

PAMELA CASTILHO DE CARVALHO

**DIARILSULFETOS ANÁLOGOS DA COMBRETASTATINA
A-4: AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA,
IMUNOMODULATÓRIA, APOPTÓTICA E PROSPECÇÃO DE
UM NOVO QUIMIOTERÁPICO**

CAMPO GRANDE

2014

PAMELA CASTILHO DE CARVALHO

**DIARILSULFETOS ANÁLOGOS DA COMBRETASTATINA
A-4: AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA,
IMUNOMODULATÓRIA, APOPTÓTICA E PROSPECÇÃO DE
UM NOVO QUIMIOTERÁPICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Andreia Conceição
Milán Brochado Antonioli Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano
Oliveira

CAMPO GRANDE

2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

PAMELA CASTILHO DE CARVALHO

DIARILSULFETOS ANÁLOGOS DA COMBRETASTATINA A-4: AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA, IMUNOMODULATÓRIA, APOPTÓTICA E PROSPECÇÃO DE UM NOVO QUIMIOTERÁPICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof^a. Dr^a. Renata Matuo
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof. Dr. Fabrício Garmus Sousa
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

Dedicatória

À Deus fonte de inspiração e sabedoria.

Aos meus pais, Romilda e Manoel,
que me proporcionaram anos de estudos para
meu desenvolvimento profissional. Agradeço

a presença em todos os momentos, a
esperança dos seus sorrisos. O brilho dos
seus olhares me fizeram tão grande quanto
o amor de vocês por mim. Se eu pudesse
lhes fazer eternos...eternos eu lhes
faria!

A vocês que sempre compartilharam meus
sonhos e desalentos, vitórias e derrotas,
alegrias e tristezas, incentivando-me a
prosseguir a jornada, fossem quais fossem
os obstáculos, mantiveram-se ao meu lado,
lutando pelo meu sucesso.

Meu muito obrigada.

A mais profunda admiração e gratidão!

Às minhas irmãs Mitsu e Camila,
Pela paciência com a irmã “chata e
estressada” . Pelo amor, companheirismo e
apoio, mesmo de longe.

Aos meus sobrinhos Ana Luisa e João Lucas,
Amo vocês.

Agradecimentos

A Deus,

De ti Senhor recebi o dom mais precioso: a vida.

As minhas irmãs Camila e Mitsu,

Pela companhia, pela força, pelas orações que com certeza fizeram a diferença, pelas piadas nas horas mais inoportunas, amo vocês.

A minha família,

Sem vocês nada seria, deixo aqui meus agradecimentos, por tanto carinho recebido, amo todos vocês.

A minha amiga Beatriz,

Se aqui pudesse expressar o vigor desta amizade! Só Deus é testemunha do quanto meu coração guarda de carinho, de afeição, de respeito por esta grande amizade. Querida amiga, palavras são poucas para expressar minha eterna gratidão e amizade. Amo você.

As meninas do laboratório, Mayra, Nath e Steph, obrigada por tudo, vocês sabem o quanto foram importantes nessa etapa da minha vida, obrigada pelas risadas até a barriga doer.

Ao Edson dos Anjos dos Santos, pelo esforço e pela grande contribuição no trabalho.

A Professora Andréia Conceição Brochado Antonioli, minha orientadora, pelo carinho, atenção e cuidado, serei eternamente grata.

Ao Professor Rodrigo Juliano Oliveira, meu co-orientador, obrigada pela paciência, compreensão, amizade e pelo esforço dedicado à concretização deste trabalho. Muito obrigada também pela confiança depositada em mim e por acreditar no meu potencial.

Aos animais utilizados para a realização deste experimento, muito obrigada.

A CAPES e a FUNDECT, pelo auxílio financeiro concedido.

“Antes do egoísmo, do orgulho e da ambição, lembra-te de que és pó....”
Desconhecido

RESUMO

CARVALHO, Pamela Castilho de. Diarilsulfetos análogos da combrestatatina A-4: avaliação toxicogenética, imunomodulatória e apoptótica. Dissertação (Mestrado Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

Resumo

A combretastatina A-4 possui eficiente potencial anticancerígeno em tumores humanos e inclusive naqueles resistentes a multidrogas. Esse fato estimulou a pesquisa com dois diarilsulfetos análogos. Foram utilizados 70 camundongos machos Swiss, divididos em 14 grupos: controle negativo, ciclofosfamida (100mg/Kg), análogo 1 e 2 nas doses de 5, 7,5 e 10,0 mg/Kg e associações desses com a ciclofosfamida. Os resultados permitiram inferir que ambos são genotóxicos, mutagênicos e apoptóticos. O análogo 1 tem uma tendência de aumentar a fagocitose esplênica enquanto o 2 a aumenta significativamente. Quando associado à ciclofosfamida o análogo 1 potencializa os efeitos mutagênicos e apoptóticos desse quimioterápico e o análogo 2 não potencializa os efeitos da ciclofosfamida e ainda impede a ocorrência de apoptose, na menor dose. Assim, propõe-se que o análogo 1 pode funcionar como adjuvante quimioterápico e, possivelmente, melhorar o efeito antineoplásico desse medicamento. O que, por sua vez, sugere a sua inclusão deste composto em processos de prospecção de um novo quimioterápico e/ou para a produção de um adjuvante para uso em terapias antineoplásicas combinadas.

Palavras chave: Diarilsulfetos; combrestatatina A-4; toxicogenética; imunomodulação; apoptose.

ABSTRACT

CARVALHO, Pamela Castilho de. Diaryl sulfide combrestatatin A-4 analogs: Toxicogenetics evaluation, immunomodulatory, apoptotic and exploration of a new chemotherapeutic Dissertation (Mestrado Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

Abstract

Combretastatin A-4 (CA-4) is an effective anticancer compound that is also able to overcome multidrug resistance, which have been promoting the development and research of CA-4 analogues. In this work, we determined the genotoxic, apoptotic and immunomodulatory activities of two CA-4 analogues based on diaryl-sulfide in male Swiss mice. In addition, we also evaluated their activities when combined with cyclophosphamide, a DNA damaging agent commonly used in cancer therapy. The results showed that both compounds were able to induce DNA damage and apoptosis, but the analogue number 1 has a modest immunomodulatory activity, while the analogue number 2 increased splenic phagocytosis considerably. Furthermore, the analogue number 1 association with cyclophosphamide led a strong increase in both DNA damage and apoptosis, while the analogue number 2 combination with cyclophosphamide was slightly antagonist. These diverse activities indicate that, despite their structural similarity, the CA-4 analogues studied here can affect different molecular processes. In turn, this peculiarity suggests that distinct therapeutic applications can be prospect for these compounds.

Keywords: Diaryl-sulfide; Combretastatin A-4; DNA damage; apoptosis; immunomodulatory activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais e dosagem dos compostos	33
Tabela 2. Média dos pesos inicial e final, e ganho de peso dos animais no período experimental.....	55
Tabela 3. Valores médios \pm erro padrão da média do peso relativo dos órgãos dos animais após o período de experimentação	55
Tabela 4. Valores médios \pm erro padrão da média da freqüência de células lesionadas, distribuição entre as classes de danos e escore referentes aos testes de (anti)genotoxicidade dos diarilsulfetos 1 e 2 no ensaio do cometa em sangue periférico de camundongos.	56
Tabela 5. Freqüência total e valores médios \pm erro padrão da média referentes ao ensaio de micronúcleo em sangue periférico de camundongos:.....	57
Tabela 6. Número total, freqüência média \pm erro padrão da média (EPM) e porcentagem de células com evidência de fagocitose esplênica em camundongos:.....	58
Tabela 7. Avaliação da apoptose em fígado, rins e baço de camundongos: ..	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Estrutura da CA-4; (B) estrutura dos diarilsulfetos 1, 2 e 3.....	31
Figura 2. Média do ganho de peso durante o período experimental. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	36
Figura 3. Média do número de células com danos no DNA. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	37
Figura 4. Média da frequência de células micronucleadas. Série 1 24h, série 2 48h, série 3 72h. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	38
Figura 6. Média do número de células apoptóticas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	40
Figura 7. Média do ganho de pesos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	41
Figura 8. Células com danos no DNA. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	42
Figura 9. Média do número de células micronucleadas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	43
Figura 10. Média do número de células com evidência de fagocitose. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	43
Figura 11. Média do número de células apoptóticas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.	44

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1 Considerações iniciais	12
1.1.1 Câncer.....	12
1.1.2 Quimioterapia.....	14
1.1.3 Relação entre as tubulinas e o câncer	15
1.1.4. Combretastatina A4	17
1.2 Ensaio Biológicos.....	18
1.2.1 Ensaio do cometa	18
1.2.2 Ensaio do micronúcleo em sangue periférico.....	20
1.2.3 Ensaio de Fagocitose Esplênica	21
1.2.4 Ensaio de apoptose	22
1.3 Referencias.....	23
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. Manuscrito.....	29
4. Anexos	55

1. Introdução

1.1 Considerações iniciais

1.1.1 Câncer

Constantemente o homem estabelece contato com um alto número de agentes exógenos, químicos, físicos e biológicos os quais podem interagir de diversas formas com o organismo humano e, por conseguinte, atuar de maneira benéfica, neutra ou prejudicial.

Problemas de saúde assim como suas soluções, decorrentes das interações com os agentes supracitados, despertam o interesse do meio científico para produtos com ação imunomodulatória, antimutagênica, anticarcinogênica e também quimioterápicos. O conhecimento de tais produtos pode ser útil tanto como medida preventiva, como no tratamento de várias doenças que acometem os homens, dentre eles o câncer.

No Brasil, as estimativas, para o ano de 2014 segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), apontavam para a ocorrência de 576.580 novos casos (INCA, 2014). Diferentemente das doenças agudas, as doenças crônicas têm origens multifatoriais, e são cada vez mais agravadas com o desenvolvimento das sociedades, onde se observa a crescente poluição ambiental, o aumento dos níveis de estresse, o sedentarismo e os hábitos alimentares inadequados (FERGUSON, 1994). Para o desenvolvimento do câncer há diferenças individuais quanto aos riscos que são provenientes entre outros fatores, da capacidade genética do indivíduo em ativar ou detoxificar os carcinógenos. Dessa forma, o risco aumentado ao desenvolvimento de tumores e os alelos específicos de genes responsáveis pela metabolização de compostos químicos são decorrentes da existência de múltiplas etapas enzimáticas do metabolismo que irão ativar ou detoxificar os xenobióticos (VARELLA, 2005).

O processo da carcinogênese se divide em 4 etapas: iniciação, promoção,

progressão e manifestação (PITOT, 1989).

As duas primeiras ocorrem durante o intervalo entre a exposição ao cancerígeno e o aparecimento de lesões consideradas (pré) neoplásicas. A iniciação constitui o primeiro passo para o desenvolvimento neoplásico e corresponde à interação do agente químico com o DNA da célula alvo. Ela pode ser provocada por ação direta do cancerígeno ou pode ser dependente da ativação deste, com formação de metabólitos ativos que interagem com o DNA, levando à sua mutação (MILLER & MILLER, 1981; CLAYSON, 1985; PARKE, 1987). É um processo irreversível, com alteração permanente da estrutura do DNA, através de ligações covalentes, distorção ou clivagem da molécula. A eficiência da iniciação depende da replicação do DNA e divisões celulares subsequentes, que “fixam” a alteração do genoma (KAUFMANN & KAUFMAN, 1993; MILLER & MILLER, 1981; PITOT, 1993).

Experimentalmente, a etapa de promoção é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões tumorais benignas ou de focos de células fenotipicamente alteradas. Em geral, os agentes promotores não reagem diretamente com o material genético da célula, mas afetam sua expressão por diferentes mecanismos. Por exemplo, interagem com receptores da membrana celular, com receptores de fatores de crescimento, com proteínas nucleares indutoras de mitoses ou com proteínas de membrana reguladoras de canais de íons. Desta forma, os agentes promotores estimulam a proliferação celular e modulam sua diferenciação, resultando na expansão clonal das células iniciadas e na expressão fenotípica da alteração do genoma (KAUFMANN & KAUFMAN, 1993; PITOT, 1993).

A etapa de progressão é caracterizada pela instabilidade genômica das células neoplásicas. As alterações estruturais do genoma, tais como aneuploidia, verificadas nesta fase, são diretamente relacionadas à invasividade, à capacidade metastática e as alterações bioquímicas características das células malignas. Esta etapa, dada às características celulares, fornece o substrato biológico para a manifestação clínica do câncer (PITOT, 1993).

Estas etapas se procedem do seguinte modo: a iniciação dá-se por uma interação entre o agente cancerígeno e o DNA, que leva após a um ciclo

de divisão celular, ao dano (MURAD, 1996), passada esta etapa a promoção ocorre expressando fenotipicamente a mutação anteriormente induzida, estimulando a proliferação celular (PITOT & DRAGAN, 1991; PITOT, 1993; WARGOVICH & PUREWAL, 1995). Já na progressão há a manifestação histológica, o que revela a instabilidade do genoma. Estas alterações estão intimamente ligadas à última etapa, a manifestação, visto que há uma intensa proliferação celular, invasividade e variadas alterações bioquímicas (PITOT, 1989).

Etiologicamente o aparecimento de cânceres se dá por inúmeros fatores, destacando-se atualmente a dieta, o meio ambiente e fatores genéticos (McBAIN & MACFARLANE *et al.*, 2001).

Diante deste fato, muitos testes têm sido desenvolvidos para aumentar o conhecimento sobre os efeitos desses parâmetros sobre a qualidade de vida das populações e em especial sobre o seu impacto no material genético e a correlação com doenças (REIFFERSCHIED & HEIL, 1996).

1.1.2 Quimioterapia

Segundo o INCA (2014), o tratamento do câncer pode ser feito através da remoção cirúrgica do tumor, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea para cânceres hematopoiéticos. Na maioria das vezes é necessário combinar mais de um tipo de tratamento.

A terapia antineoplásica ou antitumoral consiste na utilização de agentes químicos para o combate do câncer (INCA, 2012). É uma forma de tratamento sistêmico da doença e que pode ser utilizada com objetivos curativos ou paliativos, de acordo com o tipo de tumor, da extensão da doença e condição física do paciente. Outra modalidade dessa terapêutica é a quimioterapia neo-adjuvante, realizada antes da cirurgia com o objetivo de avaliar a resposta ao quimioterápico e a eventual redução do tumor. Caso o resultado seja positivo, as cirurgias podem ser feitas de forma menos agressiva, a fim de causar menos danos ao paciente. E quando utilizada após a cirurgia, pode promover a erradicação

de micrometástases, chamada de quimioterapia adjuvante (BONASSA, 2005).

Novos fármacos quimioterápicos antineoplásicos revolucionaram o tratamento do câncer e as práticas clínicas (GOODMAN e GILMAN, 2006). Grande parte das drogas utilizadas na quimioterapia convencional interferem direta ou indiretamente no ciclo celular, impedindo a replicação de DNA e provocando o controle/desaparecimento do tumor (REIS et al., 2006). Porém, há a necessidade da busca de novos fármacos que atuem melhorando a qualidade de vida do paciente, potencializando o tratamento e reduzindo os efeitos adversos.

