



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

BEATRIZ FERNANDES DE SOUZA

**EFEITOS DO COMPOSTO MESOIÔNICO MC-1 NO MODELO
EXPERIMENTAL DE TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH**

**João Pessoa
2019**

BEATRIZ FERNANDES DE SOUZA

EFEITOS DO COMPOSTO MESOIÔNICO MC-1 NO MODELO
EXPERIMENTAL DE TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas
da Universidade Federal da Paraíba, como
parte dos requisitos para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

João Pessoa, 06 de maio de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a Márcia Regina Piuvezam
Orientador (a)

Prof. Gláucia Veríssimo Faheina Martins
Professor (a) avaliador (a)

Prof. Naila Francis Paulo de Oliveira
Professor (a) avaliador (a)

Maio de 2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S729e SOUZA, Beatriz Fernandes de.
EFEITOS DO COMPOSTO MESOIÔNICO MC-1 NO MODELO
EXPERIMENTAL DE TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH / Beatriz
Fernandes de Souza. - João Pessoa, 2019.
54f. : il.

Monografia (Graduação) - UFPB/CCEN.

1. Compostos mesoiônicos. 2. Atividade antitumoral. 3.
Tumor Ascítico de Ehrlich. I. Título

UFPB/CCEN



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Centro de Ciências Exatas e da Natureza

Coordenação do Curso de Ciências Biológicas

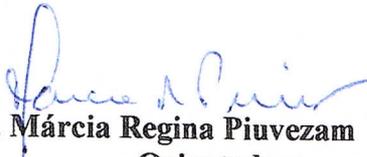
Telefone: (083) 3216.7439, Fax (083) 3216.7464.

CEP 58059-900 - João Pessoa, PB, Brasil. e-mail: cccb@dse.ufpb.br

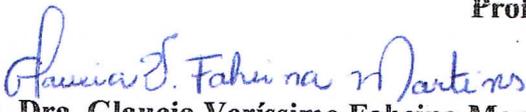
Ata da Apresentação e Defesa de Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso de BEATRIZ FERNANDES DE SOUZA

Aos seis dias do mês de maio de dois mil e dezanove, Sala de Reuniões do CCEN da Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa-PB, reuniu-se, em caráter de solenidade pública, às dez horas, a Banca Examinadora do Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso da estudante **BEATRIZ FERNANDES DE SOUZA**, composta pelos seguintes professores doutores: **Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam/** Orientador e Presidente da Banca Examinadora, **Profa. Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira/** Examinador e **Profa. Dra. Glaucia Veríssimo Faheina Martins** Examinador. Compareceram à solenidade, além da estudante e dos três membros da Banca Examinadora, alunos e professores do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba. Dando início à sessão houve a apresentação da estudante. Em seguida fez-se a apresentação da Banca Examinadora e passou a presidência da sessão para a **Márcia Regina Piuvezam** que, concomitantemente, assumiu a posição de orientadora e presidente da sessão que, após declarar o objeto da solenidade, concedeu a palavra a estudante, candidata ao Grau de **Bacharela** em Ciências Biológicas, para que dissertasse, oral e sucintamente, a respeito do trabalho de título “Efeitos do composto mesoiônico (MI-01) no modelo experimental de Tumor Ascítico de Ehrlich” Passando então a discorrer sobre o referido tema, dentro do prazo legal, a estudante foi a seguir arguida pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a Comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe as seguintes notas: **Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam** 10,0 **Profa. Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira** 10,0 e **Profa. Dra. Glaucia Veríssimo Faheina Martins** 10,0. Com média final 10,0. Perante a aprovação, declarou-se a estudante legalmente habilitada a receber o Grau de **Bacharela** em Ciências Biológicas. Nada mais havendo a tratar eu, **Márcia Regina Piuvezam**, como Presidente, lavro a presente Ata que, lida e aprovada, assino juntamente com os demais membros da Banca Examinadora.

João Pessoa, 06 de maio de 2019


Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam
Orientadora


Profa. Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira
Titular


Profa. Dra. Glaucia Veríssimo Faheina Martins
Titular


Vitor Daniel C. M. Teixeira
Secretário da Coordenação
de Ciências Biológicas
Mat. SIAPE 2330739

*Aos meus pais Josué (in memoriam) e Elizabeth, autores dos meus dias.
Com todo meu carinho e gratidão.*

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho foi resultado de um conjunto de contribuições, esforços e inspirações de diversas pessoas. Agradeço profundamente a todos os professores, funcionários, familiares e amigos, sem os quais não seria possível a conclusão e o desenvolvimento do mesmo.

Agradeço à minha mãe Elizabeth Fernandes de Araújo, não só pela minha vida, mas por toda a trajetória, por todos os esforços, pelas batalhas vencidas e por ser meu maior exemplo de coragem, determinação e força. Pelos inúmeros sacrifícios feitos e pelo carinho e amor inquestionáveis.

Ao meu pai, Josué Soares de Souza (*in memoriam*), pelo profundo amor que me foi dado e pelo exemplo que, até hoje, perdura através do tempo.

Aos meus irmãos Rafael e Leonardo, por serem o alicerce sob o qual eu cresci e me moldei, que foram e continuam sendo suporte sempre que necessário na minha caminhada. À meu tão querido amigo Antônio Gonçalves, pela sua presença fiel, sua compreensão e seu carinho.

Aos meus queridos amigos, com quem compartilhei experiências edificantes, conversas úteis (e inúteis) e que me acompanham nessa jornada, estando presentes nas mais diversas situações, que se alegraram comigo e também me apoiaram quando foi preciso. Um especial agradecimento à Maria Rafaella Freire, pela amizade fiel, pelo suporte, pelas alegrias e pelo aprendizado.

Aos meus professores, que me guiaram até onde cheguei. Um agradecimento ainda mais especial a Dado Melo (meu querido Dadinho) e a Esdras de Freitas, pelas aulas incríveis.

Agradeço à minha orientadora e amiga, professora Márcia Piuvezam, pelos valiosos conselhos, pela gentileza e pela sabedoria. Através das suas aulas, me apaixonei pela imunologia e graças a sua solicitude, pude adentrar no meio científico. Obrigada por me receber de braços abertos no Laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA).

Agradeço aos meus amigos e companheiros do projeto Ehrlich: Gabriel Rodrigues, Beatriz Calado e Matheus Mathias. Vocês me ensinaram muito! Obrigada pelo companheirismo, por toda a ajuda e por tornar os dias de trabalho mais leves. Vocês são incríveis. Agradeço também a Amanda Salmeron pelo conhecimento compartilhado.

Aos integrantes do LIMFA: Allysson Gadelha, Raquel Fragoso, Larissa Rodrigues, Laércia Paiva, Larissa Adilis, Grasiela, Tamires, João, Louise, Cosmo e a todos os amigos que fiz. Obrigada pelo incentivo, pelo conhecimento compartilhado, por serem sempre prestativos e comprometidos.

Agradeço ao Professor Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, professor do Depart-

mento de Química da UFPB e coordenador do Laboratório de Pesquisa em Bioenergética e Síntese Orgânica (LPBS), responsável pela síntese e doação do composto mesoiônico.

Agradeço à CAPES e ao Projeto Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) pela oportunidade de desenvolvimento e incentivo à pesquisa científica.

Por fim, quero agradecer a cada professor do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba. Vocês contribuíram das mais diversas formas para o meu crescimento intelectual e são peças cruciais para a formação de inúmeras pessoas. Seus esforços e contribuições são recompensados pelos incríveis pesquisadores e professores que participam ativamente do desenvolvimento do nosso país.

RESUMO

O câncer é uma doença multifatorial onde as células do organismo se dividem de forma anormal e descontrolada. Em 2018, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) estimou o surgimento de 18,1 milhões de novos casos de câncer no mundo e 9,6 milhões de mortes relacionadas. Considerando as limitações ainda existentes no tratamento do câncer (falta de especificidade e os fortes efeitos colaterais dos antineoplásicos), estudos que visem a descoberta de novas substâncias com potencial antitumoral são necessários. Os compostos mesoiônicos são substâncias sintéticas, heterocíclicas, constituídas por um anel heterocíclico de cinco átomos. Essas substâncias destacam-se por possuírem potenciais aplicações terapêuticas devido à possibilidade de introdução de heteroátomos no anel. Dados da literatura revelam atividades biológicas, como efeitos antiparasitários, antibacterianos e antineoplásicos destes compostos. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do mesoiônico 1,4-difenil-5-(5-nitro-2-furanil)-1,3,4-cloreto de tiadiazólio-2-tiol (MC-1) no desenvolvimento e na fisiopatologia do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE). A eficácia do MI-01 foi avaliada através da análise de parâmetros como a circunferência abdominal, o peso dos animais e o volume do tumor, que estão diretamente ligados à progressão tumoral, além de análises histopatológicas. As células do fluido ascítico também foram contadas e analisadas a fim de inferir o potencial neoplásico da substância e a capacidade imunomoduladora da mesma. Como resultado, observou-se que o tratamento com o composto mesoiônico foi eficaz frente aos parâmetros analisados: inibiu o ganho de peso dos animais, reduziu a formação do líquido ascítico, diminuiu a circunferência abdominal, reduziu a quantidade de células totais no sítio tumoral, modulou o perfil celular inflamatório, além de reverter as alterações histopatológicas provenientes do desenvolvimento do TAE.

Palavras-chave: Compostos mesoiônicos, atividade antitumoral, Tumor Ascítico de Ehrlich.

ABSTRACT

Cancer is a multifactorial disease in which the cells of the organism divide themselves in an abnormal and uncontrolled manner. In 2018, The International Agency for Research on Cancer (IARC) estimated the emergence of 18.1 million new cases of cancer in the world and 9.6 million of related deaths. Considering the limitations still existent on cancer treatment, antineoplastics' lack of specificity and strong side effects, studies aimed at the discovery of new substances with antitumor potential are necessary. Mesoionic compounds are synthetic, heterocyclic substances, consisting of a five-membered heterocyclic ring. These compounds are relevant for having potential therapeutic applications due to the possibility of introducing heteroatoms in the ring. Literature data reveals these compounds' biological activity, like anti-parasitic, antibacterial and antineoplastic effects. Therefore, the objective of this work was to investigate the effects of the mesoionic 1,4-diphenyl-5-(5-nitro-2-furanyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-thiol chloride (MC-1) in the development and pathophysiology of Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC). The efficacy of MI-01 was assessed by analyzing parameters such as abdominal circumference, animal weight and tumor volume, that are directly related to tumor progression, as well as histopathological analyses. Ascitic fluid cells were also counted and analyzed to infer the neoplastic potential and the immunomodulatory capacity of the substance. As a result, it was observed that the the treatment with the mesoionic compound was effective against the parameters analyzed: it inhibited the weight gain of the animals, reduced ascitic fluid formation, decreased abdominal circumference, reduced the amount of total cells at the tumor site, modulated the inflammatory cellular profile, in addition to reversing the histopathological alterations provinetes of the development of the EAC.

Key-words: Mesoionic compounds, antitumor activity, Ehrlich Ascites Tumor.

LISTA DE FIGURAS

1	Inflamação peritumoral	5
2	Componente celular e humoral associado ao tumor	5
3	Tumor de Ehrlich em sua forma sólida e ascítica	7
4	Representação genérica para os compostos mesoiônicos	7
5	Substância 1,4-difenil-5-(5-nitro-2-furanyl)-1,3,4-cloreto de tiadiazólio-2-tiol (MC-1)	12
6	Representação esquemática da distribuição dos animais por grupo experimental	13
7	Representação esquemática do protocolo de tratamento com o MC-1	13
8	Representação esquemática do protocolo de obtenção do lavado peritoneal e dos órgãos	15
9	Animais tratados com a dose de 50 mg/kg do MC-1	18
10	Micrografia das células coradas com o kit Panótico para contagem diferencial com objetiva de 100x	24
11	Fotomicrografias representativas do baço de camundongos	25
12	Fotomicrografias representativas do fígado de camundongos	26
13	Fotomicrografias representativas dos rins de camundongos	27

LISTA DE GRÁFICOS

1	Varição do peso dos animais	17
2	Circunferência abdominal	19
3	Volume do tumor	20
4	Células viáveis no fluido ascítico	21
5	Contagem diferencial de macrófagos	22
6	Contagem diferencial de linfócitos	22
7	Contagem diferencial de neutrófilos	22

LISTA DE TABELAS

1	Compostos mesoiônicos e suas atividades biológicas.	9
2	Volume do tumor	20

LISTA DE ABREVIATURAS

- AID:** citidina desaminase induzida por ativação
- ANOVA:** análise de variância
- bFGF:** fator de crescimento fibroblástico básico
- CD:** célula dentrítica
- CD95L:** *cluster of differentiation ligand 95*
- CMDS:** célula mieloderivada supressora
- CONCEA:** Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CXCL-8:** quimiocina cxc ligante 8
- DAMP:** padrão molecular associado ao dano
- DNA:** ácido desoxirribonucleico
- EGF:** fator de crescimento epidérmico
- FasL:** antígeno de apoptose 1
- FGF:** fator de crescimento de fibroblastos
- H2O2:** peróxido de hidrogênio
- IARC:** Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
- IFN:** interferon
- IL:** interleucina
- i.p.:** intraperitoneal
- INCA:** Instituto Nacional de Câncer
- LT:** linfócito T
- LTreg:** linfócito T regulatório
- MAT:** macrófago associado ao tumor
- MC-1:** mesoiônico 1,4-difenil-5-(5-nitro-2-furanil)-1,3,4-cloreto de tiadiazólio-2-tiol
- MCP-1:** proteína quimioatraente de monócito 1
- MCP:** morte celular programada
- MMP-9:** metaloproteinase de matriz 9
- n:** número de animais
- NAT:** neutrófilo associado ao tumor

