

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LARIZZA HELLEN SANTANA MATOS

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA AGUDA DOS DERIVADOS DIIDROPIRIMIDINONAS
4P E 4BC

Brasília

2017

LARIZZA HELLEN SANTANA MATOS

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA AGUDA DOS DERIVADOS DIIDROPIRIMIDINONAS
4P E 4BC

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello.

Brasília

2017

LARIZZA HELLEN SANTANA MATOS

TÍTULO: AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA AGUDA DOS DERIVADOS
DIIDROPIRIMIDINONAS 4P E 4BC.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em _____ de _____ de 2017.

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE:

Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello
Universidade de Brasília (UnB)

MEMBROS:

Prof. Dr. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza
Universidade de Brasília (FCE/UnB)

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa
Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista
Universidade de Brasília (UnB).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu bom Deus por me conceder a vida e sempre cuidar dos meus passos e das minhas escolhas.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello, pelo conhecimento compartilhado, incentivo, companheirismo e por ser meu exemplo de pesquisador e professor, sabemos que foi uma jornada repleta de desafios, mas com sua liderança conseguimos superar as dificuldades.

Agradeço aos meus pais, Leda e Matos, pela formação e apoio durante toda minha vida, pelos conselhos, pelo carinho e por não me deixar abalar diante das dificuldades, sem vocês jamais conseguiria. A minha irmã (miúda) meu obrigado pelo companheirismo e amor.

Ao meu namorado Thiago Sousa pela parceria ao longo desses anos, por me incentivar e não me deixar desanimar. Agradeço pela imensa ajuda com a parte das análises estatística e pela paciência ao longo dessa minha trajetória.

Aos meus eternos amigos da vida (Aninha, Brenda, Dayse, Luzia, Cíntia, Láyna, Ariane, Laryssa, Karol, Mari, Grazi, Camila) do trabalho (Chyntia, Helder, Tiago, Kelly, Danny, Queiroz, Ruberam e Miguel), do EJOc, aos meus familiares e minhas primas-irmãs (Raquel, Hallyne e Milena) que entenderam a minha ausência ao longo desses dois anos de estudo, mas que permaneceram presentes me apoiando e cuidando de mim.

Às professoras Dra. Pérola Magalhães, Dra. Yris Maria Fonseca-Bazzo e Dra. Dâmaris Silveira por terem me dado a oportunidade de desenvolver meu trabalho no laboratório e muito além de disponibilizar o espaço me fizeram pertencer ao grupo de pesquisa, ser parte dessa equipe maravilhosa. Meu muito obrigado.

Ao prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto e sua equipe, em especial ao Beto por terem cedido gentilmente as moléculas para execução do meu trabalho, bem como por sempre estarem disponíveis para nós para solucionar dúvidas e melhorar nossa trabalho, sem vocês nada disso seria possível.

À profa. Dra. Yanna pela colaboração e disponibilidade em nos auxiliar com os exames hematológicos e bioquímicos e a toda a equipe do Laboratório de

Doenças Celíacas que sempre foram muito gentis e prestativos, em especial à Yllana, Laise, Laís e a Cida.

Ao veterinário Dr. José Luiz Jivago pelo auxílio imparcial com os animais, como também aos bioteristas Adriana e o Everton pela amizade construída e ajuda diária.

Ao prof. Dr. Márcio Botelho de Castro pela ajuda na avaliação histológica dos nossos estudos e por permitir o trabalho em seu laboratório, acredito que iniciamos uma boa parceria.

A profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kuckelhau por ceder o espaço de trabalho e recursos para que eu conduzisse as atividades histológicas, bem como à técnica Maria da Glória por toda a ajuda e conhecimento.

Ao prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni pelo auxílio na reta final deste trabalho, assim como à profa. Dra. Daniella Mara de Oliveira e profa. Dra. Aline Pic Taylor por todas as contribuições.

A CAPES, FAP/DF e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos do Laboratório de Produtos Naturais e de Controle da qualidade de medicamentos, em especial aos meus companheiros e amigos Lorena, Yuri, Samuel, Manu, Marcela, João, Diegue, Amanda, Márcia, Paula, Gabriela, Patrícia e Ju.

Agradeço grandemente à Natália uma pessoa incrível que a toxicologia me presenteou, como foi importante ter alguém para dividir as ansiedades e dificuldade de se trabalhar com ensaios em animais, levo dessa grande experiência sua amizade. Também sou grata a Luciana Noly que foi de extrema ajuda com as técnicas de manuseio com os animais sua dedicação à pesquisa é inspiradora.

A minha eterna gratidão às duas melhores e especiais alunas de iniciação científica, Camila Letícia e a Tais Maia, vocês foram minhas grandes parceiras nessa caminhada que é a ciência, vejo um futuro muito brilhante para vocês, só tenho a agradecer pelo trabalho e dedicação. Nossa relação foi além das tardes de eutanásia e de processamentos histológicos levo uma grande amizade.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.” (Charles Chaplin)

RESUMO

O câncer é uma doença complexa e multifatorial que possui alta incidência e mortalidade em todo mundo. Os fármacos utilizados na terapia convencional apresentam inúmeros efeitos adversos e resistências, portanto existe a necessidade de desenvolvimento de novos antineoplásicos mais seguros e eficazes. O monastrol surgiu como uma opção para o tratamento do câncer e derivados diidropirimidinonas foram sintetizados e seu efeito antitumoral investigado. Os compostos 4p e 4bc apresentaram em estudos prévios atividade citotóxica contra linhagens de adenocarcinoma (MCF-7 e MDA-MB-231), sendo seletiva para as células tumorais. Diante dos resultados *in vitro* o presente estudo tem como objetivo a avaliação toxicológica aguda *in vivo* desses derivados e traçar o perfil da biodisponibilidade. Inicialmente foi avaliada a toxicidade após administração oral do 4p e 4bc, logo depois através de um estudo adicional pela via intravenosa apenas para o 4bc, não sendo observada morte, sinais clínicos de toxicidade em todas as doses e vias avaliadas. Com base nesse estudo para a exposição oral os compostos foram classificados como categoria 5 pela GHS. Também não foram reveladas alterações clinicamente relevantes no consumo de ração, água, ganho de peso e índice dos órgãos em ambos os estudos. Os exames histológicos e anatomopatológicos revelaram normalidade em todos os grupos dos ensaios. Através dos exames hematológicos e bioquímicos os parâmetros que se apresentavam fora da normalidade para a administração oral (Leucócitos, Monócitos, Contagem de plaquetas, Ureia) e intravenosa (Leucócitos, Monócitos, Contagem de plaquetas, Ureia e AST) foram relatados para todos os grupos, indicando não ser um efeito da exposição aos DHPMs. A diferença significativa e clinicamente relevante reportada entre todos os grupos tratados e os controles foi revelada após a administração pela via intravenosa do 4bc, para os parâmetros triglicérides e glicose. Não foram determinados os compostos no sangue após exposição aguda oral e intravenosa através da cromatografia líquida de alta eficiência e ensaio de luminescência. Os resultados sugerem baixa toxicidade aguda pelas vias avaliadas, sendo necessária a continuidade dos estudos e toxicidade e avaliar mais profundamente o perfil farmacocinético dos derivados 4p e 4bc.

Palavras chaves: Diidropirimidinonas, 4p, 4bc, toxicidade, biodisponibilidade.

ABSTRACT

Cancer is a complex and multifactorial disease that has a high incidence and mortality worldwide. Drugs used in conventional therapy have numerous adverse effects and resistance. The development safer and more effective antineoplastic agents. Monastrol emerged as an option for the treatment of cancer and dihydropyrimidinone derivatives were synthesized and its antitumor effect investigated. Compounds 4p and 4bc showed selective cytotoxicity for tumor cells in previous studies against adenocarcinoma (MCF-7 and MDA-MB-231) lines. In view of the in vitro results, the present study has as its objective the acute toxicological evaluation in vivo of these derivatives and to trace the bioavailability profile. Initially toxicity was assessed following oral administration of 4p and 4bc, and then further study by intravenous route only for 4bc, and no clinical signs of toxicity were observed at all doses and routes evaluated. Based on this study for oral exposure the compounds were classified as category 5 by the GHS. Further analysis showed no clinically relevant changes in feed intake, water intake, weight gain and organ index. Histological and anatomopathological studies revealed normality in all groups of the trials. Hematological and biochemical tests revealed abnormal parameters for oral administration (Leukocytes, Monocytes, Platelet Count, Urea) and intravenous (Leukocytes, Monocytes, Platelet Count, Urea and AST) were reported for all groups, indicating not to be an effect of exposure to DHPMs. The significant and clinically relevant difference reported between all treated groups and controls was revealed following intravenous administration of 4bc for the triglycerides and glucose parameters. No compounds were determined in the blood after acute oral and intravenous exposure through high performance liquid chromatography and luminescence assay. The results suggest low acute toxicity by the routes evaluated, and the continuity of the studies and toxicity is necessary and more deeply evaluate the pharmacokinetic profile of derivatives 4p and 4bc.

Key words: Dihydropyrimidinones, 4p, 4bc, toxicity, bioavailability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma	20
Figura 2. Etapas do processo de carcinogênese	22
Figura 3. Etapas do processo de metástase.	23
Figura 4. Estrutura básica das diidropirimidinonas e reação de Biginelli.....	26
Figura 5. Estrutura química do 6-metil-4-(2-hidroxifenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5 etilcarboxilato (DHPM 4p) e 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-etilcarboxilato (DHPM 4bc), respectivamente ..	29
Figura 6. Células MCF-7 foram tratadas por 24 horas com o monastrol (0,1 mM – controle positivo), 4p (0,4 mM) e 4bc (1 mM)	31
Figura 7. Modelo 3D baseado na estrutura dos complexos da Eg5 após os ensaios de Dinâmica Molecular, com a Eg5 representada na cor cinza e os resíduos anotados em preto indicam aminoácidos (verde) em que ocorre ligação direta com os compostos, e os em laranja indicam ligações mediadas por moléculas de água.	32
Figura 8. Ratos <i>Wistar Hannover</i> fêmeas.....	38
Figura 9. Etapas para a avaliação de toxicidade aguda de classes baseado no Guia da OECD 423.....	43
Figura 10. Animal acondicionado no dispositivo de retenção	44
Figura 11. Procedimento de incisão para realização da fixação por perfusão ¹²⁵	48
Figura 12. 4bc fluorescente	53
Figura 13. Delineamento experimental da análise da biodisponibilidade por fluorescência	55
Figura 14. Composto 4p após atingir a temperatura 217 °C com aspecto carbonizado.....	56
Figura 15. Predição da solubilidade do composto 4bc em função do pH do meio	59
Figura 16. Predição da solubilidade do composto 4p em função do pH do meio	59
Figura 17. Curva padrão do composto 4bc, onde y é a equação da reta.	60
Figura 18. Composto 4bc após 24 horas de agitação e temperatura controladas em tampões de pH 7 e 12 respectivamente.	61
Figura 19. Composto 4p após 24 horas de agitação e temperatura controladas em tampões de pH 12 e 7 respectivamente.	62

Figura 20. Ganho de peso dos ratos nos diferentes grupos experimentais (oral) durante os 14 dias de ensaio, representado por <i>box plot</i> com intervalos interquartis e mediana.....	66
Figura 21. Evolução da massa corporal dos ratos nos diferentes grupos experimentais durante o teste de toxicidade oral aguda	67
Figura 22. Relação de consumo de ração por peso corporal dos três animais pertencentes aos grupos experimentais (oral) durante os 14 dias de ensaio, representado por <i>box plot</i> com intervalos interquartis e mediana	68
Figura 23. Evolução do consumo de ração por peso corporal dos diferentes grupos experimentais ao longo de 14 dias (oral).....	69
Figura 24. Consumo de água por peso corporal dos três animais pertencentes aos grupos experimentais (oral) durante os 14 dias de ensaio, representado por <i>box plot</i> com intervalos interquartis e mediana.....	69
Figura 25. Evolução do consumo de água por peso corporal dos diferentes grupos experimentais ao longo de 14 dias (oral).....	70
Figura 26. Fotografia dos órgãos dos diferentes grupos experimentais (oral).....	72
Figura 27 Fotomicrografia dos tecidos avaliados nos diferentes grupos experimentais (oral).....	79
Figura 28. Ganho de peso dos ratos nos diferentes grupos experimentais (intravenoso) durante os 14 dias de ensaio, representado por <i>box plot</i> com intervalos interquartis e mediana.....	91
Figura 29. Evolução da massa corporal dos ratos nos diferentes grupos experimentais durante o ensaio de toxicidade intravenosa aguda	91
Figura 30. Consumo de ração por peso corporal dos cinco animais pertencentes aos grupos experimentais (intravenoso) durante os 14 dias de ensaio, representado por <i>box plot</i> com intervalos interquartis e mediana	92
Figura 31. Evolução do consumo de ração dos diferentes grupos experimentais ao longo de 14 dias (intravenoso)	93
Figura 32. Consumo de água por peso corporal dos cinco animais pertencentes aos grupos experimentais (intravenoso) durante os 14 dias de ensaio, representado por <i>box plot</i> com intervalos interquartis e mediana	93
Figura 33. Evolução do consumo de água dos diferentes grupos experimentais ao longo de 14 dias (intravenoso)	94
Figura 34. Curva analítica do 4p realizada em solvente.....	104