O tratamento do câncer obteve importantes avanços nas últimas décadas, com a descoberta de novas drogas e a combinação dos diferentes recursos terapêuticos disponíveis. A preocupação com a qualidade de vida dos pacientes levou ao desenvolvimento de medicamentos com elevado potencial para combater os efeitos colaterais da quimioterapia (BONASSA, 2005). A farmacogenética e farmacogenômica possuem condições de selecionar os melhores medicamentos para grupos específicos de pacientes, resultando em melhores prognósticos (TELLO, 2006).

Estudos feitos por Cornacchioni et al. (2004) também revelaram que houve melhorias nos fatores de avaliação de prognósticos, como a imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular, possibilitando uma estratificação dos pacientes em grupos de recaída, visando então a melhoria e adoção de novas condutas terapêuticas específicas para cada grupo em tratamento.

1.1.3 Relação entre as tubulinas e o câncer

Os microtúbulos são importantes alvos quimioterapêuticos devido a sua relação com a replicação celular. A inibição da formação de microtúbulos leva a interrupção da divisão mitótica celular e pode promover o rompimento vascular (PILAT e LORUSSO, 2006). A tubulina é uma

proteína crucial na divisão celular. O ciclo celular envolve a replicação do DNA e o “empacotamento” dos cromossomos replicados, resultando em duas células filhas. A separação dos cromossomos filhos na mitose ocorre através dos microtúbulos. A função de polimerização e despolimerização normal da tubulina é fundamental para a divisão celular, e, qualquer interferência neste processo romperá a divisão e causará a morte celular por apoptose (KINGSTON, 2009).

A angiogênese tumoral, processo de crescimento de novos vasos sanguíneos, essencial para o crescimento dos tumores e o espalhamento metastático, é um alvo muito promissor para o planejamento de novos agentes anticâncer (SEBAHAR *et al.*, 2009). Pesquisas no campo dos agentes antivasculares são realizadas em busca de compostos capazes de inibir os processos de polimerização e despolimerização da tubulina (O’BOYLE *et al.*, 2011).

Dessa forma, existem duas estratégias promissoras no estudo de agentes anticancerígenos: os VTA’s (do inglês *Vascular Targeting Agent*) que são agentes que impedem a formação de novos vasos sanguíneos sem, no entanto, afetar os vasos consolidados, que já alimentam tumores existentes; e os VDA’s (do inglês *Vascular Disrupting Agents*), agentes que interrompem a vascularização tumoral já consolidada, causando a obstrução ou destruição seletiva de vasos sanguíneos preexistentes que permeiam os tumores, interrompendo o fluxo de oxigênio e nutrientes (LIPPERT, 2007; PILAT e LORUSSO, 2006). Em geral, a principal função destes compostos é a mesma, perturbar ou inibir a vascularização sanguínea existente ou formada em torno do tumor através da destruição dos vasos sanguíneos que suportam a viabilidade das metástases, o crescimento da replicação e o potencial tumoral (SEBAHAR *et al.*, 2009).

Os VTA’s fazem parte dos tratamentos quimioterápicos mais aceitos e representam um largo grupo de estruturas. Isto é em parte devido ao fato de ser uma classe já estabelecida como agente anticâncer, assim como, pelos inúmeros alvos biológicos que podem afetar uma resposta (SEBAHAR *et al.*, 2009). Dentre os VTA’s mais conhecidos estão os fármacos taxol® (paclitaxel), ixempra® (ixabepilona), gleevec® (mesilato

de imatinibe), tarceva® (cloridrato de erlotinibe) entre outros (SEBAHAR *et al.*, 2009)

Os VDA's representam uma classe muito menos estabelecida de fármacos anticancer, porém são promissores devido aos seus efeitos antivasculares. Os VDA's causam a obstrução ou destroem seletivamente os vasos sanguíneos preexistentes que permeiam os tumores, causando a interrupção do fluxo de oxigênio e nutrientes (LIPPERT, 2007; PILAT e LORUSSO, 2006). Dentre os VDA's, os que vêm se destacando mais acentuadamente são os análogos da combretastatina A4 (CA-4), quais sejam: CA-4P, AVE8062A e CA-1P (ANDRALOJC *et al.*, 1996; HORI e SAITO, 2003; MANDEVILLE *et al.*, 2007).

1.1.4. Combretastatina A4

O produto natural combretastatina A-4 foi isolado da casca da árvore africana *Combretum caffrum* (Combretaceae). É um composto de baixa massa molar e estrutura simples, um dos mais poderosos inibidores da polimerização da tubulina, que se liga avidamente ao mesmo sítio de ligação da colchicina na tubulina (LIN *et al.*, 1988; PETTIT *et al.*, 1989; PETTIT *et al.*, 1995).

Essas substâncias induzem mudanças morfológicas no citoesqueleto das células endoteliais, ou seja, elas se ligam à tubulina polimerizada desestruturando o microtúbulo impedindo-o de polimerizar novamente. Esse fato resulta na retração celular de vasos sanguíneos, ocasionando o desligamento de permeabilidade vascular, levando ao aumento da pressão intersticial, acarretando o bloqueio físico dos capilares e conseqüentemente a morte do tumor, devido à falta de vascularização (GRIGGS *et al.*, 2001).

A estrutura da CA-4 é formada por dois anéis aromáticos, ligados por uma dupla ligação em configuração cis na posição C-5 do anel A. A manutenção do anel A é imprescindível para manutenção da atividade e somente o anel B é tolerante a modificações estruturais, principalmente na posição C-3' (LI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.* 2007).

As combretastatinas A-4P, A-1P e a AVE8062A são pró-fármacos mais solúveis em água e já se encontram em fase de estudos clínicos para o tratamento de câncer (YOUNG e CHAPLIN, 2004). A CA-4P (DORR *et al.*, 1996), também conhecida como fosbretabulina ou zibrestatinTM está em fase II de testes clínicos sobre câncer de pulmão e glioma (tipo de câncer cerebral) e fase III para câncer da tireóide (DUMONTET e JORDAN, 2010; OXIGENE INC., 2011), o derivado CA-1P (KIRWAN *et al.*, 2004) conhecido também como oxi4503 está em fase I de testes para tumores hepáticos (OXIGENE INC., 2011) e a AVE8062A derivada do análogo aminado CA-4NH₂ (OHSUMI *et al.*, 1998) está em ensaios de fase III para tumores do tipo sarcoma, tipo de câncer que afeta o osso, cartilagem, gordura, músculo, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo ou de suporte (DUMONTET e JORDAN, 2010).

1.2 Ensaios Biológicos

1.2.1 Ensaio do cometa

Os agentes genotóxicos são aqueles passíveis de causar danos no DNA (SAVVA, 2000) e o ensaio de cometa é uma adequada metodologia para avaliação desses danos.

O teste do cometa evidencia a corrida de fragmentos de DNA, em relação ao nucleóide principal, quando este é submetido a uma corrente eletroforética, produzindo padrões semelhantes a cometas. Foi utilizado primeiramente por Rydemberg & Johanson em 1978. Em 1984, Östling & Johanson incluíram no teste a eletroforese em pH semineutro (pH 9,5), ocasionando um aumento da sensibilidade do teste (TICE, 1995).

A eletroforese em pH alcalino (pH > 13) foi introduzida por Singh *et al.* (1988) transformando o ensaio do cometa em uma técnica de grande importância na detecção de quebras no DNA e de danos em sítios alcalilábies, *in vivo* e *in vitro*. A técnica é descrita como um método rápido,

simples e sensível, usado para quantificar danos genéticos em um pequeno número de células. A técnica é importante na detecção de diferenças intercelulares, quanto aos danos ao DNA e no reparo, em praticamente qualquer célula eucariótica onde seja possível obter uma suspensão celular, mesmo com uma amostragem bastante pequena. Os resultados podem ser obtidos em um único dia e o custo para a realização da técnica é relativamente baixo. A sensibilidade do ensaio cometa em detectar danos em células individuais, é comparável a outros métodos que avaliam danos em uma população de células (OLIVE et al., 1992; FAIRBAIRN et al., 1995; RIBAS, 1995; ROSS et al., 1995; TICE, 1995; KLAUDE et al., 1996; ANDERSON et al., 1998; TICE et al., 2000; FRIEAUFF et al., 2001).

O ensaio do cometa também é empregado na avaliação de danos no DNA, promovidos por agentes físicos e químicos. Essa técnica também é eficiente no monitoramento ambiental e até mesmo na área clínica (ANDERSON & PLEWA, 1998).

O ensaio é desenvolvido por meio da deposição de células em agarose, sobre uma lâmina de vidro para microscopia, segue-se a lise, desnaturação do DNA e eletroforese em pH alcalino ($\text{pH} > 13$). Posteriormente, as lâminas são neutralizadas, fixadas e coradas com um agente intercalante para posterior análise dos cometas a partir do DNA fragmentado em microscopia de fluorescência. Apesar de o teste ser de grande aplicação, as técnicas de isolamento celular e as condições do experimento sofrem variações, onde muitas variáveis técnicas podem afetar a sensibilidade do teste, tais como a natureza química e o mecanismo de ação do agente mutagênico, a concentração e quantidade de agarose de baixo ponto de fusão, composição da solução de lise, tempo de lise, tempo de desnaturação alcalina do DNA, composição e temperatura do tampão de eletroforese, as condições de corrida, a coloração do DNA entre outros (OLIVE et al., 1992; SPEIT e HARTMANN, 1999).

Os cometas gerados pela técnica podem ser analisados visualmente (KOBAYASHI, 1995), utilizando-se coloração com um agente intercalante fluorescente, o Brometo de Etídio, e um microscópio de fluorescência.

São classificados em: classe 0_– nucleóides sem danos e que não apresentam cauda; classe 1_– nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; classe 2 – nucleóides com cauda de tamanho ente 1 a 2 vezes o diâmetro do nucleóide; classe 3_– nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide. Nucleóides de células apoptóticas, que se apresentam totalmente fragmentados geralmente não são contabilizados (SPEIT et al., 1996).

1.2.2 Ensaio do micronúcleo em sangue periférico

Micronúcleos são frequentemente usados para quantificar a exposição a agentes químicos ou físicos (TUCKER e PRESTON, 1996). Esse ensaio de grande importância é sugerido por agências de pesquisa da área de genética toxicológica para avaliação da capacidade cancerígena de um composto (KRISHNA e HAYASHI, 2000). Os ensaios preconizam a utilização de células do sistema hematopoiético *in vivo*. Para humanos, o mais comum é o uso de linfócitos periféricos e em modelos experimentais destaca-se o uso de eritrócitos.

Sugere-se que os micronúcleos sejam avaliados em hemácias jovens, pois quando os eritroblastos expõem seus núcleos e se transformam em eritrócitos, os micronúcleos permanecem no citoplasma, sendo facilmente identificados devido à sua morfologia arredondada e coloração características (SCHMID, 1975). Entretanto, Hayashi et al. (1990) descreveram a técnica de micronúcleo em sangue periférico utilizando a coloração com Laranja de Acridina, um corante que ao se intercalar com moléculas de DNA e ao sofrer exposição à radiação ultravioleta emite uma fluorescência de cor amarela. Porém, quando o mesmo se liga ao RNA, sem a capacidade de se intercalar, a fluorescência emitida é vermelha. Essas propriedades permitem a identificação dos reticulócitos, eritrócitos jovens ricos em RNA em nível citoplasmático, que se coram em vermelho pela presença desse ácido nucléico. Já os micronúcleos que possuem DNA em sua constituição coram-se em amarelo e podem ser localizados no meio ou nas bordas das regiões coradas em vermelho.

Estudos comparativos entre a técnica convencional, em medula óssea, corada por Giemsa, e a técnica que utiliza pré-coloração com Laranja de Acridina demonstram uma boa correlação (KISHI et al., 1992), reforçando o fato que todas as técnicas mostram-se adequadas para este tipo de avaliação. Porém, a técnica de sangue periférico apresenta uma vantagem: um mesmo animal poder fornecer várias amostras de material, sem a necessidade de eutanásia do mesmo (CSGMT, 1992). Isso permite avaliar o perfil da frequência de micronúcleos em um mesmo animal ao longo de um tratamento agudo, subcrônico e crônico. Além disso, possibilita o estudo da recuperação deste mesmo indivíduo, após a suspensão das administrações das drogas-teste (OLIVEIRA, 2009).

1.2.3 Ensaio de Fagocitose Esplênica

O baço é um órgão linforeticlar, dividido em pequenos compartimentos por trabéculas de tecido conjuntivo que partem de sua cápsula. A região medular do parênquima apresenta três áreas: polpa vermelha, polpa branca e zona marginal. A polpa vermelha é formada pelos sinusóides ou seios esplênicos entre os quais se situam os cordões de Billroth, formando os plexos sanguíneos. Nessa região as células predominantes são os macrófagos, as hemácias e as plaquetas. A polpa branca é formada por nódulos linfáticos e as bainhas em torno das arteríolas apresentam-se como zonas branco-acinzentadas difusas na polpa vermelha. Nela são encontrados principalmente linfócitos. Já a zona marginal situa-se na periferia da zona branca e contém as artérias marginais (GROOM, SCHMIDT e MACDONALD, 1991).

O baço é responsável pela remoção de elementos indesejáveis do sangue por fagocitose. Assim, cerca de 1,2% de todas as hemácias do organismo são removidas diariamente pelos fagócitos, sendo 50% dessa remoção feita pelo baço. É também considerado um dos principais órgãos do sistema imunológico, visto que células esplênicas capturam antígenos e os apresentam aos linfócitos T e B, que interagem estimulando a geração de plasmócitos secretores de anticorpos. Esse órgão também é

uma fonte de células hematopoiéticas, especialmente em casos de anemia grave; além de ser responsável pelo seqüestro de elementos do sangue, em humanos, o baço contém de 30 a 40% das plaquetas do corpo. Em caso de esplenomegalia, de 80 a 90% da massa total de plaquetas pode estar isolada nos interstícios da polpa vermelha do baço, produzindo um quadro de plaquetopenia. Da mesma forma o baço pode seqüestrar leucócitos produzindo leucopenia (MEBIUS e KRAAL, 2005). Conclui-se que o baço é um importante órgão envolvido nos processos de imunomodulação. Por isso, a presente pesquisa valeu-se da técnica de fagocitose esplênica (HAYASHI et al. 1990) para caracterizar os efeitos imunomodulatórios dos compostos em teste.

1.2.4 Ensaio de apoptose

O processo natural de morte celular foi primeiramente descrito morfológicamente por Walther Flemming em 1885. Batizado de apoptose por Kerr, em 1972, para descrever a morfologia única associada à morte celular, que a difere de necrose (RAFF, 1992) Esse evento é caracterizado pela clivagem da cromatina e colapso nuclear, pela condensação do citoplasma e pelas mudanças na membrana plasmática e ausência de inflamação (RAFF, 1992).