NCI: *Nacional Institute of Cancer*

NO: óxido nítrico

NK: *natural killer*

PBS: tampão salina fosfato

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

PGE2: prostaglandina E2

RNS: espécie reativa de nitrogênio

ROS: espécie reativa de oxigênio

rpm: rotações por minuto

SN: sistema nervoso

SNC: sistema nervoso central

TAE: tumor ascítico de Ehrlich

TE: tumor de Ehrlich

TGF: fatores de crescimento tumoral

TNF: fator de necrose tumoral

TRAIL: ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

VEGF: fator de crescimento endotelial

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1	Aspectos gerais do câncer e seus mecanismos moleculares	2
2.2	Inflamação e microambiente tumoral	4
2.3	Tumor Ascítico de Ehrlich	6
2.4	Compostos mesoiônicos	7
3	OBJETIVOS	10
3.1	Objetivo geral	10
3.2	Objetivos específicos	10
4	METODOLOGIA	11
4.1	Animais	11
4.2	Eutanásia	11
4.3	Células do TAE (Tumor Ascítico de Ehrlich)	11
4.3.1	Manutenção das células <i>in vitro</i>	11
4.3.2	Indução do Tumor Ascítico de Ehrlich para experimentação <i>in vivo</i> . . .	12
4.4	Obtenção do composto mesoiônico	12
4.5	Tratamento com MC-1	12
4.6	Análise dos parâmetros tumorais	13
4.6.1	Variação do peso	13
4.6.2	Circunferência	14
4.6.3	Lavado peritoneal	14
4.6.4	Contagem celular diferencial	14
4.6.5	Coleta dos órgãos e histologia	14
4.7	Análise estatística	16
5	RESULTADOS	17
5.1	Peso dos animais	17

5.2	Circunferência abdominal	19
5.3	Volume do tumor	20
5.4	Contagem celular	21
5.4.1	Células viáveis	21
5.4.2	Contagem diferencial	21
5.5	Histologia	25
5.5.1	Baço	25
5.5.2	Fígado	26
5.5.3	Rins	27
6	DISCUSSÃO	28
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
	ANEXO A - Certificado de Aprovação - CEUA	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

Em 2018, estimou-se o surgimento de 18,1 milhões de novos casos de câncer no mundo e 9,6 milhões de mortes relacionadas, além disso, a doença incide em pelo menos um em cada cinco homens, e uma a cada seis mulheres (IARC, 2018). O tratamento do câncer se dá em função de sua origem biológica e do estágio em que esta se encontra a doença, sendo assim, dentre as diversas formas de abordagens, a quimioterapia é um dos tratamentos mais utilizados na clínica oncológica (BRASIL, 2019). Os estudos científicos em busca de novas substância com potencial antineoplásico têm crescido, resultando na padronização e na adequação de novos modelos experimentais que possibilitem avanços na área da oncologia (SCHULZ, 2007).

O Tumor de Ehrlich (TE) possui características bem descritas e sua utilização como modelo experimental permite observar como diferentes substâncias conseguem apresentar efeitos na proliferação das células cancerígenas. Ozaslan *et al.* (2011) descreveu o Tumor Ascítico de Ehrlich como um carcinoma de crescimento espontâneo rápido, indiferenciado e de comportamento agressivo, sem regressão espontânea, resultando na morte do animal. O TE foi descrito pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1905 (EHRlich e APOLANT, 1905), mas sua forma ascítica somente foi descoberta em 1932 por de Loewenthal e Jahn (CASTRO DA SILVA *et al.*, 2017).

Os compostos sintéticos, bem como as substâncias heterocíclicas, são conhecidos pela sua ampla aplicação no meio farmacêutico no combate de várias doenças (CORELL *et al.*, 1994). Os compostos mesoiônicos são substância sintéticas e heterocíclicas e destacam-se por possuírem grande potencial em aplicações terapêuticas, pois, sua configuração estrutural permite inúmeras atividades biológicas. Essas substâncias são relativamente pequenas e possuem caráter anfifílico (ATHAYDE FILHO *et al.*, 2000). Elas estão inclusas no grupo das betaínas heterocíclicas por serem estruturalmente planas, com cinco átomos, pelo menos uma cadeia lateral e um átomo alfa no mesmo plano do anel. Não são compostos aromáticos, apesar de apresentarem momento dipolo (JALES, 2005).

As substâncias mesoiônicas possuem importantes atividades biológicas documentadas como, efeito antiparasitário (FERREIRA *et al.*, 2008), atividade leishmanicida (RODRIGUES *et al.*, 2007), ação antibacteriana (ATHAYDE-FILHO *et al.*, 1996) e efeitos antidepressivos (YASHUSKII e KHOLODOV, 1980). Dessa forma, tendo em vista as diversas aplicações dos compostos mesoiônicos, este trabalho visa investigar o papel do MI-01 no desenvolvimento e na fisiopatologia do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE), considerando parâmetros fisiológicos, inflamatórios e morfo-hitológicos dos animais em modelo murino.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais do câncer e seus mecanismos moleculares

Câncer é a definição utilizada para uma situação em que as células de um organismo se dividem de forma anormal e descontrolada, podendo invadir tecidos adjacentes (INCA, 2019). As células de tecidos normais possuem seu crescimento controlado pela maquinaria da divisão celular, que é orquestrada pela produção, liberação, reconhecimento e inibição de sinais promotores de crescimento a fim de estabelecer a homeostase tecidual, contudo, as células tumorais escapam desse ciclo natural do crescimento por várias vias, sendo as mais comuns àquelas ligadas ao crescimento autossuficiente (PAIER *et al.*, 2018).

De uma maneira geral, o câncer pode ser considerado uma síndrome, pois reúne um total de 200 doenças que compartilham algumas características em comum, mas que diferem grandemente em relação a sua etiologia (*i.e.* origem genética, histopatológica, prognóstico, agressividade e tratamento) (SAITO, 2015).

A oncogênese, ou carcinogênese, pode acontecer por mecanismos químicos, físicos ou biológicos que irão causar mutações no DNA celular, provocar instabilidade genômica e ativar proto-oncogenes. Estes genes são parcialmente ativos em células normais, mas ao sofrerem mutações, transformam-se em oncogenes, resultando no fenótipo de célula cancerosa. A exposição continuada a agentes cancerígenos possui efeitos cumulativos, que lentamente poderão estabelecer a doença (PECORINO, 2016). O processo é composto pelas etapas de iniciação, promoção e progressão do tumor, onde genes-alvo sofrem alterações por agentes cancerígenos, originando assim uma multiplicação descontrolada e irreversível (INCA, 2018).

Dentre as características comuns compartilhadas entre os tipos de câncer, a imortalidade replicativa, que é estabelecida por um sinal de proliferação contínua, evasão de supressores tumorais e a resistência à morte, é a mais representativa. Além disso, células cancerosas são capazes de se auto-ativar por meio de um feedback positivo de produção de fatores de crescimento, e, portanto, ganhando independência dos sinais de outras células e tecidos adjacentes (VERMEULEN, 2003; HANAHAN, 2000).

Por outro lado, no metabolismo dessas células, a glicólise passa a ser feita em detrimento da fosforilação oxidativa, que normalmente é o principal meio de obtenção de energia (HANAHAD, 2011). Para que as células consigam se manter viva com esse aumento da demanda de nutrientes, fatores também serão produzidos a fim de induzir a angiogênese (*e.g.* Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), angiopoietinas-1 e 2, Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Proteína Químioatraente de Monócito 1 (MCP-1) e Fator de Crescimento Fibroblástico básico (bFGF)), e estabelecer uma nova rede de vasos sanguíneos e capilares voltadas para a nutrição da massa tumoral. O processo de neovascularização ocorre na fisiologia normal do organismo ao longo da vida e é estimulado por eventos fisiológicos como

a hipóxia, ativação de oncogenes e mutações em genes supressores tumorais (SIVEEN, 2017).

A nova rede de vasos sanguíneos que permeia a massa tumoral, além de permitir a continuidade dos processos vitais e biológicos das células cancerosas, exerce um papel crucial durante a metástase, fornecendo rotas para a disseminação do tumor (TOMINAGA; KATSUDA; OCHIYA, 2015). Por fim, para o que o tumor consiga se estabelecer com sucesso, a neoplasia precisará então adquirir evasão à resposta imune do organismo, já que esse sistema consegue debelar a maioria dos processos neoplásicos insipientes que surgem durante a vida (HANAHAN, 2011).

Após o estabelecimento da neoplasia, essa pode ser caracterizada como benigna ou maligna. Essa última classificação é dada em virtude da capacidade de invasão tecidual e metástase dessas células. Esses eventos configuram um dos aspectos mais letais do câncer, já que até o presente momento, o tratamento de doenças metastáticas possui baixa taxa de sucesso (INCA, 2018).

Em 2018, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) estimou o surgimento de 18.1 milhões de novos casos de câncer no mundo e 9.6 milhões de mortes relacionadas. De acordo com a pesquisa desenvolvida, um em cada cinco homens e uma a cada seis mulheres desenvolvem câncer durante a vida, e um em oito homens e uma em 11 mulheres morre da doença. (IARC, 2018).

O aumento da incidência de câncer na população mundial ocorre devido ao crescimento populacional e seu envelhecimento, além do nível de desenvolvimento socioeconômico. No Brasil, em 2018, estimou-se um total de 300 mil novos casos de câncer em homens, sendo os de próstata, traqueia, brônquios e pulmão os mais prevalentes no grupo. Para as mulheres, o número de novos casos previstos foi aproximadamente 282 mil, onde o câncer de mama feminina, cólon e reto e colo do útero são os mais comuns. (INCA, 2018).

O tratamento do câncer varia em função da etiologia da doença e também do estágio em que se encontra. Mais de uma abordagem pode ser utilizada gerando uma combinação de tratamentos. Dentre eles, pode-se destacar: quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, cirurgia, transplante de medula óssea e também tratamentos de precisão, em que médicos utilizam informações genéticas para selecionar tratamentos mais eficazes de acordo com as particularidades fisiológicas de cada paciente (NCI, 2017).

Os medicamentos antineoplásicos possuem boa efetividade terapêutica, e apresentam diversos mecanismos de ação como o bloqueio da síntese do DNA, impedindo assim a replicação celular, como também pode atuar nos microtúbulos além de bloquear receptores das células cancerosas. Anticorpos utilizados na imunoterapia conseguem atuar especificamente em receptores das células cancerígenas (e.g. Trastuzumabe®), que se liga aos receptores Her-2 que são hiper expressos no câncer de mama) (RANG, 2016).

A terapia antineoplásica deve ser efetiva e com o menor efeito colateral possível, entretanto, como a similaridade entre as células do tumor e as células saudáveis do organismo são grandes, os antineoplásicos se tornam limitados, pois agem de forma sistêmica e inespecífica, afetando principalmente células que estão em constante divisão (i.e. células endoteliais dos capilares, os leucócitos e células gastrointestinais) (BRUNTON, 2012). Como consequência, são observados diferentes efeitos adversos como náuseas e vômitos, alopecia, fraqueza e indisposição, imunossupressão, febre e o desenvolvimento de depressão. (SILVA e COMARELLA, 2013).

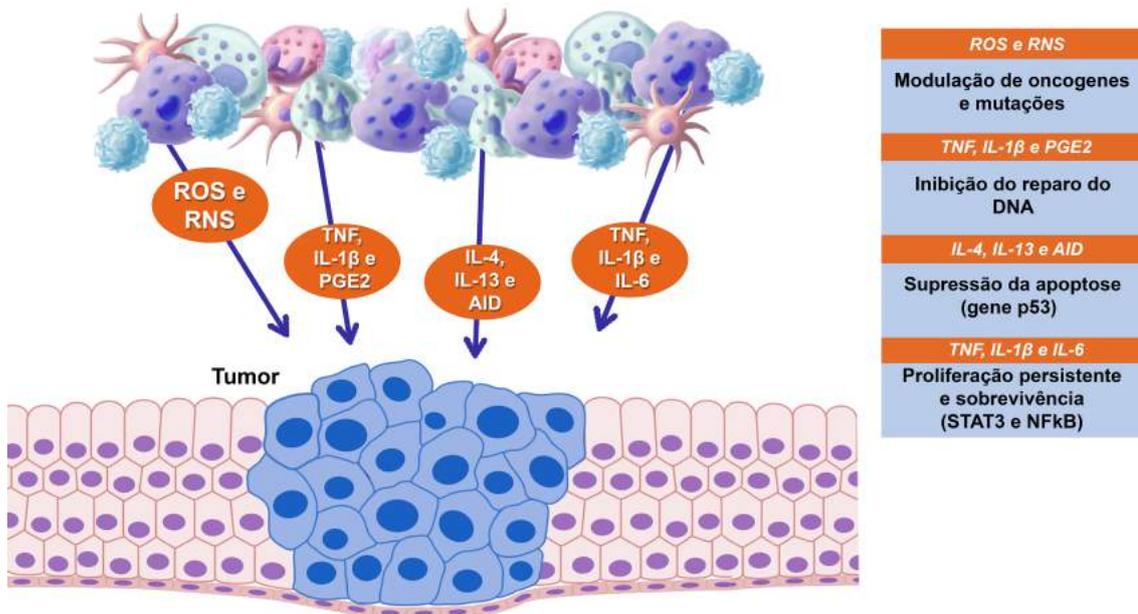
2.2 Inflamação e microambiente tumoral

A inflamação é uma resposta à lesão tecidual que utiliza sinais químicos e uma abordagem multifatorial para reestabelecer a homeostase do tecido afetado (COUSSENS e WERB, 2010). Vários componentes humorais e celulares participam desse processo, o recrutamento de leucócitos (neutrófilos, monócitos, linfócitos e etc.) bem como a produção e secreção de citocinas, interleucinas (IL) e anticorpos são primariamente direcionados para a eliminação de antígenos invasores e das células anormais do tecido, entretanto, estes componentes podem formar um arcabouço sobre o qual o tumor irá se desenvolver (CHETTIBI e FERGUSON, 1999).

A infiltração peritumoral crônica é permissiva, pois possui elevadas taxas de proliferação e sobrevivência celular, facilitando a progressão e aumentando a malignidade e potencial metastático do tumor (TRINCHIERI, 2011) (Figura 1). Geralmente, em quadros neoplásicos, há um aumento na imunidade humoral resultando em maiores concentrações de interleucinas (IL) pró-inflamatórias como IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 e IL-23, além de Fatores de Necrose Tumoral (TNF), Fatores de Crescimento Tumoral (TGF), Interferons (IFN) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS) (MANTOVANI, 2018). Por outro lado, antígenos tumorais como c-Myc, P53 e Her-2, ao invés de estabelecerem um mecanismo de citotoxicidade, estão relacionados ao crescimento tumoral, aumento da inflamação e diminuição da resposta citotóxica (SAITO, 2015).

