 p.

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 Koogan, 2005. p.288-297.

KARBER, G.; BEHRENS, B. **Statistical methods in biological assay**, 2 ed, London: [s.n.], 1964.

KIM, S. K. et al. Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*. **Archiv der Pharmazie**. Res., 24, 518 - 521, 2001.

KLEMM, W. R. Estrutura e funcionamento básico do Sistema Nervoso In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

KRISHNAN, P., BASTOW, K. Novel mechanism of cellular DNA topoisomerase II inhibition by the pyranonaphthoquinone derivatives  $\alpha$ -lapachona and  $\beta$ -lapachona. **Cancer Chemother Pharmacol**, 47, 187-198, 2001.

KUMAR, V. et al. **Robbins patologia básica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier ,2008. p.1-30.

LI, Y. et al. Potent induction of apoptosis by  $\beta$ -lapachona in human multiple myeloma cell lines and patient cells. **Molecular Medicine**, New York, v.6, n.12, p. 1008-1015, 2000.

MacDONALD, J. S. et al. Renal effects of enalapril in dogs. **Kidney Internacional**. New York, v. 31, S148-S153, 1987.

MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária: farmacologia e técnicas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 18-193.

MATTEI, R.; ITHAMAR, C.; FRANCA, F. Testes gerais para confirmar a ação central. In: ALMEIDA, R.N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 12, p.131-42, 2006.

MIDDENDORF, P. J.; WILLIAMS, P. L. Nephrotoxicity: Toxic Responses 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.

NYSKA, A. et al. Possible pitfalls in rat extended dermal toxicity testing: an hepatic-ocular syndrome. **Archives of Toxicology**, New York, n.66, p.339-346, 1992.

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

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.

OVERALL, K. L. Use of clomipramine to treat ritualistic stereotypic motor behavior in three dogs. **Journal American Veterinary Medical Association**. Schaumburg, v. 205, p.1733-1741, 1994.

PADMAVATHI, R. et al. Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7, 12 dimethyl benz(α)anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. **Life Sciences**, Tokio, v.78, n.24, p.2820-2825, 2006.

PINTO, A. V.; GILBERT, B.; PINTO, M. C.; “In Vitro and In Vivo Evaluation of the toxicity of 1,4-Naphthoquinone and 1,2-Naphthoquinone Derivatives against *Trypanosoma cruzi*”; **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v. 72, p.523, 1978.

PISSINATE, K. **Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos**. 2006, 110f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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

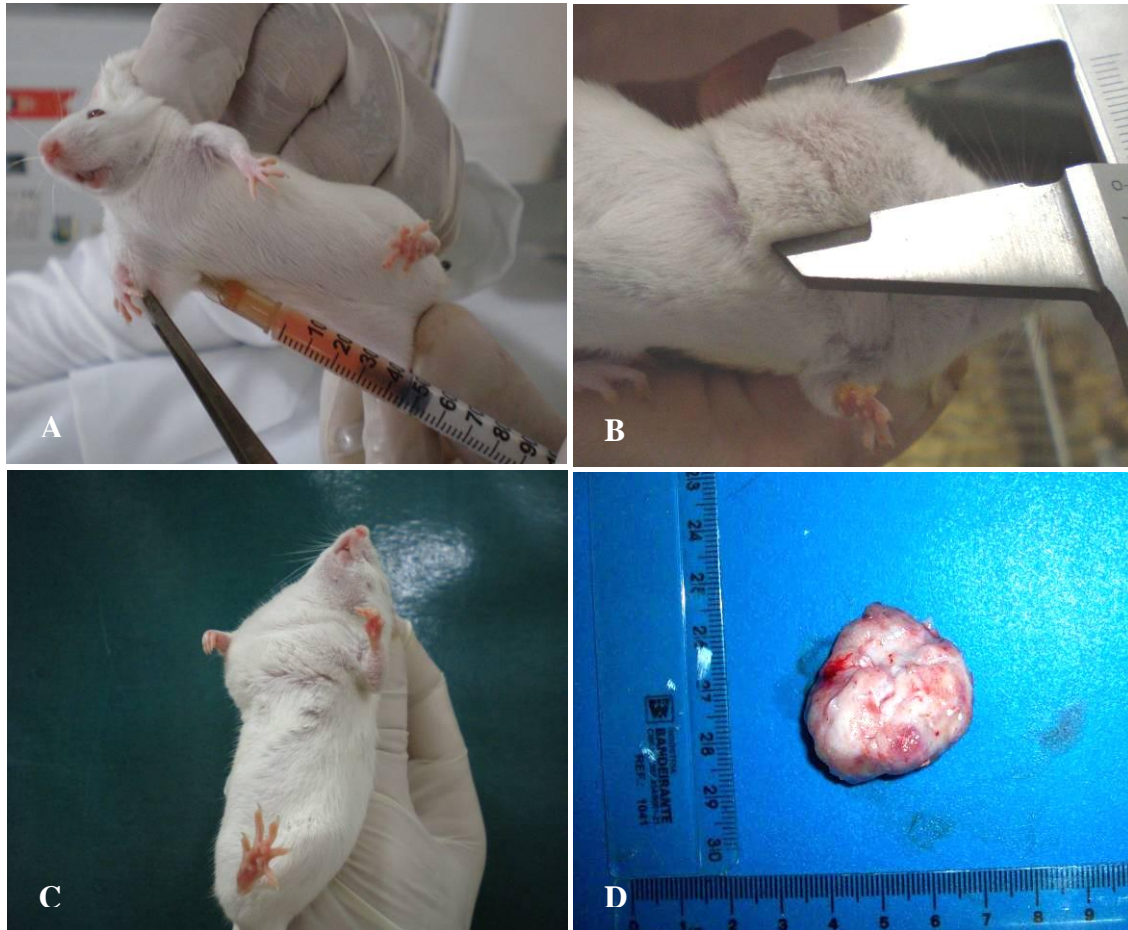
RICHARDSON, R.C. et al. Biologia dos Tumores. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4 ed. São Paulo: Manole, 1997. v.1, p.665-675.

SÁNCHEZ-BARCELÓ, E. J. et al. Melatonin and mammary cancer: 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)**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1986. 409 p.

- SHAIKH, M. B.; DE LANEROLLE, N. C. SIEGEL, A. Serotonin 5-HT 1A and 5-HT2/1C receptors in the midbrain periaqueductal gray differentially modulate defensive rage behavior elicited from the medial hypothalamus of the cat. **Brain Research**, [S.l.], v.765, n. 2, p. 198-207, 1997.
- SILVA, M. N., FERREIRA, V. F., SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p.407-416, 2003.
- SILVA, A. E., SANTOS, F. G. A., CASSALI, G. D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n. 4, p.658-661, 2006.
- SIMPSON, B. S.; SIMPSON, D. M. Behavioral pharmacotherapy. In: VOIT, V. L., BORCHELT, P. L., **Readings in Companion Animal Behavior**, [S.l.], p. 100-115, 1996.
- STEEL, G. G. **Growth Kinetics of Tumours**. Oxford: Clarendon Press, 1987.
- SUGIURA, K. **Tumor transplantation, in Methods of animal experimentation**. New York: Academic Press, 1965, v. 2, p.171 – 222.
- SUN, X. et al. Selective Induction of Necrotic Cell Death in Cancer Cells by b-Lapachone through Activation of DNA Damage Response Pathway. **Cell Cycle**. [S.l.], v.5, n.17, p.2029-2035, 2006.
- SWARTZ, M.N. Mitochondrial toxicology – new adverse drug effects. **New England Journal of Medicine**. Waltham, v.333, p.1146-48, 1995.
- TWARDOWSCHY, A. **Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das cascas de *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb (Bignoniaceae)**. 2007, 76f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 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**, Recife, 2007.
- 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.
- WARD, J.M.; GOODMAN, D.G.; SQUISE, R.A.; et al. Neoplastic and non-neoplastic lesions in ageing (C57BL/6NX C3H/HeN) F1 (B6C3F1) mice. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 63, p.849-54, 1979.

## ANEXOS



**Figura 4:** Camundongos submetidos a implante de carcinoma de Erlich aos 45 dias de idade.

**Figura 4A:** Implante das células do carcinosarcoma na região axilar.

**Figura 4B:** Medições do comprimento e diâmetro tumoral, através de paquímetro.

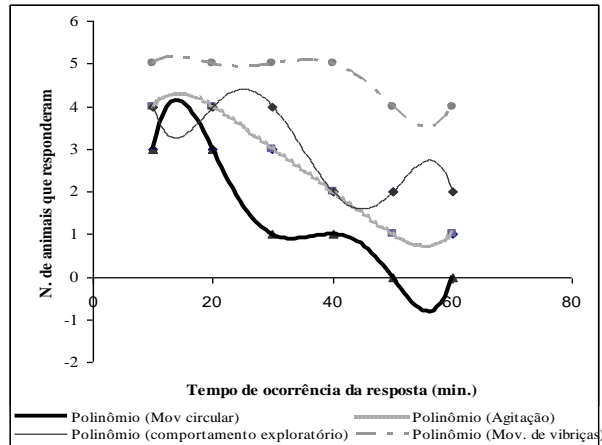
**Figura 4C:** Crescimento neoplásico tomando todo o tórax do camundongo.