A apoptose é o evento de morte celular programada, mediado por caspases, necessário à manutenção do número de células em organismos multicelulares. Caspases são enzimas que clivam proteínas, são divididas em iniciadoras e efetoras. As iniciadoras, como por exemplo, caspase-8 e caspase-9, clivam pró-formas inativas de caspases efetoras, ativando-as. Já as efetoras, caspase-3 e caspase-7, por exemplo, clivam outros substratos protéicos da célula, resultando em apoptose e todo este processo que acontece em forma de cascata é regulada por inibidores de caspases (AMARANTE-MENDES, 1999).

A utilização de métodos confiáveis e reprodutíveis para identificar e quantificar a apoptose é uma condição essencial na diferenciação da apoptose em grupos sinalizados (MAURO, 2011). A técnica de Rovozzo

(1973), adaptada por Mauro et al. (2011), foi novamente readaptada para utilização em experimentos *in vivo* a fim de identificar células apoptóticas por meio de análise do padrão de fragmentação do DNA nuclear, a partir de coloração com Alaranjado de Acridina.

1.3 Referencias

ANDERSON, D.; PLEWA, M. J. The international comet assay workshop. **Mutagenesis**, v. 13, p. 67-73, 1998.

ANDERSON, D.; YU, T. W.; MC-GREGOR, D. B. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. **Mutagenesis**, v. 13, p. 539-555, 1998.

ANDRALOJC, P. J.; RYAN, J. E.; PARRY, M. A. J.; KEYS, A. J. **Biochemical Journal**. v.316, p.389, 1996.

CLAYSON, D.B. Dose relationships in experimental carcinogenesis; dependence on multiple factors including biotransformation. **Toxicol. Pathol.**, 13: 119-27, 1985.

CSGMT, Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. **Mutation Res.**, v. 278, p. 83-98, 1992.

CORNACCHIONI, A.L.B.; CRISTOFANI, L.M.; ALMEIDA, M.T.A.; MALUF JR, P.T.; FILHO, V.O. Recidivas extramedulares em Leucemia Linfocítica Aguda: Impacto da quimioterapia e definição de um grupo particularmente favorável. **Pediat**, v. 26(1), p. 27-33, 2004.

DORR, R. T.; DVORAKOVA, K.; SNEAD, K.; ALBERTS, D. S.; SALMON, S. E.; PETTIT, G. R. **Investigational New Drugs**. v.14, p.131, 1996.

DUMONTET, C.; JORDAN, M. A. **Nature Reviews Drug Discovery**. v.9, p.790, 2010.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, v. 339, p. 37-59, 1995.

FRIEAUFF, W.; HARTMANN, A.; SUTER, W. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. **Mutagenesis**, v. 16, n. 2, p. 133-137, 2001.

GOODMAN E GILMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica;. 12. ed. Rio de Janeiro: **McGraw-Hill Interamericana do Brasil**; 2012.

GRIGGS, J.; METCALFE, J. C.; HESKETH, R. **The Lancet Oncology**. v.2, p.82, 2001.

GROOM, A.C.; SCHMIDT, E.E.; MacDONALD, I.C. Microcirculatory pathways and blood flow in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy. **Scan Microsc.**, v. 5, p. 159-174, 1991.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE JUNIOR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutat. Res**, v. 245, p. 245-249, 1990.

HORI, K.; SAITO, S. **British Journal of Cancer**. v.89, p.1334, 2003.

INCA – Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Tratamento [Internet]. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2014. Em: <http://www.inca.gov.br>.

KAUFMANN, W.K. & KAUFMAN, D.G. Cell cycle control, DNA repair and initiation of carcinogenesis. **FASEB J.**, 7: 1188-91, 1993.

KINGSTON, D. G. I. **Journal of Natural Products**. v.72, p.507-515, 2009.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutat. Res.**, v. 363, p. 89-96, 1996.

KIRWAN, I. G.; LOADMAN, P. M.; SWAINE, D. J.; ANTHONY, D. A.; PETTIT, G. R.; LIPPERT, J. W.; SHNYDER, S. D.; COOPER, P. A.; BIBBY, M. C. **Clinical Cancer Research**. v.10, p.1446, 2004.

KISHI, M.; HORIGUCHI, Y.; WATANABE, S.; HAYASHI, M. Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane. **Mutat. Res.**, v. 278, p. 205-208, 1992.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Communications**, v. 2, p. 103-115,1995.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 155-166, 2000.

LIN, C. M.; SINGH, S. B.; CHU, P. S.; DEMPCY, R. O; SCHMIDT, J. M.; PETTIT, G. R.; HAMEL, E. **Molecular Pharmacology**. v.34, p.200, 1988.

LIPPERT, J. W. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.15, p.605–615, 2007.

MANDEVILLE, H. C.; NG, Q.; MILNER, J.; TAYLOR, N. J.; STIRLING, J. J.; PADHANI, A. R.; D'ARCY, A. J.; COLLINS, D. J.; SAUNDERS, M. I.; HOSKIN, P. J. **Clinical Oncology** (*Royal College of Radiologists (Great Britain)*). v.19, p.38, 2007.

MAURO, MO. Atividade do micronutriente selênio na cinética de proliferação celular, citotoxicidade, indução de apoptose e expressão dos genes CASP9, BCL XL e APC em células HT29. Dissertação de Mestrado, Unesp, Rio Claro-SP, 2011.

MCBAIN, A.J.; MACFARLANE, G.T. Modulation of genotoxic enzyme activities by non-digestible oligosaccharide metabolism in in-vitro human gut bacterial ecosystems. **J. Med. Microbiol.** – Vol50, 833-842. 2001.

MELBIUS, R.E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, p. 606-616, 2005.

MILLER, E.C. & MILLER, J.A. Mechanisms of chemical carcinogenesis. **Cancer**, 47: 1055-64, 1981.

MURAD, A.; KATZ, A. **Oncologia: bases clínicas do tratamento / Oncology: clinical basis of the treatment**. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan; 435 p. ilus, graf. 1996.

O'BOYLE, N. M.; GREENE, L. M.; BERGIN, O.; FICHET, JEAN-B.; MCCABE, T.; LLOYD, D. G.; ZISTERER, D. M.; MEEGAN, M. J. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 19, p.2306, 2011.

OHSUMI, K.; NAKAGAWA, R.; FUKUDA, Y.; HATANAKA, T.; MORINAGA, Y.; NIHEI, Y.; OHISHI, K.; SUGA, Y.; AKIYAMA, Y.; TSUJI, T. *Journal of Medicinal Chemistry*. 41, 3022, 1998.

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANÁTH, P. Factors influencing DNA Migration from Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. **Exper. Cell Res.**, v. 198, p. 259-267, 1992.

OLIVEIRA, R.J. Os compostos 6-dimetilaminopurina e ciclohexamida são genotóxicos, mutagênicos, alteram o desempenho reprodutivo e a expressão dos genes TP53, CASP9 e CCNA em sistemas testes de mamíferos. Tese de Doutorado. Unesp, Rio Claro- SP, 2009.

PARKE, D.V. Activation mechanisms to chemical toxicity. **Arch. Toxicol.**, 60: 5-15, 1987.

PETTIT, G. R.; SINGH, S. B.; HAMEL, E.; LIN, C. M.; ALBERTS, D. S.; G. KENDALL D. **Experientia**. v.45, p.209, 1989.

PETTIT, G. R.; TEMPLE JR., C.; NARAYANAN, V. L.; VARMA, R.; SIMPSON, M. J.; BOYD, M. R.; RENER, G. A.; BANSAL, N. **Anti-Cancer Drug Design**. v.10, p.299, 1995.

PILAT, M. J. ; LORUSSO, P. M. **Journal of Cellular Biochemistry.** v.99, n.1021, 2006.

PITOT, H.C.; DRAGAN, Y.P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB J.**, v.5, p. 2280-6, 1991.

PITOT, H.C. Progression: the terminal stage in carcinogenesis. **Jpn. J. Res.**, v. 80, p. 599-607, 1989.

PITOT, H.C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v.72, p. 962-7, 1993.

RAFF, M.C. Social controls on cell survival and cell death. **Nature**, v. 356, 397-400, 1992.

REIFFERSCHIED, Z.; HEIL, J. Validation of SOS/umu test using results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. **Mutat. Res.**, n. 369, p. 129-145, 1996.

REIS, M. Farmacogenética aplicada ao câncer. Quimioterapia individualizada e especificidade molecular. **Medicina**, v. 39(4), p. 577-586, 2006.

RIBAS, G.; FRENZILLI, G.; BARALE, R.; MARCOS, R. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell electrophoresis (SCGE) assay. **Mutat. Res.**, v. 344, p. 41-54, 1995.

ROSS, G. M.; MCMILLAN, T. J.; WILCOS, P.; COLLINS, A. R. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications- Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research in 1994. **Mutat. Res.**, v. 337, p. 57-60. 1995.

ROVOZZO, GC; BURKE, CN. A manual of basic virological techniques. New Jersey: Prentice Hall, p. 159, 1973.

SEBAHAR, P. R.; WILLARDSSEN, A.; ANDERSON, M. B. **Current Bioactive Compounds.** 5, 79, 2009.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exper. Cell Res.**, v.175, 184-191, 1988.

SPEIT, G.; HANELT, S.; HELBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicol. Let.**, v. 88, p. 91-98, 1996.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The cometaAssay (Single-Cell Gel Test), a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: HENDERSON, D. S. Methods in molecular biology: DNA repair protocols - Eukaryotic Systems. **Totowa: Humana Press.**, p.203-211, 1999.

TELLO, E. D. Farmacogenética I. Concepto, historia, objetivos y áreas de estudio. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 97, n. 10, p. 623-629, 2006.

TICE, R. R. The single cell gel/ Comet assay: a microgel eletrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D. H. E.; VENITT, S. **Environmental Mutagenesis**. Oxford: Bios Scientific Publishers. p.315-339, 1995.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F.. The single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro e in vivo genetic toxicology testing. **Mutat. Res.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TUCKER, J.D.; PRESTON, R.J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutat. Res.**, v.365, n.1-3, p.147-159, 1996.

WARGOVICH, M.J.; PUREWAL, M. Biomarkers of gastrointestinal neoplasia. In: **Gastrointestinal cancers: biology, diagnosis, and therapy**. Philadelphia: Anil K. Rustgi/Lippincott-Raven, p. 77-87. 1995.

YOUNG, S. L.; CHAPLIN, D. J. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **2004**, 13,1171.

ZHANG, Q.; PENG, Y.; WANG, X. I.; KEENAN, S. M.; ARORA, S.; WELSH, W. J. **Journal of Medicinal Chemistry**. 50, 749, 2007.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as atividades genotóxica, mutagênica, imunomodulatória e apoptótica dos diarilsulfetos 1 e 2 *in vivo* e sua ação quando associados ao quimioterápico ciclofosfamida.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a atividade (anti)genotóxica dos diarilsulfetos 1 e 2, por meio do ensaio do cometa.

Avaliar a atividade (anti)mutagênica dos diarilsulfetos 1 e 2, por meio do ensaio do micronúcleo em sangue periférico.

Avaliar a atividade imunomodulatória dos diarilsulfetos 1 e 2, por meio da fagocitose esplênica.

Avaliar a atividade apoptótica dos diarilsulfetos 1 e 2, por meio do ensaio de apoptose.

Avaliar a ação da associação dos diarilsulfetos 1 e 2 quando associados ao quimioterápico ciclofosfamida. Comparar a ação dos diarilsulfetos 1 e 2 administrados de forma isolada e de forma associada ao quimioterápico ciclofosfamida.

3. Manuscrito

Diarilsulfetos análogos da combrestatina A-4: avaliação toxicogenética, imunomodulatória, apoptótica e prospecção de um novo quimioterápico.

Pamela Castilho de Carvalho^{1,2}, Edson dos Anjos dos Santos³, Beatriz Ursinos Catelán Shneider^{1,2}, João Renato Pesarini^{1,2}, Andréa Luiza Cunha Laura⁴, Antônio Carlos Duenhas Monreal⁴, Dênis Pires de Lima⁵, Rodrigo Juliano Oliveira^{1,2,4}, Andréia Conceição Brochado Antonioli Silva^{1,2}.

¹Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica - CeTRoGen, Núcleo de Hospital Universitário - NHU, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, Brasil;

²Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Faculdade Medicina - FAMED, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, Brasil;

³Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Apucarana, PR, Brasil;

⁴Programa de Mestrado em Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, Brasil;

⁵Programa de Pós Graduação em Química, Instituto de Química - IQ, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, Brasil;

Resumo

A combretastatina A-4 possui eficiente potencial anticancerígeno em tumores humanos e inclusive naqueles resistentes a multidrogas. Esse fato estimulou a pesquisa com dois diarilsulfetos análogos. Foram utilizados 70 camundongos machos *Swiss*, divididos em 14 grupos: controle negativo, ciclofosfamida (100mg/Kg), análogo 1 e 2 nas doses de 5, 7,5 e 10,0 mg/Kg e associações desses com a ciclofosfamida. Os resultados permitiram inferir que ambos são genotóxicos, mutagênicos e induzem apoptose. Ambos os análogos aumentam a fagocitose esplênica, porém com o 2 há um aumento significativamente. Quando associado à ciclofosfamida o análogo 1 potencializa os efeitos mutagênicos e apoptóticos desse agente antitumoral, mas o mesmo não ocorre para o análogo 2, que não potencializa os efeitos da ciclofosfamida e ainda impede a ocorrência da apoptose, na menor dose. Frente ao exposto, sugere-se que o análogo 1 seria indicado como quimioterápico, e é capaz de potencializar os efeitos da

ciclofosfamida, funcionando como adjuvante terapêutico, melhorando assim o efeito antineoplásico desse medicamento. Verifica-se, portanto, potencial terapêutico para esse composto o que sugere a sua inclusão em processos de prospecção de um novo quimioterápico e/ou para a produção de um adjuvante para uso em terapias antineoplásicas combinadas.

Palavras chave: câncer, antineoplásico, quimioterápico, sulfeto, ensaio do cometa, ensaio de micronúcleo

1. Introdução

A combretastatina A-4 (CA-4), isolada da casca da árvore africana *Combretum caffrum* (Combretaceae), possui eficiente potencial anticancerígeno em diferentes tumores humanos e inclusive naqueles resistentes a multidrogas. Esse composto possui alta afinidade pelo sítio de ligação da tubulina e está descrito como citotóxico/antiproliferativo para células endoteliais que estão presentes nos tumores em contínuo processo de mitose, assim como também é utilizado para tratar leucemia, tumores de cólon, glioblastoma, melanoma, carcinoma de próstata, adenocarcinoma de ovário e carcinoma bronqui-alveolar pulmonar (DARK et. al., 1997; LI et. al., 1998; PETTIT et. al., 1989; PETTIT et. al., 1998; SIEMAN et. al., 2009). Logo, é um importante agente antivascolar que reduz os vasos sanguíneos e o suprimento de oxigênio e nutrientes para o tumor (KANTHOU, 2004; HORSMAN et. al., 1998). Esse composto apesar de utilizado em terapias antineoplásicas, possui efeitos colaterais como alterações cardiovasculares, hiper e hipotensão, linfopenia e dor. Porém, não apresenta os efeitos tradicionais de outros agentes citotóxicos, tais como mielossupressão e alopecia (BRANDÃO, 2010).