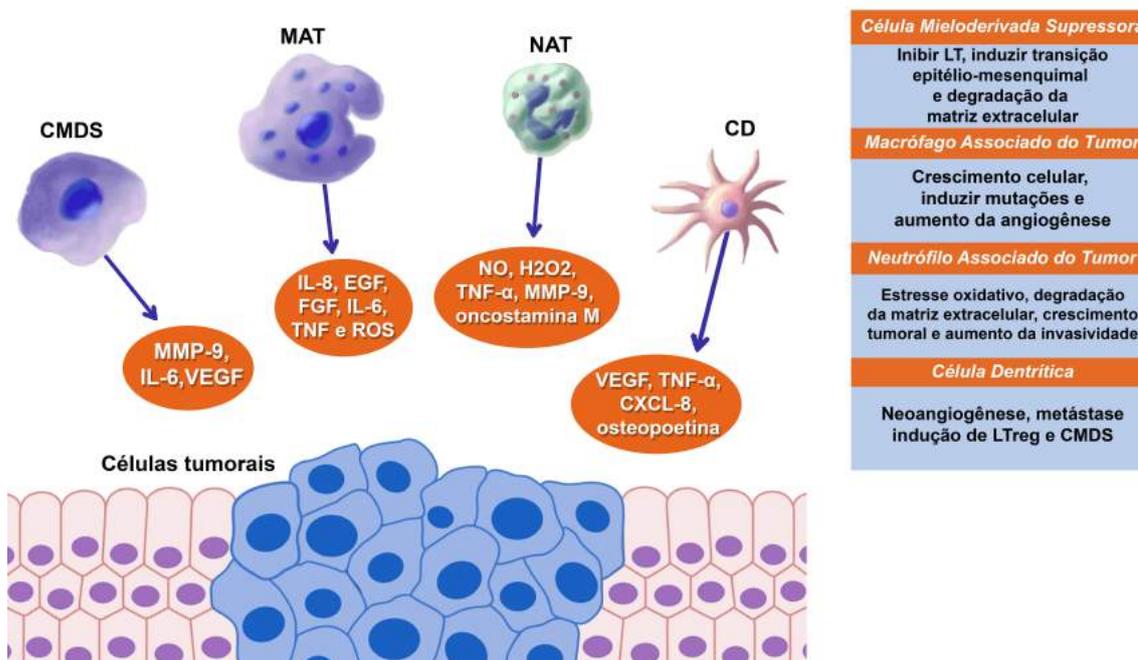
Essa modulação da resposta imunológica permite que células como os macrófagos, neutrófilos e até mesmo células dendríticas sejam cooptadas para promover o crescimento do tumor (PATHRIA; LOUIS; VARNER, 2019) (Figura 2).

Figura 1: Inflamação peritumoral



A inflamação crônica gerada no tecido que permeia as células cancerígenas propicia um microambiente favorável à carcinogênese. Fonte: elaborado pela autora.

Figura 2: Componente celular e humoral associado ao tumor



As células cancerosas estabelecem uma troca de informações através de citocinas e outros fatores solúveis com as células do sistema imune a fim de cooptar esses componentes para a progressão do tumor (CMDS: Célula Mieloderivada Supressora; MAT: Macrófago Associado ao Tumor; NAT: Neutrófilo Associado ao Tumor; CD: Célula Dendrítica). Fonte: elaborado pela autora.

2.3 Tumor Ascítico de Ehrlich

O tumor de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário transplantável de camundongo fêmea que foi descrito em 1905 por Paul Ehrlich (EHRlich e APOLANT, 1905). A sua forma ascítica somente veio a ser descoberta em 1932 a partir dos experimentos de Loewenthal e Jahn (SILVA *et al.*, 2017); a partir de então, estudos posteriores proporcionaram adequações e padronizações possibilitando assim o seu uso em experimentos quantitativos e qualitativos.

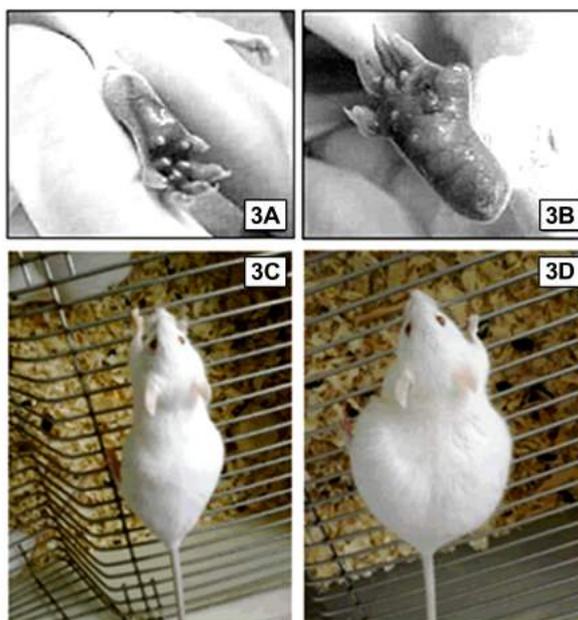
O Tumor de Ehrlich (TE) possui características bem descritas que permitem sua ampla utilização como modelo experimental e permite observar como as mais diversas substâncias conseguem apresentar efeitos na proliferação das células cancerígenas, sendo, portanto, possíveis candidatos à antineoplásicos (IBRAHIM *et al.*, 2019; ASADUZZAMAN *et al.*, 2018).

As células do TE possuem crescimento espontâneo rápido e indiferenciado, além de comportamento agressivo; seu curto período de vida não apresenta regressão espontânea e culmina, muitas vezes, na morte do animal (OZASLAN *et al.*, 2011). Em relação à sua morfologia, as células se mostram grandes, isoladas e arredondadas. Os núcleos são volumosos e a cromatina é irregular, possuindo pequenos grânulos com nucléolos que se sobressaem (CASTRO DA SILVA *et al.*, 2017).

As formas de desenvolvimento do TE variam de acordo com a via de inoculação escolhida. A forma sólida é obtida quando as células são injetadas no tecido subcutâneo ou via intramuscular de camundongos, já a forma ascítica é desenvolvida a partir de inoculação intraperitoneal (JAGANATHAN *et al.*, 2010). No Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) é possível identificar efeitos sistêmicos como esplenomegalia, hematopoese esplênica, neutrofilia e aumento na quantidade de macrófagos, sendo os mecanismos que levam a esse resultado ainda desconhecidos (SIGIURA, 1965).

A forma ascítica do tumor recebe essa denominação por produzir ascite na cavidade peritoneal do animal. Essa acumulação de fluídos na membrana que envolve os órgãos abdominais acontece na forma de exsudato, contendo proteínas, células e outros fatores relacionados ao processo inflamatório como citocinas e quimiocinas. (JÚNIOR *et al.*, 2009). Com a progressão do tumor, o peritônio apresenta coloração avermelhada devido à hemorragia e os processos de angiogênese, e dependendo da concentração de células injetadas, em poucos dias ocorre a morte do animal, devido o aumento da pressão abdominal e compressão dos órgãos adjacentes (OZASLAN, 2011).

Figura 3: Tumor de Ehrlich em sua forma sólida e ascítica

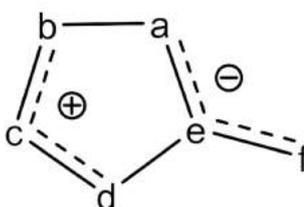


3A: coxim plantar saudável; 3B: coxim plantar com tumor sólido; 3C: animal saudável; 3D: animal com Tumor Ascítico de Ehrlich. Fonte: modificado de SILVA (2004) e YURCHENKO (2015).

2.4 Compostos mesoiônicos

Os compostos mesoiônicos são substâncias sintéticas classificadas como betaínas heterocíclicas: compostos planos com cinco membros, com pelo menos uma cadeia lateral, átomo alfa no mesmo plano do anel e apresentando momento dipolo (OLIVEIRA *et al.*, 1996). Estes compostos não são aromáticos apesar de serem estabilizados devido ao deslocar de cargas e elétrons (Figura 3) (JALES, 2005).

Figura 4: Representação genérica para os compostos mesoiônicos



Fonte: OLIVEIRA, 2009

Os compostos heterocíclicos, como os mesoiônicos, estão envolvidos em diversos processos e reações biológicas fundamentais à vida, como a síntese de energia, transmissão de impulsos nervosos, hereditariedade das informações genéticas e metabolismo (POZHARSKU

et al., 1997). Sendo assim, essas substâncias destacam-se por possuírem grande potencial em aplicações terapêuticas e um desenvolvimento de uma ampla gama de compostos devido à possibilidade de introdução de heteroátomos no anel.

Suas atividades biológicas podem ser fundamentadas em sua configuração estrutural: o tamanho relativamente pequeno associado às variações das densidades eletrônicas positiva e negativa confere-lhes caráter anfifílico (ATHAYDE FILHO *et al.*, 2000); o conjunto dessas características permite interações com biomoléculas (i.g. proteínas e DNA) (KIER, 1967).

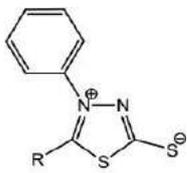
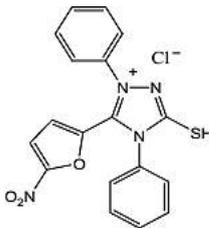
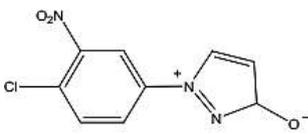
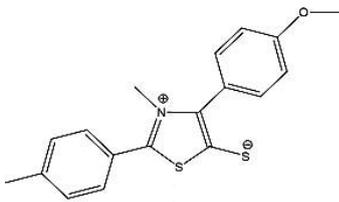
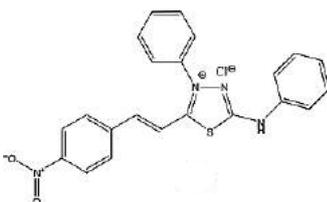
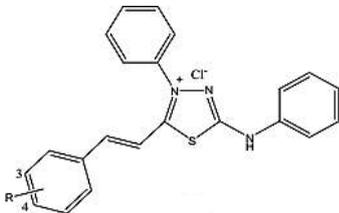
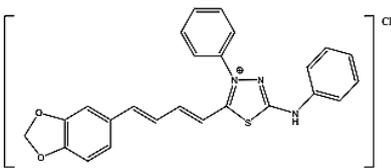
Como consequência da observação dessas atividades, os mesoiônicos têm sido alvo de diversas experimentações e estudos em várias áreas, até mesmo, já possuindo derivados que são utilizados na terapia medicinal como o “Sydnophen” (cloridrato do mesoiônico 3-(fenilisopropil)-1,2,3-oxadiazólio-5-imideto (4)), que possui ação psicoestimulante e antidepressiva, e o “Sydnocarb” (3-(fenilisopropil)-n-(6)-fenilcarbamoil-1,2,3-oxadiazólio-5-imideto) também empregado no tratamentos de doenças mentais (YASHUSKII e KHOLODOV, 1980).

Bem como as substâncias supracitadas, os compostos 3-alquil-sidnonas também possuem ação estimulante do Sistema Nervoso Central (SNC) além de moderada ação diurética e capacidade de reduzir a pressão arterial (KIER e ROCHE, 1968), e as substâncias do grupo 3-aminoalquil-sidnonas, demonstraram atividades anestésicas (WAGNER, 1974).

Como descrito na tabela 1, os compostos mesoiônicos conseguem desempenhar inúmeras atividades biológicas constituindo uma nova classe de substâncias com grande potencial de aplicações farmacêuticas.

O composto mesoiônico utilizado no presente estudo foi sintetizado por Oliveira (2009) e, além de descrever os processos de síntese (Figura 4), este também realizou a avaliação de sua capacidade antifúngica frente à espécie *Candida albicans*. Como resultado, o mesoiônico inibiu de forma significativa o crescimento fúngico. Além disso, o 1,4-difenil-5-(5-nitro-2-furanyl)-1,3,4-cloreto de tiadiazólio-2-tiol (MC-1) também possui atividade bactericida frente a bactéria *Staphylococcus aureus* documentada em estudos prévios (OLIVEIRA, 2011).

Tabela 1 – Compostos mesoiônicos e suas atividades biológicas

Referências	Compostos	Estruturas	Efeitos
Kier e Stewart (1965)	4-fenil-1,3,4-tiadiazólio-2- tiolato 5- substituídos		Ação antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Diplococcus pneumoniae</i> e <i>Escherichia coli</i> .
Athayde-Filho et al., 1996	Mesoiônico do sistema 1,3,4- triazólio-2-tiolato		Ação bactericida contra bactérias gram-positivas e álcool-ácido- resistentes.
Grynberg et al., 1997	Composto SYD-1 - 3-(4-cloro- 3-nitro- fenil)-1,2,3-oxadiazólio-5- olato		Atividade antitumoral em ratos com Tumor de Ehrlich e Sarcoma 180.
Lira, 2004	Composto mesoiônico 2-(4 clorofenil)-3 metil-4-(4- metóxfenil)-1,3- tiazólio-5- tiolato		Efeito vasorelaxante em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato.
Senff-Ribeiro et al., (2004a, b)	Cloridratos mesoiônicos do sistema 1,3,4 tiadiazólio		Atividade antimelanoma.
Rodrigues et al., 2007	Derivados mesoiônicos do sistema 1,3,4-tiadiazólio-2- aminida		Atividade leishmanicida contra <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i> .
Ferreira et al., 2008	Derivados mesoiônicos do sistema 1,3,4-tiadiazólio-2- aminida		Efeito antiparasitário e reduzida citotoxicidade frente aos macrófagos <i>in vitro</i> .

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos do composto mesoiônico 1,4-difenil-5-(5-nitro-2-furanil)-1,3,4-cloreto de tiadiazólio-2-tiol (MC-1) no desenvolvimento e na fisiopatologia do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) em modelo experimental murino.