Figura 35. Perfil Cromatográfico do 4p (20ug/mL) a 312 nm.....	105
Figura 36. Curva analítica do 4bc realizada em solvente.....	105
Figura 37. Perfil Cromatográfico do 4bc (4ug/mL) a 312 nm.....	106
Figura 38. Perfil Cromatográfico do 4p após método de extração a 312 nm, realizado por técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	106
Figura 39. Perfil Cromatográfico do 4p após método de extração a 312 nm, realizado por técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	107
Figura 40. Perfil Cromatográfico do composto 4bc extraído após 1h 30 da administração intravenosa a 312 nm, realizado por técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência.....	108
Figura 41. Análise da biodistribuição <i>in vivo</i> pelo equipamento IVIS Lumina XR. (A) Controle Xarope, (B) Composto 4bc administrado pela via oral, (C) Controle suspensão e (D) Composto 4bc administrado pela via intravenosa.....	110
Figura 42. Avaliação empírica da emissão de fluorescência pelo composto 4bc....	111
Figura 43. Análise <i>ex vivo</i> dos animais expostos ao 4bc fluorescente pela via oral (dose 50mg/kg) em comparação com o controle xarope. A- rins, fígado e coração. B- cérebro	111
Figura 44. Análise <i>ex vivo</i> dos animais expostos ao 4bc fluorescente pela via intravenosa (dose 2,5 mg/kg) em comparação com o controle suspensão. A- rins, fígado e coração. B- cérebro.....	112
Figura 45. Esfregaço sanguíneo avaliado por microscopia de fluorescência. A - Controle Xarope e B – composto 4bc fluorescente (50mg/kg) administração oral ..	113
Figura 46. Esfregaço sanguíneo avaliado por microscopia de fluorescência. A – Controle Suspensão e B – composto 4bc fluorescente (2,5 mg/kg) administração intravenosa.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais classes de fármacos antineoplásicos divididos pela ação sobre o ciclo celular.....	25
Tabela 2 - Desenho experimental para a avaliação da toxicidade aguda oral dos compostos 4p e 4bc	43
Tabela 3 - Desenho experimental para a avaliação da toxicidade aguda intravenosa do composto 4bc	45
Tabela 4 - Desenho experimental para coleta de sangue seriada para predição do perfil de absorção.....	51
Tabela 5 - Gradiente da fase móvel para a detecção dos compostos 4p e 4bc	53
Tabela 6 - Resultado do ponto de fusão do composto 4bc	56
Tabela 7 - Resultados do pKa dos compostos 4bc e 4p	58
Tabela 8- Dados da curva analítica espectrofotométrica do composto 4bc	60
Tabela 9 - Resultado da solubilidade do composto 4bc em meios de pH 7 e 12	61
Tabela 10 - Número de animais que apresentaram os sinais clínicos de toxicidade e a intensidade	65
Tabela 11- Valores médios dos índices dos órgãos (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via oral com 4p e 4bc na dose de 300 mg/kg e 200mg/kg e grupos controles.....	75
Tabela 12 - Valores médios dos parâmetros hematológicos (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via oral com 4p e 4bc na dose de 300 mg/kg e 2000 mg/kg e grupos controles.....	84
Tabela 13 - Valores médios da contagem de células (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via oral com 4p e 4bc na dose de 300 mg/kg e 2000 mg/kg e grupos controles.....	85
Tabela 14 - Valores médios dos parâmetros bioquímicos (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via oral com 4p e 4bc na dose de 300 mg/kg e 2000 mg/kg e grupos controles.....	88
Tabela 15 - Número de animais que apresentaram os parâmetros de toxicidade e a intensidade	90
Tabela 16 – Valores médios dos índices dos órgãos (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via intravenosa com 4bc na dose de 1,0 mg/kg, 2,50 mg/kg e 5,0 mg/kg e grupos controles	96

Tabela 17 - Valores médios da contagem de células (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via intravenosa com 4bc na dose de 1,0 mg/kg, 2,50 mg/kg e 5,0 mg/kg e grupos controles	98
Tabela 18 - Valores médios dos parâmetros hematológicos (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via intravenosa com 4bc na dose de 1,0 mg/kg, 2,50 mg/kg e 5,0 mg/kg	99
Tabela 19- Valores médios dos parâmetros bioquímicos (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via intravenosa com 4bc na dose de 1,0 mg/kg, 2,50 mg/kg e 5,0 mg/kg e grupos controles	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DHPM	Diidropirimidinona
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECC	Fármacos específicos para o ciclo celular
GHS	<i>The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals</i>
HCM	Hemoglobina corpuscular média
ICC	Fármacos inespecíficos para o ciclo celular
INCA	Instituto Nacional de Câncer
OECD	<i>Organization of Economic Cooperation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
RDW	Amplitude de distribuição dos eritrócitos
TCA	Ácido tricloroacético
UnB	Universidade de Brasília
UV-IS	Ultravioleta visível
VCM	Volume corpuscular médio
VPM	Volume plaquetário médio

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1.	CÂNCER.....	19
2.2.	TERAPIAS CONVENCIONAIS.....	23
2.3.	DIIDROPIRIMIDINONAS.....	25
2.3.1.	DHPMs com atividade antitumoral	26
2.4.	DERIVADOS DHPMS 4P E 4BC.....	27
2.5.	AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA.....	31
2.5.1.	Toxicidade aguda	32
2.5.2.	Biodisponibilidade	32
3.	OBJETIVOS	35
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	35
4.	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1.	MATERIAL.....	36
4.1.1.	Derivados DHPMs- 4p e 4bc	36
4.1.2.	Local dos experimentos	36
4.1.3.	Modelo animal	36
4.1.3.1.	Considerações éticas.....	37
4.2.	MÉTODO.....	38
4.2.1.	Perfil físico químico	38
4.2.1.1.	Ponto de fusão.....	38
4.2.1.2.	Técnicas <i>in silico</i> (previsão de pKa e solubilidade).....	38
4.2.1.3.	Determinação experimental da solubilidade.....	39
4.2.2.	Formulações	39
4.2.2.1.	Formulação oral.....	39
4.2.2.2.	Formulação Intravenosa.....	40
4.2.3.	Experimentos <i>in vivo</i>	41
4.2.3.1.	Toxicidade oral aguda.....	41
4.2.3.2.	Toxicidade intravenosa aguda.....	43
4.2.3.3.	Avaliação dos sinais de toxicidade.....	44
4.2.3.4.	Avaliação ponderal.....	45

4.2.3.5.	Avaliação do consumo de ração e água.....	45
4.2.3.6.	Avaliação anatomopatológica.....	45
4.2.3.7.	Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	46
4.2.3.8.	Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	46
4.2.3.9.	Histologia.....	47
4.2.3.9.1.	<i>Fixação por perfusão</i>	47
4.2.3.9.2.	<i>Perfusão por imersão</i>	47
4.2.3.9.3.	<i>Processamento dos tecidos</i>	47
4.2.3.9.4.	<i>Microtomia</i>	48
4.2.3.9.5.	<i>Coloração com hematoxilina-eosina</i>	48
4.2.3.9.6.	<i>Análise histológica</i>	49
4.2.4.	Avaliação da biodisponibilidade	49
4.2.4.1.	Cromatografia de alta eficiência (CLAE).....	49
4.2.4.1.1.	<i>Obtenção das amostras</i>	49
4.2.4.1.2.	<i>Processo de extração</i>	50
4.2.4.1.3.	<i>Análise</i>	51
4.2.4.2.	Fluorescência.....	52
4.2.4.2.1.	<i>Composto 4bc fluorescente</i>	52
4.2.4.2.2.	<i>Desenho experimental</i>	53
4.2.5.	Análise Estatística	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1.	PERFIL FÍSICO QUÍMICO – 4P E 4BC.....	55
5.1.1.	Ponto de fusão	55
5.1.2.	Previsão do pKa	57
5.1.3.	Determinação de solubilidade	57
5.1.3.1.	Predição de solubilidade – <i>In sílico</i>	57
5.1.3.2.	Determinação experimental da solubilidade.....	58
5.2.	TOXICIDADE AGUDA.....	62
5.2.1.	Toxicidade oral aguda – 4p e 4bc	62
5.2.1.1.	Avaliação da toxicidade sistêmica.....	62
5.2.1.1.1.	<i>Mortalidade</i>	62
5.2.1.1.2.	<i>Sinais clínicos de toxicidade</i>	63
5.2.1.2.	Avaliação ponderal.....	65

5.2.1.3.	Avaliação do consumo de ração e água.....	66
5.2.1.4.	Avaliação anatomopatológica.....	69
5.2.1.5.	Avaliação dos índices dos órgãos.....	72
5.2.1.6.	Avaliação histológica.....	75
5.2.1.7.	Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	79
5.2.1.8.	Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	85
5.2.2.	Toxicidade intravenosa aguda – 4bc	88
5.2.2.1.	Avaliação da toxicidade sistêmica.....	88
5.2.2.1.1.	<i>Mortalidade</i>	88
5.2.2.1.2.	<i>Sinais clínicos de toxicidade</i>	88
5.2.2.2.	Avaliação ponderal.....	89
5.2.2.3.	Avaliação do consumo de ração e água.....	91
5.2.2.4.	Avaliação anatomopatológica.....	93
5.2.2.5.	Avaliação dos índices dos órgãos.....	94
5.2.2.6.	Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	95
5.2.2.7.	Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	99
5.3.	AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE.....	103
5.3.1.	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência	103
	(CLAE)	
5.3.2.	Fluorescência	108
6.	CONCLUSÃO	113
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
8.	ANEXO I	132

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças caracterizada pelo crescimento celular desordenado, que levam a alterações na fisiologia das células e comprometem seu funcionamento. Sua origem é multicausal sendo considerada uma das principais causas de morte no mundo desenvolvido e em desenvolvimento, nas quais a soma de casos novos diagnosticados a cada ano aumenta consideravelmente e as terapias medicamentosas convencionais provocam uma série de efeitos adversos ^{1 2}.

Diante da problemática que é o câncer na saúde pública e na economia das nações as pesquisas de descoberta que candidatos antineoplásicos com baixa toxicidade e redução de mecanismos de resistência é bastante estimulada ^{3 4}.

Nesse contexto a química medicinal vem como estratégia de inovação farmacêutica, na qual a partir de um arcabouço estrutural químico conhecido são realizadas variações nas cadeias laterais, a fim de se obter compostos com atividades biológicas e características farmacotécnicas mais promissoras ^{5 6}.

O monastrol é o composto protagonista da classe das diidropirimidinonas, sendo a primeira molécula conhecida capaz de inibir a proteína motora Eg5 e assim bloquear a mitose, de forma mais específica nas células tumorais. A partir da sua descoberta muitos análogos foram sintetizados mantendo o núcleo pirimidínico, mas alterando os grupamentos químicos ligados a ele em busca de derivados mais potentes, específico e com reduzida toxicidade ^{7 8}. Os compostos 4p e 4bc foram desenvolvidos a partir dessa estratégia ^{9 10}.

Em estudos anteriores os compostos 4p e 4bc foram avaliados em relação à atividade antimicrobiana e posteriormente à antitumoral e apresentaram como resultado a ação citotóxica e/ou citostática para células cancerosas com concentrações pequenas sem consideráveis danos a células normais, elevada toxicidade específica para as células tumorais em diferentes concentrações, além de alterar a morfologia das células neoplásicas seletivamente e reduzir a angiogênese ^{6 9 10 11}.

Desta maneira a proposta deste estudo foi verificar a toxicidade aguda oral dos derivados DHPM 4p e 4bc e intravenosa do 4bc em ratas *Wistar*, analisando-se parâmetros hematológicos, perfil bioquímico e características anátomo-histopatológicas dos animais expostos a estes compostos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CÂNCER

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças caracterizadas pelo descontrole de proliferação e resistência aos mecanismos de morte, que podem então invadir partes adjacentes do corpo e / ou espalhar-se para outros órgãos, podendo afetar diversas partes do corpo. Além disso, possui muitos subtipos anatômicos e moleculares que exigem estratégias de tratamento específicas ¹².

O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo e representou 8,8 milhões de óbitos em 2015. Globalmente, cerca de uma em cada seis mortes é causada pelo câncer ^{1 12 13}. Estimativas indicam que em 2030- cerca de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes em função do câncer aparecerão. O aumento da populações e sua expectativa de vida, bem como a alta taxa de sedentarismo, infecções e exposição a fatores de risco são justificativas para números tão alarmantes ¹⁴.

Os tipos de câncer mais incidentes (casos/ano), mundialmente, são os de pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os tipos mais frequentes foram os de pulmão, próstata, intestino, estômago e fígado. Em mulheres, as maiores frequências encontraram-se para os cânceres de mama, intestino, pulmão, colo do útero e estômago ^{1; 12}.

Para o biênio 2016-2017, estima-se a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer no Brasil. Diferentemente do perfil global o câncer de próstata em homens (61 mil) e o de mama em mulheres (58 mil) ainda são os mais prevalentes. O panorama geral dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil por sexo está expresso na Figura 1.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens 	Mulheres 	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma

Fonte: INCA ¹

O câncer é causado por diversos fatores sendo eles classificados como externos ou internos e atuam de forma inter-relacionada. Os fatores externos representam cerca de um terço das mortes por câncer, e representam os cinco principais riscos comportamentais e dietéticos: alto índice de massa corporal, baixa ingestão de frutas e vegetais, falta de atividade física, uso de tabaco e consumo de álcool. Os fatores externos estão relacionados com os hábitos de vida em sociedade, já os fatores internos são inerentes ao organismo, e se manifestam como mutações genéticas hereditárias, alterações hormonais e diversas condições imunológicas¹. De acordo com a evidência atual, entre 30% e 50% das mortes por câncer poderiam ser evitadas com a modificação ou redução dos fatores de risco chave, por exemplo, evitar produtos de tabaco, reduzir o consumo de álcool, manter um peso corporal saudável, exercitar-se regularmente e ter uma alimentação equilibrada¹².