A estrutura da CA-4 (Figura 1) é composta por dois anéis aromáticos ligados por uma dupla ligação em configuração *cis* na posição C-5 no anel A. As substituições trimetoxi no anel A foram relatadas como pré-requisitos para a manutenção da atividade, enquanto o anel B é tolerante a modificações estruturais principalmente na posição C-3' (ZHANG et. at., 2007; LI et. al., 2011).

Para o presente trabalho foram utilizados dois análogos da combretastatina A-4,

1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metoxi-3-nitrofenil)tio]benzeno (1) e o 1,2,3-trimetoxi-5-[(3-amino-4-metoxifenil)tio]benzeno (2) mostrados na Figura 2. Santos et. al. (2013), através de ensaios biológicos *in vitro* demonstraram que o grupo nitro em 1 apresentou um decréscimo na atividade citotóxica e um aumento na atividade antitubulínica quando comparado ao análogo 3 (BARBOSA et. al., 2009); enquanto que o grupo amino em 2 contribuiu para o aumento da citotoxicidade e um maior potencial na atividade antitubulínica e na inibição da ligação da colchicina à tubulina, podendo 2 ser comparado à atividade da CA-4 (SANTOS et. al., 2013).

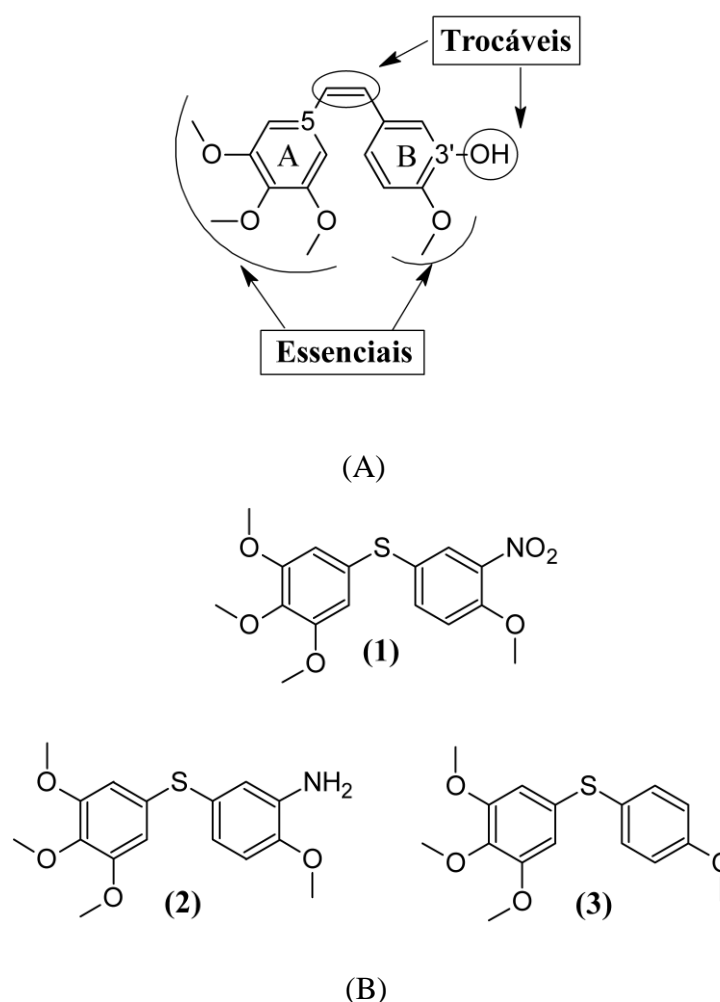


Figura 1. (A) Estrutura da CA-4; (B) estrutura dos diarilsulfetos 1, 2 e 3.

Frente ao exposto a presente pesquisa realizou a avaliação toxicogenética, imunomodulatória e apoptótica dos diarilsulfetos análogos 1 e 2 da combretastatina A-4 *in vivo*, em associação com o quimioterápico ciclofosfamida, que é amplamente utilizado para o tratamento de diversos tipos de tumores como linfomas, mieloma múltiplo, leucemias, adenocarcinoma de ovário, carcinoma de mama e neoplasias malignas do pulmão. A finalidade desta pesquisa foi verificar o mecanismo de ação dos compostos teste em associação ou não com o fármaco antineoplásico.

2. Materiais e Métodos

2.1 Agentes químicos, animais e delineamento experimental

Os diarilsulfetos 1 (1,2,3-trimetoxi-5-[(4-metoxi-3-nitrofenil)tio]benzeno (1)) – EAS ANO₂) e 2 (1,2,3-trimetoxi-5-[(3-amino-4-metoxifenil)tio]benzeno – EAS 64P) sintetizados, purificados e identificados por Santos et. al. (2013), foram primeiramente diluídos em Tween 80 (4%) (WENT, 1977) e posteriormente em etanol (1%). As doses utilizadas para os tratamentos foram 5, 7,5 e 10 mg/kg (p.c., i.p.). Ciclofosfamida (Fosfaseron®, Laboratórios Ítaca, REG. M.S. No. 1.2603.0056.002-1; Batch 063020, Brasil) foi preparada em solução fisiológica, pH 7,4 e administrado em concentração final de 100mg/Kg de peso corpóreo (p.c.), por via intraperitoneal (i.p.) em dose única.

Foram utilizados 70 camundongos da linhagem Swiss (*Mus musculus*), machos e sexualmente maduros provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CCBS/UFMS) subdivididos em 14 grupos experimentais (n = 5 animais). Os animais foram mantidos em caixas de propileno recobertas por sepilho e alimentados com ração comercial (Nuvital®) e água filtrada *ad libitum*. A temperatura e luminosidade foram controladas utilizando-se fotoperíodo de doze

horas (12 horas de luminosidade: 12 horas de escuro), com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de $55\%\pm 10$ em estante ventilada (ALESCO®). O experimento foi conduzido segundo as normas das diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais e com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMS (Protocolo Número 399/2012 e 523/2013).

Para fins comparativos, todos os tratamentos foram realizados com o veículo Tween 4% e etanol 1%. Os grupos experimentais e a dosagem dos compostos são apresentados na tabela 1. Após 24, 48 e 72h da administração dos análogos, foram coletadas amostras de $20\mu\text{L}$ de sangue periférico para o ensaio do micronúcleo. Após 24h coletou-se $20\mu\text{L}$ de sangue periférico, para realização do ensaio do cometa. Outra alíquota de $20\mu\text{L}$ foi coletada em 72h para a contagem diferencial de células do sangue. Após 72h de experimentação os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de órgãos para os ensaios de fagocitose esplênica e de apoptose.

Tabela 1. Grupos experimentais e dosagem dos compostos

	Análogo 1	Análogo 2	Ciclofosfamida
C-	-	-	-
CP	-	-	100mg/kg
D1 5mg/Kg	5mg/kg	-	-
D1 7,5mg/Kg	7.5mg/kg	-	-
D1 10mg/Kg	10mg/kg	-	-
CP+D1 5mg/Kg	5mg/kg	-	100mg/kg
CP+D1 7,5mg/Kg	7.5mg/kg	-	100mg/kg
CP+D1 10mg/Kg	10mg/kg	-	100mg/kg
D2 5mg/Kg	-	5mg/kg	-
D2 7,5mg/Kg	-	7.5mg/kg	-
D2 10mg/Kg	-	10mg/kg	-
CP+D2 5mg/Kg	-	5mg/kg	100mg/kg
CP+D2 7,5mg/Kg	-	7.5mg/kg	100mg/kg
CP+D2 10mg/Kg	-	10mg/kg	100mg/kg

2.2 *Ensaio Biológicos*

2.2.1 *Ensaio do Cometa*

O ensaio do cometa foi realizado segundo o protocolo de Singh et. al. (1988). O material foi analisado em microscópio de epifluorescência (Bioval®) em aumento de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Como descrito por Kobayashi et. al. (1995), analisou-se 100 células por animal. A ciclofosfamida, que é um agente alquilante de ação indireta, para a indução de danos no DNA foi usada como controle positivo.

2.2.2 *Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico*

O ensaio do micronúcleo em sangue periférico foi realizado segundo Hayashi et al. (1990). Uma alíquota de 20µL de sangue periférico foi colocada sobre uma lâmina previamente recoberta por 20µL de Alaranjado de Acridina (1,0 mg/mL). Em seguida depositou-se uma lamínula sobre o material biológico. A lâmina permaneceu em *freezer* (-20° C) por um período mínimo de sete dias. A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência (Bioval®, Modelo L 2000A), na objetiva de 400x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Foram analisadas 1000 células por animal. A ciclofosfamida foi usada como controle positivo.

2.2.3 *Ensaio de Fagocitose Esplênica*

Um fragmento de aproximadamente 1/3 do tamanho do baço foi macerado em solução fisiológica. Cem microlitros da suspensão celular foram colocadas em uma lâmina previamente corada com 20µL de Alaranjado de Acridina (1,0 mg/mL) e recoberta por uma lamínula. As lâminas foram estocadas em um *freezer* até o momento da análise. A análise foi feita em microscópio de fluorescência (Bioval®, Modelo L 2000A) em um aumento de 400x com filtro de 420-490nm e filtro de barreira de 520nm (Ishii et. al., 2011). Foram analisadas 200 células por

animal. A ausência ou presença de fagocitose foi baseada na descrição de Hayashi et. al. (1990).

2.2.4 *Ensaio de apoptose*

Para a confecção de um esfregaço, 100µL de uma solução de macerado de fígado ou rim foram utilizados. A lâmina foi fixada em *Carnoy* por 5 minutos. Em seguida a mesma foi submetida a uma bateria de concentrações decrescentes de etanol (95% - 75% - 50% - 25%), seguida de lavagem com Tampão *McIlvaine* por 5 min., coloração com alaranjado de acridina (0,01%, 5 min.) e nova lavagem com o tampão. Foram analisadas 100 células por animal. A identificação das células em apoptose se deu por meio da análise de padrões de fragmentação do DNA, segundo Rovozzo & Burke (1973), Mauro et. al. (2011) e Navarro et. al. (2014). A ciclofosfamida, que é induz morte celular por apoptose como consequência do acúmulo de danos no DNA, foi usada como controle positivo.

2.2.5 *Cálculo da porcentagem de redução de danos (RD%) e incremento de danos (ID%)*

Foi proposto por Manoharan & Beneriee (1985) e Waters (1990) o cálculo da porcentagem de redução de danos para se avaliar a capacidade quimiopreventiva de uma substância quando essa é associada a uma substância sabidamente mutagênica. Na presente pesquisa o análogo em teste apresentou atividade antígenotóxica, mas não antimutagênica. Nesse último caso registrou-se aumento da frequência de danos no DNA. Assim, para a presente pesquisa, tanto a porcentagem de redução de danos quanto a de incremento foram calculadas pela mesma fórmula.

$$\begin{array}{l} \text{RD\%} = \frac{\text{Média do controle positivo} - \text{Média do grupo associado}}{\text{Média do controle positivo} - \text{Média do controle neg}} \times 100 \\ \text{ou} \\ \text{ID\%} \end{array}$$

2.2.6 Análise estatística

Os valores foram expressos em média \pm EPM e os dados foram analisados por ANOVA/Tukey por meio do software *GraphPad Prism* (version 3.02; Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) . O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. O diarilsulfeto 1 é genotóxico, mutagênico e indutor de apoptose. Não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) em peso inicial, final e ganho de peso (Figura 2) durante o período experimental, o que sugere ausência de toxicidade aguda. Em acordo com o peso total, não houveram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) nos pesos relativos de coração, pulmão, fígado, rins e baço (dados não apresentados).

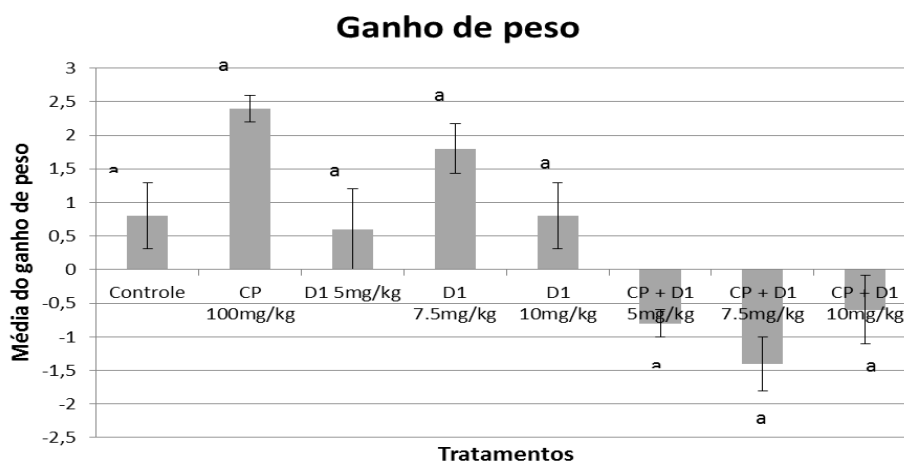


Figura 2. Média do ganho de peso durante o período experimental. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

O diarilsulfeto 1 apresentou potencial genotóxico, aumentando a frequência de danos no DNA (Figura 3) ($p < 0,05$) na ordem de 2,32, 3,09 e 3,8 vezes, para as doses de 5, 7,5 e 10 mg/Kg, respectivamente.