3.2 Objetivos específicos

- Definir os efeitos do MC-1 em parâmetros como o volume do tumor, circunferência abdominal, peso corporal e quantidade de células viáveis no fluído ascítico de animais com Tumor Ascítico de Ehrlich.
- Avaliar os efeitos do MC-1 na migração de células inflamatórias para a região intraperitoneal de camundongos com Tumor Ascítico de Ehrlich através da contagem diferencial das células presentes no líquido ascítico.
- Determinar os efeitos do tratamento com MC-1 em parâmetros histopatológicos de órgãos como fígado, rins e baço de animais com Tumor Ascítico de Ehrlich.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados 72 camundongos Swiss fêmeas (6 a 8 semanas), não isogênicos, pesando entre 25 e 30g foram obtidos no biotério Professor Thomas George do IPeFarM/UFPB sob protocolos experimentais submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos/UFPB e aprovados com o número 109/2017. Eles foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e submetidos a ciclos claro/escuro de 12 horas tendo livre acesso à água e ração durante o período de experimentação. Após o término do período de experimentação os animais foram encaminhados ao biotério Prof. Dr. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba, para o destino adequado.

4.2 Eutanásia

O procedimento de eutanásia foi realizado por deslocamento cervical após a injeção intramuscular de uma solução de ketamina 100mg/kg e xilazina 10mg/kg. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.3 Células do TAE (Tumor Ascítico de Ehrlich)

4.3.1 Manutenção das células *in vitro*.

As células utilizadas nesse estudo foram obtidas da equipe da professora Dra. Vivian Rumjanek, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ/Brasil. As amostras são criopreservadas em nitrogênio líquido no laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA) do IPeFarM/UFPB. Após o descongelamento das células foi necessário realizar procedimentos de repiques, ou passagens, onde as células foram inoculadas em animais, a fim de promover uma aclimatação ao novo ambiente, e conseqüentemente, aumentar a sua viabilidade. Inicialmente, foi escolhida uma amostra e as células foram injetadas em camundongos fêmeas a uma concentração de 1×10^6 células/animal, em um volume de 200 μl via intraperitoneal; esse processo é denominado passagem zero. Cinco dias após a passagem zero, foi feito o primeiro repique (primeira passagem). Para este procedimento, os animais da passagem zero foram sacrificados, o lavado peritoneal coletado, e posteriormente, foi avaliada a viabilidade destas células. A contagem foi feita em câmara de Neubauer numa diluição de 1×10^6 por animal. Em observações prévias, foi constatado que essas células suportam um ciclo de cinco repiques, e que após esse período, a quantidade de células vivas decai, resultando numa redução da viabilidade celular.

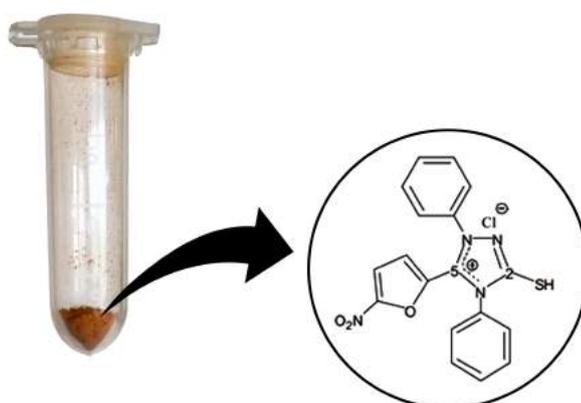
4.3.2 Indução do Tumor Ascítico de Ehrlich para experimentação *in vivo*.

Para os experimentos, foi injetada intraperitonealmente uma concentração de 1×10^5 de células por animal em um volume de $200 \mu\text{l}$ de salina, onde a viabilidade da amostra obtida da manutenção *in vivo* foi superior a 90 %.

4.4 Obtenção do composto mesoiônico

O composto mesoiônico MC-1 foi gentilmente fornecido pelo Professor Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, professor do departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba/João Pessoa/PB/Brasil (Figura 5). O MC-1 foi sintetizado no laboratório do referido professor (OLIVEIRA, C. S, 2009 - SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS).

Figura 5: Substância 1,4-difenil-5-(5-nitro-2-furanil)-1,3,4-cloreto de tiadiazólio-2-tiol (MC-1)

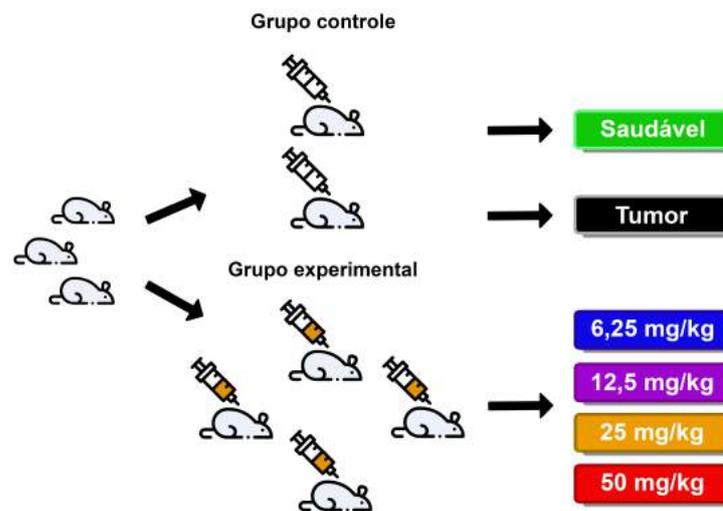


Fonte: modificado de OLIVEIRA, 2011

4.5 Tratamento com MC-1

O tratamento com o MC-1 iniciou-se uma hora após a inoculação das células. Os animais, de acordo com os seus respectivos grupos, foram tratados com o MC-1 nas doses de 6,25, 12,5, 25 e 50 mg/kg ($n = 6$) por via intraperitoneal durante um período de nove dias. Os grupos controle (saudável e com tumor; $n = 6$) receberam apenas o veículo de diluição (solução salina e Tween 80 a 2 %) durante o período de experimentação (Figura 6). Vinte e quatro horas após o último tratamento, os animais foram eutanasiados para a obtenção do lavado peritoneal, circunferência, coleta dos órgãos e contagem celular. A figura 7 mostra o delineamento experimental. Todos os grupos experimentais (exceto o grupo controle “saudável”) tiveram o TAE inoculado.

Figura 6: Representação esquemática da distribuição dos animais por grupo experimental



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 7: Representação esquemática do protocolo de tratamento com o MC-1



Fonte: Elaborado pela autora

4.6 Análise dos parâmetros tumorais

4.6.1 Variação do peso

O peso de cada animal foi aferido diariamente durante todo o período de experimentação através de uma balança de precisão. A variação do peso foi avaliada pela comparação das médias diárias de peso de cada grupo com a média de peso destes antes do início do tratamento e os resultados foram expressos em gramas.

4.6.2 Circunferência

A circunferência abdominal foi medida apenas no último dia do experimento, após a eutanásia dos animais. Para isto, foi utilizada uma fita métrica. A comparação foi feita entre os grupos controle e os grupos tratados com o composto.

4.6.3 Lavado peritoneal

A coleta do lavado peritoneal foi realizada 24h após o último tratamento. Nessa etapa, as células do líquido ascítico, contidas do peritônio, foram retiradas e analisadas. Para a obtenção do lavado peritoneal (fluido ascítico) dos animais, após a eutanásia, foi realizada a assepsia do animal com álcool 70 GL, e então realizada uma incisão longitudinal, utilizando pinça e tesoura. Utilizando uma seringa foi introduzido 3 mL de PBS gelado dentro do peritônio e em seguida foi aspirado o maior volume possível do volume ascítico. O lavado peritoneal coletado foi armazenado em tubo falcon e mantido em gelo para manter a viabilidade celular. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1500 RPM, 4°C por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células formado foi utilizado para a contagem de células totais e diferenciais (Figura 8).

4.6.4 Contagem celular diferencial

As contagens de células viáveis e inviáveis foram realizadas em câmara de Neubauer, utilizando uma alíquota da amostra do lavado peritoneal (fluido ascítico) diluída em solução de azul de Tripán numa proporção 1:10 respectivamente (Figura 8). A leitura foi feita no microscópio óptico na objetiva de 40x. Para a confecção das lâminas para contagem diferencial, foi utilizada a centrífuga Cytospin, 1500 rpm por 10 min (Figura 8). Foram utilizados dois volumes de amostra por lâmina, 25 μ l e 50 μ l de células. Posteriormente, as células foram coradas utilizando o Kit Panótico, composto por três substâncias diferentes: fixador (etanol), corante basófilo (eosina) e corante acidófilo (azul de metileno). As lâminas secaram por 24 horas, e cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células em microscópio óptico, com objetiva de 100x, utilizando o óleo de imersão. As células foram diferenciadas em macrófago, linfócito e neutrófilo, baseado na morfologia celular.

4.6.5 Coleta dos órgãos e histologia

Para avaliar os parâmetros morfo-histológicos do fígado, do baço e dos rins dos camundongos com tumor de Ehrlich e tratados, os órgãos foram coletados no desfecho do experimento, 24h após o último tratamento (Figura 8). Os órgãos foram colocados em tubos do tipo falcon identificados contendo formalina tamponada a 10 % para evitar a degradação do tecido

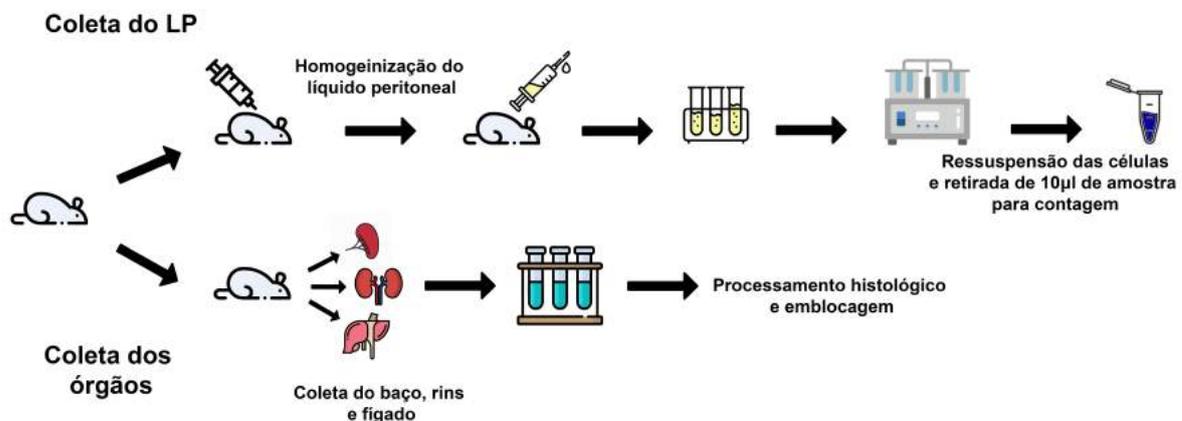
pela ação de enzimas celulares (autólise) ou bacterianas. Em seguida, foram colocados e identificados individualmente em cassetes e submetidos a 2 horas de banho em água corrente para retirada do excesso de fixador. Em seguida, as amostras foram colocadas em álcool etílico 70 % para iniciar a bateria de processamento. Os órgãos fixados foram inicialmente desidratados em diferentes concentrações de álcool etílico 70, 80, 90 e 100 %, 30 minutos em cada.

O processo de desidratação é necessário para preparar as amostras para a diafanização, já que a água nos tecidos não é miscível em substâncias apolares como o xilol e a parafina de inclusão. Após a desidratação as amostras foram submetidas a diafanização, banhos em xilol I e xilol II por 30 min para preparar as amostras para a inclusão em parafina. Em seguida, os cassetes foram imersos em parafina líquida (submetida a aquecimento e mantida a temperatura de 56°C), sendo dois os banhos, cada um de 1 hora em parafina I e II para infiltração desta na amostra.

Posteriormente, o tecido foi transferido para o molde (forma histológica) onde foi imerso em parafina (Parafina para análise histológica- QEEL, São Paulo, SP). Poucos minutos após ser colocada na forma e esfriar, obter-se-á o "bloco" de parafina contendo a amostra de tecido em seu interior. Os blocos de parafina assim formados, foram retirados das formas e identificados. Prosseguindo com o protocolo, foi realizada a microtomia, processo de corte dos blocos, a fim de formar fitas de aproximadamente 5 μm de espessura com o auxílio de um micrótomo (SP Labor 300).

Os cortes são colocados em banho-maria (38 – 39°C), sendo retirados após, com lâminas de vidro para microscopia. A secagem das lâminas é realizada ao ar livre, em temperatura ambiente. Com os cortes aderidos às lâminas, prossegue-se o protocolo com a realização da coloração Hematoxilina-Eosina (HE) para evidenciar alterações morfohistológicas.

Figura 8: Representação esquemática do protocolo de obtenção do lavado peritoneal e dos órgãos



Fonte: Elaborado pela autora

4.7 Análise estatística

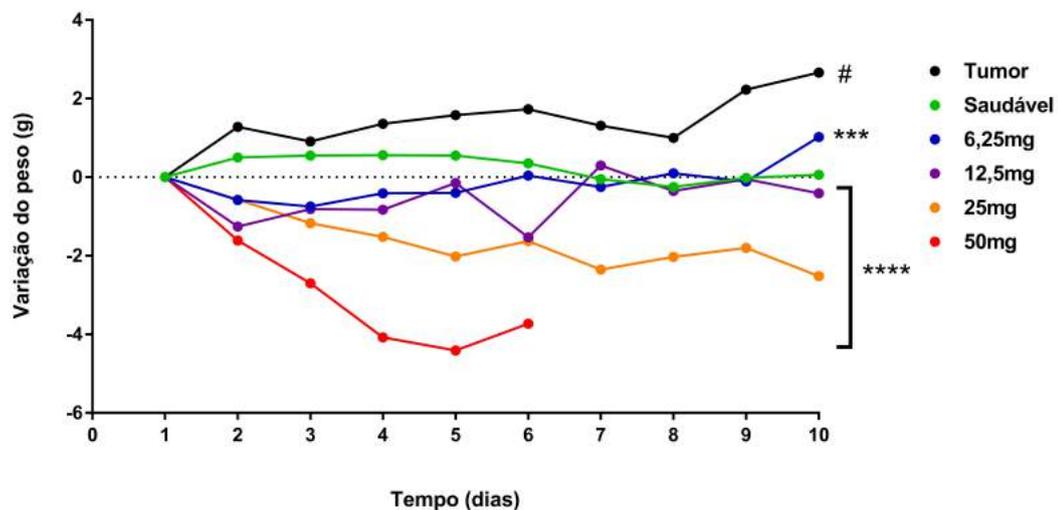
Os resultados foram analisados pelo método de Análise de Variância (ANOVA) não paramétrico com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. Para as análises foram utilizados o programa Graph Pad Prism versão 6.0, os valores com $P < 0,05$ foram considerados significativos (Graph Pad Software Inc., San Diego, U.S.A.).