As células normais que constituem os tecidos do organismo são capazes de se multiplicar seguindo a regulação de crescimento celular por meio dos genes que ativam a proliferação (proto-oncogenes) e os que inibem a divisão celular (supressores tumorais). O equilíbrio na atuação desses dois grupos de genes resulta no perfeito funcionamento do ciclo celular e caso esse sistema falhe ainda existem os genes que reparam o DNA, ou processos que levam à morte celular por apoptose^{3 15 16}. Diante disso as alterações que impulsionam a progressão descontrolada do ciclo celular são eventos necessários na oncogênese¹⁶. As células cancerosas possuem como características fenotípicas a rápida taxa de divisão celular, alta taxa metabólica, perda da inibição por contato, perda de adesão, síntese de proteases, habilidade de invadir e colonizar domínios reservados para outras células e morfologia anormal^{17 18}.

A literatura evidência que a oncogênese em seres humanos é um processo de vários passos e que essas etapas refletem alterações genéticas que impulsionam a transformação progressiva de células humanas normais em derivados altamente malignos¹⁷. Para que essa transição ocorra seis alterações fisiológicas são essenciais, sendo elas: a insensibilidade aos sinais inibitórios de crescimento, potencial replicativo ilimitado, auto suficiência no crescimento, resistência à apoptose, indução da angiogenese, ativação da invasão e metástase, essas características são comuns a todos os tipos de tumores¹⁷. Mais recentemente

outras características das células cancerígenas foram descobertas, sendo as duas principais: reprogramação do metabolismo energético e a evasão da inativação pelo sistema imunológico. Essas características conferem às células tumorais a capacidade de sobrevivência, multiplicação e disseminação o que determina o prognóstico para os portadores dessas doenças ¹⁸.

O processo de carcinogênese é dividido em três estágios, sendo eles: iniciação, promoção e progressão (Figura 2) ¹⁹.

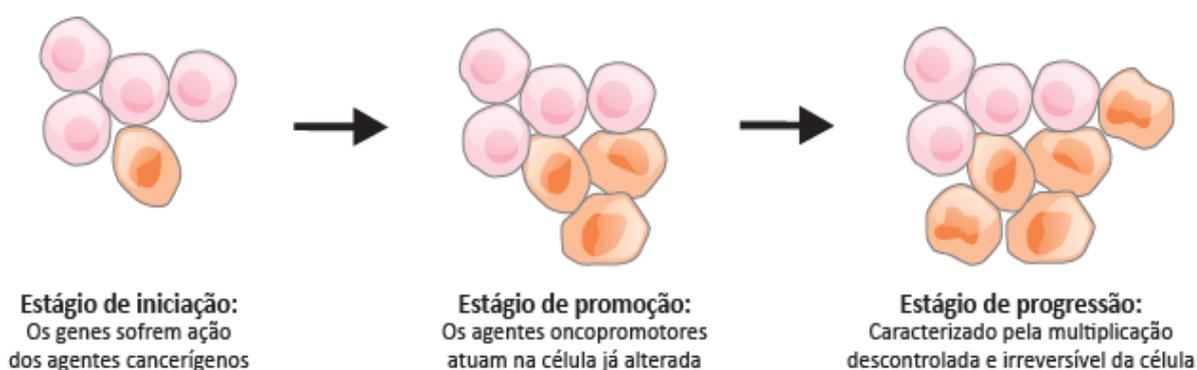


Figura 2. Etapas do processo de carcinogênese

Fonte: INCA ¹⁹

O primeiro estágio é definido pela exposição das células aos agentes cancerígenos que causam modificações em seus genes que passam a receber informações erradas para suas atividades ou mesmo a interferência de fatores epigenéticos, mas não é possível ainda detectar um tumor clinicamente. O segundo momento é marcado pela ação dos oncopromotores sobre as células já afetadas, de forma lenta e gradual as células iniciadas são transformadas em células malignas. A última etapa se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas ^{19 20 21}.

Os processos de oncogênese também são influenciados pelos mecanismos epigenéticos, os quais parecem ser importantes por alterarem a expressão de genes chave no desenvolvimento da oncogênese, sendo os mecanismos principais: a metilação do DNA e a modificação de histonas, que poderia causar instabilidade do genoma permitindo outras mutações necessárias na formação de tumores ¹⁸.

Em alguns tipos do câncer a invasão e a metástase tumoral são acontecimentos dependentes da angiogênese, que é induzida precocemente

durante o desenvolvimento em vários estágios de câncer invasivo tanto em modelos animais quanto em seres humanos ^{18 22}.

A metástase ocorre quando as células tumorais acessam aos vasos sanguíneos e linfáticos, penetram pela membrana basal e pela parede endotelial e se disseminam pelo lúmen dos vasos com consequente colonização de órgãos distantes do tumor primário, sendo a ativação da transição epitélio-mesenquimal (TEM) indicada como mecanismo crítico para a aquisição de fenótipos metastático de câncer ^{23 24 25}.

O processo de invasão e metástase ocorre a partir de vários passos causados por alterações genéticas e epigenéticas em moléculas reguladoras chaves ²⁶. A sucessão de alterações biológicas celulares começa com a invasão local, seguida do intravasamento das células cancerosas, transporte através da circulação, extravasamento, formação de micrometástase e finalmente a colonização (Figura 3) ^{22 23 24}.

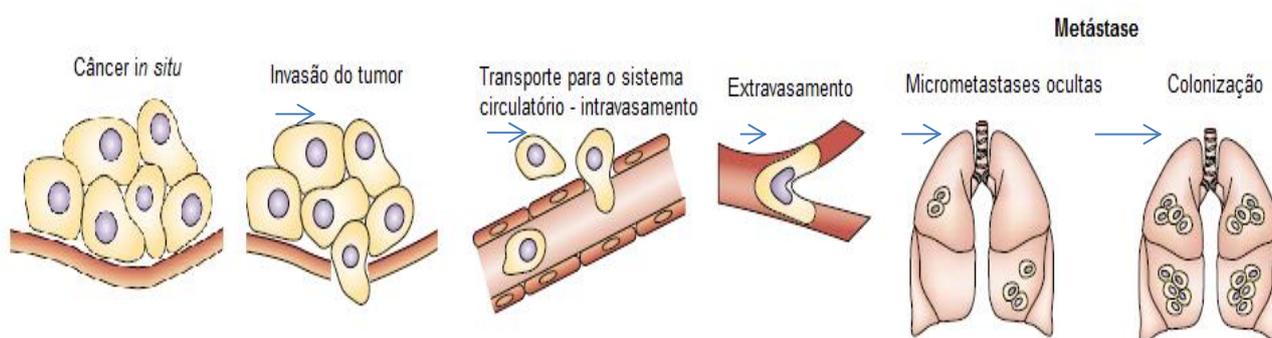


Figura 3. Etapas do processo de metástase.

Fonte: Adaptado de Steeg, Nature Reviews Cancer, 2003 ²²

Alterações na transcrição de genes de marcadores de diferenciação epitelial, como o da E-caderina e β -catenina, por meio de metilação no DNA, bem como a ativação ou supressão de histona desacetilases, histonas acetiltransferases e outras enzimas modificadoras da cromatina, causam a diminuição da adesão entre as células e entre as células e a matriz facilitando o desprendimento do tumor primário ^{26 27}. A locomoção das células ocorre através da matriz modificada por proteólise e que as fazem atingir o sistema circulatório. As células ao aderirem às plaquetas circulantes, por meio da expressão de integrinas se camuflam protegendo-se das células de defesa circulantes. Dessa forma atingem outras regiões diferentes do

local do tumor primário dando origem a tumores micrometastáticos, que evoluem para macroscópicos, quando então se considera que a célula tumoral colonizou o tecido ²⁸.

2.2. TERAPIAS CONVENCIONAIS

Existem três abordagens principais para o tratamento do câncer: excisão cirúrgica, irradiação e quimioterapia. Atualmente a terapia de fotoradiação com derivados hematoporfirínicos e a imunoterapia também estão sendo incorporadas nas práticas clínicas. Normalmente é necessária a abordagem combinada, onde são associados mais de uma modalidade de tratamento.

A quimioterapia é utilizada quando é necessário um tratamento sistêmico, já que a cirurgia e a irradiação são locais, e tem apresentados resultados de cura de até 90% dependendo do tipo de câncer e do diagnóstico precoce. No entanto, os efeitos adversos e os mecanismos de resistência têm surgido como limitantes das terapias atuais e impulsionado pesquisas de novos candidatos a fármacos e aos programas de saúde que estimulem medidas para o diagnóstico precoce.

A limitação da maioria dos fármacos antineoplásicos disponível pode ser entendida pelas informações sobre a cinética celular das células cancerígenas, já que afetam diferentes processos celulares e dessa forma as células tumorais podem “escapar” de suas ações e então proliferar-se. ^{3 29}.

Os fármacos utilizados no tratamento do câncer podem ser divididos em duas grandes categorias de acordo com o mecanismo de ação: fármacos específicos para o ciclo celular (ECC) e fármacos inespecíficos para o ciclo celular (ICC) ^{3 30}.

Os fármacos ECC são mais indicados no tratamento de tumores sólidos e neoplasias hematológicas, já os ICC são direcionados no tratamento de tumores sólidos com baixa taxa de crescimento ³. As principais classes de agentes quimioterápicos compreendidas como ECCs e ICCs estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1- Principais classes de fármacos antineoplásicos divididos pela ação sobre o ciclo celular

Fonte: Adaptado de Almeida, Química Nova, 2005

Fármacos específicos do ciclo celular (ECCs)	Fármacos inespecíficos do ciclo celular (ICCs)
Antimetabólitos (fase S) : Metotrexato, Gencitabina	Fármacos alquilantes: Ciclofosfamida, Bussulfano, Nitrossuréias
Epipodofilotoxinas (Fase G₁-S): Etopósido	Antibióticos antitumorais: Dactinomicina, Mitomicina
Taxanos (Fase M): Paclitaxel, Cabazitaxel	Camptotecinas: Irinotecana, Topotecana
Alcaloides da vinca (Fase M): Vimblastina, Vincristina	Análogos da platina: Cisplatina, Oxaliplatina
Inibidor antimicrotúbulo (Fase M): Ixabepilona	Antraciclinas: Epirrubicina, Idarrubicina
Antibióticos antitumorais (Fase G₂-M): Bleomicina	

Os fármacos capazes de inibir a mitose por ação sobre o fuso mitótico normalmente interferem com a dinâmica dos microtúbulos. Esses componentes são importantes na manutenção das funções do citoesqueleto, transporte intracelular, inclusive nas células neurais onde o transporte axonal de vesículas contendo neurotransmissores é orientada pelos micronúcleos. Dessa forma, o efeito adverso comum a esses fármacos é a neuropatia periférica que limita a dose tolerada pelos pacientes ³¹.

Esses fármacos não atuam exclusivamente sobre as células tumorais. As células dos tecidos que se renovam constantemente, como a pele a mucosa do tubo digestivo e a medula óssea também são alvos da terapia antitumoral. A mielossupressão é o efeito mais grave, bloqueando a proliferação das células precursoras hematopoéticas ^{3 19 32}.

Estima-se que a resistência à quimioterapia é a causa de fracasso em cerca de 90% dos paciente com câncer metastático ³³. A resistência aos inibidores da mitose pode ser intrínseca e também adquirida, estando associada a múltiplos mecanismos, como: efluxo do fármaco, mudanças na distribuição e metabolismo, alterações na tubulina e perturbação no ciclo celular ^{3 33 34}.

Apesar dos diversos efeitos adversos, a inibição da mitose ainda é um mecanismo altamente eficaz na inibição da proliferação tumoral, dessa forma compostos que a inibem a partir de mecanismos diferentes dos atualmente disponíveis, podem trazer perspectivas de uma terapia mais eficaz e menos tóxica.

2.3. DIIDROPIRIMIDINONAS

A classe das diidropirimidinonas do tipo Biginelli recebeu considerável atenção nas últimas décadas devido às propriedades farmacológicas versáteis detectadas, sendo vinculadas essas ações à estrutura química privilegiada composta pelo anel pirimidínico heterocíclico ^{35 36}.

São sintetizados por uma reação de heterociclização do tipo multicomponente (*Multicomponent Reaction* - MCR) conhecida como reação de Biginelli que envolve a combinação de um aldeído, um β -cetoéster e uréia (ou tiourea) em catálise ácida produzindo uma diidropirimidinona (Figura 4) ^{37 38}. Atualmente são descritos outros mecanismos de síntese desses compostos com o objetivo de aumentar o rendimento e reduzir formação de subprodutos tóxicos e a contaminação do ambiente e do manipulador através da chamada química verde ^{9 39}.

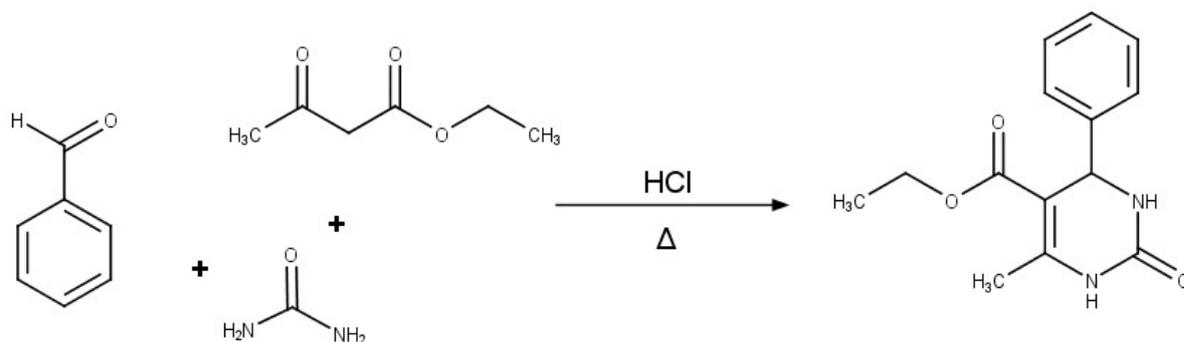


Figura 4. Estrutura básica das diidropirimidinonas e reação de Biginelli

Fonte: Adaptado de Ramos, 2012 ¹⁰

O monastrol foi o primeiro composto da classe a ser sintetizado e estudado e funcionou como protótipo para a projeção da estrutura de outros derivados com ampla variedade de atividades biológicas ⁴⁰.