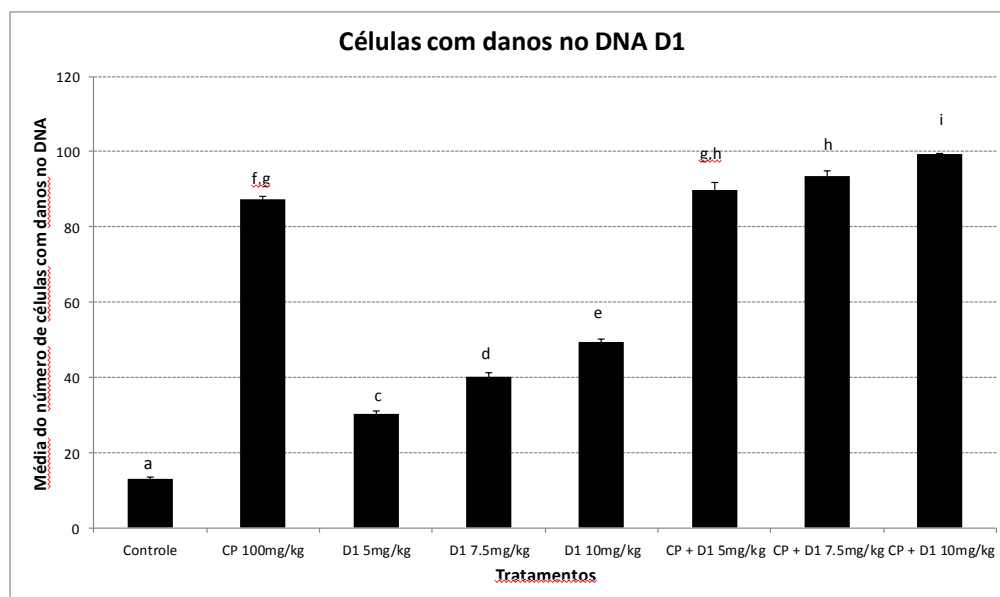


Figura 3. Média do número de células com danos no DNA. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Houve potencialização do efeito da ciclofosfamida nas duas maiores doses, com taxas de incremento de danos no DNA na ordem de 3,77, 8,89 e 16,71%, resultado este que se correlaciona diretamente com o encontrado no ensaio do micronúcleo, que indica o potencial mutagênico do composto teste, o qual aumentou ($p < 0,05$) a frequência de micronúcleos em 1,68, 2,49 e 3,01 vezes após 24h; 1,82, 2,77 e 3,41 vezes após 48h; e 1,26, 2,00 e 2,39 vezes após 72h de tratamento para as doses de 5; 7,5 e 10 mg/Kg (Figura 4), respectivamente, sendo que nesse último tempo de análise a menor dose deixou de apresentar atividade mutagênica. Os dados demonstram relação diretamente proporcional entre o aumento da dose e o aumento das mutações. Quando associado à ciclofosfamida o análogo 1 potencializou ($p < 0,05$) os danos mutagênicos causados por esse quimioterápico e a porcentagem de incremento de danos foi da ordem de 13,19, 21,18, 35,76% após 24h; 48,61, 50,46 e 58,33% após 48h e 35,29, 47,90 e 70,58% após 72h de tratamento, para as doses de 5, 7,5 e 10 mg/kg, respectivamente.

Esses dados demonstram que existe uma correlação direta entre o aumento da dose e o aumento da frequência de mutações.

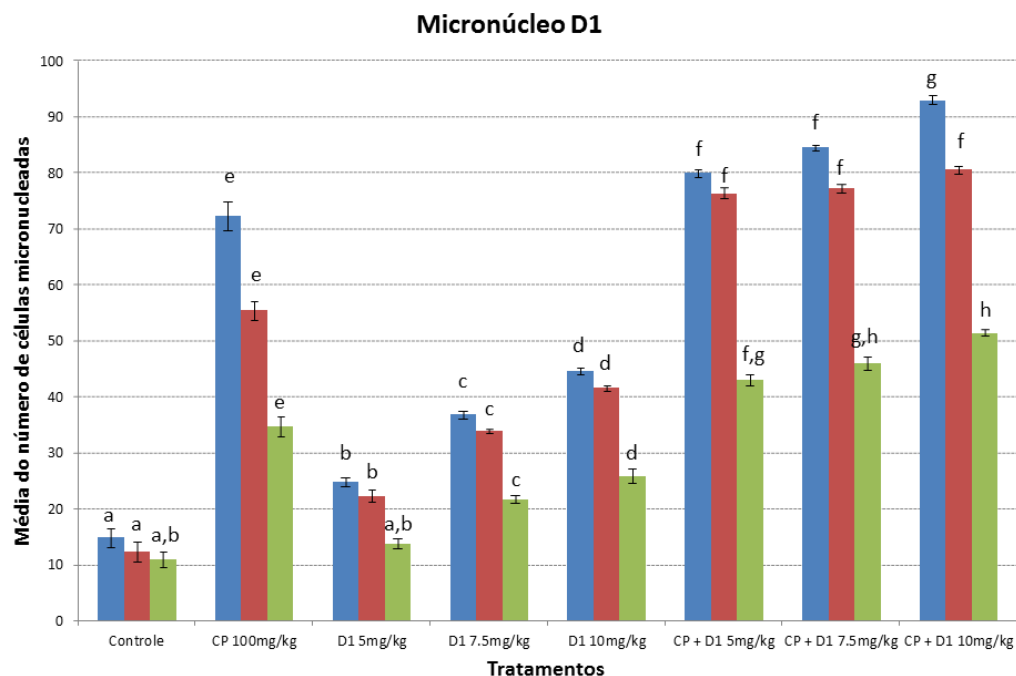


Figura 4. Média da frequência de células micronucleadas. Série 1 24h, série 2 48h, série 3 72h. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

O aumento na frequência de mutações possui uma correlação positiva com o aumento da fagocitose esplênica. O diarilsulfeto 1 apresentou tendência ao aumento da porcentagem de fagocitose quando administrado isoladamente. Quando administrado simultaneamente ao quimioterápico, potencializou a frequência de fagocitose quando comparado com o grupo ciclofosfamida. Esse efeito foi da ordem de 15,6 e 24,2 pontos percentuais para as doses de 7,5 e 10 mg/kg, respectivamente (Figura 5).

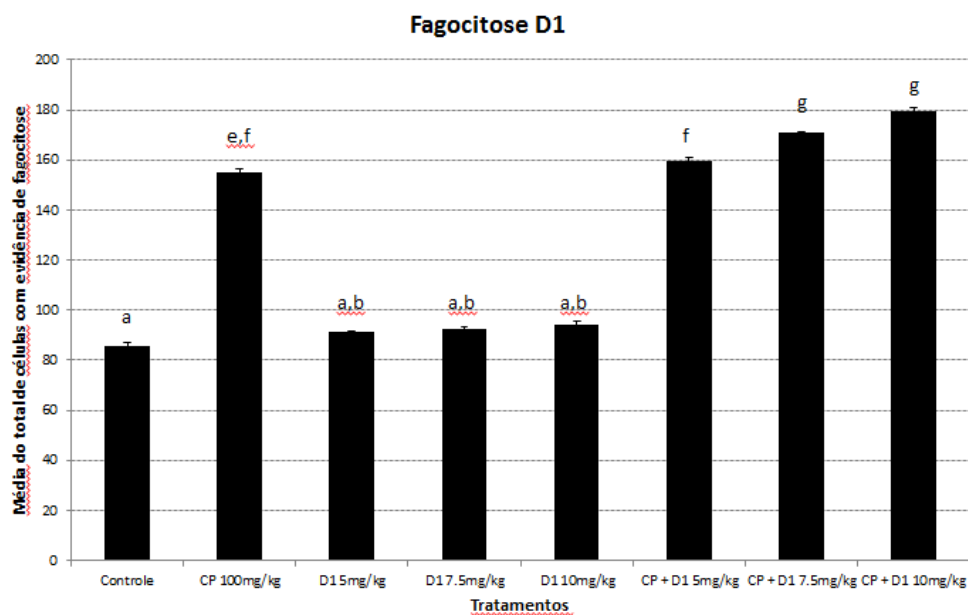


Figura 5. Média do total de células com evidência de fagocitose. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

A alta quantidade de danos genotóxicos e mutagênicos também se correlacionam de forma positiva com a frequência de células em apoptose, uma vez que as células danificadas tendem a ser eliminadas do organismo. O diarilsulfetos 1 administrado isoladamente aumenta ($p < 0,05$) a frequência de apoptose em 3,33 e 5,33 vezes para o fígado nas duas maiores doses (7,5 e 10mg/Kg). Nos rins apenas na maior dose causou aumento significativo de 9,67 vezes e no baço as duas maiores doses causaram aumento ($p < 0,05$) de 4,00 e 5,17 vezes. Quando associado à ciclofosfamida, houve uma potencialização significativa dos níveis de apoptose, para as duas maiores doses, da ordem de 1,27 e 1,65 vezes no fígado, 1,22 e 1,61 nos rins e de 1,26 e 1,64 no baço, respectivamente (Figura 6).

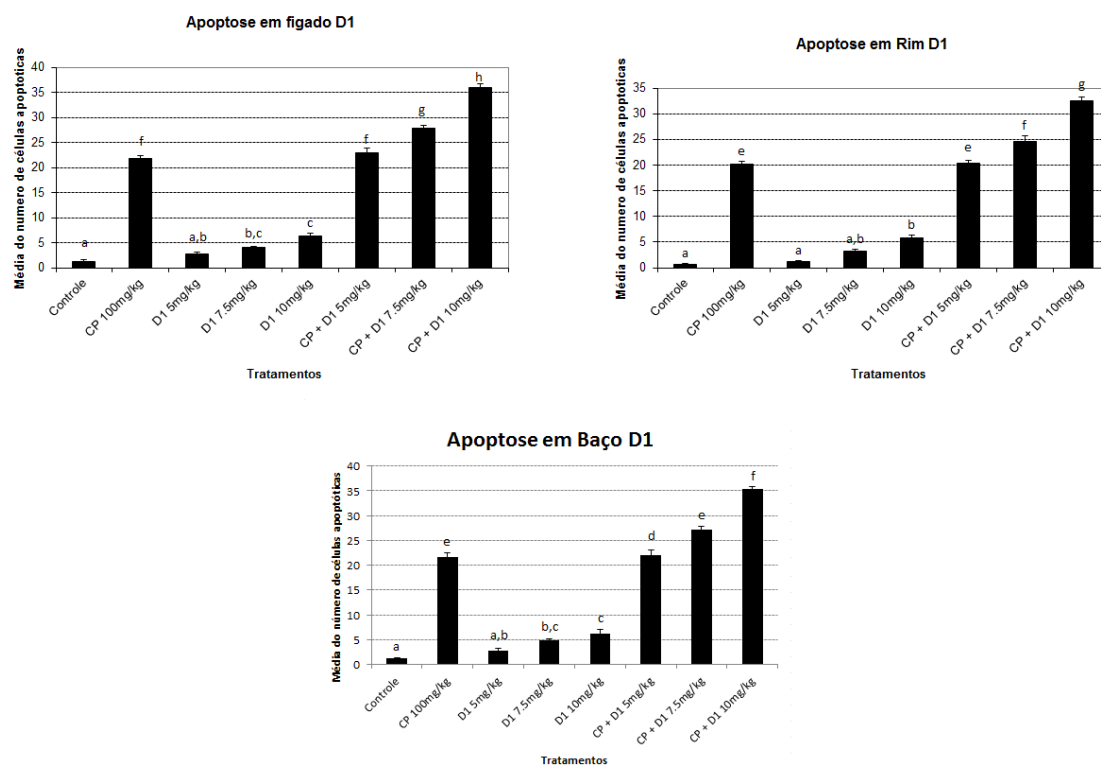


Figura 6. Média do número de células apoptóticas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

3.2. O diarilsulfeto 2 é imunomodulador e indutor de apoptose. Não houveram alterações estatisticamente significativas nos pesos inicial, final e ganho de peso durante o período avaliado. Os pesos relativos do coração, fígado, rins e baço não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 7), indicando ausência de toxicidade aguda para as doses administradas.

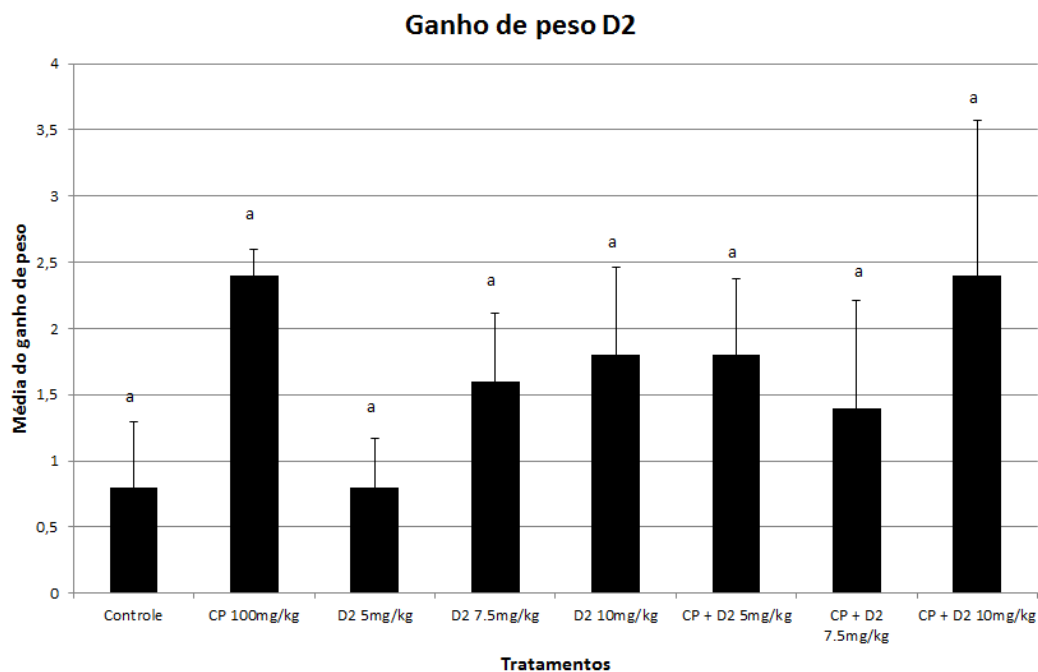


Figura 7. Média do ganho de pesos. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

O análogo 2 apresentou potencial genotóxicos, aumentando ($p < 0,05$) a frequência de danos observados no DNA em 1,63, 1,63 e 1,54 vezes para as doses de 5; 7,5 e 10 mg/Kg, respectivamente (figura 8). Porém, quando associado à ciclofosfamida, não houve prevenção nem potencialização de danos. O potencial genotóxico é corroborado pela taxa de 1,49 vezes no incremento de micronúcleos, encontrado apenas para a maior dose, 24h após o tratamento. O composto associado à ciclofosfamida não foi capaz de prevenir ou potencializar ($p > 0,05$) danos mutagênicos, o que condiz com os resultados encontrados também no ensaio do cometa (Figura 9).