5 RESULTADOS

5.1 Peso dos animais

Os animais foram pesados no dia 1, antes de receberem as células do tumor via intraperitoneal, e após receberem as células, foram pesados diariamente até o décimo dia, no desfecho do experimento, antes de serem eutanasiados. No gráfico 1, é possível observar as mudanças nos pesos dos animais provocadas pela administração do MC-1.

Gráfico 1: Variação do peso dos animais



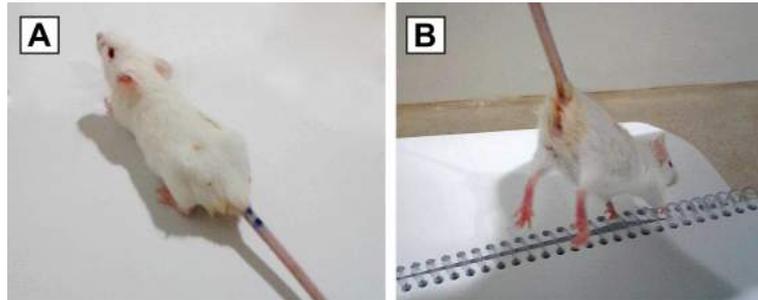
#: grupo tumor em relação ao saudável; ***: 6,25 mg/kg em relação ao grupo com o tumor; ****: 12,5 mg, 25 mg e 50 mg em relação ao grupo com o tumor.

O cálculo da variação do peso dos animais possibilitou uma observação mais clara da influência do MC-1 na redução do crescimento tumoral: o grupo tumor apresentou um aumento no peso de 2,66 g ao fim do experimento. Essa diferença foi significativa em relação ao grupo saudável ($p = 0,0177$). Os animais do grupo saudável mantiveram seu peso relativamente constante, tendo aumentado em média apenas 0,8 g até a finalização do estudo. No décimo dia, a variação de peso do grupo de 6,25 mg/kg foi de 1,64 g ($\pm 0,90$ g) e quando comparado com o grupo tumor, percebe-se que a dose foi capaz de inibir o crescimento do TAE ($p = 0,0008$). As concentrações de 12,5 e 25 mg/kg do mesoiônico também foram capazes de inibir o ganho de peso nos animais tratados. No sexto dia, os animais do grupo de 50 mg/kg foram eutanasiados devido às condições físicas precárias dos animais.

Os tratamentos com as diferentes doses do MC-1 provocaram alterações fisiológicas e comportamentais nos animais dos grupos pertencentes às doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg. Nos animais dos grupos tratados com 25 e 12,5 mg/kg, foi observado aumento na agressividade e vocalização, além de piloereção minutos após a administração da substância. No grupo de

animais 50 mg/kg, os efeitos colaterais foram mais graves isto é: a partir do terceiro dia de tratamento foi observada alopecia além de alterações na cor e consistência das fezes (Figura 10). Concomitantemente, houve redução na atividade comportamental e uma crescente redução de força para agarrar. No quinto dia de tratamento, dois animais foram encontrados mortos, e no sexto dia, todos os animais do grupo foram eutanasiados devido à impossibilidade de continuar a experimentação no referido grupo.

Figura 9: Animais tratados com a dose de 50 mg/kg do MC-1



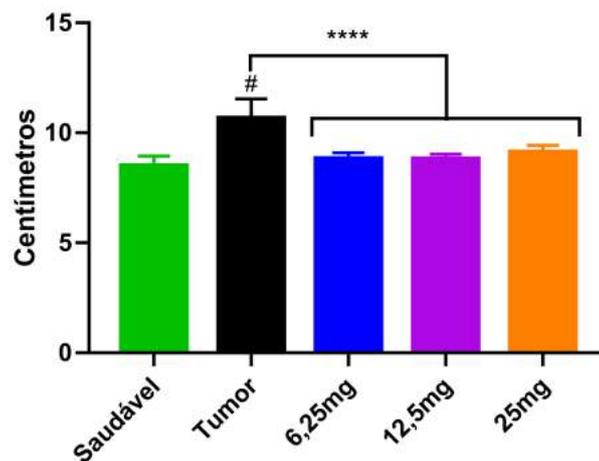
Observa-se grande redução de peso e tamanho do animal (A) e mudança na pelagem (B).

5.2 Circunferência abdominal

A circunferência abdominal está relacionada com a dilatação da cavidade peritoneal do animal, indicando assim o aumento na produção do fluido ascítico e, conseqüentemente, o crescimento tumoral. Esse dado foi obtido após a eutanásia dos animais no décimo dia.

Os maiores valores de circunferência abdominal foram obtidos no grupo tumor (12 cm) devido ao grande volume de fluido ascítico formado. O grupo saudável teve a circunferência abdominal em média de 8,5 cm, e os animais tratados com MC-1 não apresentaram diferenças estatísticas entre si, nem com o controle saudável. Todavia, as três doses (6,25, 12,5 e 25 mg/kg) do MC-1 foram capazes de inibir a formação de fluido ascítico e, conseqüentemente, a reduziram a circunferência abdominal dos animais de forma significativa em relação ao tumor ($p < 0,0001$) (Gráfico 2).

Gráfico 2: Circunferência abdominal



#: grupo tumor em relação ao saudável; ****: 6,25 mg, 12,5 mg e 25 mg em relação ao grupo com o tumor.

5.3 Volume do tumor

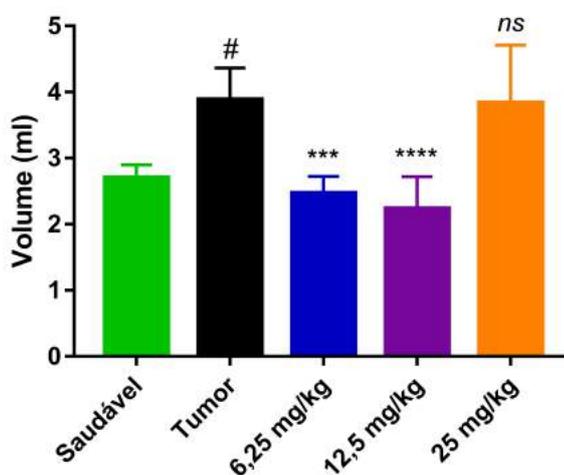
Os tratamentos com o MC-1 nas doses de 6,25 e 12,5 mg/kg reduziram, significativamente, o volume ascítico (fluido ascítico) em relação aos animais do grupo tumor (2,4 ml \pm 0,10, $p = 0,0006$ e 2,2 ml \pm 0,19, $p < 0,0001$, respectivamente). Entretanto, a dose de 25 mg/kg não apresentou eficácia na redução do volume tumoral (Tabela 2 e Gráfico 3).

Tabela 2: Volume do tumor

Grupos experimentais	Vol. injetado	Média do vol. aspirado
Saudável	3ml	2,7 ml \pm 0,08
Tumor	3ml	3,8 ml \pm 0,20 ^a
6,25mg/kg	3ml	2,4 ml \pm 0,10 ^b
12,5mg/kg	3ml	2,2 ml \pm 0,19 ^c
25mg/kg	3ml	3,8 ml \pm 0,35 ^{ns}

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média de seis animais analisados por ANOVA seguidos por Tukey. $p^a = 0,0045$: tumor em relação ao saudável; $p^{b,c,ns} = 0,0006$, $< 0,0001$ e *não significativa*: grupo tratado em relação ao tumor.

Gráfico 3: Volume do tumor



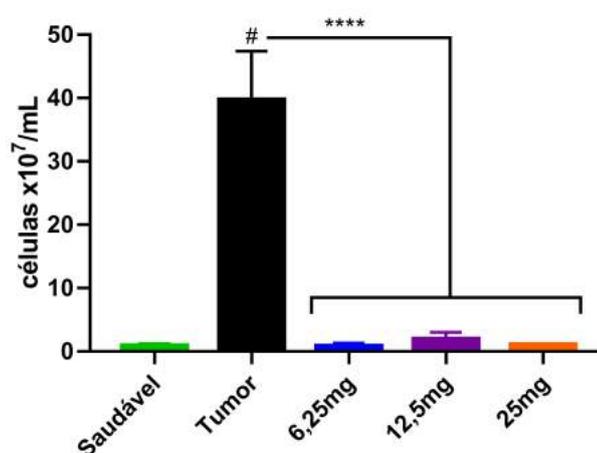
#: grupo tumor em relação ao saudável; ***: dose de 6,25 mg/kg em relação ao tumor; ****: dose de 12,5 mg/kg em relação ao tumor; ns: dose de 25 mg/kg em relação ao tumor.

5.4 Contagem celular

5.4.1 Células viáveis

A contagem total das células viáveis informa a quantidade de células vivas presente no fluido ascítico. Observou-se que nos grupos de animais tratados com o MC-1 houve redução significativamente no número de células totais no fluido ascítico. Dentre os grupos tratados, a dose de 6,25 mg/kg apresentou redução mais expressiva no número de células viáveis (média de $0,85 \pm 0,18 \times 10^7$) seguida da dose de 25 e 12,5 mg/kg (dados não mostrados) (Gráfico 4).

Gráfico 4: Células viáveis no fluido ascítico

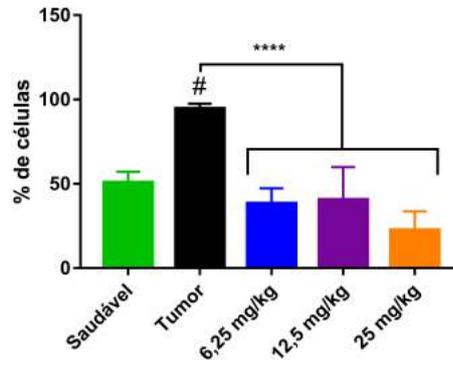


#: grupo tumor em relação ao saudável; ****: grupo das doses de 6,25, 12,5 e 25 mg/kg em relação ao tumor.

5.4.2 Contagem diferencial

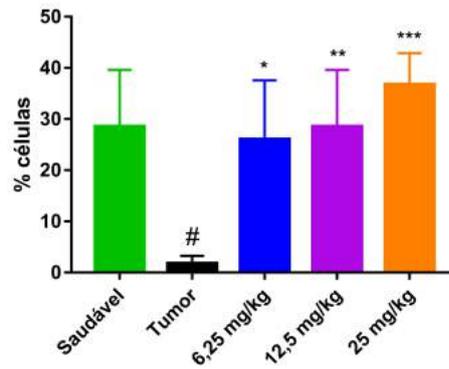
A contagem diferencial é uma técnica que determina as quantidades relativas dos diferentes tipos de leucócitos presentes na amostra analisada. O grupo tumor apresentou, no fluido ascítico, um aumento de 43,75% no número de macrófagos (Gráfico 5) e uma redução de 26,75% de linfócitos (Gráfico 6) e 17% de neutrófilos (Gráfico 7). Em relação à quantidade de macrófagos, a dose de 25 mg/kg foi capaz de diminuir 72% destas células, enquanto as concentrações de 6,25 e 12,5 mg/kg, reduziram 56,25% e 54%, respectivamente. A contagem no número de linfócitos evidenciou que houve um aumento dessas células em 35% na dose de 25 mg/kg, 28% na dose de 12,5 mg/kg e 24,25% na concentração de 6,25 mg/kg. A quantidade de neutrófilos também aumentou nos grupos tratados, sendo a concentração de 25 mg/kg, a mais efetiva em termos numéricos 37%.

Gráfico 5: Contagem diferencial de macrófagos



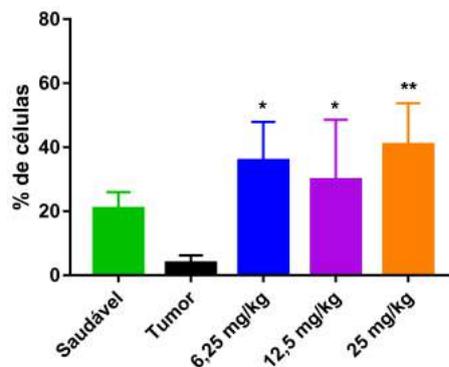
#: grupo tumor em relação ao saudável; ****: diferentes concentrações do MC-1 em relação ao grupo tumor.

Gráfico 6: Contagem diferencial de linfócitos



#: grupo tumor em relação ao saudável; *: dose de 6,25 mg/kg em relação ao grupo tumor; **: dose de 12,5 mg/kg em relação ao grupo tumor; ***: dose de 25 mg/kg em relação ao grupo tumor.