São descritos para essa classe de compostos uma série de propriedades farmacológicas, como antitumoral ^{41 42 43 44}, anti-inflamatória ^{45 46 47}, antibacteriana ⁴⁸

^{49 50}, antifúngica ^{51 52 53}, antiviral ^{54 55 56}, antiparasitária ^{57 58 59}, inibição de canais de cálcio ^{60 61 62}, hipoglicemiante ⁶³, antidiabética ^{64 65}, anti-hipertensiva ⁶⁶ e antioxidante ^{67 68 69}.

2.3.1. DHPMs com atividade antitumoral

A atividade mais estudada e descrita dos compostos da classe DHPM é a antitumoral. Em 1893 Pietro Biginelli através da reação multicomponentes sintetizou o etileno4-(3-hidroxifenil)-6-metil-2-sulfanilida-3,4-di-hidro-1H-pirimidina-5-carboxilato, mas somente em 1999 através de Mayer e colaboradores a atividade desse composto foi testada ^{37 38 70 71}.

Mayer estava em busca de compostos pequenos e permeáveis às células, que de algum modo perturbassem a divisão celular sem afetar a tubulina, através da mensuração da fosfonucleolina. Através de uma biblioteca de moléculas pequenas, Mayer chegou ao composto sintetizado por Biginelli. Usando técnicas de imunohistoquímica observou que as células tratadas por ele apresentavam um fuso mono astral ⁷².

Na mesma década foram publicados estudos que avaliavam a função da proteína Eg5 na divisão celular e comparando com os resultados apresentados nesses trabalhos Mayer afirmou que a inibição da proteína motora Eg5 seria um possível alvo do composto em questão e ele passou a chamá-lo de Monastrol. Dessa forma, foi visto como uma ferramenta particularmente útil para estudar mecanismos mitóticos. Estudos posteriores confirmaram as previsões de Mayer ^{73 74 75 7 76; 77}. A principal atividade farmacológica dos derivados DHPMs está relacionada à inibição da proteína motora cinesina-5 que confere o seu potencial antitumoral.

As cinesinas são proteínas motoras associadas aos microtúbulos, que estão envolvidas em diversos processos celulares como transportes de vesículas, organelas e cromossomos e a dinâmica do microtúbulos.

A família cinesina - 5 é composta por diversos membros sendo eles: KH11, BimC, CIN8 KIP4, Cut7 e a Eg5. O último desempenha função na formação do fuso mitótico no início da divisão, sua ligação cruzada com os dois microtúbulos antiparalelos permite o deslizamento dos filamentos em direções opostas estabelecendo o fuso bipolar, por isso sua inibição confere o aspecto monastral do fuso. A grande importância dessa proteína está na sua expressão que é acentuada

em tecidos durante o estágio proliferativo e foi reportada sua super expressão em vários tumores sólidos e em leucemias ⁷⁸ .

O monastrol foi testado frente a diversas linhagens de câncer e apresentou-se mais eficaz que os alcaloides da vinca, taxanos e epotilonas uma vez que não interfere em outros processos que envolvem microtúbulos, tendo menor efeito neurotóxico ^{42 77 79 80 81 82 83 84 85} .

Diferentemente dos compostos que se ligam à tubulina, o monastrol tem sua atividade baseada na inibição reversível e específica da motilidade da cinesina mitótica Eg5 por meio da inibição alostérica da hidrólise de ATP ^{75 86 87} .

Diante da ação do monastrol outros DHPMs foram sintetizados e investigados em relação à atividade antitumoral. Diversos DHPMs foram avaliados para inibição do crescimento de diversas linhagens de diferentes tipos de câncer ^{44 88 89 90 91} .

Além dos estudo *in vitro*, Bhat em 2016 confirmou a atividade antitumoral do composto DHP-5 em camundongos nudes, na qual foi observado a redução do crescimento do tumor de LOVO (xenógrafo de câncer de cólon) em animais submetidos ao tratamento intraperitoneal por 14 dias da dose de 50mg/kg ⁹² .

Exertier e colaboradores (2013) constataram que outro derivado DHPM, o dimetilenastrol, causa inibição da angiogênese *in vitro* em células HUVEC e *in vivo* nas membranas corioalantóicas dos embriões de galinha (CAM)⁹³ .

Stuepp (2013) relatou atividade do composto LaSOM 65 sobre linhagem de glioblastoma, na qual foi relatado diminuição do crescimento celular nas células tumorais e não indução de características neurotóxicas. Diante dos resultados, Torres (2014) realizou a avaliação da toxicológica aguda e a farmacocinética desse derivado DHPM, indicando baixa toxicidade e boa biodisponibilidade ^{94 95} .

2.4. DERIVADOS DHPMS 4P E 4BC

Em 2012 uma série de 37 derivados DHPMs foram sintetizados pelo Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica - Universidade de Brasília (UnB). O grupo desenvolveu e otimizou a reação de Biginelli, com o uso de um novo catalisador de ferro ^{9; 10} .

As moléculas sintetizadas foram inicialmente avaliadas em relação à atividade antibacteriana e antifúngica através de um antibiograma (avaliação do halo de inibição). Os compostos foram testados contra as seguintes linhagens: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC

10231) e *Trichoderma asperellum* (identificada e doada pelo Laboratório de microbiologia da UFG), no entanto para os derivados sintetizados e testados não houve atividade muito promissora frente aos antimicrobianos. Frente a esses resultados outro alvo terapêutico foi avaliado ^{9; 10}.

Diante dos vários trabalhos descritos na literatura sobre a atividade antitumoral do monastrol e outros derivado DHPMs se fez interessante a avaliação dos compostos sintetizados frente a essa ação, sendo a priori realizada em células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) por meio do ensaio de citotoxicidade por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) variando a concentração entre 0,5 μ M e 1,0 mM para análise da viabilidade celular nos tempos de 24, 48 e 72h ^{9 10}.

Diante dos ensaios iniciais os compostos 4p e 4bc (Figura 6) apresentaram atividade inibitória superior à 50% no tempos de 24h, 48h e 72h sendo citotóxicos para as células cancerosas com concentrações pequenas, sem qualquer dano considerável para as células normais ^{9 10}.

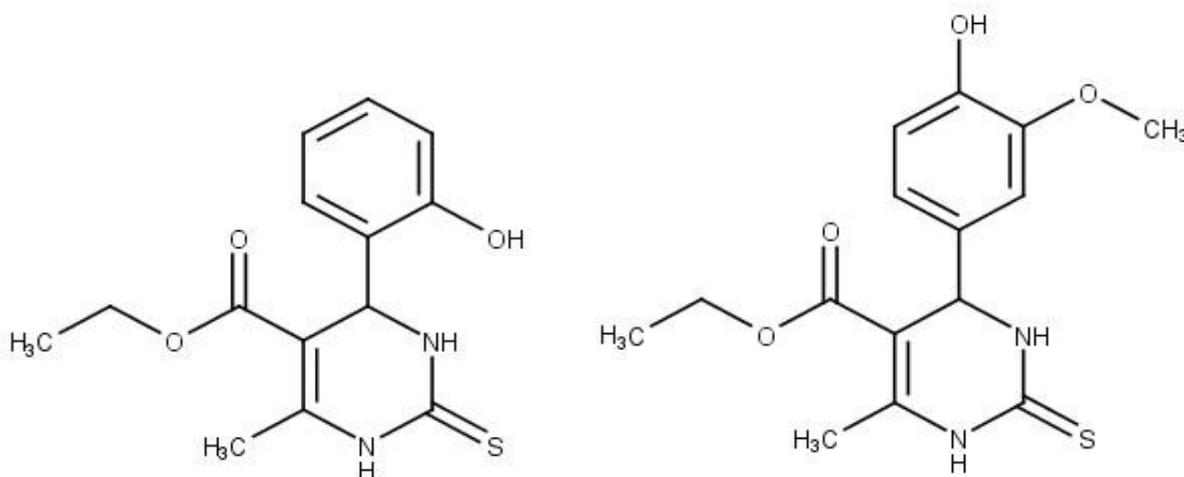


Figura 5. Estrutura química do 6-metil-4-(2-hidroxifenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-etilcarboxilato (DHPM 4p) e 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-etilcarboxilato (DHPM 4bc), respectivamente .

Em continuidade com a avaliação do potencial antineoplásico desses derivados, Guido em 2015 realizou a análise das células tumorais quanto a sua morfologia, proliferação, ciclo celular, perfil de morte, capacidade de

neovascularização, invasibilidade quando tratadas com os esses DHPMs em células MCF-7 e MDA-MB-231, além da avaliação da dinâmica molecular *in silico* que demonstrou a interação dos inibidores com a proteína Eg5^{6 96}.

Para avaliar a interferência dos compostos na formação do fuso as células foram imunomarcadas com anticorpo anti- α -tubulina (verde) e o DNA das células foi corado com DAPI (azul) e através da análise em microscópio confocal de varredura a laser foi possível observar a formação do fuso monastrol após tratamento com o composto 4bc e a indução da fragmentação nuclear e a disrupção do fuso mitótico, conforme Figura 6, além de causar uma redução e arredondamento nas células^{6 96}.

Também foi detectado que esses derivados impedem a progressão do ciclo celular mantendo as células em G2/M^{6 96}.

O 4p apresentou atividade antiangiogênica pronunciada em modelo *in vitro* e *in vivo* e o 4bc menos acentuada, mas nenhum dos dois interferiu no potencial de invasibilidade das células tumorais de mama^{6 96}.

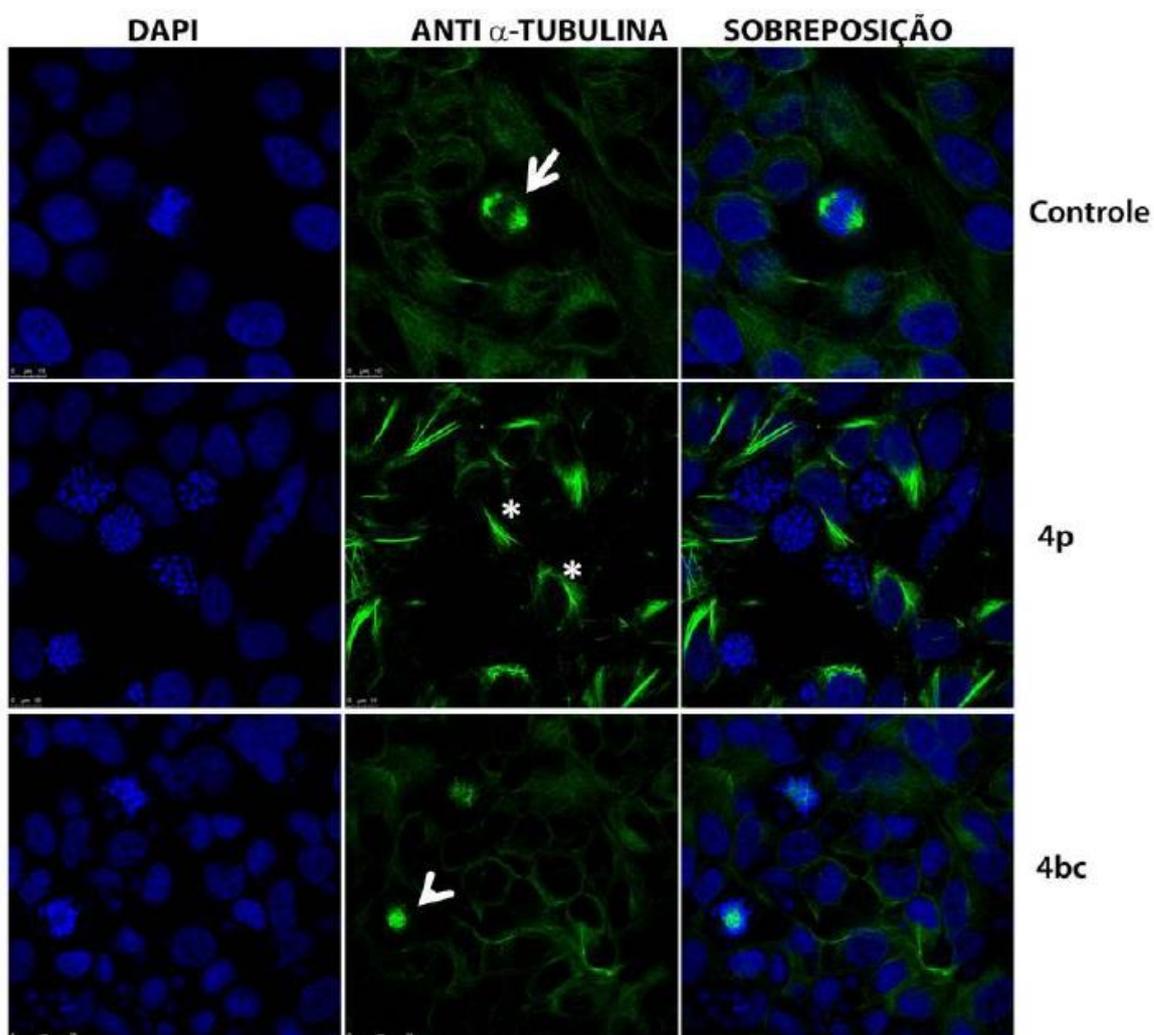


Figura 6. Células MCF-7 sem tratamento (controle negativo) e as que foram tratadas por 24 horas com o 4p (0,4 mM) e 4bc (1 mM).