**Figura 4D:** Aspecto macroscópico do tumor após dissecação do tecido subcutâneo.

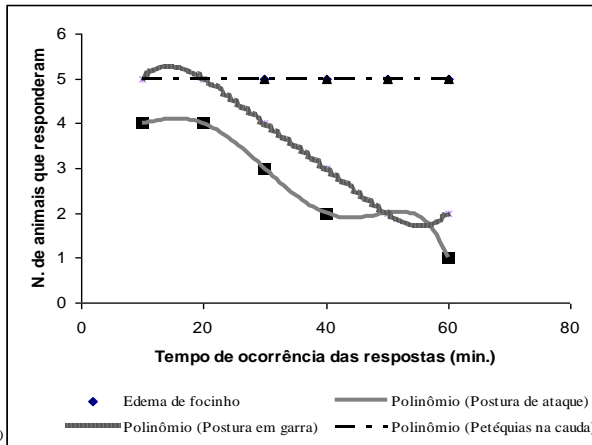
**Tabela 1:** Atividade Farmacológica sobre os parâmetros comportamentais observados no ensaio de toxicidade aguda em camundongos machos Swiss tratados com 2-N-glicina-1,4naftoquinona na concentração de 120, 240, 1000 e 4000µg//Kg aos 60 dias de idade.

Atividade Farmacológica		Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
		Até 30 min	60 min	24 horas	48 horas	72 horas
1. SNC	Dosagens (µg/Kg)					
<b>a) Estimulante</b>						
Agitação/ Agressividade	120	+	+	+	+	+
	240	+	+	+	+	+
	1000	++	++	++	++	++
	4000	++	++	++	++	++
Andar em Círculo	120	+	+	0	0	0
	240	+	0	0	0	0
	1000	++	0	0	0	0
	4000	+	0	0	0	0
Movimento de Esteriotipia	120	++	++	+	+	+
	240	++	++	+	+	+
	1000	++	++	+	+	+
	4000	+	+	+	+	+
Movimento de Vibrissas	120	++	++	++	++	+
	240	++	++	++	++	+
	1000	++	++	++	++	+
	4000	++	++	++	++	+
Exoftalmia	120	+	0	0	0	0
	240	+	0	0	0	0
	1000	++	0	0	0	0
	4000	++	+	0	0	0
Postura em garra	120	++	++	+	+	+
	240	++	++	+	+	+
	1000	++	++	++	++	+
	4000	++	++	++	++	+
Salto	120	+	+	+	+	+
	240	+	+	+	+	+
	1000	++	+	++	+	+
	4000	+	+	+	+	+
<b>b) Depressores</b>						
Ambulação das patas do trem posterior	120	++	+	0	0	0
	240	++	+	0	0	0
	1000	0	0	0	0	0
	4000	0	0	0	0	0
Analgesia	120	++	+	0	0	0
	240	++	+	0	0	0
	1000	+	+	0	0	0
	4000	+	0	0	0	0
<b>2. SNA</b>						
Excreção Fecal	120	+	+	+	+	+
	240	++	++	++	++	++
	1000	++	+	+	+	+
	4000	+	+	+	+	+
Micção	120	++	+	+	+	+
	240	++	+	+	+	+

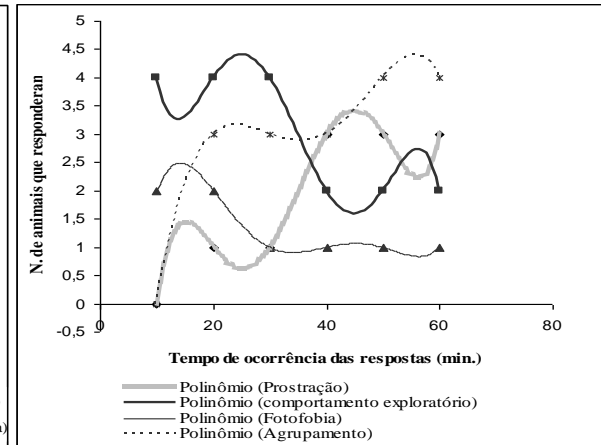
	<b>1000</b>	+	+	+	+	+
	<b>4000</b>	+	+	+	+	+
<b>Edema de focinho</b>	<b>120</b>	++	++	++	++	++
	<b>240</b>	++	++	++	++	++
	<b>1000</b>	++	++	++	++	++
	<b>4000</b>	++	++	++	++	++
<b>Petéquias na cauda</b>	<b>120</b>	++	++	++	++	++
	<b>240</b>	++	++	++	++	++
	<b>1000</b>	++	++	++	++	++
	<b>4000</b>	++	++	++	++	++
<b>3. Mortes</b>	<b>120</b>	0	0	0	0	0
	<b>240</b>	0	0	0	0	0
	<b>1000</b>	0	0	0	0	0
	<b>4000</b>	0	0	0	0	0



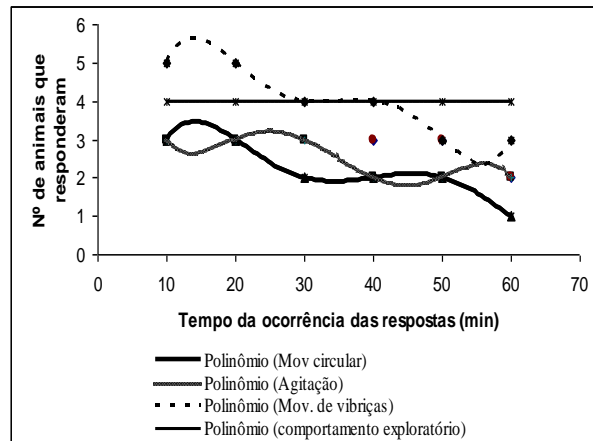
**Figura 5:** Alterações de comportamento no número de camundongos em decorrência do tempo em minutos sobre a análise do comportamento espontâneo em animais tratados com o derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona na concentração de 120 µg/Kg.



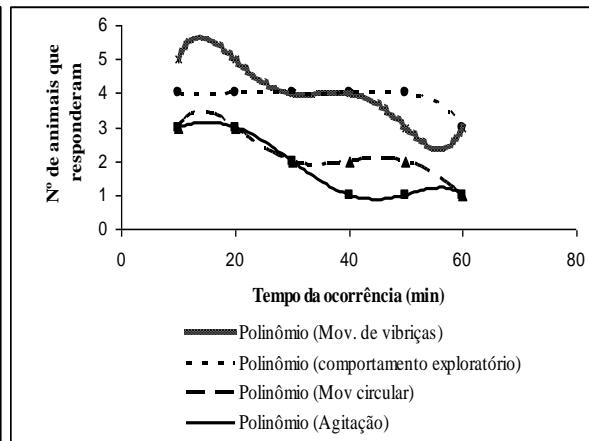
**Figura 6:** Alterações de comportamento no número de camundongos em decorrência do tempo em minutos sobre a análise do comportamento espontâneo em animais tratados com o derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona na concentração de 120 µg/Kg.



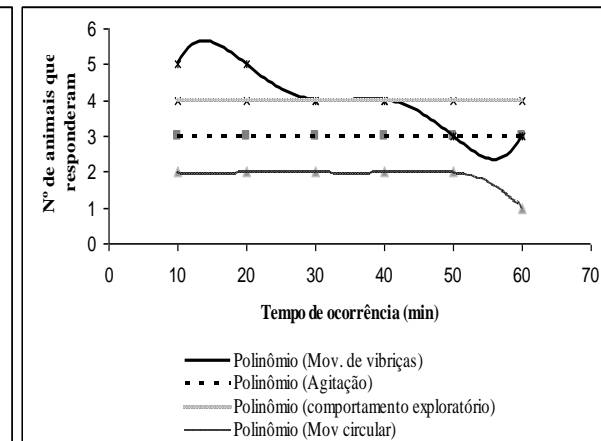
**Figura 7:** Alterações de comportamento no número de camundongos em decorrência do tempo em minutos sobre a análise do comportamento espontâneo em animais tratados com o derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona na concentração de 120 µg/Kg.