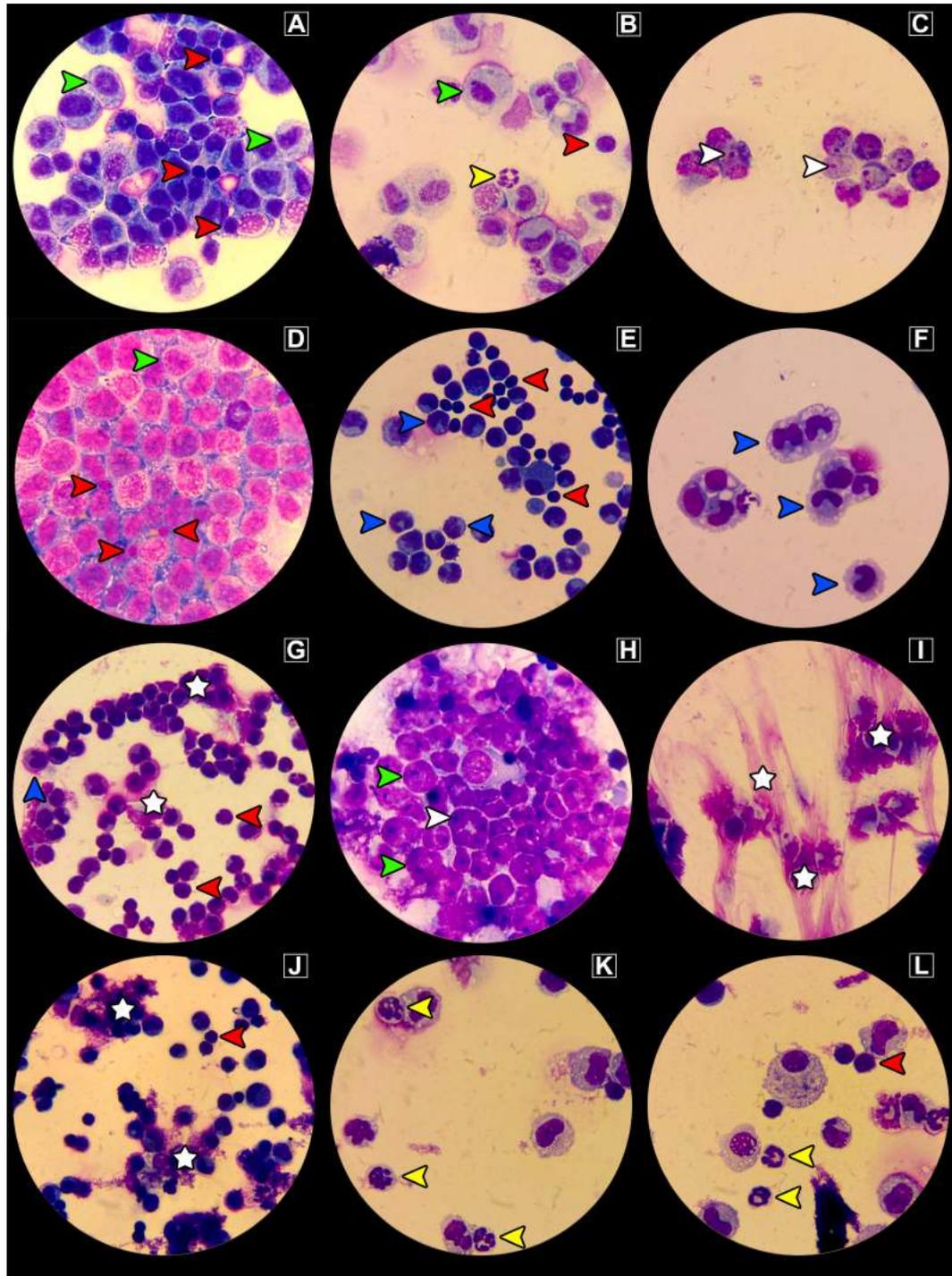
Gráfico 7: Contagem diferencial de neutrófilos



*: dose de 6,25 mg/kg em relação ao tumor; *: dose de 12,5 mg/kg em relação ao tumor; **: dose de 25 mg/kg em relação ao tumor.

As fotomicrografias das células do líquido ascítico foram feitas observando as lâminas através de uma objetiva de 100x com óleo de imersão. Esse processo permite identificar alterações morfológicas nos leucócitos e distinguir fatores relacionados ao desenvolvimento tumoral. No grupo saudável (Figura 11A e 11B), não foram identificadas alterações celulares, entretanto, nas imagens do grupo com TAE não tratado (Figura 11C e 11D), constatou-se uma grande quantidade de macrófagos e células com núcleos proeminentes. Células imaturas como mielócitos, promielócitos e bastonetes foram identificadas nos grupos tratados com as doses 6,25 e 12,5 mg/kg (Figura 11E, 11F e 11G). Além disso, nas doses de 12,5 e 25 mg/kg, estruturas relacionadas a presença do TAE, como tira de fibrinas e agrupamentos celulares, puderam ser identificados (Figura 11G, 11I e 11J). Por fim, nas lâminas representativas da dose de 25 mg/kg ainda pôde ser identificada a presença de neutrófilos atípicos em forma de anel e hipersegmentados (Figura 11K e 11L).

Figura 10: Micrografia das células coradas com o kit Panótico para contagem diferencial com objetiva de 100x



As **setas verdes** indicam os macrófagos, as **vermelhas**, os linfócitos, as **amarelas**, os neutrófilos, e as **estrelas brancas**, indicam estruturas incomuns relacionadas ao desenvolvimento tumoral; as **setas azuis** indicam células imaturas (promielócitos, mielócitos e bastonetes) **A e B**: grupo saudável; **C e D**: grupo tumor; **E e F** : grupo de 6,25 mg/kg; **G, H e I**: grupo de 12,5 mg/kg; **J, K e L**: grupo de 25 mg/kg.

5.5 Histologia

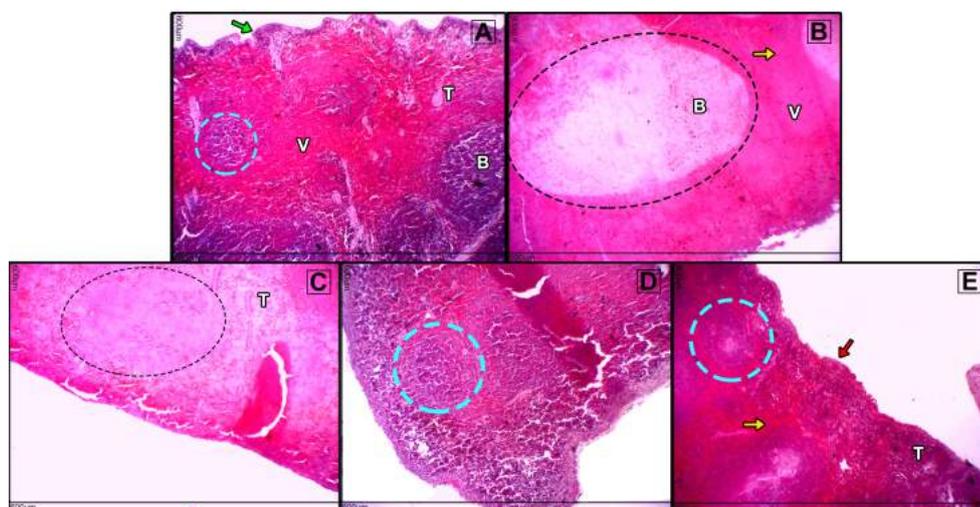
5.5.1 Baço

Para uma análise mais detalhada dos possíveis efeitos tóxicos do MC-1 sobre os órgãos dos animais tratados, foi realizada uma análise histológica.

O grupo de animais saudáveis (Figura 12A) apresentou baço com características histológicas normais: cápsula conectiva presente, polpa vermelha com trabéculas e polpa branca. O círculo azul tracejado identifica os folículos linfoides (zona de linfócitos B). O grupo com TAE não tratado (Figura 12B) apresentou folículos com hipocelularidade difusa e polpa vermelha com zonas hialinizadas.

Nos animais tratados com o MC-1 foi possível observar algumas alterações histológicas. No grupo de 6,25 mg/kg (Figura 12C), o baço apresentou hipocelularidade nos folículos (polpa branca) além de trabéculas e cordões esplênicos disformes. No grupo de 25 mg/kg (Figura 12E), a cápsula aparece com espessamento e há focos de hialinização na polpa vermelha. Não foram observadas alterações histopatológicas no grupo da dose de 12,5 mg/kg.

Figura 11: Fotomicrografias representativas do baço de camundongos



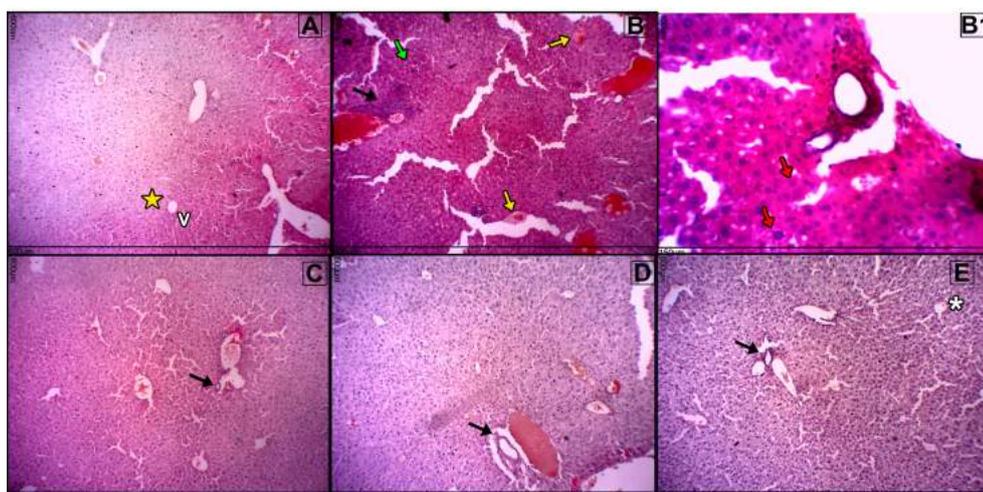
A: grupo: controle saudável; **B:** grupo controle com tumor não tratado; **C:** dose de 6,25 mg/kg; **D:** dose de 12,5 mg/kg; **E:** dose de 25 mg/kg; **seta verde:** cápsula conectiva; **seta vermelha:** espessamento da cápsula conectiva; **seta amarela:** zonas hialinizadas; **círculo azul tracejado:** folículos linfoides-zona de linfócitos B; **círculo preto tracejado:** parênquima com hipocelularidade maciça difusa; **T:** trabéculas; **B:** polpa branca; **V:** polpa vermelha. As amostras foram coradas em hematoxilina e eosina. (600 μ at 100x).

5.5.2 Fígado

As fotomicrografias da figura 13 são representativas de cortes histológicos do fígado de camundongos. No grupo saudável (Figura 11A), a estrutura lobular está preservada, os espaços portais estão regularmente distribuídos contendo a veia central e os hepatócitos estão distribuídos em placas. O grupo com tumor não tratado (Figura 13B e 13B1) apresentou infiltrado celular e focos hemorrágicos no parênquima hepático. Os hepatócitos apresentaram alterações no tamanho do núcleo e na afinidade aos corantes.

Nos grupos tratados com o MC-1 houve diminuição do infiltrado celular nas três doses analisadas (Figura 13C, 13D e 13E). Na figura 13D, que é representativa do grupo de 12,5 mg/kg, observou-se congestão nos ramos da veia porta, hepatócitos com variação no tamanho nuclear e na coloração nuclear e citoplasmática. Os camundongos tratados com 25 mg/kg apresentaram uma leve dilatação da área portal e sinusóides hepáticos.

Figura 12: Fotomicrografias representativas do fígado de camundongos

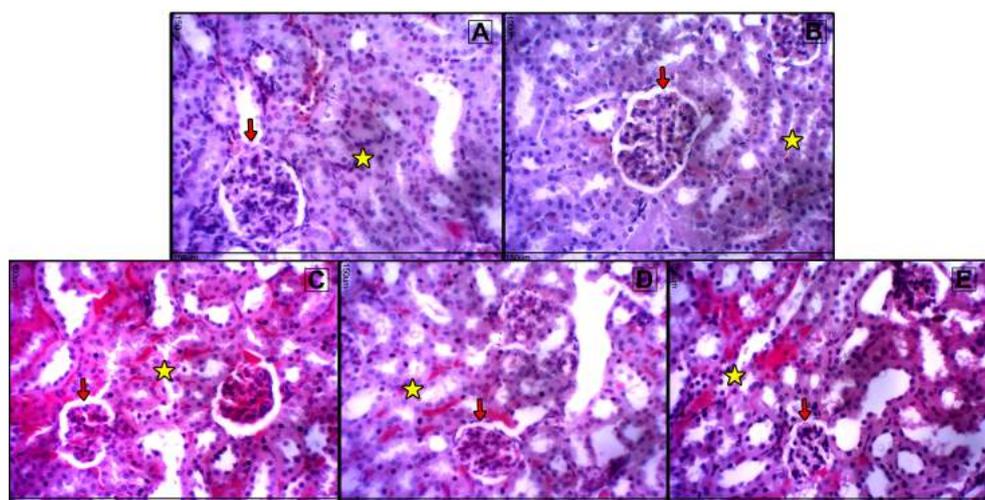


A: grupo controle saudável; **B e B1:** grupo controle com tumor não tratado; **C:** grupo da dose de 6,25 mg/kg; **D:** grupo da dose de 12,5 mg/kg; **E:** grupo da dose de 25 mg/kg; **seta preta:** infiltrado celular maciço; **seta amarela:** focos hemorrágicos no parênquima hepático; **seta vermelha:** hepatócitos apresentando alterações no tamanho do núcleo e na afinidade aos corantes; **V:** veia central; **asterisco:** leve dilatação da área portal e sinusóides hepáticos; **estrela:** hepatócitos distribuídos em placas. As amostras foram coradas em hematoxilina e eosina (600 μ at 100x).

5.5.3 Rins

As análises dos cortes histológicos dos rins dos grupos saudável e tumor (TAE) apresentaram padrões histológicos normais com lobos renais e labirinto cortical conservados (Figura 14A e 14B). Além disso, não houve alteração histopatológica renal em nenhum dos animais tratados com o mesoiônico MI-01 (Figura 14C, 14D e 14E). Os lóbulos renais, bem como os glomérulos, estavam conservados e envolvidos por fina cápsula de Bowmann (folheto visceral e folheto parietal) e sustentados por células mesangiais.

Figura 13: Fotomicrografias representativas dos rins de camundongos



A: grupo controle saudável; **B :** grupo controle com tumor não tratado; **C:** grupo da dose de 6,25 mg/kg; **D:** grupo da dose de 12,5 mg/kg; **E:** grupo da dose de 25 mg/kg; **seta vermelha:** parênquima glomerular e labirinto cortical conservados; **estrela:** lobos renais conservados. As amostras foram coradas em hematoxilina e eosina (600 μ at 100x).

6 DISCUSSÃO

Em virtude da grande variedade de tipos de câncer tem-se um grande desafio à ciência e à medicina pois, apesar do progresso nas estratégias de prevenção e tratamento, muitas formas da doença ainda permanecem incuráveis (DING LI *et al.*, 2018). Apesar do grande avanço na descoberta de novas substâncias antineoplásicas, a maioria das drogas utilizadas nos tratamentos possuem efeitos colaterais graves aos pacientes em virtude de sua toxicidade não seletiva (AL-TEL, 2010).

A quimioterapia antineoplásica utiliza agentes químicos isolados ou em combinação, por via oral, intravenosa, intramuscular, intradérmica ou tópica com o objetivo de debelar tumores malignos; sendo essa uma das formas de tratamento amplamente utilizadas na clínica oncológica (BRASIL, 2019). Compostos heterocíclicos naturais participam de diversos processos biológicos nos seres vivos, como o metabolismo e fornecimento de energia, transmissão de impulsos nervosos além de transferência de informações hereditárias (POZHARSKU *et al.*, 1997).