As células foram imunomarcadas com anticorpo anti- α -tubulina (verde) e o DNA das células foi corado com DAPI (azul). As análises foram feitas em microscópio confocal de varredura a laser e mostram a formação atípica de fusos monoastrais (cabeças de setas) induzida pelos tratamentos com os derivados de DHPMs, reproduzindo o efeito já descrito pelo monastrol. O tratamento com o composto 4p induziu a fragmentação nuclear e a disrupção do fuso mitótico (asteriscos). As células não tratadas, em sua maioria, apresentam correta separação das cromátides-irmãs possuindo fuso mitótico bipolar (seta). Fonte: Guido et al., 2015 ¹¹.

A interação dos compostos 4p e 4bc no sítio catalítico da Cinesina Eg5 ocorre de forma diferente, efeito que justifica o mecanismo de ação sobre o fuso mitótico apresentar-se com um padrão distinto, sendo o 4bc a ação semelhante ao do monastrol ^{6 96}.

O 4p não interage com nenhum resíduo do sítio de ação, apenas é notado uma ligação com Gly117 por meio de ligações com moléculas de água presentes no

sítio, já o 4bc interage diretamente no sítio assegurando um forte estabilidade com a Eg5, conforme Figura 7 ^{6 96}.

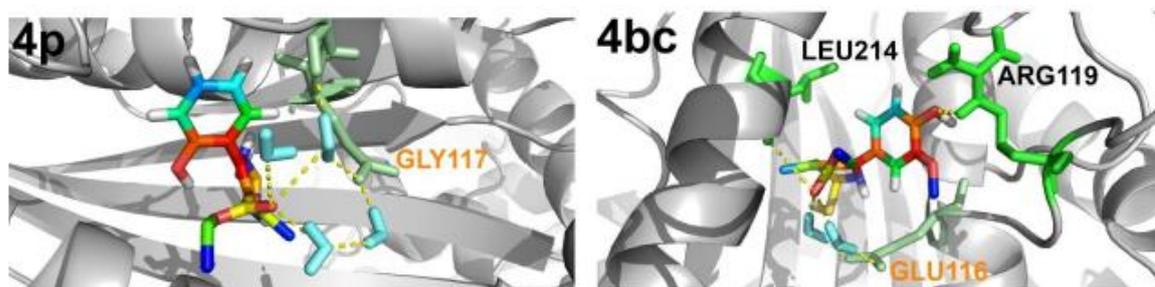


Figura 7. Modelo 3D baseado na estrutura dos complexos da Eg5 após os ensaios de Dinâmica Molecular, com a Eg5 representada na cor cinza e os resíduos anotados em preto indicam aminoácidos (verde) em que ocorre ligação direta com os compostos, e os em laranja indicam ligações mediadas por moléculas de água

Fonte: Guido et al, 2015 ¹¹

Os resultados dos ensaios farmacológicos *in vitro*, *in silico* e *in vivo* previamente realizados com o 4p e 4bc indicam seu relevante interesse. Estes resultados levam para o avanço nas etapas de investigação pré-clínica em face à possibilidade de serem utilizados como candidatos ao tratamento de câncer, especialmente o de mama ^{6 96}.

2.5. AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA

O desenvolvimento de novos fármacos é acompanhado de um processo complexo, onde é exigida uma série de etapas que podem ser divididas, a grosso modo, em pesquisa pré-clínica e pesquisa clínica ⁹⁷.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão responsável pela regulamentação de medicamentos no Brasil, a segurança e eficácia dos fármacos devem ser definidas por estudos *in vitro* e *in vivo*. Os efeitos biológicos relevantes, metabolismo do fármaco e perfis farmacocinéticos devem ser realizados antes dos testes clínicos em humanos os estudos *in vivo* que utilizam animais como medida de economia de recursos e de tempo de pesquisa ^{98 99}

Dessa forma estão inclusos nos estudos pré-clínicos de toxicidade: os testes de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, de interesse na avaliação da segurança farmacológica, toxicocinética, além de outros que se façam necessários ⁹⁹.

Os resultados pré-clínicos devem fornecer informações sobre as aplicações terapêuticas e estimar alguns riscos vinculados à sua exposição, assim subsidiando

as pesquisas que serão realizadas em humanos. No caso do desenvolvimento de antineoplásicos a importância desses ensaios prévios é ainda maior, tendo em vista que o primeiro uso em humanos é realizado em pacientes não responsivos a outros quimioterápicos e que estão fortemente debilitados, diferentemente da fase clínica 1 de outras terapias que são realizadas em pacientes saudáveis. Portanto, a dose inicial selecionada a partir dos ensaios pré-clínicos precisa garantir segura e maior probabilidade de eficácia ¹⁰⁰.

Os estudos de toxicidade e farmacocinética até os anos de 1990 eram realizados apenas na fase final do desenvolvimento de fármacos e muitos problemas eram atribuídos aos resultados obtidos por eles, diante disso Wanterbeemd e colaboradores evidenciaram que é necessário que essas características sejam avaliadas inicialmente durante o processo de descoberta de fármacos evitando assim o desperdício de tempo e custos inerentes à investigação de novos agentes terapêuticos ¹⁰¹.

2.5.1. Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda avalia a toxicidade gerada por uma substância quando essa é administrada em dose única ou em repetidas administrações durante um período de até vinte quatro horas e com uma observação continuada de quatorze dias após a administração oral ^{99 102}.

Segundo Valadares, 2013, a avaliação da toxicidade aguda determina o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana. É utilizada para classificar substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade ¹⁰³.

A literatura descreve uma boa correlação entre os resultados de toxicidade obtidos para antitumorais na fase pré-clínica realizada com roedores e a fase clínica 1 em humanos, ratificando a importância desses ensaios no desenvolvimento de antitumorais ¹⁰⁰.

A ANVISA não mais exige a determinação do valor preciso da DL50, podem ser utilizados métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um menor número de animais ^{99; 104}.

Os protocolos da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) são métodos indicados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA) para direcionar os estudos não clínicos de segurança imprescindíveis ao desenvolvimento de novos medicamentos ⁹⁹.

A OECD é uma organização internacional que apresenta padrões para a segurança de produtos químicos, classificando-os em níveis de segurança e o ensaio OECD 423 (toxicidade oral aguda) é um método reconhecido em todo o mundo como eficaz e que utiliza um número reduzido de animais respeitando o programa dos 3 R's (*Reduction, Refinement, Replacement*) ^{102 105 106}.

O protocolo OECD 423 de avaliação da toxicidade oral aguda consiste em um procedimento gradual com a utilização de três animais do mesmo sexo por passo. Ausência ou presença de mortalidade relacionada com composto, dos animais tratados numa dada etapa, determinará a etapa seguinte (quatro possíveis resultados: não são necessários mais ensaios; dosagem de três animais com a mesma dose; dosagem de três animais na dose maior ou dosagem de três animais na dose menor) como consta no esquema da Figura 9. Em média, 2-4 passos são necessários para permitir avaliar a faixa de toxicidade aguda de uma substância por esse teste ¹⁰².

Este procedimento é reprodutível, usa número limitado de animais e permite classificar as substâncias de um modo semelhante a outros métodos de ensaio de toxicidade aguda que utilizam mais animais como o OECD 420. O método de classificação de toxicidade aguda baseia-se na avaliação biométrica com doses fixas, separadas apropriadamente para permitir a classificação de uma substância quanto a sua periculosidade. A DL50 é expressa por meio de dois limites de classe de DL50 (*cutoff*), nos quais a classificação é determinada para intervalos de toxicidade definidas.

2.5.2. Biodisponibilidade

A biodisponibilidade é o termo aplicado à velocidade e extensão com a qual uma substância ou seu componente ativo é liberado a partir de qualquer via de administração na circulação sistêmica ^{3 107}. Dessa forma, para que um fármaco exerça sua atividade no organismo ele precisa chegar no local de ação em quantidades adequadas, e para que isso ocorra, é necessário que seja biodisponível ^{107 108}.

Por via oral, a taxa de absorção é dependente de alguns parâmetros, principalmente a solubilidade em água, a permeabilidade gastrointestinal, as características físico-químicas da molécula e a existência de metabolismo de primeira passagem. Para a via intravenosa espera-se biodisponibilidade de 100%³
¹⁰⁸.

A definição de posologias em eventuais tratamentos com base nas substâncias avaliadas leva em consideração os dados de biodisponibilidade obtidos nesses estudos, além dos outros parâmetros farmacocinéticos relevantes, consubstanciando as pesquisas de toxicidade de dose repetida, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade e carcinogenicidade, sendo necessária sua avaliação na fase inicial dos ensaios pré-clínicos¹⁰¹.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil toxicológico agudo de dois derivados diidropirimidinonas (DHPMs), 4p e 4bc.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Classificar em termos toxicológicos os derivados DHPM's 4p e 4bc.
- Descrever os sinais clínicos de intoxicação induzidos pela administração oral do 4p e 4bc e intravenosa do 4bc em ratos Wistar Hannover.
- Avaliar parâmetros bioquímicos e hematológicos após a exposição aguda dos animais aos derivados DHPMs em dose oral e intravenosa.
- Avaliar o perfil anátomo-histopatológico de ratos expostos ao 4p e ao 4bc, por via oral.
- Avaliar o perfil de biodisponibilidade dos compostos estudados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Derivados DHPMs - 4p e 4bc

Os derivados DHPMs 4p e 4bc (Figura 5) foram sintetizados ⁹ e gentilmente cedidos pelo Prof. Brenno Amaro da Silva Neto (Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica - Universidade de Brasília).

4.1.2. Local dos experimentos

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas em diversos locais, sendo centralizado na Faculdade de Ciências da Saúde/UnB no Laboratório de Controle de Qualidade e Laboratório de Produtos Naturais, em colaboração com as professoras Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista, Dâmaris Silveira e Yris Maria Fonseca-Bazzo.

Os ensaios *in vivo* foram desenvolvidos no Biotério do Instituto de Biologia e as cirurgias realizadas no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina /UnB.

As atividades relacionadas à histopatologia foram realizadas em primeiro momento no Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina /UnB em parceria com a Profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kuckelhaus, mas foram finalizadas no Laboratório de Histologia do Hospital Veterinário/UnB em parceria com o Prof. Dr. Márcio Botelho de Castro.

As análises hematológicas e bioquímicas foram executadas no Laboratório de Pesquisas em Doenças Imunogenéticas e Crônico-degenerativas/UnB em parceria com a Prof. Dr. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega.

4.1.3. Modelo animal

Foram utilizados ratos *Wistar Hannover* fêmeas (nulíparas e não grávidas), hípidas, obtidos do Biotério de Produção de Ratos-Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo(USP), no período de maio de 2016 a maio de 2017.

Os animais testados tinham idade entre oito e quatorze semanas e com o peso entre 180 e 280 g no início dos ensaios, destacando que no mesmo grupo a

diferença inicial do peso dos animais não superou $\pm 20\%$, como preconizado pelo Guia OECD 423.

Durante os ensaios os ratos foram mantidos agrupados em gaiolas de polietileno (41 x 34 x 16cm) forradas com maravalha previamente autoclavada (Figura 8), sob condições de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) e umidade (30% a 70%) controladas, em ciclos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro ^{102; 106}. Ademais tiveram acesso *ad libitum* à água potável acondicionada em garrafas graduadas de polietileno e à ração comercial (marca Purina ©) esterilizada pelo método de irradiação gama, peletizada e balanceada para suprir todas as necessidades do animal.

Para acompanhamento de consumo de ração, água, peso diário e sinais de toxicidade os animais foram marcados, a partir da base da cauda, com número de traços feitos com uma caneta marcadora.



Figura 8. Ratos *Wistar Hannover* fêmeas

4.1.3.1. Considerações éticas

Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e delineado seguindo a Diretriz Brasileira para cuidado e utilização de animais para fins Científicos e Didáticos ³⁵, bem como pelos *Guidelines* publicados pela OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) ¹⁰². Dessa forma a pesquisa foi

desenvolvida de forma parcimoniosa, obedecendo obrigatoriamente os princípios da ética científica que norteiam os experimentos *in vivo*, para obtenção de uma pesquisa racional, na qual minimiza o uso de animais e seu sofrimento sem comprometer a qualidade da pesquisa científica, consubstanciando o princípio dos 3R's de Willian Russel ^{99; 105}.

O projeto foi previamente submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília, com aprovação UnBDoc nº 1293556/2015 (ANEXO I).

A eutanásia foi conduzida em acordo com as Diretrizes para Eutanásia em Animais, do CONCEA ⁴⁰ e o Guia Brasileiro para Boas Práticas para Eutanásia em Animais, do Conselho Federal de Medicina Veterinária ¹⁰⁹. Após a eutanásia e coleta do material hematológico e histológico as carcaças dos animais foram descartadas como preconiza a Lei Nacional de Resíduos Sólido N° 12.305/2010 ¹¹⁰.

4.2. MÉTODO

4.2.1. Perfil físico químico

4.2.1.1. Ponto de fusão

A determinação do ponto de fusão dos compostos 4p e 4bc foi realizada em aparelho automático marca Fisatom 430 D (método do capilar). Para a execução da técnica, as amostras foram trituradas usando almofariz e pistilo de vidro. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.1.2. Técnicas *in silico* (previsão de pKa e solubilidade)

Todos os cálculos foram realizados pelo software Marvin Suite®, da empresa ChemAxon. O pKa dos compostos 4p e 4bc foi previsto por meio do método de cálculo empírico das cargas parciais ^{111 112}. A previsão da solubilidade foi obtida pela ferramenta “*Chemaxon's Solubility Predictor*”, que usa o método de avaliação da solubilidade por fragmentos moleculares ¹¹³.