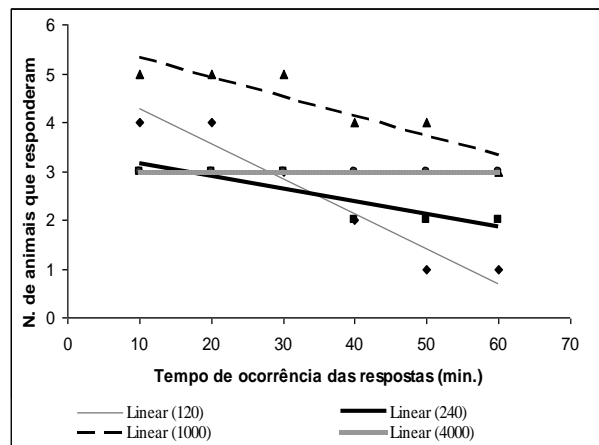
**Figura 8:** Alterações de comportamento no número de camundongos em decorrência do tempo em minutos sobre a análise do comportamento espontâneo em animais tratados com o derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona na concentração de 240 µg/Kg.



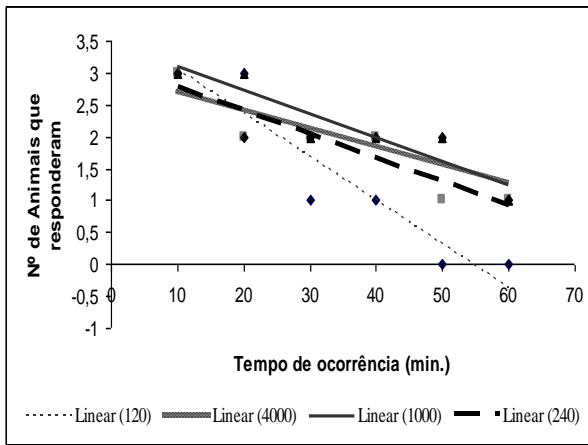
**Figura 9:** Alterações de comportamento no número de camundongos em decorrência do tempo em minutos sobre a análise do comportamento espontâneo em animais tratados com o derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona na concentração de 1000 µg/Kg.



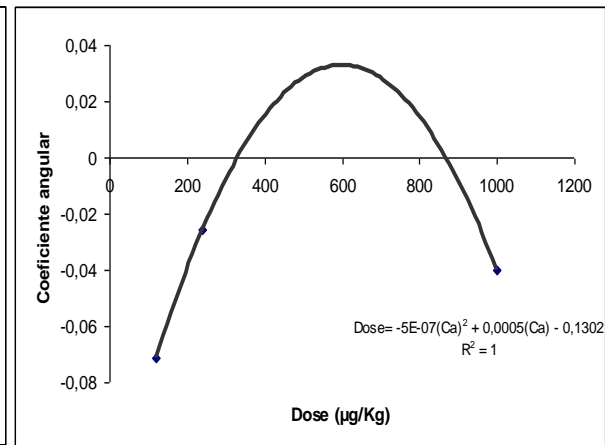
**Figura 10:** Alterações de comportamento no número de camundongos em decorrência do tempo em minutos sobre a análise do comportamento espontâneo em animais tratados com o derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona na concentração de 4000 µg/Kg.



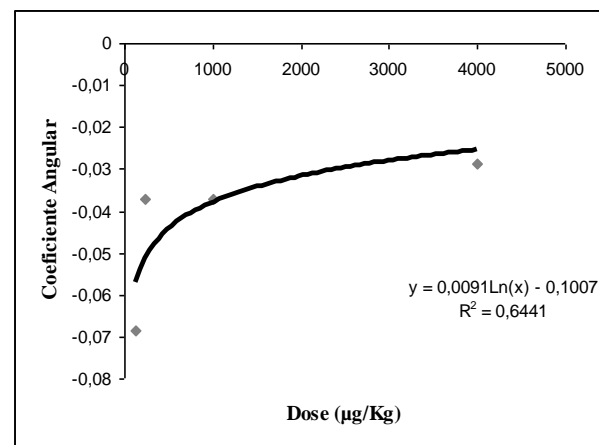
**Figura 11** Análise do comportamento de agitação em decorrência do tempo em minutos sobre a análise do comportamento espontâneo nos camundongos tratados com o derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona nas quatro dosagens testes.



**Figura 12:** Análise do comportamento de movimento circular dos camundongos em decorrência do tempo em minutos sobre a análise do comportamento espontâneo em animais tratados com o derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona nas quatro dosagens testes.

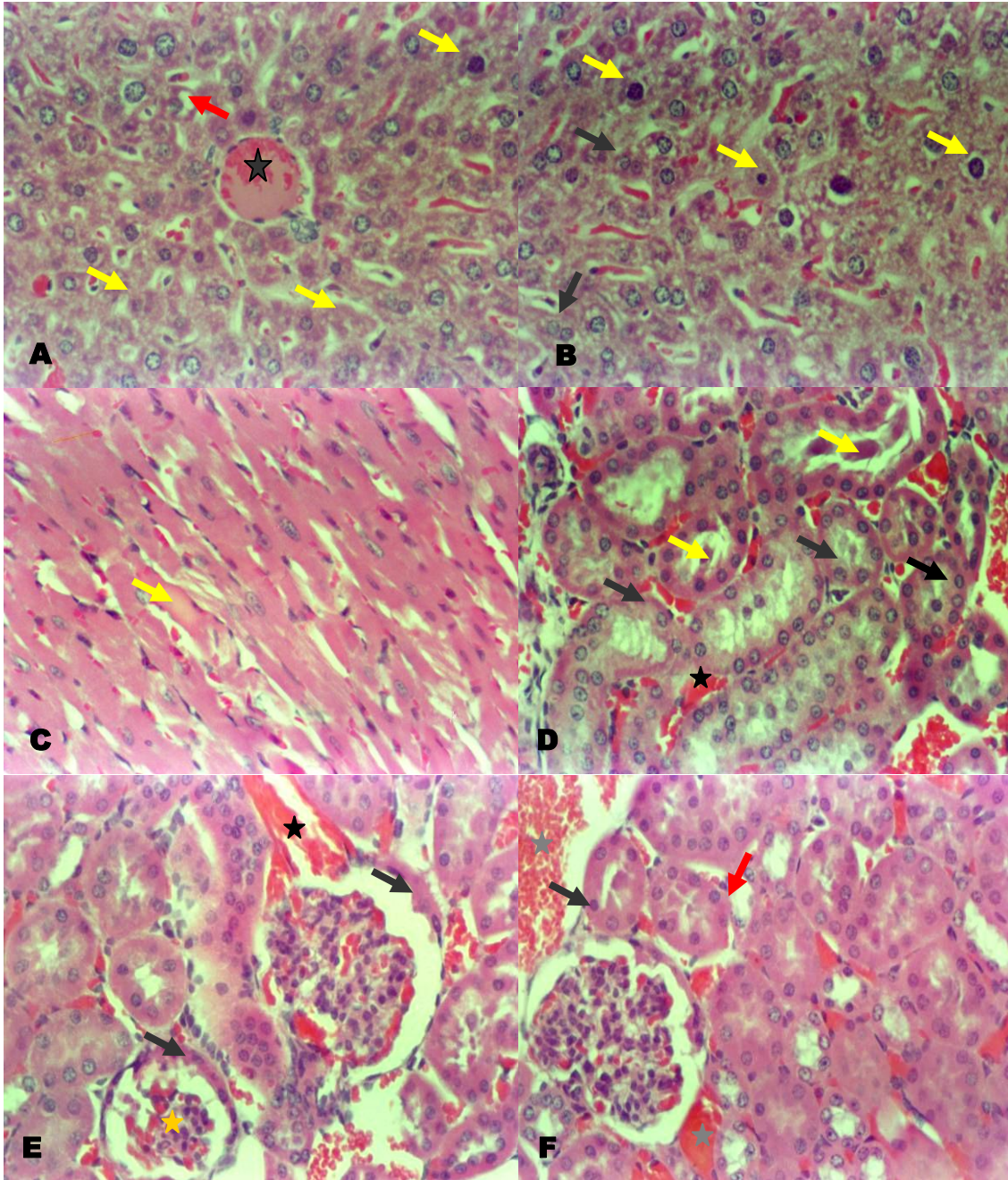


**Figura 13:** Análise do coeficiente angular do comportamento de agitação dos camundongos em decorrência das concentrações testadas do derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona.



**Figura 14:** Análise do coeficiente angular do comportamento de movimento circular dos camundongos em decorrência das concentrações testadas do derivado 2-N-glicina-1,4naftoquinona.





**Figura 15:** Fotomicrografias de órgãos vitais de camundongos Swiss tratados com a dosagem 120µg/Kg da droga 2-N-glicina-1,4naftoquinona.