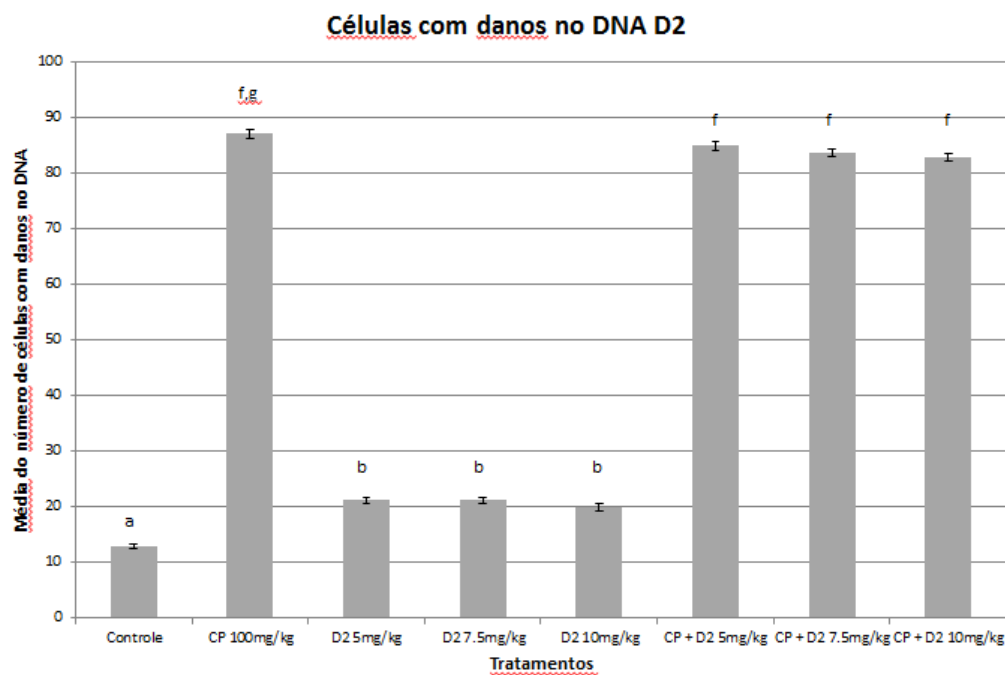


Figura 8. Células com danos no DNA. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

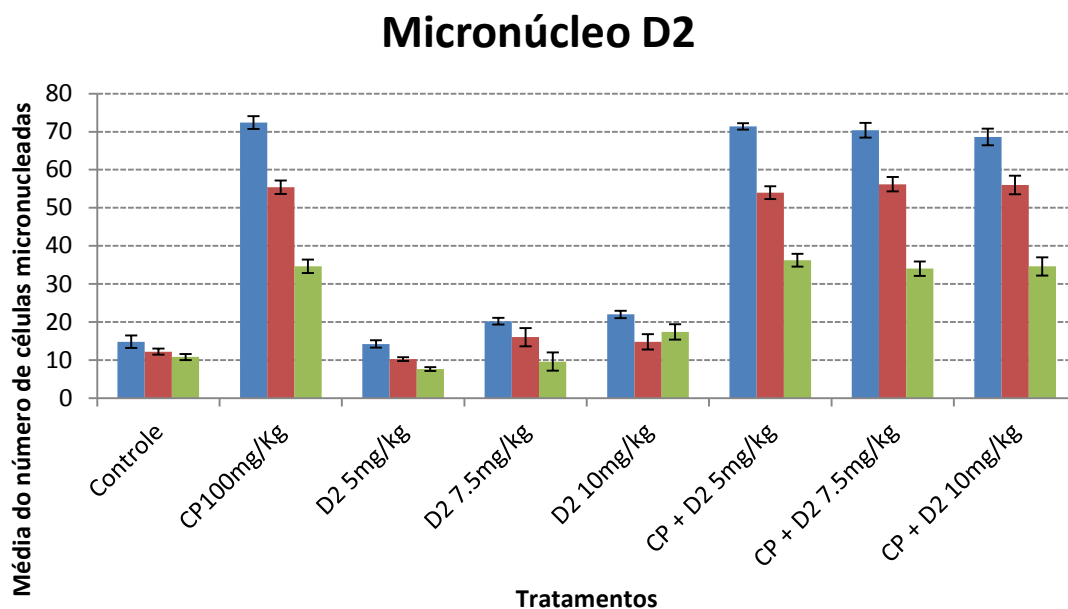


Figura 9. Média do número de células micronucleadas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

O decaimento do número de células micronucleadas é compatível com o aumento da fagocitose esplênica, que para o diarilsulfeto isolado sofreu um aumento da ordem de 7,1, 14,5 e 21,9 pontos percentuais para as doses de 5, 7,5 e 10 mg/Kg, respectivamente. Porém, quando em associação, apresentou uma tendência à redução da frequência de fagocitose para as duas menores doses e uma redução significativa para a maior dose testada sendo esta de 45,6 pontos percentuais (Figura 10).

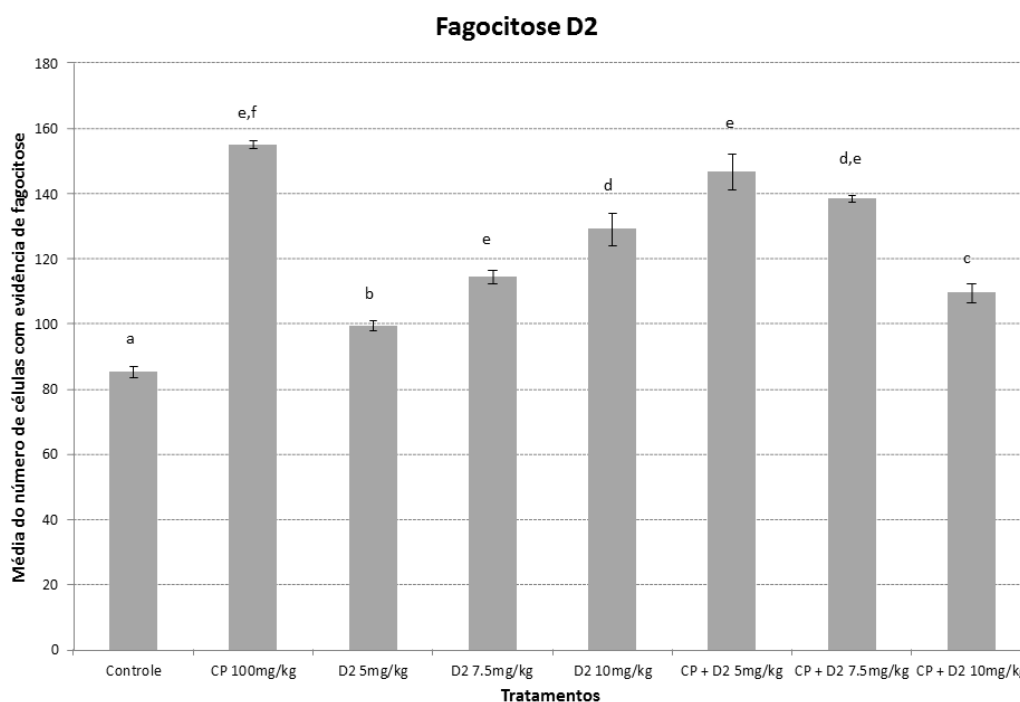


Figura 10. Média do número de células com evidência de fagocitose. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Os danos mutagênicos e genotóxicos encontrados correlacionam-se positivamente com o resultado do ensaio de apoptose onde análogo 2, quando administrado isoladamente, causou aumento ($p < 0,05$) da frequência de apoptose no fígado e no baço, apenas para a maior dose, na ordem de 3,33 e 3,83,

respectivamente. Em associação com a ciclofosfamida, a maior dose testada não alterou a frequência de apoptose. No entanto as duas menores doses determinaram uma redução significativa da frequência de apoptose da ordem de 2,10 e 1,53 vezes no fígado, 2,06 e 1,53 vezes nos rins e de 1,89 e 1,54 vezes no baço para as doses de 5 e 7,5 mg/kg, respectivamente (Figura 11).

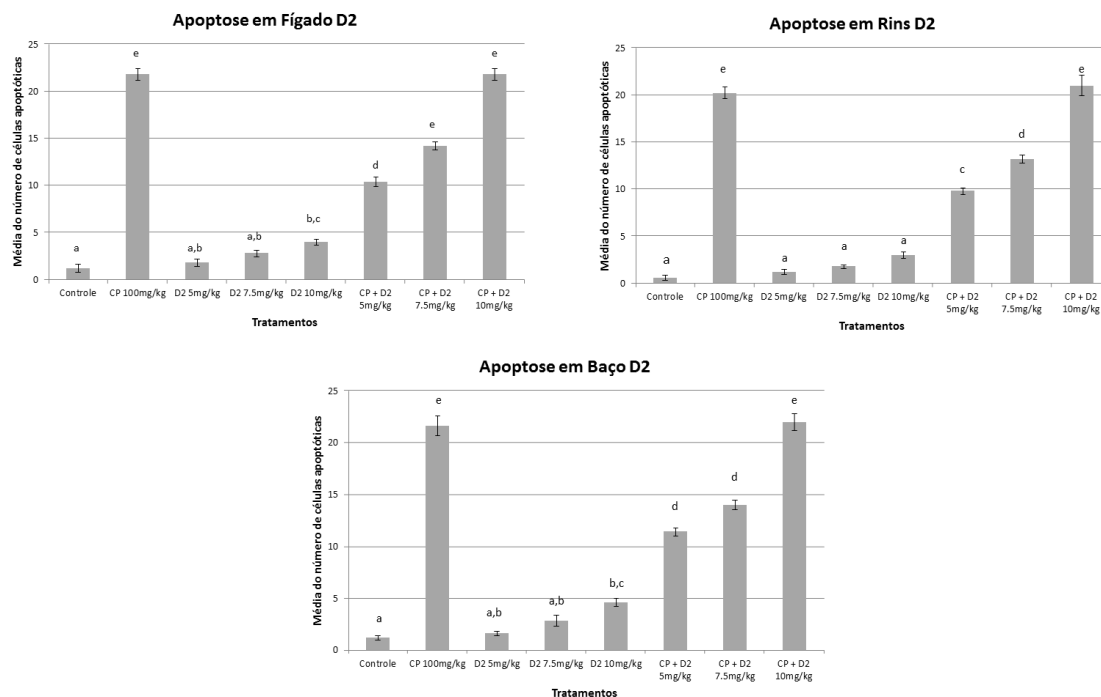


Figura 11. Média do número de células apoptóticas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

A avaliação toxicogenética demonstrou que os dois análogos são genotóxicos e mutagênicos quando administrados isoladamente. O ensaio do cometa permite inferir que o análogo 1 possui maior capacidade de causar lesões no DNA quando comparado ao 2. Destaca-se ainda que o primeiro apresentou curva dose resposta, ou seja, com o aumento da dose observa-se aumento da frequência de células com danos no DNA. Entretanto, o análogo 2 não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as doses, e as menores doses demonstram maior frequência de danos genotóxicos, o que sugere uma inversão da curva dose resposta.

4. Discussão

Os dados biométricos sugerem que as doses de 5, 7,5 e 10 mg/kg dos diarilsulfetos 1 e 2, análogos da CA-4 não apresentam toxicidade aguda segundo o protocolo testado, uma vez que não foram observadas variações no peso dos animais e dos órgãos, exceto para o peso absolutos e relativos dos pulmões. No entanto, esta variação não parece indicar relevância biológica de toxicidade, uma vez que as observações clínicas, eriçamento de pêlos, ressecamento de mucosa, diarreia, redução na ingesta de ração e água e nem mudanças de comportamento, não foram evidenciadas. Por outro lado, Eikesdal et. al. (2000) demonstraram que a administração de doses superiores de CA-4 (50mg/kg) em ratos, causou diminuição de peso corpóreo, indicando toxicidade.

O ensaio de mutagenicidade (ensaio do micronúcleo) foi corroborado pelos resultados observados no ensaio de genotoxicidade (ensaio do cometa), uma vez que observou-se a mesma relação dose resposta para o análogo 1, nos três diferentes momento de análise (24, 48 e 72h). Destaca-se ainda que a maior frequência de micronúcleos foi evidenciada após 24h de tratamento, o que sugere uma ação mutagênica direta para o análogo 1, além de uma queda da atividade mutagênica tempo-dependente. Esse fato pode estar relacionado a metabolização do composto que acarretaria inativação e/ou o encaminhamento do mesmo para a excreção, por meio de enzimas da Fase I e II. Em relação ao análogo 2, somente a maior dose, após 24h de tratamento, apresentou atividade mutagênica, o que sugere que esse agente é menos eficiente em causar mutações quando comparado com o análogo 1. Esse fato ainda sugere que os danos observados no ensaio do cometa podem ter sido reparados, por isso as mutações não foram observadas na mesma proporção que os danos genotóxicos, de forma estatisticamente significativa, para as outras doses. Segundo alguns autores, danos diretos do tipo quebras de fita simples e duplas, sítios álcali-lábeis, crosslinks e sítios de reparo por excisão, ou danos indiretos como lesões por metilação e adutos, que sendo álcali-lábeis, se expressam como quebras de fita simples, podem ser detectados pela versão alcalina do cometa (pH>13) (SINGH et. al., 2000; TICE et. al., 2000; HERMETO et. al., 2014) e esses podem ser reparados (OLIVEIRA et al., 2007) antes de se fixarem como mutações ao longo de um ciclo celular, visto que os danos do micronúcleo só se expressam na telófase ou após a citocinese quando a célula está em intérfase.

A fagocitose esplênica é capaz de retirar células com danos no DNA da circulação sanguínea (ZU-WEI et. al., 1992; BAZO et. al., 2002; ISHII et. al., 2011). Esse fato pode relacionar a uma diminuição da frequência de células com danos observadas no ensaio de micronúcleo e/ou cometa, por exemplo. Na presente pesquisa observou-se que os maiores níveis de danos genotóxicos e mutagênicos foram observados para o análogo 1. Para esse mesmo composto foi observado que os níveis de fagocitose não se alteraram em relação ao controle negativo apesar de ser observada uma tendência ao aumento. Já para o análogo 2, onde foram observados os menores níveis de lesões genotóxicas e mutagênicas, verificou-se os maiores níveis de fagócitos esplênica. Esse fato pode parcialmente ser responsável por uma baixa estimativa da frequência de lesões no DNA.

Ainda reforça a aplicabilidade do análogo 1 no estudo realizado por Kanthou et. al. (2004), no qual o agente ligante da tubulina CA-4 gera alta frequência de micronúcleos e danos celulares, os quais interrompem a mitose e induzem morte celular. Nesse estudo ainda foi citada a capacidade da CA-4 reduzir vasos sanguíneos tumorais, o que demonstra sua ação antivascular. A união desses achados permitiu o desenvolvimento de um novo produto quimioterápico. Logo os resultados do análogo 1 suportam a possibilidade do início da prospecção de um novo quimioterápico fato que demonstra o ineditismo e pioneirismo desse estudo.

No presente estudo foi utilizada a ciclofosfamida, que é um agente alquilante com alta capacidade de formar intermediários reativos que se ligam de modo covalente a sítios de alta densidade de elétrons. Para a produção dos metabólitos é necessário ativação metabólica por meio de enzimas microssomais hepáticas, com formação de intermediário ativado com conseqüente transporte até os locais de ação. Este fármaco age de maneira inespecífica no ciclo celular, portanto a seletividade contra determinados tecidos malignos pode resultar, em parte, da capacidade dos tecidos normais de degradar os intermediários ativos por meio de diversas vias como a do aldeído desidrogenase e glutathione transferase, por exemplo (GOODMAN & GILMAN, 2012). Das ações inespecíficas da ciclofosfamida no ciclo celular pode-se supor alta frequência de danos no DNA que determinam apoptose de células tumorais. Esses danos celulares podem ser monitorados, por exemplo, pela presença de biomarcadores como os micronúcleos (HAYASHI et. al, 1992; MATSUMOTO & COLUS, 2000). Assim, compostos

que possam potencializar efeitos mutagênicos são também capazes de potencializar efeitos antitumorais (NAVARRO et al., 2014). As assertivas anteriores demonstram a possibilidade de se combinar a ciclofosfamida, um agente antineoplásico largamente utilizado no tratamento de diversos tumores (CHASE et. al, 1998; AYERS et. al, 2004; DIAZ-MONTERO et. al, 2009;) com análogos da CA-4, uma vez que essa além de possuir menores efeitos colaterais, principalmente no caso da mielossupressão que reduz a expectativa de vida do paciente, ainda possui mecanismo de ação focado na redução da vasculatura impedindo assim o crescimento tumoral (KANTHOU, 2004).