4.2.1.3. Determinação experimental da solubilidade

A análise experimental da solubilidade dos compostos 4p e 4bc foi realizada utilizando o método do equilíbrio empregando a técnica *shake-flask*^{114 115 116} no equipamento *shaker (Incubator Shaker Series – Innova® 44)*. Foi definido como condições para o teste a temperatura de 25°C, agitação 150 rpm pelo período de 24 horas.

Foram utilizados como meio de teste tampões fosfato de pH 7 e pH 12. O ensaio foi realizado nas concentrações 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL para ambos os tampões e moléculas. Foram mensurados os pHs do material após o crescimento dos compostos aos tampões e ao fim das 24 horas de agitação.

Após as 24 horas as amostras foram retiradas do *shaker* e imediatamente filtradas, por meio do filtro de seringa poro 0,45 µm (Millex® HV Membrana Durapore® em PVDF) as alíquotas foram avaliadas pelo método espectrofotométrico. As leituras foram realizadas em 312 m, que corresponde ao comprimento de onda de maior absorbância do composto 4bc.

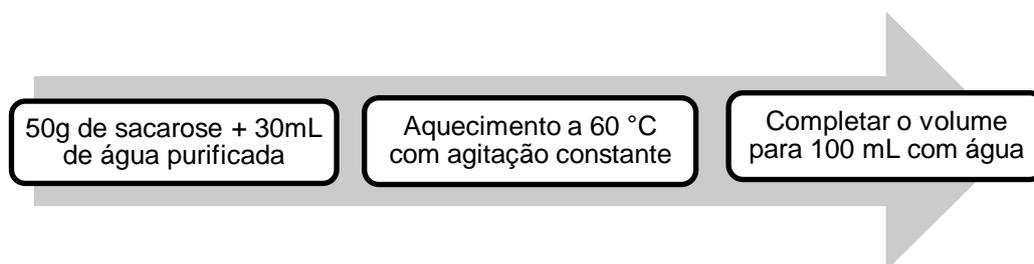
Concomitantemente o método analítico para a avaliação da solubilidade foi determinado utilizando o filtrado da solução menos concentrada (0,01 mg/mL), onde houve 100% de dissolução. A partir dessa solução procederam-se as diluições utilizando o meio de solubilização correspondente, dessa forma obtendo as curvas analíticas.

Os materiais filtrados correspondentes as concentrações de 1,0 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,01 mg/mL foram diluídos e aferidos no espectrofotômetro e foi então definida a solubilidade. A partir dos resultados foi possível comparar com os critérios determinados pela Farmacopeia Brasileira para estabelecer o grau de solubilidade dos compostos¹¹⁷.

4.2.2. Formulações

4.2.2.1. Formulação Oral

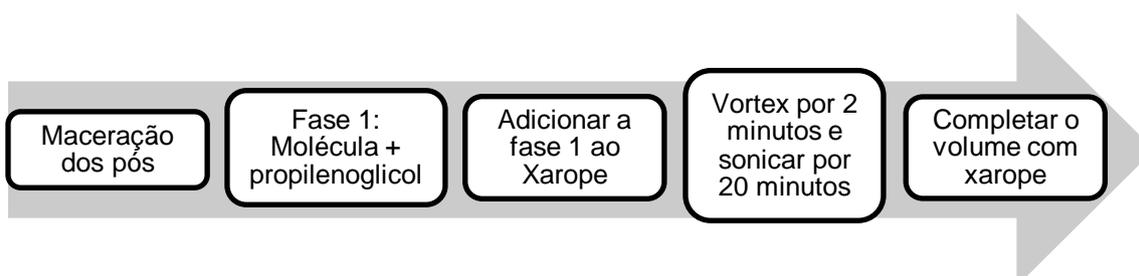
Os compostos 4p e 4bc foram incorporados a um xarope simples, nas concentrações de 15 mg/mL e 100 mg/mL. O processo foi adaptado da Farmacopeia Brasileira¹¹⁸, como descrito no esquema.



Essas concentrações foram definidas de acordo com as doses preconizadas pela OECD 423 e pelo requisito de administração de volume constante para todos as doses, sendo o volume máximo permitido para esse tipo de administração 1 mL/100g de peso corporal do animal.

Após o preparo prévio do xarope, os compostos em pó foram macerados com auxílio de almofariz e pistilo de vidro e adicionado (20%) do umectante propilenoglicol, dando origem a fase 1 da formulação.

Essa fase foi incorporada ao xarope seguida por 2 minutos no vórtex para mistura completa das fases e posteriormente submetida a 20 minutos no sonicador. Como esquematizado abaixo.

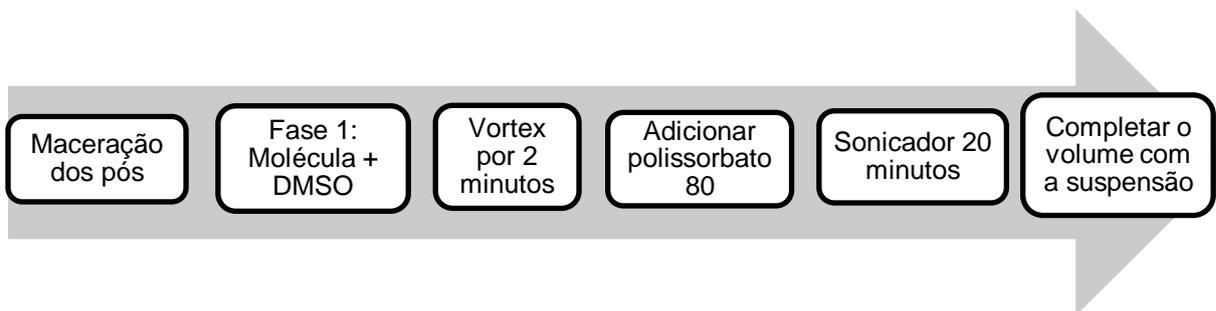


A formulação foi preparada no máximo com 48 horas de antecedência à administração e armazenada em vidro âmbar à temperatura de 20°C.

4.2.2.2. Formulação Intravenosa

A formulação intravenosa foi desenvolvida para a obtenção das concentrações de 1,0 mg/mL e 2,5 mg/mL.

Foi desenvolvida uma suspensão de polissorbato em soro fisiológico, onde o pó macerado foi dissolvido em 7,5% de DMSO (dimetilsulfóxido) com auxílio do vórtex. À mistura completa foi adicionado 7,5% do agente dispersante Polissorbato 80, seguida de sonicação por 20 minutos ⁹⁶.



4.2.3. Experimentos in vivo

4.2.3.1. Toxicidade oral aguda

O ensaio de toxicidade aguda oral foi realizado de acordo com o Guia OECD-423/2001, que preconiza doses fixas a serem utilizadas no ensaio (5mg/kg, 50mg/kg, 300 mg/kg ou 2000 mg/kg). Três animais são requeridos para cada dose (Figura 9). A administração foi realizada via gavagem por sonda oro-gástrica (aço inox- 16GA - 1,2mm x 38 mm), previamente esterilizada em autoclave ^{119 120}.

De acordo com o protocolo quando não se tem conhecimento prévio da toxicidade das amostras testadas é recomendável que se inicie o teste com a dose de 300 mg/kg, dessa forma essa foi selecionada como a inicial para o estudo. A sequência do experimento depende da mortalidade (ou estado moribundo) ou não dos animais nessa dose, após as 24 primeiras horas da exposição. A partir dessas observações pode-se estimar a categoria toxicológica, segundo GHS (*The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*).

Tendo em vista que em nossos experimentos não houve morte ou moribundez na primeira dose (300mg/kg) testada, testamos a maior dose (2000mg/kg), e portanto foram utilizados 18 animais (12 animais com dose e 6 controles) para cada composto. A distribuição dos grupos é apresentada na Tabela 2.

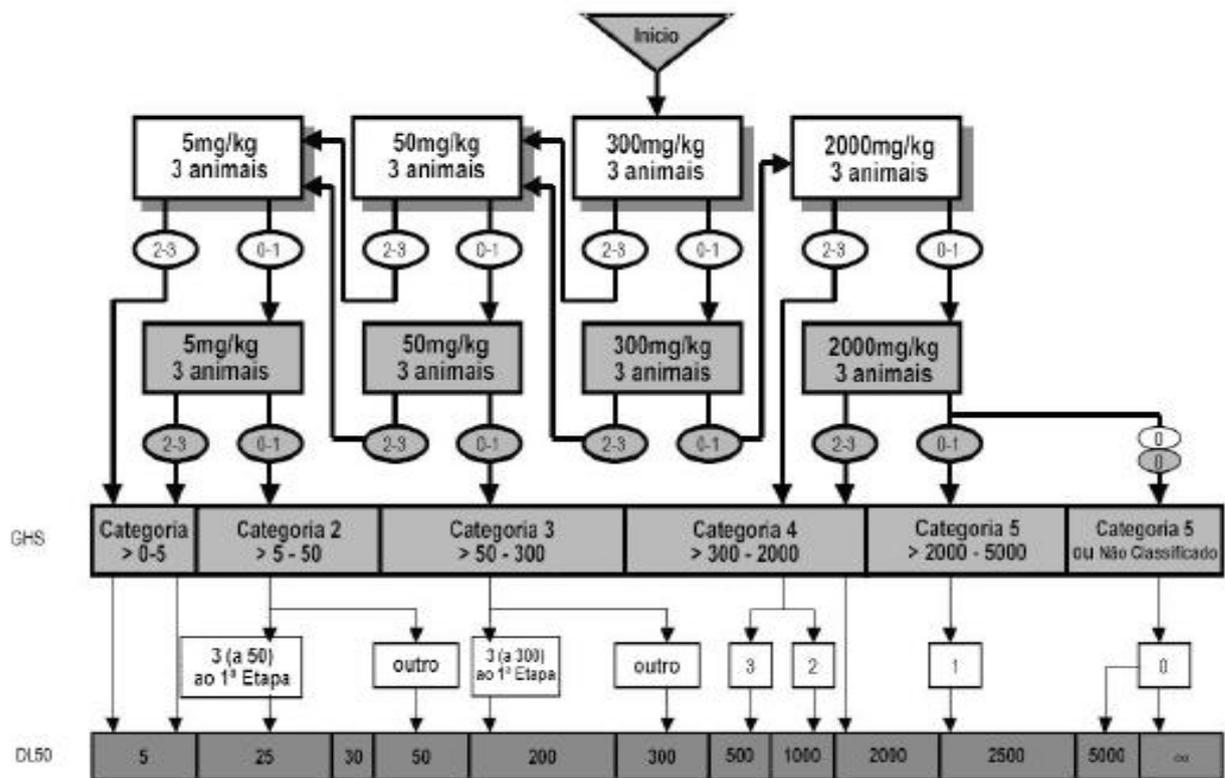


Figura 9. Etapas para a avaliação de toxicidade aguda de classes baseado no Guia da OECD 423

Tabela 2 - Desenho experimental para a avaliação da toxicidade aguda oral dos compostos 4p e 4bc

	Doses administradas	Composto	Teste 1	Teste 2
	Controle	Xarope		
	Controle	Solução salina		
	300 mg/kg de peso corporal	4p		
	300 mg/kg de peso corporal	4bc		
	2000 mg/kg de peso corporal	4p		
	2000 mg/kg de peso corporal	4bc		

Para a dose de 300 mg/kg, os animais ficaram em jejum por 8 horas anteriores as administrações, com acesso livre apenas à água, sendo a ração permitida após 4 horas da administração.

Para a dose de 2000 mg/kg, devido à limitação da solubilidade dos compostos na formulação, foram necessárias duas administrações dentro do intervalo de 24h, respeitando um intervalo de 8 horas entre as doses para completo esvaziamento gástrico. Tal procedimento é previsto pela OECD-423, sendo assim o animal permaneceu em jejum pelo período total entre as doses.

4.2.3.2. Toxicidade intravenosa aguda

O ensaio de toxicidade aguda intravenosa foi realizado de acordo com a adaptação do Guia OECD-423/2001 e também baseado no estudo de Torres et al.,2013 ⁹⁶. As doses utilizadas no ensaio foram: 1,0 mg/mL/kg ,2,5 mg/kg ou 5,0 mg/kg, na qual o número de cinco animais foi requerido para cada dose.

A administração foi realizada pela injeção intravenosa através da veia da cauda, essa técnica requer o uso de dispositivos de retenção Figura 10. Os dispositivos foram limpos a cada injeção com álcool 70% e com água abundante para evitar o estresse induzido por feromônio ou infecção cruzada ^{119 120 121}. Após os animais serem acondicionados, a cauda foi aquecida em água morna (30-35°C) por até 3 minutos, para garantir a vasodilatação e facilitar o acesso às veias laterais. ¹²⁰.



Figura 10. Animal acondicionado no dispositivo de retenção

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 5 animais sendo que o peso não variou mais que 20% em relação à média do grupo. Foram utilizados 25 animais no total para a avaliação toxicológica aguda intravenosa do composto 4bc.

Foi necessária a inclusão de dois grupos controles, o primeiro corresponde ao grupo controle suspensão na qual foi administrado apenas a formulação de incorporação dos compostos, e o segundo foi administrado a solução salina (NaCl 0,9%), que foi nomeada como grupo controle salina.

O grupo I recebeu a dose de 1mg/mL/kg, o grupo II a dose 2,5 mg/kg e o grupo III a dose 5mg/mL/kg do composto 4bc, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Desenho experimental para a avaliação da toxicidade aguda intravenosa do composto 4bc

	Doses administradas	Composto	Grupos
	Controle	Suspensão	
	Controle	Solução salina	
	1mg/kg de peso corporal	4bc	
	2,5 mg/kg de peso corporal	4bc	
	5mg/kg de peso corporal	4bc	

4.2.3.3. Avaliação dos sinais de toxicidade

Após a administração pela via oral e intravenosa foram realizadas observações comportamentais sistemáticas durante as primeiras 24 horas, nos tempos de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas e nos seguintes 13 dias uma vez diariamente, até a eutanásia que foi realizada no 14º dia do estudo.