**Figura 15A** – Detalhe do parênquima hepático. Notar congestão da veia centrolobular (estrela); necrose de coagulação dos hepatócitos periportal (seta amarela) e vacuolização citoplasmática (seta vermelha). Aumento 200X.

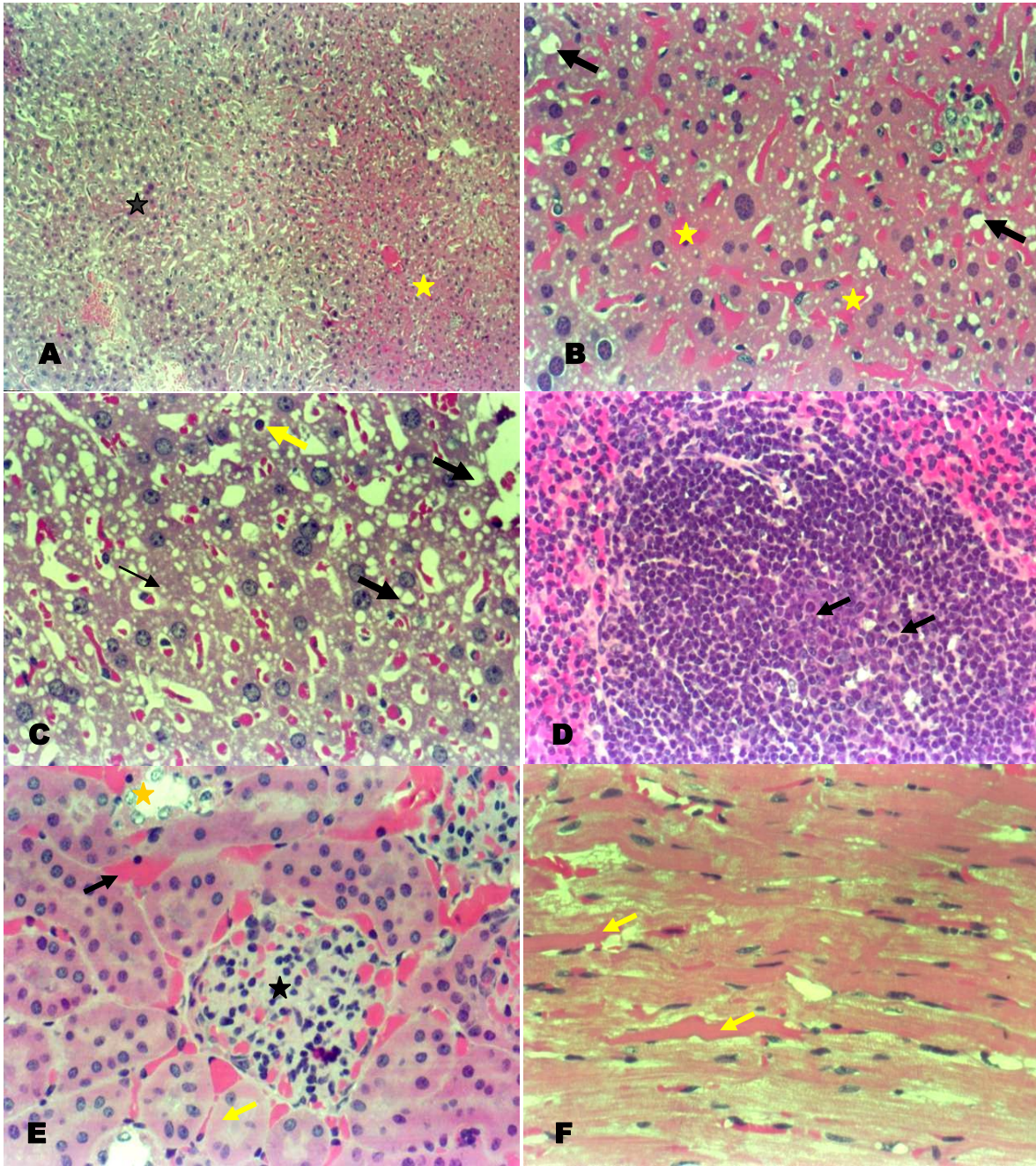
**Figura 15B** – Detalhe hepatócito com diferentes estágios de picnose nuclear (seta amarela), hepatócitos binucleados (seta preta). Aumento 200X.

**Figura 15C** – Detalhe do miocárdio em corte longitudinal com perda de estriação transversal, necrose de coagulação (seta amarela) e eosinofilia celular. Aumento 200X.

**Figura 15D** – Detalhe dos túbulos contorcidos renais com cilindros protéicos no lúmen (seta amarela). Notar intensa congestão (estrela), tumefação turva com aumento do volume celular (seta preta). Aumento 200X.

**Figura 15E**– Detalhe do parênquima renal, onde se pode visibilizar a congestão (estrela preta), atrofia de glomérulo (estrela amarela) e espessamento da cápsula de Bowman (seta preta). Aumento 200X.

**Figura 15F** – Detalhe do parênquima renal, onde se podem notar a congestão (estrela), picnose de célula tubular (seta preta) e tumefação turva (seta vermelha). Aumento 200X.



**Figura 16:** Fotomicrografias de órgãos vitais de camundongos Swiss tratados com a dosagem 240µg/Kg da droga 2-N-glicina-1,4naftoquinona.

**Figura 16A** – Parênquima hepático de camundongos. Observar a intensa congestão difusa (estrela amarela) e necrose de coagulação periportal (estrela preta). Aumento 50X.

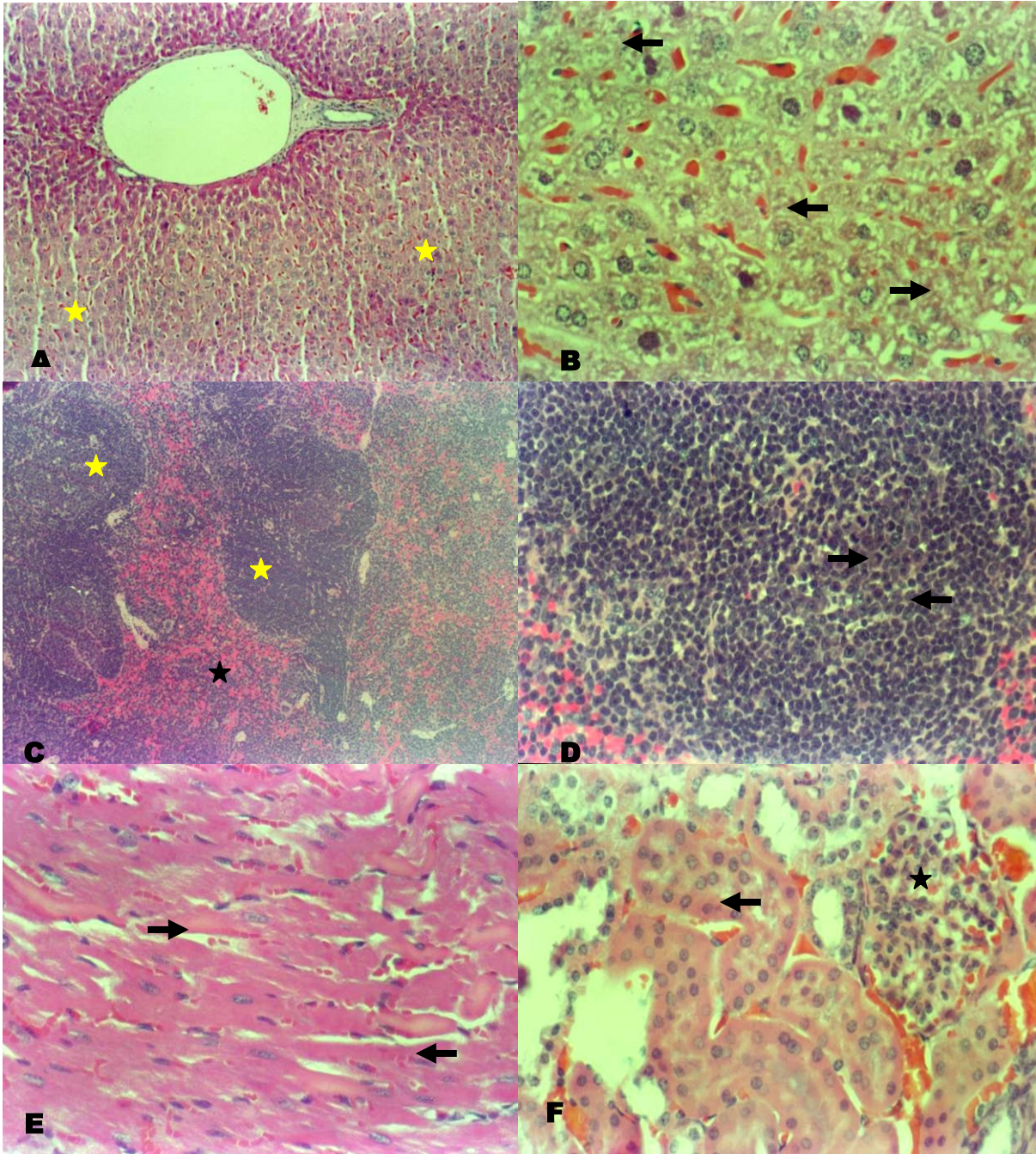
**Figura 16B** – Detalhe do parênquima hepático congestionado (estrela), com macrosteatose (seta larga). Aumento 200X.