Quando comparado a estrutura molecular do análogo 1 e análogo 2 (Figura 2) observamos que a única diferença esta relacionada ao grupo existente na posição C-3', sendo um grupo nitro (NO₂) para o análogo 1 e um grupo amino (NH₂) para o análogo 2. Acredita-se que a maior atividade mutagênica conferida ao análogo 1 está possivelmente associada a presença do grupo nitro, um grupo eletrofílico, que pode realizar ligações no DNA, atuando de maneira semelhante a ciclofosmamida, que permite a geração de intermediários eletrofílicos *in vivo* (SŁOCZYŃSKA et. al., 2014). Além disso, a atividade de 1 pode estar relacionada com o metabolismo redutor enzimático gerando intermediários nitrosos (R-N=O) e *N*-hidroxilados (R-NH-OH) elevando assim seu potencial mutagênico (GUENGERICH, 1992).

Diante dessa proposta experimental pode-se ainda observar que o análogo 1, que por analogia pode apresentar o mesmo efeito da CA-4, é ainda capaz de potencializar os efeitos da ciclofosfamida no que se refere ao aumento de lesões no DNA. Esses indícios sugerem que o uso do análogo 1 como coadjuvante quimioterápico da ciclofosfamida pode permitir duas formas de combate às células tumorais e ao tumor: (I) causando maior freqüência de mutações que levariam as células à apoptose e ainda (II) impedindo o processo de angiogênese que por conseqüência impediria o crescimento do tumor por determinar a morte celular pela incapacidade de oxigenação e nutrição das mesmas. Salienta-se ainda que a potencialização do efeito mutagênico da ciclofosfamida foi da ordem de até 70,58%, 72h após a administração simultânea entre os dois compostos, o que resultou em um aumento na morte celular, principalmente por apoptose. Este dado é um importante indicativo de que análogo 1 é capaz de potencializar e ainda aumentar o tempo de ação da ciclofosfamida na indução de danos mutagênicos, mesmo na presença de metabolização, os quais seriam responsáveis pelo efeito

quimioterápico do medicamento comercial, visto que o aumento da morte celular é um importante indicativo de eficácia para a terapia antitumoral.

Os resultados obtidos reportaram diferenças na atividade genotóxica ou mutagênica para o análogo 2 quando comparado com análogo 1. Frente ao exposto, sugere-se que o análogo 2 pode apresentar uma atividade imunodulatória. Segundo Pero et al. (2004), a aplicação de pequenas doses de CA-4 em animais com tumores melhora a resposta imune e é capaz de neutralizar a imunossupressão induzida pelo próprio tumor, sem causar destruição vascular. Esses autores escolherem esse modelo experimental para inferir possibilidades no tratamento de humanos por meio da combinação da CA-4 e outras terapias imunológicas. Os resultados observados para o análogo 2 permitem esse mesmo tipo de inferência. No entanto, o análogo 1, que até o presente momento possui as melhores características para a quimioterapia e/ou terapia adjuvante, não possui essa característica, visto que as terapias antitumorais por si só possuem dentre os seus principais efeitos colaterais a imunossupressão. Logo agentes quimioterápicos e/ou adjuvantes quimioterápicos capazes de causar imunoestimulação, aumentando assim a qualidade e expectativa de vida dos pacientes são requisitos básicos para inovações tecnológicas nessa terapêutica.

Além das células micronucleadas, a fagocitose esplênica é capaz também de remover restos celulares e/ou de células que tiveram suas membranas degradadas. Segundo Parihar et. al. (2013), um análogo da CA-4 testados em linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) possui capacidade de lesionar membranas celulares em células cancerígenas, corroborando as afirmações de estudos anteriores quanto ao potencial terapêutico das combretastatinas. Se assim o for, talvez células mutadas e/ou iniciadas para o câncer, as quais possuem instabilidade cromossômica/genômica, também possam ser expostas às lesões de membranas o que pode explicar a maior frequência de células fagocíticas presente nos grupos tratados com o análogo 2 em comparação com o grupo controle. Assim, o tratamento com o análogo 2 poderia resultar em aumento de dano celular, que por sua vez, levaria ao aumento da frequência de células fagocíticas, como observado neste trabalho.

A associação do análogo 1 e da ciclofosfamida resultou no aumento de fagocitose esplênica nas duas maiores doses. Esse fato indica que um maior número de células com lesões no DNA e/ou outras lesões celulares, incluindo as de

membrana, estão sendo fagocitadas. Esse dado reforça atividade imunoestimulatória para o análogo 1 quando esse é utilizado como adjuvante quimioterápico e não isoladamente. Já na associação do análogo 2 observou-se que as duas menores doses não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle positivo. Mas, a maior dose foi capaz de reduzir significativamente a frequência de fagocitose.

O análogo 1 é capaz de induzir aumento significativo de apoptose em fígado, rins e baço e em especial nas duas maiores doses. Já o análogo 2 possui essa mesma capacidade somente para fígado e baço na maior dose. Segundo Iyer et. al. (1998), a CA-4 induz apoptose por meio da conversão da proenzima CPP32 em caspase 3 ativa, que age como um gatilho para a apoptose. Esses mesmos autores relatam que a incubação de células tumorais com CA-4, após 8h, leva a 99% de morte celular por apoptose, provando que este é o mecanismo primário de morte celular e da ação quimioterápica desse composto. A avaliação da apoptose nos grupos tratados simultaneamente com a ciclofosfamida e os análogos demonstraram que o análogo 1, nas duas maiores doses, é capaz de aumentar os níveis de apoptose em fígado, rins e baço. Já o análogo 2, nas duas menores doses, é capaz de reduzir os índices de apoptose nesses mesmos órgãos.

A ciclofosfamida é capaz de gerar a produção de radicais livres e esses também são responsáveis pelos danos no DNA que levam as células mutadas à apoptose (CAI et. al., 1997) Segundo Aziz et. al. (2013) a CA-4 também é capaz de induzir as espécies reativas de oxigênio e esse fato é importante para garantir a seletividade contra células cancerígenas, já que as mesmas são mais sensíveis ao stress oxidativo. A junção dessas duas informações nos sugere que os maiores índices de apoptose encontrados na associação do análogo 1 e da ciclofosfamida se deva ao sinergismo de ação desses dois compostos no intuito de causar a morte celular seja mediada por danos diretos ao DNA ou por danos indiretos causados pelos radicais livres provenientes da ação da ciclofosfamida e do análogo 1.

Em uma análise geral pode-se verificar ainda que o grupo tratado com o análogo 2 associado à ciclofosfamida quando comparado ao grupo tratado somente com a ciclofosfamida não aumentou os níveis de danos genotóxicos e mutagênicos, e nem os níveis de fagocitose esplênica, apesar de ser observada uma tendência à redução. Além disso, verificou-se a prevenção de apoptose. Os dados apresentados até o momento não permitem elucidar porque o análogo 2 reduz os

índices de apoptose do quimioterápico ciclofosfamida. Assim, novos estudos são necessários para melhor compreensão dessa questão.

Os resultados indicam que o análogo 1 tem atividade genotóxica, mutagênica e apoptótica o que indica o seu uso como quimioterápico, e é capaz de potencializar a ação da ciclofosfamida, funcionando como adjuvante terapêutico, melhorando assim o efeito antineoplásico desse medicamento. Além disso, o referido composto não induziu toxicidade aguda. Frente ao exposto, considera-se que o análogo 1 possui potencial terapêutico e deve ser considerado na prospecção de uma novo quimioterápico e/ou para a produção de um adjuvante para uso em terapias antineoplásicas combinadas.

5. Referências

- AYERS, M.; SYMMANS, W.F.; STEC, J.; DAMOKOSH, A.I.; CLARK, E.; HESS, K.; LECOCKE, M.; METIVIER, J.; BOOSER, D.; IBRAHIM, N.; VALERO, V.; ROYCE, M.; ARUN, B.; WHITMAN, G.; ROSS, J.; SNEIGE, N.; HORTOBAGYI, G.N.; PUSZTAI, L. Gene Expression Profiles Predict Complete Pathologic Response to Neoadjuvant Paclitaxel and Fluorouracil, Doxorubicin, and Cyclophosphamide Chemotherapy in Breast Cancer. *JCO*. v. 22, n. 12, p. 2284-2293, 2004.
- AZIZ, G.; ODLO, K.; HANSEN, T.V.; PAULSEN, R.E.; MATHISEN, G.H. Combretastatin A-4 and structurally related triazole analogues induce caspase-3 and reactive oxygen species-dependent cell death in PC12 cells. *European Journal of Pharmacology*, v.703, p.25–32, 2013.
- BAIKAR, S.; MALPATHAK, N. Secondary metabolites as DNA topoisomerase inhibitors: A new era towards designing of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev*. Jan-Jun; v.4, n.7, p.12–26, 2010.
- BARBOSA, E. G.; BEGA, L. A. S.; BEATRIZ, A.; SARKAR, T.; HAMEL, E.; DO AMARAL, M. S.; DE LIMA, D. P. A diaryl sulfide, and sulfone bearing structural similarities to combretastatin A-4. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, p.2685, 2009.
- BAZO, A.P. ; RODRIGUES, M. A. M. ; SFORCIN, J. M. ; RIBEIRO, L.R. ; CAMARGO, J. L.V. de ; SALVADORI, D. M. F. . Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, v. 22, n.3, p. 183-194, 2002.

BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.P.; COUTO, R.D.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J.M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. Quím. Nova, v.33 n.6, 2010.

CAI, L.; HALES, B.F.; ROBAIRE, B. Induction of Apoptosis in the Germ Cells of Adult Male Rats after Exposure to Cyclophosphamide. Biology of reproduction. v.56, p.1490-1497, 1997.

CHASE, M.; CHUNG, R.Y.; CHIOCCA, E.A. An oncolytic viral mutant that delivers the *CYP2B1* transgene and augments cyclophosphamide chemotherapy. Nature Biotechnology. v.16, p.444 – 448, 1998.

DARK, G.G.; HILL, S.A.; PRISE, V.E.; TOZER, G.M.; PETTIT, G.R.; CHAPLIN, D.J. Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. Cancer Res. v.57, p.1829–34, 1997.

DIAZ-MONTERO, C.M.; SALEM, M.L.; NISHIMURA, M.I.; GARRETT-MAYER, E.; COLE, D.J.; MONTERO, A.J. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin–cyclophosphamide chemotherapy. Cancer Immunology, Immunotherapy. v. 58, n.1, p 49-59, 2009.

EIKESDAL, H.P.; SCHEM, B.C.; MELLA, O.; DAHL, O. The new tubulin-inhibitor combretastatin A-4 enhances thermal damage in the BT₄An rat glioma. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. v. 46, n. 3, p. 645–652, 2000.

GUENGERICH, P. F. Metabolic activation of carcinogens. Pharm. Ther., v. 54, 17-61, 1992.

GOODMAN E GILMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica;. 12. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2012.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE JUNIOR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. Mutat. Res, v. 245, p. 245-249, 1990.

HAYASHI, M.; KODAMA, Y.; AWOGI, T.; SUZUKI, T.; ASITA, A.O.; SOFUNI, T. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C- and cyclophosphamide-treated rats. Mut. Res. v.278, n.2-3, p.209–213, 1992.

HERMETO, L.C.; OLIVEIRA, R.J.; MATUO, R.; JARDIM, P.H.A.; ROSSI, R.; BROCHADO-ANTONIOLLI, A.C.M.; DEFFUNE, E.; EVARISTO, T.C.; SANTANA, A.E. Ensaio cometa em células tronco mesenquimais do tecido adiposo: efeitos do pH sobre a avaliação da integridade genômica. Genet. Mol. Res. Im press 2014.

HORSMAN, M.R.; EHRNROOTH, E.; LADEKARL, M.; OVERGAARD, J. The effect of Combretastatin A-4 disodium phosphate in a C3H mouse mammary carcinoma and a variety of murine spontaneous tumors. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. v., 42, n., 4, p. 895–898, 1998.

ISHII P.L., PRADO C.K., MAURO M.O., CARREIRA C.M., MANTOVANI M.S., RIBEIRO L.R., DICHI J.B., OLIVEIRA R.J.. Evaluation of *Agaricus blazei* *in vivo* for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* v.59, p.412–422, 2011.

IYER, S.; CHAPLIN, D.J.; ROSENTHAL, D.S.; et.al. Induction of Apoptosis in Proliferating Human Endothelial Cells by the Tumor-specific Antiangiogenesis Agent Combretastatin A-4. *Cancer Research.* v.58, p.4510-4514, 1998;

KANTHOU, C.; GRECO, O.; STRATFORD, A.; COOK, I.; KNIGHT, R.; BENZAKOUR, O.; TOZER, G. The Tubulin-Binding Agent Combretastatin A-4-Phosphate Arrests Endothelial Cells in Mitosis and Induces Mitotic Cell Death. *American Journal of Pathology*, v. 165, n. 4, 2004.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Communications*, v. 2, p. 103-115, 1995.

LI, L.; ROJANI, A., SIEMANN, D.W. Targeting the tumor vasculature with combretastatin A-4 disodium phosphate: effects on radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* v.42, p.899–903, 1998.

LI, YAO-W.; LIU, J.; LIU, NA; SHI, D.; ZHON, XIAO-T.; LV, JIA-G.; ZHU, J.; ZHENG, CAN-H., ZHOU, YOU-J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.19, p.3579, 2011.

MAGALHÃES, Hemerson Iury Ferreira. Propriedades anticâncer da fenstatina, 4-metoxifenil-3, 4, 5-trimetoxifenilmetanona (RR07). 2009.

MANOHARAN, K.; BANERJEE, M.R. Beta-carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture, *Cell Biol. Int. Rep.* v.9, p.783–789, 1985.

MATSUMOTO, F.E.; COLUS, I.M.S.. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genet. Mol. Biol.*, São Paulo , v. 23, n. 2, 2000 .

MAURO, MO. Atividade do micronutriente selênio na cinética de proliferação celular, citotoxicidade, indução de apoptose e expressão dos genes CASP9, BCL XL e APC em células HT29. Dissertação de Mestrado, Unesp, Rio Claro- SP, 2011.

MAURO, M.O.; SARTORI, D.; OLIVEIRA, R.J.; ISHII, P.L.; MANTOVANI, M.S.; RIBEIRO, L.R. Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells. *Mutat. Res.* v.715, p. 7–12, 2011.

NAVARRO, S.D.; BEATRIZ, A.; MEZA, A.; PESARINI, J.R.; GOMES, R.S.; KARAZIACK, C.B.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; ROMÃO, W.; JÚNIOR, V.L. MAURO, M.O.; OLIVEIRA, R.J. A new synthetic resorcinolic lipid 3-

Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H isobenzofuran-1-one: Evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v.75, p.132-142, 2014.