Por meio do *screening hipocrático* os parâmetros analisados foram: frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto da cauda, convulsão,

tremores finos e grosseiros, contorção, ereção de cauda, tremor, motilidade, diarreia, chiados, coçar focinho, salivação excessiva, hiperatividade, dilatação ou contração da pupila, lacrimejamento, piloereção, hipotermia, hipertemia e cianose ^{122 123}.

A intensidade, duração e progressão dos sinais foram anotadas e tabuladas numa escala de 0 a 4 (ausente, raro, pouco, moderado, intenso), para análise posterior ¹²².

4.2.3.4. Avaliação ponderal

O ganho de massa ao longo dos 14 dias de ensaio foi verificado pela pesagem diária dos animais e sua evolução individual comparada com a dos animais que receberam o mesmo tratamento e dose, bem como com o controle e com as diferentes doses do composto testado.

4.2.3.5. Avaliação do consumo de ração e água

O parâmetro de consumo de água e ração também foi avaliado como possível efeito de toxicidade e mensurados diariamente durante os 14 dias de experimento.

Como os animais foram alojados de forma coletiva o consumo analisado não foi individual, sendo na verdade representativo do tratamento que os animais foram expostos. Diante disso, foi necessária uma análise da média de consumo, relativa ao somatório do peso dos animais, calculado pela fórmula abaixo.

$$\text{CONSUMO (ração)} = \frac{\text{consumo de ração diário médio(g)}}{\text{massa média dos animais (g)}}$$

De forma semelhante foi realizada a avaliação do consumo de água, porém a média foi expressa em mL/ g.

$$\text{CONSUMO (hídrico)} = \frac{\text{consumo de água diário médio(mL)}}{\text{massa média dos animais (g)}}$$

4.2.3.6. Avaliação anatomopatológica

No décimo quarto dia os animais foram anestesiados com tiopental sódico (180mg/kg Thiopentax®, Cristália) e eutanasiados por exsanguinação (punção cardíaca) e foi então realizada a coleta dos órgãos.

Os órgãos foram avaliados em busca de alterações macroscópicas, comparando-se com os órgãos dos animais do grupo controle, nas quais foi

observada alteração de cor, forma, tamanho, presença de hemorragias e sinais de necrose.

Os órgãos (baço, tireoide, timo, coração, pulmão direito e esquerdo, rim direito e esquerdo, fígado estômago, útero com o ovário) foram pesados e normalizados em relação à massa total do animal, gerando o parâmetro “Índice do órgão”, calculado seguindo a fórmula abaixo ¹²⁴.

$$\text{ÍNDICE DO ÓRGÃO} = \frac{\text{massa do órgão(g)}}{\text{massa do animal (g)}} \times 100$$

4.2.3.7. Avaliação dos parâmetros hematológicos

Uma fração (0,5 mL) do sangue obtido dos animais foi armazenado em tubos contendo EDTA (tubos de microcoleta, Vacuette®). Uma gota do sangue coletado, ainda sem anticoagulante, foi utilizada para se obter o esfregaço sanguíneo.

O sangue com EDTA foi utilizado para a realização do hemograma completo (série vermelha, série branca e plaquetas). A análise foi realizada em contador automático ADVIA® 60. O esfregaço foi corado utilizando-se um corante panótico comercial (New Prov®) e analisado em microscopia óptica para confirmação das contagens automáticas e realização da contagem diferencial de leucócitos.

4.2.3.8. Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Uma fração (4 mL) do sangue obtido dos animais foi armazenado em tubos com gel separador e ativador de coágulo (Vacuette®). O sangue foi submetido à centrifugação por 4500 rpm durante 5 minutos para a obtenção do soro, que foi aliquoteado e armazenado a -80°C até o momento da análise, quando o material foi descongelado e avaliado no analisador bioquímico Respons®910 (DiaSys®). Foram analisados os seguintes parâmetros: albumina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, cálcio, colesterol, bilirrubina total e frações, fosfatase alcalina, glicose, HDL, LDL, triglicerídeos, proteínas totais e ureia.

4.2.3.9. Histologia

4.2.3.9.1. Fixação por perfusão

Usando anestesia profunda foi realizada uma incisão lateral de 5-6 cm através do tegumento e da parede abdominal próximo à caixa torácica para assim expor a cavidade pleural dando acesso ao coração do animal (Figura 11). Pelo ventrículo esquerdo, administrou-se 40 mL de PBS (tampão fosfato salino), e na sequência, 40 mL de formalina alcoólica.

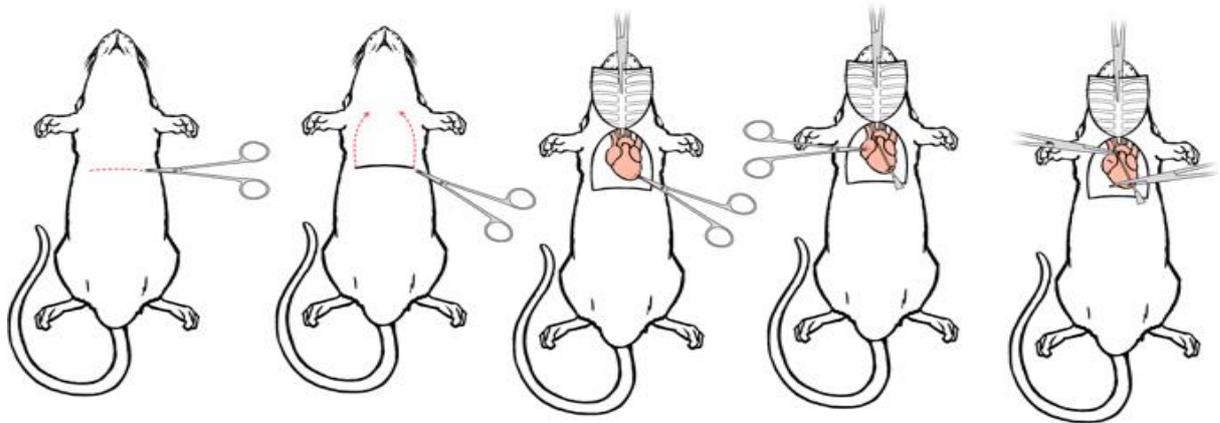


Figura 11. Procedimento de incisão para realização da fixação por perfusão ¹²⁵

O procedimento foi adaptado de Gage et al.,2012 ¹²⁵, sem a utilização de bomba de perfusão peristáltica.

4.2.3.9.2. Perfusão por imersão

Previamente à fixação, os órgãos foram clivados até cerca de 3 mm de espessura para facilitar a penetração do fixador e a difusão dos reagentes durante as demais etapas ¹²⁶.

Os órgãos coletados foram imersos em solução de Formalina tamponada 10%, por no mínimo 48 horas, com uma relação entre o volume do fixador e o volume dos fragmentos de aproximadamente 20 vezes.

Após a fixação completa o material foi acondicionado em cassetes devidamente identificados.

4.2.3.9.3. Processamento dos tecidos

O processamento histológico consiste nas etapas de desidratação, diafanização, inclusão em parafina e a finalização pelo corte no micrótomo ¹²⁷.

A desidratação foi realizada por meio de quatro banhos consecutivos em álcool 100% (v/v) por imersão, com duração de uma hora cada.

Após a desidratação, os tecidos passam pela diafanização/clarificação por imersão em quatro banhos de Xilol 100% (v/v) por quarenta minutos cada.

A impregnação (inclusão em parafina) foi realizada por meio de três banhos de uma hora de parafina (Parafina *Low Melt*, EASYPATH) fundida em estufa a 60 °C.

Os cortes de tecidos foram então fixados na parafina em moldes de metal na posição vertical e no fundo da forma, com o auxílio de pinça pré-aquecida. O material parafinado foi mantido em temperatura ambiente e depois acondicionado a 4°C para completo endurecimento da parafina e armazenado para realização de cortes de tecido no micrótomo (Rotary microtome, modelo RM2125, Leica® Biosystems, Alemanha) em temperatura ambiente.

4.2.3.9.4. *Microtomia*

Os tecidos emblocados em parafina foram previamente resfriados por 30 minutos a 20°C antes do início dos cortes.

Os blocos foram cortados com espessura de 3 a 5 µm com o uso de navalha descartável de perfil alto - Leica® e os cortes coletados em lâminas e colocados em banho-maria a 37°C para serem distendidos. As lâminas com o material adesivado foram colocadas em estufa aquecida a 60°C, para remoção do excesso de parafina por 30 minutos, depois armazenadas à temperatura ambiente até a coloração.

4.2.3.9.5. *Coloração com hematoxilina-eosina*

Após a microtomia os procedimentos gerais para a coloração são: desparafinização, hidratação, coloração, desidratação, clarificação e montagem da lâmina ¹²⁷. O material histológico foi corado com hematoxilina e eosina, corantes não vitais.

Para a desparafinização o material foi imerso em consecutivos banhos em xilol e reidratados em banhos de álcool absoluto e água, como descritos a seguir.

- 4 banhos em xilol, por 3 minutos cada;
- 4 banhos em álcool, por 1 minuto cada;
- 2 banhos em água destilada, por 1 minuto cada;

- Lavagem em água corrente, por 3 minutos;
- Lavagem em água destilada, por 2 minutos;

A coloração foi realizada pela imersão em solução de hematoxilina de Harris (5 g hematoxilina, 2,5 g óxido mercúrio, Alúmen de Potássio 100 g, Etanol a 100% 50 mL, Água destilada 1000 mL) por 5 minutos. Este procedimento é seguido de lavagem em água corrente para retirada do excesso do corante, finalizando com imersão em água destilada

O preparo do material para receber o corante ácido é feito por mergulho em álcool ácido (ácido clorídrico 1% em álcool 70%) seguido de lavagem em água destilada e diferenciação por imersão em Solução de Carbonato de lítio (0,05 g carbonato de lítio, água destilada 100 mL) por 30 segundos e novamente lavagem em água destilada e por fim mergulhadas em eosina alcoólica 1% por 3 minutos.

Para finalização do processo o material foi desidratado por meio de 4 banhos em álcool absoluto por 1 minuto e prosseguiram em 4 banhos de xilol por 1 minuto para a clarificação.

As lâminas foram secas com papel absorvente e meio sintético Entellan (Entellan new, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gotejado sobre o corte histológico e então a lamínula foi fixada.

4.2.3.9.6. *Análise histológica*

A análise histológica foi realizada em colaboração com o patologista Prof. Dr. Márcio Botelho de Castro através da observação das imagens dos cortes dos tecidos obtidas em microscópio comum (Nikon, Eclipse E200-LED) e capturadas por câmera digital acoplada ao sistema.

4.2.4. Avaliação da biodisponibilidade

4.2.4.1. Cromatografia de alta eficiência (CLAE)

4.2.4.1.1. *Obtenção das amostras*

Foi realizada a coleta seriada de sangue após a administração oral dos compostos 4p e 4bc e após a administração intravenosa do composto 4bc pela veia *retro sinus orbital* ^{128 129}, nos tempos de 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora e 30 minutos, 3 horas e 4 horas e 30 minutos após a administração. Antes de cada coleta foi administrado aproximadamente 0,2 mL (cerca de 5 gotas) de colírio

anestésico (Allergan®) contendo cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1%.

Foi coletado o volume de 200µL em cada um dos tempos e então armazenados em tubo heparinizados (Tubo de microcoleta de 0,5mL, Vacuette®), sendo os quatros primeiros pontos coletados do olho direito e os restantes do olho esquerdo de cada animal. Foram utilizados três animais por dose/via de administração/composto, como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Desenho experimental para coleta de sangue seriada para predição do perfil de absorção

Via de administração	Doses administradas	Composto	Grupos
	Controle	Xarope	
	Controle	Solução salina	
	300 mg/kg de peso corporal	4p	
	300 mg/kg de peso corporal	4bc	
	Controle	Suspensão	
	Controle	Solução salina	
	2,5 mg/kg de peso corporal	4bc	

 via intravenosa  via oral

Após a coleta os tubos foram centrifugados por 4500 rpm por 5 minutos para a obtenção do plasma, que foi aliqotado e juntado em um *pool* por grupo, por tempo, e então armazenados a -20°C até a etapa de extração.

4.2.4.1.2. Processo de extração

O solvente acetato de etila utilizado para a extração foi adquirido da empresa Dinâmica® e o ácido tricloroacético da Sigma- Aldrich®, na qual foi preparada uma solução de 20% desse ácido.

O plasma colhido dos animais foi descongelado e o volume de 400µL transferido para um eppendorf, onde foi adicionado 20 µL de ácido tricloroacético - TCA a 20% (Sigma-Aldrich). Após agitação em mixer por aproximadamente 2 minutos. Em seguida foram adicionados 2mL de acetato de etila P.A. (Dinâmica®), agitou-se em mixer por mais 1 minuto e a mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana de 0,22 µm. O filtrado foi evaporado à secura em um equipamento concentrador de amostras (*speed vac – Eppendorf® – Concentrator R301*). O resíduo foi ressuscitado em 50 µL de acetonitrila (J.T.Baker®) e adicionado ao vial para análise ¹³⁰.

A curva padrão foi construída da mesma forma que as amostras, tendo sido utilizado plasma branco (380 µL) adicionado de soluções dos compostos em acetonitrila (20 µL) obtendo as seguintes concentrações no plasma: 0,25µg/mL, 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 2,0µg/mL e 5,0 µg/mL.