Diversos compostos heterocíclicos são encontrados atualmente em medicamentos com atividades diversificadas, como: anti-hipertensivos (Losartana), anti-inflamatórios e analgésicos (Dipirona), além de antitumorais (Carbamato de fluorouracil). Os compostos mesoiônicos estão inseridos nessa categoria de substâncias heterocíclicas, e segundo estudos realizados por Senff-Ribeiro *et al.*, (2004) e Bhosale *et al.*, (2015), estes compostos possuem propriedades anti-proliferativas potentes em células tumorais e efeitos moderados nos tecidos normais, sendo clinicamente bem tolerados.

No TAE, parâmetros como o ganho de peso dos animais, volume ascítico e circunferência abdominal são importantes indicadores da progressão da doença (SILVA *et al.*, 2017). Ainda no desenvolvimento tumoral, existem propriedades celulares que indicam a instalação e progressão da doença, como: diferenciação e proliferação celular desordenada, estabelecimento de um microambiente favorável bem como os processos angiogênicos (SCHULZ, 2007).

No presente estudo, o TAE apresentou um crescimento progressivo do volume ascítico e do número das células na cavidade peritoneal, corroborando com as descrições prévias de Vincent e Nicholls (1967) e Mangueira *et al.*, (2017). Tanto o aumento do volume ascítico como o a multiplicação do número de celular interfere imediatamente no peso dos animais. Santos *et al.* (2016) constatou que houve um ganho de peso nos animais de aproximadamente 12g em 15 dias de experimentação, e Salmeron (2018), um ganho de quase 20 gramas 19 dias após a inoculação do TAE. Essas observações acerca do rápido ganho de peso nos animais confirmam a agressividade do tumor e a sua rápida capacidade de gerar grande aumento na quantidade de células viáveis e do líquido ascítico (SILVA; SANTOS; CASSALI, 2006).

Considerando a variação do peso dos animais tratados com MC-1 nas doses de 6,25,

12,5 e 25 mg/kg, não houve ganho de peso, e a diferença foi significativa em relação ao grupo controle com TAE não tratado, corroborando a hipótese da inibição na formação do líquido ascítico e na diminuição da quantidade de células intraperitoneais.

No grupo de animais tratado com a dose de 50 mg/kg do MI-01, houve efeitos colaterais graves. Não só a anorexia, mas também outros sintomas relacionados à toxicidade da dose como: alopecia, alterações nas fezes e redução da força para agarrar. Além disso, ainda durante o protocolo de 9 dias de tratamento, dois animais morreram, impossibilitando a continuidade da experimentação no referido grupo. Em estudos que avaliaram a atividade de substâncias antineoplásicas, a perda de peso é tipicamente associada à toxicidade da substância em questão (TALMADGE *et al.*, 2007). Tanto a perda de peso quanto a desnutrição estão diretamente relacionadas a quadros de anorexia, muito presente em pacientes com câncer devido às alterações gastrointestinais, dificuldade de cicatrização, supressão da resposta imunológica e, consequentemente, redução da qualidade de vida e da sobrevivência (OLIVEIRA, 2010).

Um resultado intrigante observado foi que nos primeiros instantes após a administração do MC-1 (1-3 minutos), os animais dos grupos tratados com 12,5 ou 25 mg/kg se comportaram de forma hiperativa, além de aumentar a frequência de vocalizações e apresentarem piloereção.

O crescimento da circunferência abdominal de animais com TAE é um parâmetro observado que está imediatamente ligado à quantidade de líquido ascítico formado (MANGUEIRA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2016; FECCHIO *et al.*, 1990). Nesse trabalho, os resultados das medições da circunferência abdominal demonstraram que entre os grupos de animais tratados (6,25, 12,5 e 25 mg/kg) não houve diferença estatística, porém, quando comparadas com o grupo tumor, a redução foi significativa para as três doses do MC-1.

Uma vez inoculadas por via intraperitoneal, as células de Ehrlich irão se desenvolver na sua forma ascítica. A ascite é a acumulação de fluidos no peritônio na forma de exsudato, contendo proteínas, células e outros fatores relacionados ao processo inflamatório como citocinas e quimiocinas (JÚNIOR *et al.*, 2009). Além disso, há uma importante relação entre a quantidade de ascite gerada durante o quadro inflamatório ou neoplásico e o influxo inflamatório celular (macrófagos, neutrófilos, linfócitos etc) e a permeabilidade vascular do peritônio (FERNANDES, 2015).

O tratamento com MC-01 nos animais do modelo experimental do TAE (6,25 e 12,5 mg/kg) induziu redução no volume do tumor, todavia, a dose de 25 mg/kg do MC-1 não apresentou efeitos nesse parâmetro. Nos animais saudáveis não foi possível aspirar a mesma quantidade de salina injetada (3 ml), isso porque o peritônio é uma membrana permeável a soluções aquosas, além de não haver o estímulo tumoral e inflamatório para o desenvolvimento da ascite. Nas concentrações de 6,25 e 12,5 mg/kg o mesoiônico foi eficaz na redução do volume tumoral, sendo a média do volume ascítico aspirado do grupo tratado com 6,25 mg/kg igual a 2,4 ml ($\pm 0,10$), e a do grupo da dose de 12,5 mg/kg igual a 2,2 ml ($\pm 0,19$). Sendo assim, esses

resultados reiteram a eficácia do mesoiônico na inibição da formação da ascite.

A quantidade de células totais é um parâmetro importante para avaliar a progressão do quadro neoplásico e o crescimento das células malignas. Esse é um dos critérios a ser avaliado em estudos de substâncias antineoplásicas (SCHULZ, 2007). A morte celular pode ocorrer por diversos mecanismos, e a apoptose é um tópico amplamente discutido quando se trata de terapias antineoplásicas (MISHRA, 2018). O mecanismo da apoptose consiste em mudanças morfofisiológicas nas células e a consequente formação de corpos apoptóticos, que contêm os componentes intracelulares (KOLB, 2017).

Os estímulos responsáveis pelo início do processo apoptóticos podem ser intrínsecos ou extrínsecos à célula. A via intrínseca (ou mitocondrial) pode ser iniciada na presença de estímulos como lesão ao DNA, elevadas concentrações de radiação, ausência de fatores de crescimento ou de hormônios além da presença de radicais livres e toxinas no meio extracelular (GREEN, 2011). Por sua vez, a via extrínseca é ativada quando ligantes como TNF, Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF (TRAIL) e CD95L (FasL) ativam os Receptores de Morte Celular (BOATRIGT, 2003). Além da apoptose, outras vias de morte celular como a necroptose (necrose programada), a piroptose (indução da inflamação por liberação de DAMPs e citocinas no meio extracelular), a ferroptose (mecanismo de defesa contra o acúmulo de radicais tóxico nas células) e a autofagia (resposta a estresses como danos ambientais, flutuações químicas, privação metabólica e exposição a patógenos) também são importantes meios de contenção de danos ao tecido bem como métodos essenciais para a eliminação de células neoplásicas incipientes (KOLB, 2017).

Os resultados do tratamento com o MC-1 em camundongos com TAE demonstraram que houve redução drástica no número de células viáveis em relação ao grupo de animais com tumor não tratados. No presente estudo, o grupo com tumor não tratado atingiu uma concentração celular de aproximadamente 39×10^7 /mL ao final do período de experimentação, já a dose de 6,25 mg/kg do MC-1 reduziu em aproximadamente 97.8 % as células totais do líquido ascítico (média de $0,85 \pm 0,18 \times 10^7$), enquanto a dose de 25 mg/kg do MC-1 reduziu 97.2 % e a de 12,5 mg/kg reduziu 94.8 %.

A contagem diferencial das células (linfócitos, neutrófilos e macrófagos) foi realizada no líquido ascítico dos animais com TAE tratados ou não com o MC-1 a fim de melhor compreender a dinâmica do influxo celular inflamatório para a região intraperitoneal. A dose de 25 mg/kg do MC-1 induziu grande concentração de infiltrado celular inflamatório (reduzindo 72 % de macrófagos e aumentando 37 % de neutrófilos e 35 % de linfócitos) quando comparado ao grupo tumor. O grupo com TAE não tratado exibiu um aumento de 43.75 % de macrófagos e redução de linfócitos (26.75 %) e neutrófilos (17 %) quando comparado ao grupo saudável, demonstrando os efeitos da condição neoplásica no desenvolvimento da resposta inflamatória no peritônio dos animais. Ferreira *et al.*, 2008 demonstrou que derivados mesoiônicos do sistema 1,3,4- tiadiazólio-2-aminida tinham baixa citotoxicidade frente aos macrófagos *in vitro*,

e Macêdo (2017), em sua avaliação do potencial antineoplásicos dos compostos MIH 2.4BI e MIH 2.4Zn concluiu que estes possuíam citotoxicidade seletiva para as células tumorais e baixa toxicidade para células normais *in vitro*, desempenhando atividade antitumoral.

As células inflamatórias presentes no líquido ascítico dos diferentes grupos de animais em estudo foram fixadas em lâminas pela cito-centrifugação (Cytospin) e observadas via a objetiva de 100x com óleo de imersão no microscópio óptico, estas apresentaram características atípicas possivelmente causadas pelo processo inflamatório agudo do TAE. Inicialmente, observou-se um aumento do número de bastonetes e presença ocasional de células imaturas, como mielócitos e promielócitos (Figuras 10E, 10F e 10G). Linfócitos em diferentes estágios de maturação também foram identificados, além de células mononucleares e polimorfonucleares apresentando hipercromia basofílica e uma grande quantidade de células atípicas. No grupos de animais com TAE observou-se tiras de fibrinas e agrupamentos celulares conectados por essas fibras (Figura 10G, 10I e 10J). Além disso, várias células apresentam vacúolos e nucléolos proeminentes (Figura 10C e 10H).

Os neutrófilos formam uma importante barreira contra o desenvolvimento de tumores e a presença dessas células no tecido tumoral pode estar associada a um prognóstico favorável na resolução dos tumores (FRIDLENDER, 2009). Os neutrófilos medeiam a morte de células neoplásicas por mecanismos tais como a Citotoxicidade Mediada por Células Dependente de Anticorpos (ou em inglês, a sigla ADCC) e a trogocitose, ou seja, a aquisição do conteúdo citoplasmático ou fragmentos da membrana celular de outra célula com quem interage, passando a expressar esses antígenos (MATLUNG, 2018). Esses mecanismos apresentam como resultado final uma potente ativação da resposta antitumoral dos linfócitos T e das células NK.

Nos animais em que o TAE foi induzido foram observados neutrófilos atípicos, com núcleo em forma de anel (Figura 10L) além de células com hipersegmentações nucleares (Figura 10K). Essas observações podem indicar uma mielopoiese anormal, onde células ainda imaturas são direcionadas ao sítio inflamado, e as células já maduras, permanecem por muito tempo no local de inflamação (HELLEBREKERS, 2018).

As análises histológicas de tecidos provenientes do baço, fígado e rins dos animais dos grupos controles e daqueles submetidos ao tratamento com MC-1 demonstram que houve alterações histológicas no baço e no fígado, e que o tratamento foi capaz de amenizar essas alterações. O baço é um órgão linfoide atuante nas respostas imunológicas contra antígeno e sua histologia revela componentes como as poulpas vermelha e branca, sendo que nessa última, estão localizados os linfócitos T na bainha peri-arteriolar, e os linfócitos B, nos folículos (MEBIUS, 2005). As fotomicrografias de cortes do órgão corados em hematoxilina e eosina demonstram que no grupo saudável não houve alterações histológicas, contudo, o grupo com tumor não tratado apresentou regiões com baixa concentração celular na região folicular (Figura 11B), uma característica de processos apoptóticos mediados por linfócitos B. Nos grupos dos animais tratados com o MC-1 nas doses de 12,5 e 25 mg/kg observamos redução nesse

parâmetro histológico sugerindo um efeito benéfico do composto no baço.

O fígado é um dos órgãos que mais apresenta susceptibilidade a substâncias tóxicas pois ele é responsável pelo processamento de metabólitos do organismo. Os dois tipos celulares epiteliais principais presentes nesse órgão são os hepatócitos, constituindo cerca de 60 % das células totais, e as células epiteliais biliares, presentes nos ductos biliares (NAVES e MORENO, 2000). O resultado de estudos histológicos de cortes de fígado dos animais revelaram infiltrados celulares maciços além de focos hemorrágicos, contudo, o tratamento com MC-1 provocou redução desse infiltrado celular mas promoveu alterações morfológicas no sistema porta do órgão, como dilatação de sinusóides hepáticos e congestão nos ramos da veia porta.

Os rins fazem o papel de filtro e como tal são responsáveis pela depuração de substâncias que devem ser eliminadas do organismo. Os cortes histológicos dos rins dos grupos de animais com TAE, com ou sem tratamento com o MC-1, não apresentaram alterações histológicas e estavam com todos os parâmetros morfológicos normais.

Embora a atuação de compostos mesoiônicos no desenvolvimento tumoral seja pouco estudada, o presente trabalho demonstrou que o mesoiônico 1,4-difenil-5-(5-nitro-2-furanyl)-1,3,4-cloreto de tiadiazólio-2-tiol (MC-1), em sua menor concentração (6,25 mg/kg), estudado no modelo experimental de Tumor de Ehrlich na forma ascítica, obteve os melhores resultados, sendo capaz de alterar o curso da doença pela diminuição da formação do líquido ascítico, redução do volume do tumor além de modificar o padrão de migração celular do fluido ascítico, reduzindo o número de macrófagos e aumentando a quantidade de linfócitos e neutrófilos. Em adição o tratamento dos animais com tumor com o MI-01 reduziu aos parâmetros histopatológicos relacionados ao desenvolvimento do tumor nos órgãos tais como baço e fígado.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com o tratamento do MC-1 em modelo murino de Tumor Ascítico de Ehrlich permitem concluir que o mesoiônico:

- Foi capaz de inibir o ganho de peso dos animais em suas três concentrações analisadas;
- Reduziu a formação do líquido inflamatório ascítico característico do processo inflamatório agudo no TAE;
- Diminuiu os valores da circunferência abdominal dos animais tratados;
- Reduziu a quantidade de células totais presentes no líquido ascítico;
- Modulou o perfil do infiltrado inflamatório celular, reduzindo o número de macrófagos e aumentando a quantidade de linfócitos e neutrófilos;
- Reverteu alterações histopatológicas provocadas pelo desenvolvimento do TAE no fígado e baço dos animais tratados.