OLIVEIRA, R.J.; MATUO, R.; SILVA, A.F.; MATIAZI, H.J.; MANTOVANI, M.S.; RIBEIRO, L.R. Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicology in vitro*. v.21, n.1, p. 41–52, 2007.

OLIVEIRA, R.J.; SALLES, M.J.; DA SILVA, A.F.; KANNO, T.Y.N.; LOURENÇO, A.C.S.; FREIRIA, G.A.; MATIAZI, H.J.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S. Effects of the polysaccharide β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* v.53, p.164–173, 2009.

PARIHAR, S.; KUMAR, A.; CHATURVEDI, A.K.; SACHAN, N.K.; LUNGMAN, S.; CHANGKIJA, B.; MANOHAR, M.; PRAKASH, O.; CHANDA, D.; KHAN, F.; CHANOTIYA, C.S.; SHANKER, K.; DWIVEDI, A.; KONWAR, R.; NEGI, A.S. Synthesis of combretastatin A4 analogues on steroidal framework and their anti-breast cancer activity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v., 137, p. 332-344, 2013.

PERO, R.W.; LEE, F.Y.F.; EDVARDSEN, K.; SJÖGREN, H.O. Use of combretastatin A4 and its prodrugs as an immune enhancing therapy. Patente n.US6773702 B2. Disponível em: <http://www.google.com/patents/US6773702> Acesso em: 27/03/2014.

PETTIT, G. R.; SINGH, S. B.; HAMEL, E.; LIN, C. M.; ALBERTS, D. S.; G.-KENDALL D. *Experientia*, v.45, p.209, 1989.

PETTIT, G. R.; TOKI, B.; HERALD, D. L.; V.-PINARD, P.; BOYD, M. R.; HAMEL, E.; PETTIT, R. K. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.41, p.1688, 1998.

ROVOZZO, G.C.; BURKE, CN. *A manual of basic virological techniques*. New Jersey: Prentice Hall, p. 159, 1973.

SANTOS, E.A.; Hamel, E.; Bai, R.; Burnett, J. C.; Tozatti, C. S. S.; Bogo, D.; Perdomo, R. T.; Antunes, A. M. M.; Marques, M. M.; Matos, M. F. C.; Lima, D. P. Synthesis and evaluation of diaryl sulfides and diaryl selenide compounds for antitubulin and cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 23, p. 4669–4673, 2013.

SIEMANN, D.W.; CHAPLIN, D.J.; WALICKE, P.A.. A review and update of the current status of the vasculature-disabling agent combretastatin-A4 phosphate (CA4P). *Expert Opin. Invest. Drugs*. v.18, p.189–197, 2009.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exper. Cell Res.*, v.175, p.184-191, 1988.

SŁOCZYŃSKA, K.; POWROŹNIK, B.; PEKALA, E.; WASZKIELEWICZ, A. M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J Appl Genetics*, v. 55, 273-285, 2014.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

WATERS, M.D.; BRADY, A.L.; STACK, H.F.; BROCKMAN, H.E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. *Mutat. Res.* v.238, p.57-85, 1990.

WENT, VAN G.F. Mutagenicity testing of 3 hallucinogens:LSD, psilocybin and Δ^9 -THC, using the micronucleus test. *National Institute of Public Health*, p.324-325, 1977.

ZHANG, Q.; PENG, Y.; WANG, X. I.; KEENAN, S. M.; ARORA, S.; WELSH, W. J. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.50, p.749, 2007.

ZU-WEI. G.; BAO-ZHEN, Z.; NATH, B.; WEN-ZONG, W.; WALLACE, W.E.; TONG-MAN, O. Micronucleus induction and phagocytosis in mammalian cells treated with diesel emission particles. *Mut. Res.* v.279, n. 1, p.55-60, 1992.

4. Anexos

Tabela 2. Média dos pesos inicial e final, e ganho de peso dos animais no período experimental

Grupos	Peso inicial	Peso final (g)	Ganho de
Controles			
C -	33,00±1,73 ^a	33,80±1,59 ^a	0,80±0,49 ^a
CP	31,60±0,24 ^a	34,00±0,45 ^a	2,40±0,20 ^a
Diarilsulfeto 1			
D1 5mg/Kg	38,60±1,81 ^a	39,20±1,56 ^a	0,60±0,60 ^a
D1 7,5mg/Kg	35,20±1,56 ^a	37,00±1,30 ^a	1,80±0,37 ^a
D1 10mg/Kg	34,60±2,34 ^a	35,40±2,32 ^a	0,80±0,49 ^a
CP+D1	35,60±1,87 ^a	34,80±1,88 ^a	-0,80±0,20 ^a
CP+D1	36,00±0,84 ^a	34,60±0,68 ^a	-1,40±0,40 ^a
CP+D1	37,80±2,38 ^a	37,20±2,08 ^a	-0,60±0,51 ^a
Diarilsulfeto 2			
D2 5mg/Kg	37,80±1,72 ^a	38,60±1,81 ^a	0,80±0,37 ^a
D2 7,5mg/Kg	32,00±0,32 ^a	33,60±0,24 ^a	1,60±0,51 ^a
D2 10mg/Kg	33,80±1,66 ^a	35,60±2,29 ^a	1,80±0,66 ^a
CP+D2	33,00±2,93 ^a	34,80±3,02 ^a	1,80±0,58 ^a
CP+D2	33,00±1,00 ^a	34,40±0,81 ^a	1,40±0,81 ^a
CP+D2	35,20±0,66 ^a	37,60±0,87 ^a	2,40±1,17 ^a

Tabela 3. Valores médios ± erro padrão da média do peso relativo dos órgãos dos animais após o período de experimentação

Grup	Coraç	Pulmão	Fígado	Rins	Baço
Peso Relativo (g)					
Controles					
C -	0,0060	0,0092±	0,0480	0,0131	0,0038±0
CP	0,0055	0,0058±	0,0393	0,0125	0,0027±0
1					
D(1)	0,0065	0,0090±	0,0482	0,0144	0,0059±0
D(1)	0,0066	0,0085±	0,0467	0,0129	0,0044±0
D(2)	0,0050	0,0072±	0,0477	0,0124	0,0059±0
CP+D	0,0167	0,0075±	0,0494	0,0145	0,0030±0
CP+D	0,0058	0,0081±	0,0486	0,0132	0,0026±0
CP+D	0,0061	0,0102±	0,0547	0,0147	0,0046±0
2					
D(2)	0,0051	0,0072±	0,0475	0,0138	0,0057±0
D(2)	0,0054	0,0062±	0,0471	0,0123	0,0046±0
D(2)	0,0045	0,0062±	0,0433	0,0123	0,0048±0
CP+D	0,0064	0,0070±	0,0437	0,0133	0,0028±0
CP+D	0,0055	0,0069±	0,0411	0,0136	0,0025±0
CP+D	0,0055	0,0073±	0,0449	0,0134	0,0064±0

Tabela 4. Valores médios \pm erro padrão da média da frequência de células lesionadas, distribuição entre as classes de danos e escore referentes aos testes de (anti)genotoxicidade dos diarilsulfetos 1 e 2 no ensaio do cometa em sangue periférico de camundongos.

Grupos Experime	Célul as	Classes de danos				Escor e	Porc enta
		0	1	2	3		
Controles							
C -	13,00	87,00	13,	0,0	0,0	13,00	-
CP	87,20	12,80	37,	24,	25,	162,2	-
D1	30,20	69,80	22,	7,4	0,0	37,60	
D1	40,20	59,80	32,	7,6	0,0	47,80	
D1	49,40	50,60	39,	9,4	0,4	59,60	
CP+D1	89,80	12,60	40,	34,	15,	154,2	3,77
CP+D1	93,60	6,40 \pm	45,	34,	14,	156,4	8,89
CP+D1	99,40	0,60 \pm	42,	36,	20,	177,2	16,71
D2	21,20	78,80	17,	4,2	0,0	25,40	-
D2	21,20	78,20	15,	6,0	0,0	27,20	-
D2	20,00	80,00	17,	3,0	0,0	23,00	-
CP+D2	85,00	15,00	35,	34,	15,	149,6	0,03
CP+D2	83,80	16,20	38,	33,	12,	140,8	0,05
CP+D2	83,00	17,00	38,	32,	12,	140,6	0,06

Tabela 5. Frequência total e valores médios \pm erro padrão da média referentes ao ensaio de micronúcleo em sangue periférico de camundongos:

Grupos Experimentais	Média \pm EPM			Porcentagem de redução de danos %		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
	Controles					
C -	14,80 \pm 1,74 ^a	12,20 \pm 1,65 ^a	10,8 \pm 1,39 ^{a,b}	-	-	-
C +	72,40 \pm 2,58 ^e	55,40 \pm 1,69 ^e	34,6 \pm 1,78 ^e	-	-	-
	Diarilsulfeto 1			Porcentagem de incremento de danos (%)		
D(1) 5mg/Kg	24,80 \pm 0,86 ^b	22,20 \pm 1,02 ^b	13,60 \pm 0,81 ^{a,b}	-	-	-
D(1) 7,5mg/Kg	36,80 \pm 0,73 ^c	33,80 \pm 0,37 ^c	21,60 \pm 0,51 ^c	-	-	-
D(1) 10mg/Kg	44,60 \pm 0,51 ^d	41,60 \pm 0,51 ^d	25,80 \pm 1,16 ^d	-	-	-
Ass(1)	80,00 \pm 0,71 ^f	76,40 \pm 0,93 ^f	43,00 \pm 1,05 ^{f,g}	13,19%	48,61%	35,29%
Ass(1)	84,60 \pm 0,51 ^f	77,20 \pm 0,73 ^f	46,00 \pm 1,14 ^{g,h}	21,18%	50,46%	47,90%
Ass(1)	93,00 \pm 0,71 ^g	80,60 \pm 0,68 ^f	51,40 \pm 0,51 ^h	35,76%	58,33%	70,58%
	Diarilsulfeto 2			Porcentagem de redução de danos (%)		
D(2) 5mg/Kg	14,20 \pm 1,24 ^a	10,20 \pm 0,97 ^a	7,60 \pm 0,51 ^a	-	-	-
D(2) 7,5mg/Kg	20,20 \pm 1,65 ^{a,b}	16,00 \pm 0,89 ^a	9,60 \pm 2,38 ^a	-	-	-
D(2) 10mg/Kg	22,00 \pm 0,71 ^b	14,80 \pm 0,97 ^a	17,40 \pm 2,01 ^{b,c}	-	-	-
Ass(2)	71,40 \pm 2,06 ^e	54,00 \pm 0,84 ^e	36,20 \pm 1,69 ^{e,f}	0,02%	0,03%	-0,07%
Ass(2)	70,40 \pm 2,29 ^e	56,20 \pm 1,93 ^e	34,00 \pm 1,90 ^e	0,03%	-0,02%	0,03%
Ass(2)	68,60 \pm 1,03 ^e	56,00 \pm 2,21 ^e	34,60 \pm 2,42 ^e	0,07%	-0,01%	0,00%

Tabela 6. Número total, frequência média \pm erro padrão da média (EPM) e porcentagem de células com evidência de fagocitose esplênica em camundongos:

Grupos Experimentais	Total de células com evidência de Fagocitose	
	Média \pm EPM	Porcentagem (%)
	Controles	
C -	85,40 \pm 1,78 ^a	42,7
C +	155,20 \pm 1,28 ^{e,f}	77,6
	Diarilsulfeto 1	
D(1) 5mg/Kg	91,20 \pm 0,58 ^{a,b}	45,6
D(1) 7,5mg/Kg	92,40 \pm 1,12 ^{a,b}	46,2
D(1) 10mg/Kg	94,40 \pm 1,21 ^{a,b}	47,2
Ass(1) 5mg/Kg	159,60 \pm 1,36 ^f	79,8
Ass(1) 7,5mg/Kg	170,80 \pm 0,73 ^g	85,4
Ass(1) 10mg/Kg	179,40 \pm 1,36 ^g	89,7
	Diarilsulfeto 2	
D(2) 5mg/Kg	99,60 \pm 1,63 ^b	49,8
D(2) 7,5mg/Kg	114,40 \pm 1,88 ^e	57,2
D(2) 10mg/Kg	129,20 \pm 5,05 ^d	64,6
Ass(2) 5mg/Kg	146,80 \pm 5,46 ^e	73,4
Ass(2) 7,5mg/Kg	138,60 \pm 1,03 ^{d,e}	69,3
Ass(2) 10mg/Kg	109,60 \pm 2,98 ^c	54,8

Tabela 7. Avaliação da apoptose em fígado, rins e baço de camundongos:

Grupos Experimentais	Fígado	Rim	Baço
	Média±EPM	Média±EPM	Média±EPM
Controles			
C-	1,20±0,37 ^a	0,60±0,24 ^a	1,20±0,20 ^a
CP 100mg/Kg	21,80±0,58 ^f	20,20±0,58 ^e	21,60±0,93 ^e
Diarilsulfeto 1			
D1 5mg/Kg	2,80±0,37 ^{a,b}	1,20±0,20 ^a	2,80±0,37 ^{a,b}
D1 7,5mg/Kg	4,00±0,32 ^{b,c}	3,20±0,37 ^{a,b}	4,80±0,37 ^{b,c}
D1 10mg/Kg	6,40±0,51 ^c	5,80±0,58 ^b	6,20±0,86 ^c
D1 5mg/Kg +	23,00±0,89 ^f	20,40±0,51 ^e	22,00±1,00 ^e
D1 7,5mg/Kg +	27,80±0,58 ^g	24,60±1,08 ^f	27,20±0,73 ^d
D1 10mg/Kg +	36,00±0,71 ^h	32,60±0,68 ^g	35,40±0,51 ^f
Diarilsulfeto 2			
D2 5mg/Kg	1,80±0,37 ^{a,b}	1,20±0,20 ^a	1,60±0,24 ^{a,b}
D2 7,5mg/Kg	2,80±0,37 ^{a,b}	1,80±0,20 ^a	2,80±0,49 ^{a,b}
D2 10mg/Kg	4,00±0,32 ^{b,c}	3,00±0,32 ^a	4,60±0,40 ^{b,c}
D2 5mg/Kg +	10,40±0,51 ^d	9,80±0,37 ^c	11,40±0,40 ^d
D2 7,5mg/Kg +	14,20±0,37 ^e	13,20±0,37 ^d	14,00±0,45 ^d
D2 10mg/Kg +	21,80±0,58 ^f	21,00±1,05 ^e	22,00±0,84 ^e



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 399/2012 do Pesquisador Rodrigo Juliano Oliveira referente ao projeto de pesquisa **“Avaliação de atividade (anti) mutagênica, imunomodulária, apoptótica e histopatológica dos lipídeos resorcinólicos MAS-35AA, MAS-35BB e MAS-49 *in vivo*”**, está de acordo com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária de 23 de março de 2012.

Campo Grande (MS), 23 de março de 2012.

Dr^a Joice Stein
Coordenadora da CEUA