**Figura 16C** – Detalhe da área necrótica, do fígado onde podem ser visibilizadas células com núcleo picnótico (seta amarela), célula sem núcleo (seta fina) e vacúolos citoplasmáticos. Aumento 200X.

**Figura 16D** – Detalhe da hiperplasia do centro germinativo do nódulo linfóide, onde podem ser observadas algumas figuras de mitose (seta). Aumento 200X.

**Figura 16E** – Detalhe da glomerulonefrite proliferativa (estrela preta), necrose de células da parede tubular (seta amarela) e congestão renal (seta preta). Aumento 200X.

**Figura 16F** – Detalhe do miocárdio. Observar célula mais eosinofílica com necrose de coagulação (seta amarela), com perda da estriação transversal. Aumento 200X.



**Figura 17: Fotomicrografias de órgãos vitais de camundongos Swiss tratados com a dosagem 1000µg/Kg da droga 2-N-glicina-1,4naftoquinona.**

**Figura 17A** – Parênquima hepático de animais tratados. Notar congestão dos capilares sinusóides e necrose de coagulação periportal (estrela amarela). Aumento 50X.

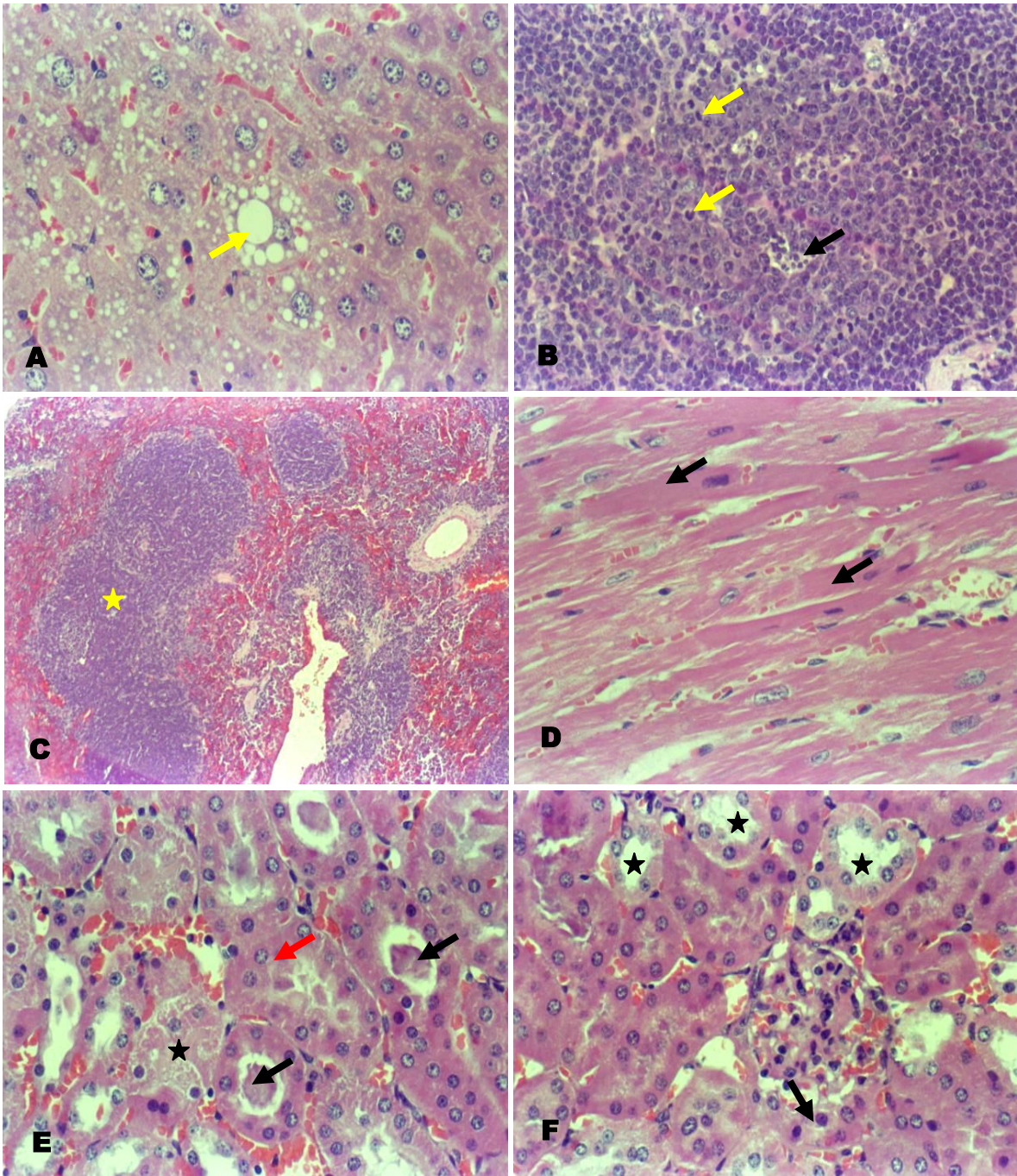
**Figura 17B** – Detalhe da necrose celular no fígado (seta preta), notar a vacuolização citoplasmática. Aumento 200X.

**Figura 17C** – Parênquima esplênico com congestão de polpa vermelha (estrela preta) e hiperplasia de polpa branca (estrela amarela). Aumento 50X .

**Figura 17D** – Detalhe do nódulo linfóide do baço. Observar a presença de células em divisão celular (seta preta). Aumento 200X.

**Figura 17E** – Detalhe do miocárdio em corte longitudinal com perda de estriação transversal, necrose de coagulação (seta preta) e eosinofilia celular. Aumento 200X.

**Figura 17F** – Detalhe do parênquima renal, onde se podem notar a congestão, degeneração hidrópica (seta preta) e glomerulonefrite proliferativa (estrela). Aumento 200X.



**Figura 18: Fotomicrografias de órgãos vitais de camundongos Swiss tratados com a dosagem 4000µg/Kg da droga 2-N-glicina-1,4naftoquinona.**

**Figura 18A** – Detalhe do parênquima hepático com diferentes graus de necrose celular e macroesteatose (seta) e microesteatose, congestão dos capilares sinusóides. Aumento 200X.

**Figura 18B** – Detalhe da polpa branca do baço. Notar a ativação do centro germinativo com figuras de mitose (seta amarela); apoptose celular (seta preta). Aumento 200X.

**Figura 18C** – Parênquima esplênico, onde pode ser vista a hiperplasia e fusão dos nódulos linfóides (estrela), intensa congestão do órgão. Aumento 50X.

**Figura 18D** – Detalhe do miocárdio em corte longitudinal. Visibilizar o cardiomiócito com perda de estriação transversal e necrose de coagulação (seta preta). Aumento 200X.