Assim, conclui-se que o mesoiônico 1,4-difenil-5-(5-nitro-2-furanil)-1,3,4-cloreto de tiadiazólio-2-tiol possui efeitos relevantes frente aos parâmetros tumorais do modelo experimental de Tumor Ascítico de Ehrlich, abrindo novas possibilidades de estudos para alternativas terapêuticas, bem como, compreender de forma mais eficaz, os mecanismos pelos quais essa substância atua em seus efeitos imunomoduladores e antineoplásicos.

Certificado de Aprovação - CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
GABINETE DA VICE-REITORIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação da atividade antineoplásica e imunomoduladora dos compostos mesoiônicos no modelo experimental de tumor Ascítico de Ehrlich**” protocolo nº **109/2017** sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. **Marcia Regina Piuvezam** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 14/12/2017.

Vigência do Projeto	2017 - 2018
Espécie/linhagem	Camundongo Swiss (<i>Mus musculus</i>)
Número de animais	203 animais
Idade/peso	6 – 8 semanas / 25 - 30 g
Sexo	Fêmeas
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM - UFPB

Prof. Dra. Islânia Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB

REFERÊNCIAS

- AL-TEL, T. H. Design and synthesis of novel tetrahydro-2H-Pyrano[3,2-c]Pyridazin-3(6H)-one derivatives as potential anticancer agents. **Eur.J.Med.Chem.**, v. 45, p. 5724–5731, 2010.
- ASADUZZAMAN, A. K. M. *et al.* Moringa oleifera seed lectin inhibits Ehrlich ascites carcinoma cell growth by inducing apoptosis through the regulation of Bak and NF-B gene expression. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 1936-1944, 2018.
- ATHAYDE FILHO, Petrônio Filgueiras *et al.* Synthesis and spasmolytic activity of mesoionic 1, 4-diphenyl-5-(5-nitro-2-furyl)-1, 3, 4-triazolium-2-thiolate hydrochloride. **Heterocyclic Communications**, v. 2, n. 6, p. 573-580, 1996.
- ATHAYDE-FILHO, P. F.; SIMAS, A. M.; MILLER, J. Mesoionic compounds: Amphiphilic heterocyclic betaines. **Synthesis, Journal of Synthetic Organic Chemistry**, 2000(11): 1565-1568, 2000.
- BHOSALE, S. K. *et al.* Design, synthesis and cytotoxic activity evaluation of mesoionic 4-methoxyphenyl sydnone analogs against 60 human tumors cell lines. **Scholars Research Library –Der Pharma Chemica**, v. 7, n. 5, p. 306–318, 2015.
- BOATRIGT, Kelly M. *et al.* A unified model for apical caspase activation. **Molecular cell**, v. 11, n. 2, p. 529-541, 2003.
- BRUNTON, L. L. *et al.* **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 13 ed. [S.L.]: AMGH Editora Ltda., 2012. 1760 p.
- COUSSENS, Lisa M.; Zena Werb. Inflammation and cancer. **Nature**, [S.L.], v. 420, p. 860–867, dez. 2002.
- CORELL, T. *et al.* Pharmacology of mesoionic oxatriazole derivatives in blood, cardiovascular and respiratory systems. **Pol J Pharmacol**. 1994; 46: 553– 566.
- DING, Li *et al.* Perspective on oncogenic processes at the end of the beginning of cancer genomics. **Cell**, v. 173, n. 2, p. 305-320. e10, 2018.
- DOUGLASHANAHAN, ; A.WEINBERG, Robert. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [S.L.], v. 144, n. 5, p. 646-674, /mar. 2011.
- EHRlich, Paul; APOLANT, H. Beobachtungen über maligne Mauseumoren. **Klin. Wschr**, Berlin, v. 28, n. 871-874, jan. 1905.
- ELINAV, Eran *et al.* Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 11, p. 759, 2013.
- FECCHIO, D.; SIROIS, P.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Studies on inflammatory response induced by ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. **Inflammation**, Vol. 14, No. 1, 1990.

- FERNANDES, Patrícia Dias *et al.* Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor development. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 71, p. 83-89, 2015.
- Fridlender ZG, Sun J, Kim S, *et al.* Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. **Cancer Cell**. 2009;16:183-194.
- GREEN, Douglas R. Means to an end: apoptosis and other cell death mechanisms. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2011.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, [S.L], v. 100, n. 1, p. 57-70, jan. 2000.
- HELLEBREKERS, Pien; VRISEKOOOP, Nienke; KOENDERMAN, Leo. Neutrophil phenotypes in health and disease. **European journal of clinical investigation**, v. 48, p. e12943, 2018.
- IBRAHIM, Abeer Y.; EL-NEWARY, Samah A.; IBRAHIM, Gamil E. Antioxidant, cytotoxicity and anti-tumor activity of Cordia dichotoma fruits accompanied with its volatile and sugar composition. **Annals of Agricultural Sciences**, 2019.
- INCA, . **Abc do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 4 ed. Rio de Janeiro: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018. 111 p.
- INCA. **Estatísticas de câncer**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-decancer/>. Acesso em: 13 abr. 2019.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que é câncer?**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer/>. Acesso em: 10 abr. 2019.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Latest global cancer data: cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018**. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/prglobocanfinal.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2019.
- JALES-FILHA, M. P. A. **Síntese, Caracterização e Avaliação Biológica de Novos Compostos Mesoiónicos de Núcleo 1,3,4-Tiadiazólio-5-Tiolato e seus Derivados Ftalidínicos**. Dissertação de Mestrado. UFPB, 2005.
- JÚNIOR, D. R. D. A. *et al.* Ascite - estado da arte baseado em evidências. **Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 55, n. 4, p. 489-96, jan. 2009.
- KIER, L. B.; ROCHE, E. B. J.; **Pharmaco Science**, v. 55, p. 807, 1968.
- KIER, Lemont B.; ROCHE, Edward B. Medicinal chemistry of the mesoionic compounds. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 56, n. 2, p. 149-168, 1967.
- KOLB, Joseph P. *et al.* Programmed cell death and inflammation: winter is coming. **Trends in immunology**, v. 38, n. 10, p. 705-718, 2017.

- MACÊDO, Jamilly Lopes de. **Avaliação do potencial antineoplásico dos compostos mesoiônicos MIH 2.4BL e MIH 2.4Zn, pertencentes ao grupo tiolato, e seus possíveis mecanismos de ação.** 122 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Renorbio)) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2007.
- MANGUEIRA, Vivianne Mendes *et al.* A new acridine derivative induces cell cycle arrest and antiangiogenic effect on Ehrlich ascites carcinoma model. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 90, p. 253-261, 2017.
- MANTOVANI, Alberto. The inflammation – cancer connection. **The FEBS journal**, [S.L], v. 285, n. 4, p. 638-640, jan. 2018.
- MATLUNG, Hanke L. *et al.* Neutrophils kill antibody-opsonized cancer cells by trogoptosis. **Cell reports**, v. 23, n. 13, p. 3946-3959. e6, 2018.
- MEBIUS, Reina E.; KRAAL, Georg. Structure and function of the spleen. **Nature reviews immunology**, v. 5, n. 8, p. 606, 2005.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **Câncer: o que é, causas, tipos, sintomas, tratamentos, diagnóstico e prevenção.** Disponível em:
;http://portalms.saude.gov.br/saude-de-az/cancer;. Acesso em: 14 abr. 2019.
- MISHRA, Abhay P. *et al.* Programmed cell death, from a cancer perspective: An overview. **Molecular diagnosis therapy**, v. 22, n. 3, p. 281-295, 2018.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Types of cancer treatment.** Disponível em:
;https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types;. Acesso em: 13 abr. 2019.
- NAVES, Maria Margareth Veloso; MORENO, Fernando Salvador. Diferenciação celular: importância na hepatocarcinogênese e papel modulador do β -caroteno. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 46, n. 4, p. 389-99, 2000.
- OLIVEIRA, C.S. **Síntese, Caracterização e Avaliação farmacológica de novos compostos mesoiônicos.** Dissertação de mestrado em Química. UFPB, 2009.
- OLIVEIRA, L. P.; PINEHIRO, R. C.; VIEIRIA, M. S.; PAULA, J.R.; BARA, M. T.; VALADARES, M.C. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum L.*, Punicaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.2, p. 201-207, 2010.
- OLIVEIRA, M. *et al.* Phosphorus, Sulfur, Silicon and the Related Elements. **Chemical physics letters**, [S.L], v. 257, n. 5, p. 639-646, jan. 1996.
- OZASLAN, M. *et al.* Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, [S.L], v. 10, n. 13, p. 2375-2378, jan. 2011.
- PATHRIA, Paulina; LOUIS, Tiani L.; VARNER, Judith A.. Targeting TumorAssociated Macrophages in Cancer. **Trends in Immunology**, [S.L], v. 40, n. 4, p. 310- 327, abr. 2019.

- PECORINO, Lauren. **Molecular biology of cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics**. 4 ed. Oxford: OUP Oxford, 2016. 400 p.
- POZHARSKÛ, A. F.; SOLDATENKOV, A. T.; KATRITZKY, A. R., In Heterocyclics in life and society. **Chichester: John Wiley Sons**, 1997. 301p.
- RANG, Rang. Rang dale farmacologia. 8 ed. [S.L.]: **Elsevier**, 2016. 784 p.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro-RJ. 2010.
- ROBERTO, C. *et al.* Natural products as new antimitotic compounds for anticancer drug development. **Clinics**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 73(suppl 1):e813s, out. 2018.
- RODRIGUES, Raul F. *et al.* A comparative study of mesoionic compounds in Leishmania sp. and toxicity evaluation. **European journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 7, p. 1039-1043, 2007.
- SAITO, R. D. F. *et al.* **Fundamentos de oncologia molecular**. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. 498 p.
- SALMERON, Amanda Costa Ayres. **Análise do pré-tratamento com ouabaína nos parâmetros inflamatórios do tumor ascítico de Ehrlich**. Bacharelado em Biotecnologia, UFPB. João Pessoa, 2018.
- SANTOS, Orlando José dos *et al.* Use of raw Euphorbia tirucalli extract for inhibition of ascitic Ehrlich tumor. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, n. 1, p. 18-21, 2016.
- SCHULZ, Wolfgang. Molecular biology of human cancers: an advanced student's textbook. **Springer Science Business Media**, 2005.
- SENF-FRIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E. F., Antimelanoma activity of 1,3,4- thiadiazolium mesoionic: a estrutura-activity relationship study. **Anti-cancer Drugs** 15 (3): 269-275, 2004a.
- SENF-FRIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E. F., Cytotoxic effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. **British J. Cancer** 91(2): 297-304, 2004b.
- SENF-FRIBEIRO, Andrea *et al.* Effect of a new 1, 3, 4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 murine melanoma. **Melanoma research**, v. 13, n. 5, p. 465-471, 2003.
- SIGIURA, K. **Tumor transplantation: methods of animal experimentation**. 1 ed. New York and London: Academic Press, 1965. 171-222 p.
- DA SILVA, Franciele Cristine Marcon; COMARELLA, Larissa. Efeitos adversos associados à quimioterapia antineoplásica: levantamento realizado com pacientes de um hospital do estado do Paraná. **Revista Uniandrade**, v. 14, n. 3, p. 263-277, 2013.

SILVA, Alessandra Estrêla da *et al.* Efeito do hipotireoidismo no tumor de Ehrlich sólido em camundongos fêmeas castradas e não castradas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 48, n. 6. dez. 2004.

SILVA, Pedro Iuri Castro Da; FREITAS, Jofre Jacob Da Silva; DOMINGUES, Robson José De Souza. Manual de oncologia experimental: **Tumor de Ehrlich um Modelo Experimental Centenário**. 1 ed. Universidade do Estado do Pará: Editora da Universidade do Estado do Pará, 2017. 63 p.

SIVEEN, S. et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) signaling in tumour vascularization: potential and challenges. **Current Vascular Pharmacology, Bentham Science Publishers**, v. 15, n. 4, p. 339-351, jul. 2017.

SOARES DE OLIVEIRA, Cleudualdo et al. Drug resistance modulation in Staphylococcus aureus, a new biological activity for mesoionic hydrochloride compounds. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2023-2031, 2011.

SUNIL,D.;ISLOOR,A.M.;SHETTY,P.;NAYAK,P.G.;PAI,K.S.R.In vivo anticancer and histopathology studies of Schiff bases on Ehrlich ascitic carcinoma cells. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 6, p. 25–33, 2013.

TALMADGE, J.E; SINGH,R.K.; FILDLER, I.J.; RAZ, A. A murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p.739, 2007.

TOMINAGA, Naoomi; KATSUDA, Takeshi; OCHIYA, Takahiro. Micromanaging of tumor metastasis by extracellular vesicles. **Seminars in Cell Developmental Biology**, [S.L], v. 40, p. 52-59, /abr. 2015.

TRINCHIERI, Giorgio. Innate inflammation and cancer: is it time for cancer prevention?. **F100 medicine reports**, [S.L], v. 3, n. 11, jun. 2011.

VERMEULEN, Katrien; BOCKSTAELE, Dirk R. Van; BERNEMAN, Zwi N.. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, [S.L], v. 36, n. 3, p. 131-149, jun. 2003.

Vincent, P. C., Nicholls, A. (1967). Comparison of the growth of the Ehrlich ascites tumor in male and female mice. **Cancer Research**, 27, 1058–1065.

WAGNER, H.; HILL, John B. Antiinflammatory sydnone. 1. **Journal of medicinal chemistry**, v. 17, n. 12, p. 1337-1338, 1974.

YASHUNSKII, Vladimir Genrikhovich; KHOLODOV, L. E. The chemistry of sydnone imines. **Russian Chemical Reviews**, v. 49, n. 1, p. 28, 1980.

YURCHENKO, Ekaterina A. *et al.*. Hsp70 induction and anticancer activity of U-133, the acetylated trisglucosydic derivative of echinochrome. **Med. Chem**, v. 5, n. 6, p. 2161-0444.1000274, 2015.