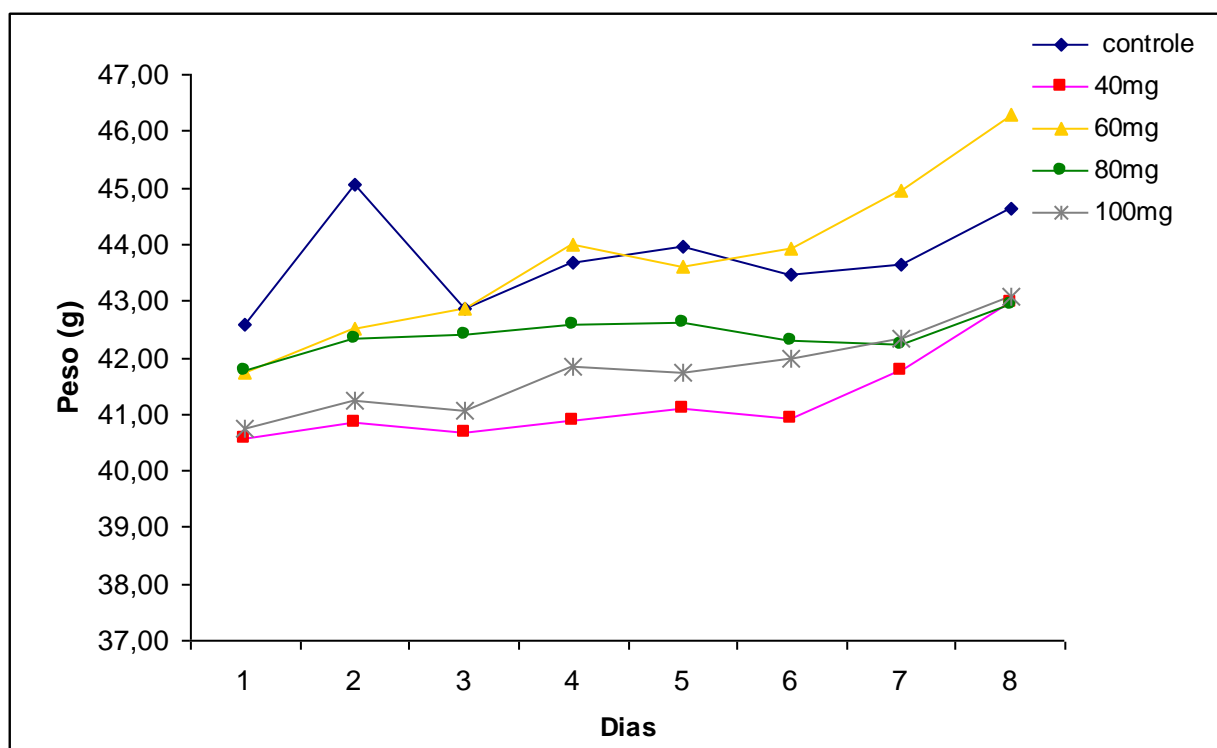
**Figura 18E** – Detalhe dos túbulos contorcidos renais com deposição de proteína em seu lúmen (seta preta). Notar intensa congestão do órgão e tumefação turva com aumento do volume celular (seta vermelha). Aumento 200X.

**Figura 18F** – Detalhe do parênquima renal, onde se pode visibilizar degeneração hidrópica dos túbulos renais (estrela), congestão renal, glomérulo atrofiado e com espessamento da cápsula de Bowman (seta preta). Aumento 200X.



**Tabela 2:** Médias e desvios padrão do peso (g) corporal de camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N- glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

Dias	Controle n=6	40 µg//Kg n=6	60 µg//Kg n=6	80 µg//Kg n=6	100 µg//Kg n=6	P
1	42,58±2,11	40,58±3,83	41,73±4,15	41,76±1,99	40,75±4,83	<b>0,8734</b>
2	45,05±5,62	40,85±4,15	42,5±4,71	42,33±2,24	41,25±4,64	<b>0,6418</b>
3	42,85±1,87	40,66±3,65	42,86±4,78	42,41±2,17	41,05±4,23	<b>0,7226</b>
4	43,66±2,37	40,88±3,45	44,00±4,96	42,58±1,64	41,83±4,42	<b>0,5538</b>
5	43,95±1,34	41,08±2,87	43,60±4,37	42,61±2,47	41,75±3,91	<b>0,4980</b>
6	43,45±1,68	40,93±2,93	43,93±4,12	42,31±1,97	42,00±3,69	<b>0,4639</b>
7	43,63±1,68	41,78±3,12	44,93±3,62	42,21±1,84	42,33±3,59	<b>0,3398</b>
8	44,65±1,47	42,96±3,63	46,30±3,81	42,93±1,81	43,06±3,12	<b>0,2232</b>

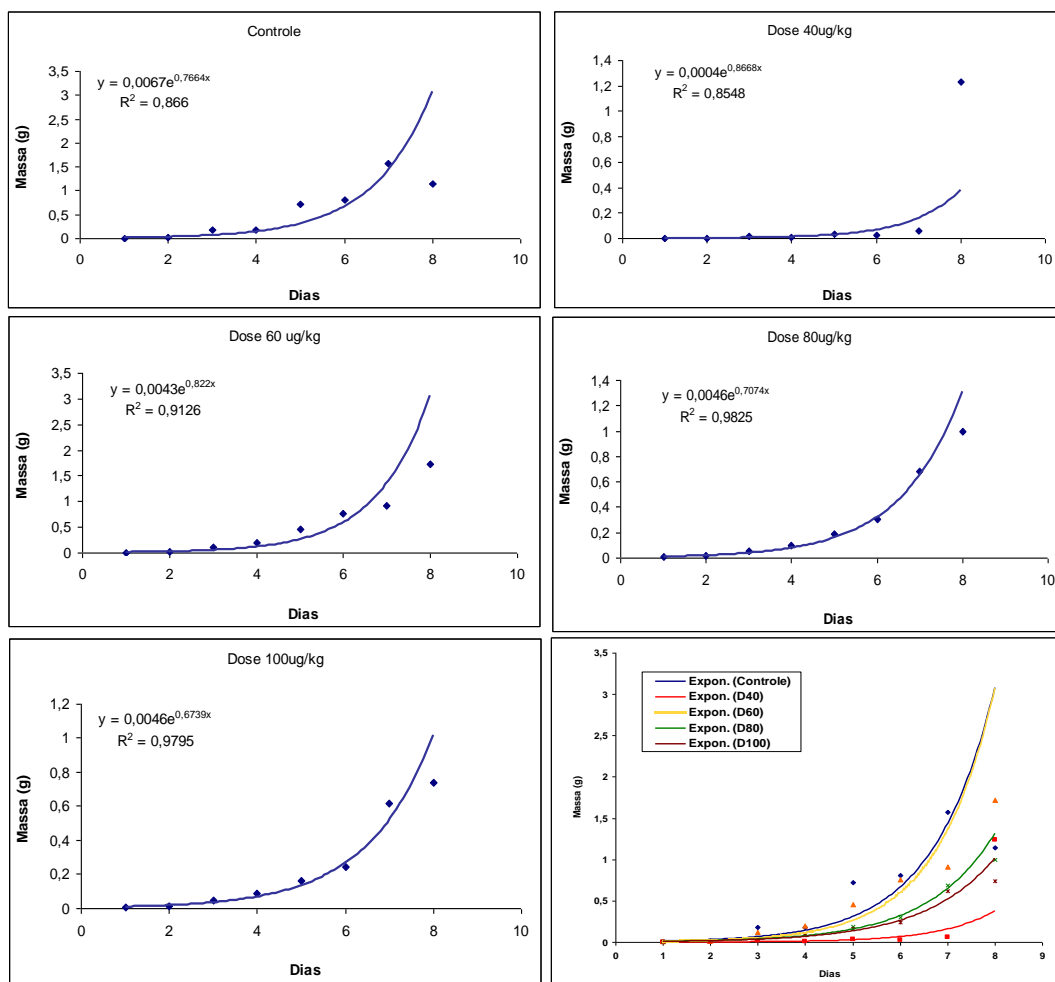


**Figura 19** – Desenvolvimento ponderal do peso (g) corporal de camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

**Tabela 3:** Médias e desvios padrão da evolução, ao longo do período experimental, da massa tumoral (mg) de camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

Dias	Controle n=6	40 ug/Kg n=6	60 ug/Kg n=6	80 ug/Kg n=6	100 ug/Kg n=6	p
1	7,84±6,35	1,01±2,35	4,35±5,39	7,12±7,3	7,94±4,95	0.0289
2	14,00±8,62a	1,03±2,34b	14,21±18,10ab	15,63±11,97a	13,18±11,38ab	0.0193
3	182,05±162,6a	16,60±36,40b	117,98±141,1ab	51,37±42,07ab	45,30±33,72ab	0.0237
4	181,15±159,1a	9,16±18,40b	196,52±164A	99,87±74,16ab	86,51±47,46ab	0.0055
5	724,76±1087a	37,63±84,07b	458,04±521,8ab	189,64±84,65ab	160,23±90,81ab	0.0205
6	811,89±1172a	26,42±49,66b	759,52±524,0A	300,93±163,4ab	240,75±232,8ab	0.0038
7	1577,6±2382a	59,24±103,2b	912,67±565,5a	685,0±400,1ab	617,52±405,4ab	0.0096
8	1145±929,8	1125±751,4	1718,3±1174	995±382,9	741,66±424,1	0.7001

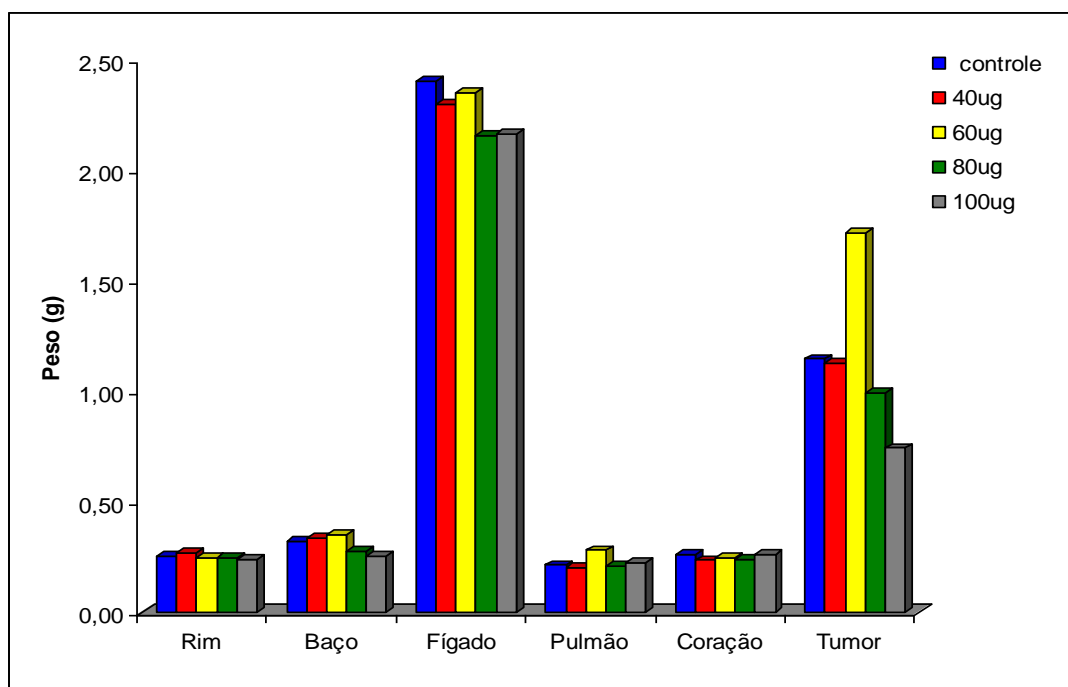
Letras diferentes na mesma linha indicam significância estatística entre grupos. (p<0,05)



**Figura 20 -** Representação gráfica da variação da evolução, ao longo do período experimental, da massa tumoral (mg) de camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

**Tabela 4:** Médias e desvios padrão do peso (g) de órgãos de camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

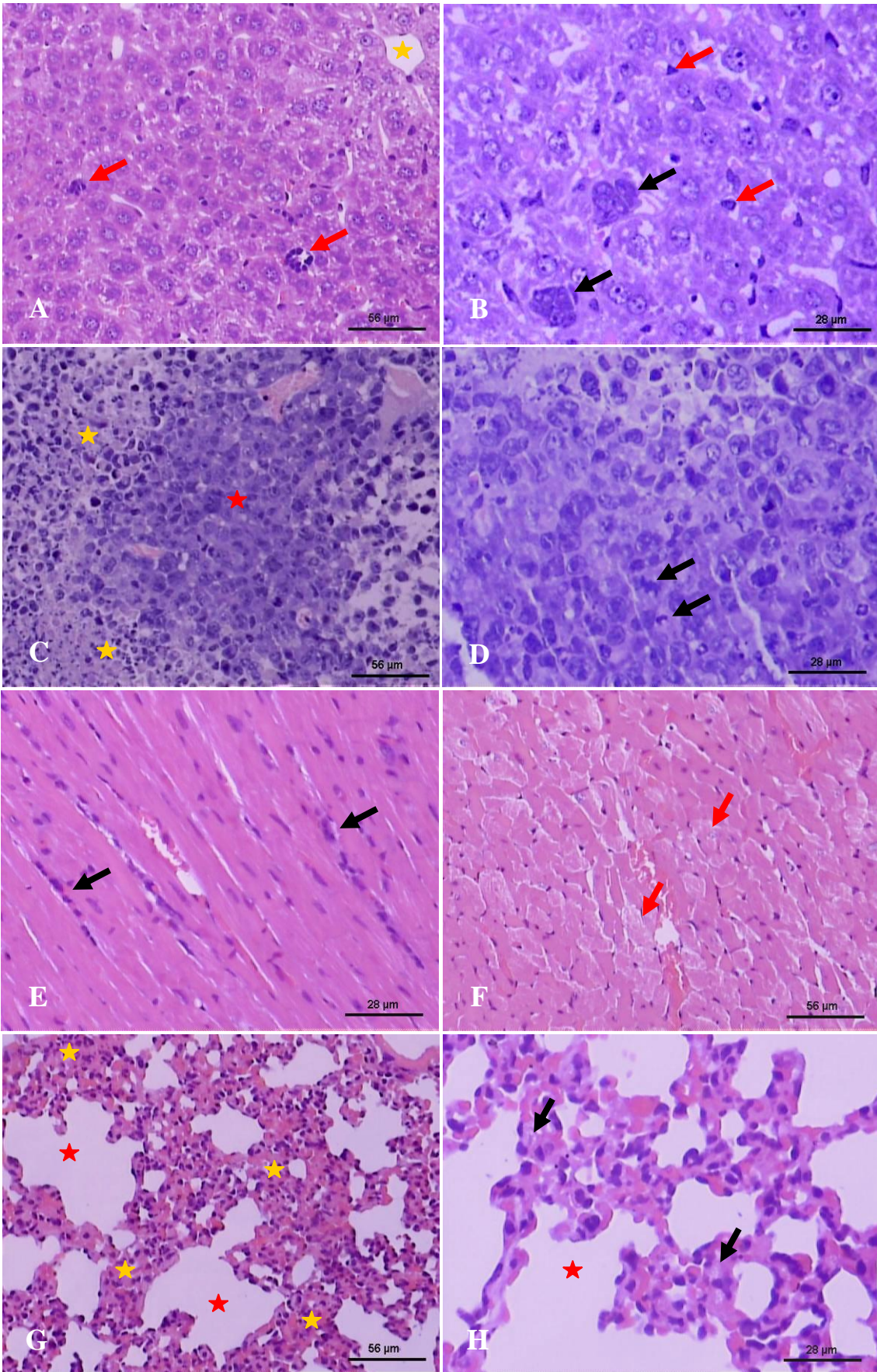
ÓRGÃOS	Controle n=6	40 ug/Kg n=6	60 ug/Kg n=6	80 ug/Kg n=6	100 ug/Kg n=6	P
<b>Fígado</b>	2,40±0,15	2,29±0,25	2,35±0,20	2,15±0,10	2,16±0,15	<b>0,0946</b>
<b>Baço</b>	0,31±0,07ab	0,331±0,03ab	0,34±0,01a	0,275±0,04ab	0,25±0,05b	<b>0,0081</b>
<b>Rim</b>	0,25±0,02	0,27±0,04	0,24±0,02	0,24±0,03	0,23±0,03	<b>0,4910</b>
<b>Pulmão</b>	0,21±0,02	0,19±0,02	0,27±0,15	0,20±0,01	0,22±0,03	<b>0,3966</b>
<b>Coração</b>	0,26±0,04	0,23±0,03	0,24±0,03	0,24±0,02	0,25±0,05	<b>0,7397</b>
<b>Tumor (8º dia)</b>	1,14±0,92	1,12±0,75	1,71±1,17	0,99±0,38	0,74±0,42	<b>0,7001</b>

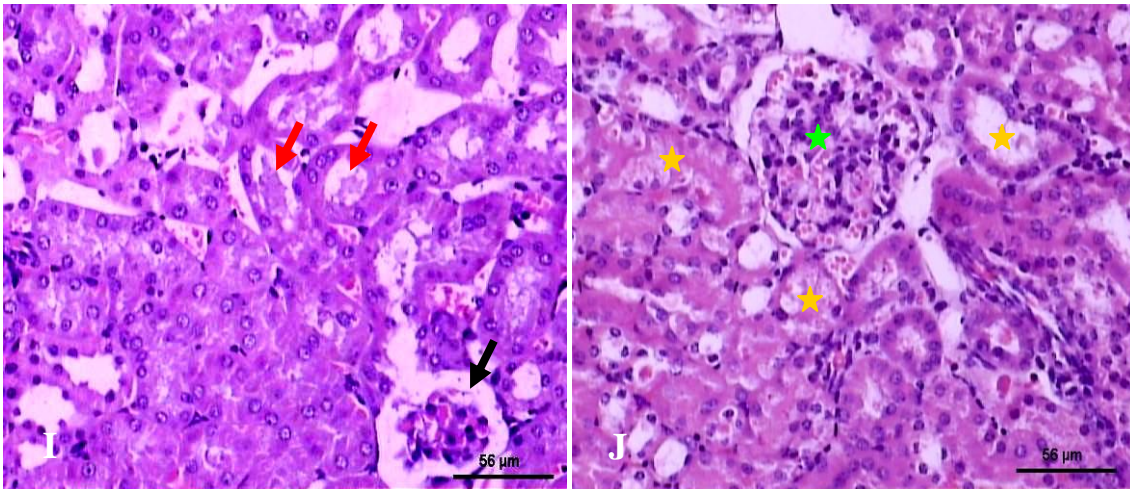


**Figura 21** – Variação do peso (g) de órgãos de camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

**Tabela 5:** Valores hematológicos de camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

<b>Parâmetros</b>	<b>Controle (n=6)</b>	<b>40 mg Kg (n=6)</b>	<b>60 mg/kg (n=6)</b>	<b>80 mg/kg (n=6)</b>	<b>100 mg/kg (n=6)</b>	<b>P</b>
<b>Hematócrito</b>	44,2 ± 2,16a	37,83 ± 2,92ab	31,60 ± 8,53b	40,60 ± 2,88ab	38,83 ± 7,25ab	<b>0,0409</b>
<b>Leucócitos</b>	9500 ± 2000	11833,3±4996,7	15200± 5794,4	13000± 4513,9	12008,3 ± 4591,1	<b>0,5729</b>
<b>Eosinófilos</b>	1,6 ± 1,14	1,16 ± 0,75	1,4 ± 1,14	1,4± 0,54	1,0 ±0,89	<b>0,8513</b>
<b>Basófilos</b>	0,0± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ±0,0	0,16 ±0,40	<b>0,4779</b>
<b>Bastonetes</b>	0,4± 0,89	0,66 ± 1,03	1,8 ± 1,48	1,4 ±2,19	1,0 ±1,26	<b>0,4821</b>
<b>Segmentados</b>	38,6± 8,26	41,66 ± 9,81	46,0 ± 10,12	40,0 ± 17,04	38,33 ± 7,89	<b>0,7476</b>
<b>Linfócitos</b>	57,0± 7,96	55,5 ± 11,64	49,4 ± 12,74	55,4 ± 20,33	58,33 ± 8,80	<b>0,8261</b>
<b>Monócitos</b>	2,4± 1,81	1,0 ± 1,095	1,4 ± 1,14	1,6 ± 1,34	1,33 ± 1,50	<b>0,6674</b>
<b>Plaquetas</b>	220000± 27386	216666,6 ± 25820	220000 ± 57009	200000 ± 70711	250000 ± 77460	<b>0,8295</b>





**Figura 22 - Fotomicrografias de tumor e órgãos vitais de camundongos Swiss dos grupos controle e tratados com a 2-N-glicina-1,4naftoquinona nas dosagens de 40, 60, 80 e 100µg/Kg, durante 8 dias.**

**Figura 22A** - Parênquima hepático, onde se pode observar microesteatose difusa e infiltrado mononuclear linfocitário (seta vermelha). Aumento de 100X.

**Figura 22B** - Detalhe do parênquima hepático. Visualizar células de Kupffer (seta vermelha), focos de metástase (seta preta) entre os hepatócitos. Aumento de 200X.

**Figuras 22 C e D** - Detalhe do tecido tumoral. Neste é possível visibilizar áreas de intensa atividade (estrela vermelha) e áreas de necrose (estrela amarela). Notar na área de tumor ativo, algumas células mitóticas (setas pretas). Aumento de 100X e 200X respectivamente.

**Figuras 22 E e F** - Parênquima cardíaco. Notar discreto infiltrado mononuclear linfocitário entre as fibras do miocárdio (seta preta) e degeneração hidrópica dos cardiomiócitos (seta vermelha). Aumento de 100X e 200X respectivamente.

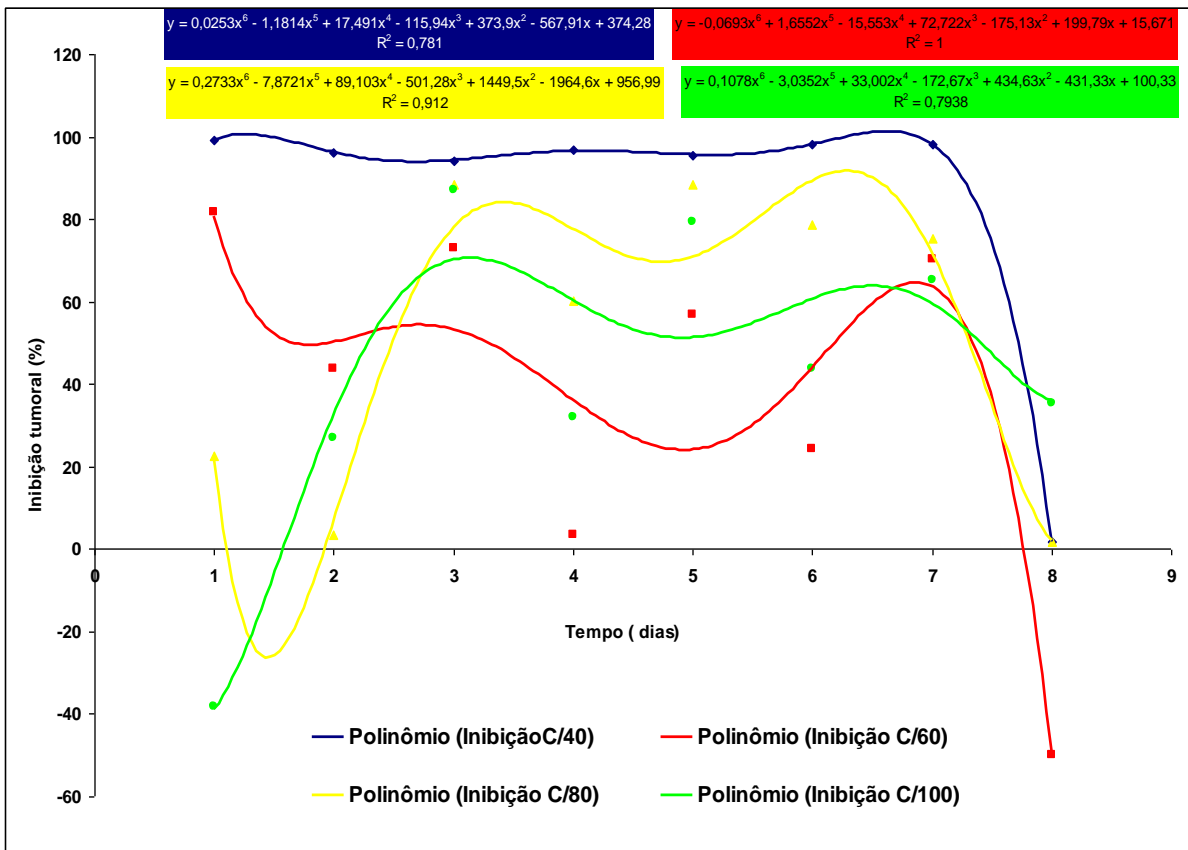
**Figuras 22 G e H** - Parênquima pulmonar, o qual pode se observar: enfisema pulmonar (estrela vermelha), pneumonia intersticial crônica (estrela amarela) e ativação de pneumócitos do tipo II (seta preta). Aumento de 100X e 200X respectivamente.

**Figuras 22 I e J** - Detalhe do parênquima renal. Neste é possível visibilizar atrofia de glomérulo (seta preta), glomerulonefrite proliferativa (estrela verde), presença de cilindros protéicos no lúmen dos túbulos contorcidos (seta vermelha) e túbulos renais com degeneração hidrópica (estrela amarela). Aumento de 100X.

**Tabela 6:** Taxa de inibição tumoral diária (%) ao longo do período de tratamento, média e desvio padrão da inibição tumoral em camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.

$p=0,0245$ . Letras diferentes na mesma linha indicam significância estatística entre grupos.

Dias	InibiçãoC/40	Inibição C/60	Inibição C/80	Inibição C/100
2	96,25	43,65	3,34	27,02
3	94,21	72,94	88,43	87,03
4	96,69	3,44	60,16	32,11
5	95,47	56,84	88,43	79,47
6	98,28	24,37	78,86	43,77
7	98,19	70,26	75,36	65,19
8	1,75	-50,07	1,75	35,23
Media± DP	<b>82,98±35,85 a</b>	<b>31,63±43,78 b</b>	<b>56,62±38,15 ab</b>	<b>52,83±24,2 ab</b>



**Figura 23:** Curvas polinomiais da taxa de inibição tumoral diária ao longo do período de tratamento em camundongos, tratados com diferentes doses de 2-N-glicina-1,4-naftoquinona durante 8 dias, após implante subcutâneo de carcinoma de Ehrlich.