4.2.4.1.3. Análise

A identificação e quantificação dos compostos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo LaChrom Elite (Hitachi, Toquio, Japão) equipado com detector L2455 DAD (Hitachi, Toquio, Japão), injetor L2200, bomba L2130 e forno para coluna L2300. Os dados foram obtidos com o software EZChrom Elite (version 3.3.2 SP1 Scientific Software. Inc.). Foi utilizada uma coluna C18 Core Shell Kinetex (110mm x 4,6 mm, 5µm) Phenomenex®, o forno da coluna foi mantido a 25°C, o volume de injeção foi de 10 µL, o fluxo foi mantido a 1 mL/min e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 312 nm para o composto 4bc e 307 nm para o 4p. A fase móvel foi constituída de gradiente de Acetonitrila (Bomba C) e Água (Bomba D), como detalhado na Tabela 5.

O método, previamente validado no laboratório, é linear no intervalo de concentrações proposto, e apresenta recuperação entre 85% e 105%.

Tabela 5 - Gradiente da fase móvel para a detecção dos compostos 4p e 4bc

Tempo (min)	Bomba C (%)	Bomba D (%)
0-0,2	20	80
0,2 – 3,5	20	80
3,5- 4,5	80	20
4,5 – 4,6	80	20
4,6- 7,0	20	80

A identificação dos compostos ocorreu por meio da comparação das áreas do pico da curva extraída em que as concentrações são conhecidas com as áreas equivalentes (tempo de retenção e espectro similares) na amostra.

4.2.4.2. Fluorescência

4.2.4.2.1. Composto 4bc fluorescente

O composto 4bc fluorescente foi sintetizado e fornecido pelo Prof. Brenno Amaro da Silva Neto (Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica - Universidade de Brasília), conforme Figura 12

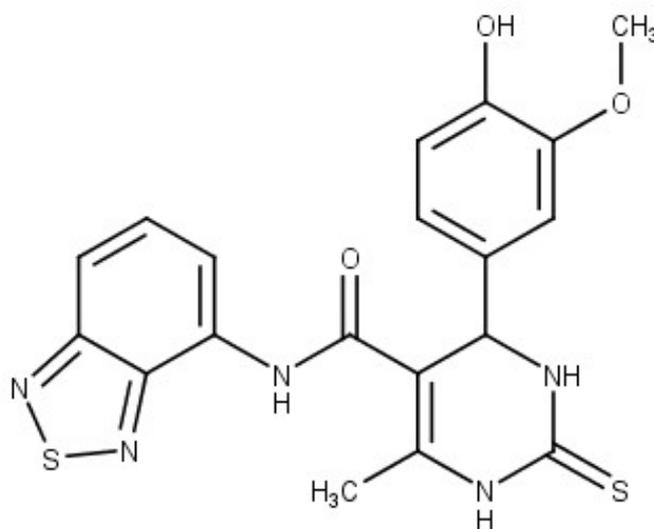


Figura 12. 4bc fluorescente

4.2.4.2.2. Desenho experimental

A avaliação da biodisponibilidade foi realizada para as duas vias de administração (oral e intravenosa), sendo necessária a inclusão dos controles referentes aos veículos utilizados na incorporação do composto 4bc (xarope e suspensão), sendo as mesmas formulações utilizadas no ensaio de toxicidade aguda.

Para esses ensaios foram usados 4 ratos fêmeas Wistar com 4 semanas e peso de 160-180g, sendo 2 animais para o controle (xarope e suspensão) e um para cada via de administração. O número de animais para esse ensaio foi reduzido em decorrência da pequena quantidade de amostra do 4bc fluorescente e por ser um ensaio predominantemente qualitativo. Todos os animais foram previamente depilados na região abdominal.

O experimento foi realizado em duas etapas, primeiramente *in vivo* e posteriormente *ex vivo*, metodologia adaptada de Moura (2017) ¹³¹ com a utilização do equipamento IVIS Lumina XR (Xenogen Corporation-Caliper, Alameda, CA, USA), disponível no laboratório de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília, UnB.

Para a via oral a dose utilizada foi de 50mg/kg e o tempo de espera para início das análises foi de uma hora, já para a via intravenosa a dose foi de 2,5 mg/kg e a análise foi iniciada após 30 minutos da administração.

Após a administração do composto pela via oral e intravenosa, os animais foram levados para o equipamento de imageamento animal IVIS LUMINA® e permaneceram anestesiados, com o uso do anestésico inalatório isoflurano na concentração de 1,5%.

E segundo momento após a retirada dos animais do equipamento eles foram anestesiados (180mg/kg Thiopentax®, Cristália), o sangue foi coletado por punção cardíaca e o esfregaço sanguíneo foi confeccionado. Esse material foi armazenado ao abrigo de luz e após 24 horas analisado por meio da microscopia de fluorescência.

Dos animais eutanasiados por exsanguinação foram coletados os órgãos (coração, fígado, rins e cérebro) e então analisados no IVIS LUMINA®, dessa forma os dados foram obtidos e analisados pelo software *Living Image*.

O delineamento está esquematizado na Figura 13.

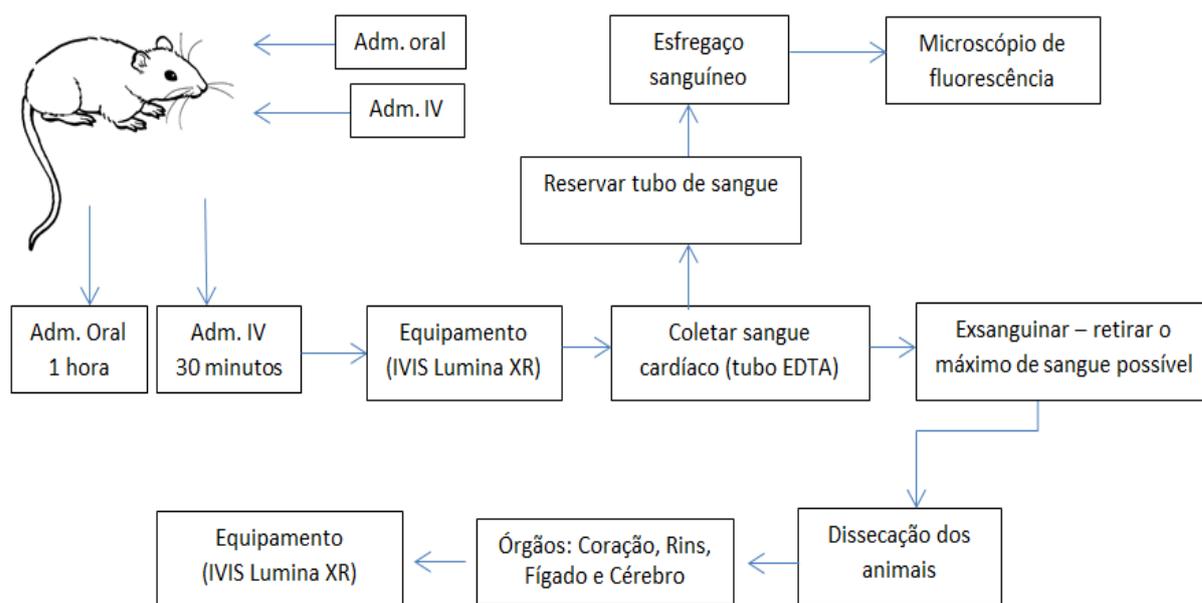


Figura 13. Delineamento experimental da análise da biodisponibilidade por fluorescência

4.2.5. Análise estatística

Os dados foram analisados no programa estatístico R. Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Utilizamos o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar a distribuição dos dados pertencentes a diferentes grupos. Uma das vantagens em se utilizar um teste não paramétrico é que não precisamos saber qual é a distribuição dos dados, e não precisamos assumir, por exemplo, que os dados são normalmente distribuídos. Para nossos experimentos isso é uma vantagem, já que o número de repetições para checar a hipótese de normalidade nesse caso não é viável.

Primeiro, checamos se existe diferença significativa utilizando todos os grupos. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Na existência de diferença significativa, procedemos com o teste de Kruskal-Wallis, comparando de dois em dois grupos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PERFIL FÍSICO QUÍMICO – 4p e 4bc

5.1.1. Ponto de fusão

A determinação da faixa de fusão do composto 4bc foi analisada em triplicada e apresentou resultados compreendidos em intervalo entre 220 °C e 222°C (Tabela 6), sendo em média 11°C a baixo dos valores teóricos, especificado por Ramos et al., 2012 (233-234 °C)¹⁰ e por Srinivas et al., 2004 (233-234 °C)¹³².

Tabela 6 - Resultado do ponto de fusão do composto 4bc

4bc	Temperatura (°C)			Média ± Desvio padrão
	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	
Início	220	221	220	220,3 °C ± 0,6°C
Fim	221	222	221	221,3°C ± 0,6°C

Para o composto 4p não foi possível à determinação do ponto de fusão, visto que não ocorreu a liquefação da amostra nas temperaturas descritas na literatura 175-176 °C¹⁰ e 178-179°C¹³³.

No momento que a temperatura atingiu faixa de 217°C - 219°C o pó apresentou-se completamente carbonizado e com a formação de grumos como demonstrado na Figura 14 e em nenhuma temperatura foi observada mudança do estado sólido para o líquido.



Figura 14. Composto 4p após atingir a temperatura 217 °C com aspecto carbonizado.

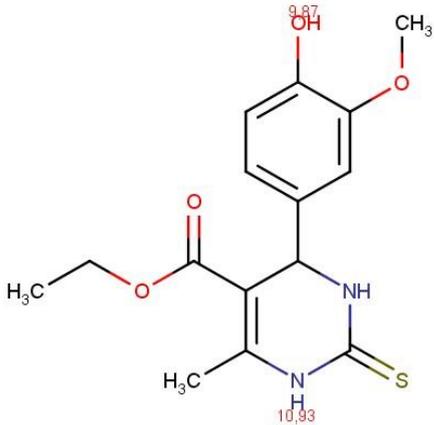
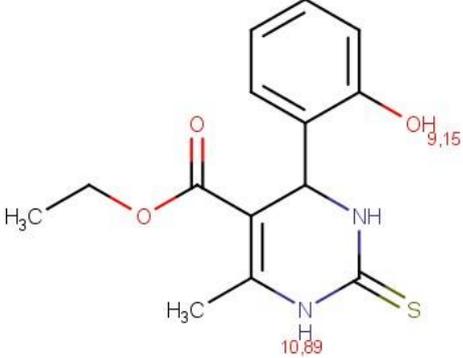
A variação dos pontos de fusão determinados com os descritos na literatura pode ter sido causada pela existência de polimorfos cristalinos do 4p e 4bc, o que

significa que esses compostos têm a capacidade de existir em mais de uma forma cristalina gerando diferentes conformações cristalográficas. A existência dessas formas polimórficas pode afetar os parâmetros físico-químicos, como solubilidade, ponto de fusão e sublimação, velocidade de dissolução, densidade, higroscopicidade e estabilidade ¹³⁴. Além desse fato, pode ainda ter ocorrido variação na determinação do início da fusão, visto que a leitura da temperatura no termômetro foi realizada a olho nu.

5.1.2. Previsão do pKa

Com auxílio do software *Marvin Suite*[®], foi calculado o logaritmo da constante de dissociação ácida dos compostos 4bc e 4p, conforme Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados do pKa dos compostos 4bc e 4p

	Estrutura química	pKa
4bc		1. 9,87 2. 10,93
4p		1. 9,15 2. 10,89

5.1.3. Determinação de solubilidade

5.1.3.1. Predição de solubilidade – *In sílico*

Com auxílio do software *Marvin Suite*[®] foi calculado que acima do pH 12 os compostos 4p e 4bc apresentariam melhor solubilidade em água, conforme Figura 15 e 16 respectivamente. A unidade logS é uma unidade comumente utilizada na mensuração da solubilidade, e representa o logaritmo da solubilidade em mg/mL. Isto equivale a dizer que, para os compostos em estudo, a solubilidade prevista seria de aproximadamente 1 mg/mL (logS = 0; portanto S = 1) na faixa de pH acima de

12. Abaixo de pH 8, a solubilidade prevista seria de aproximadamente 0,0025mg/mL ($\log S = -2,6$; portanto $S = 0,0025$).

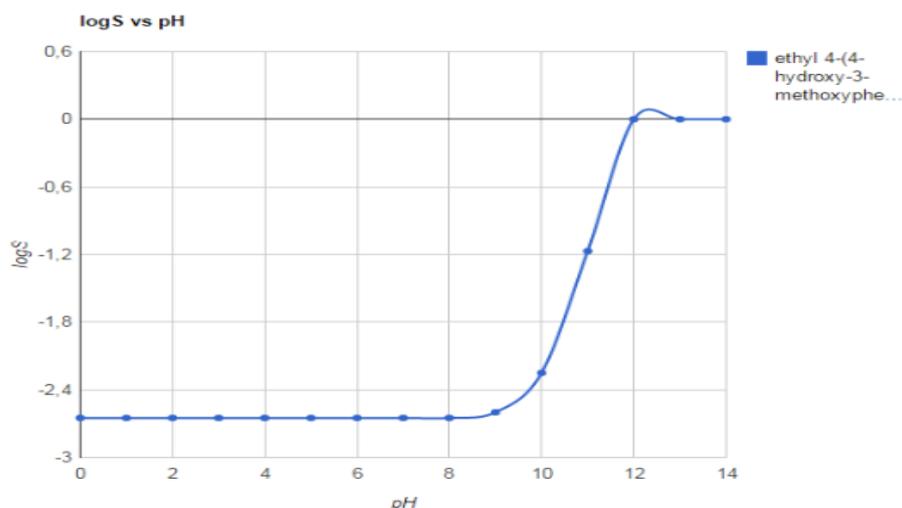


Figura 15. Predição da solubilidade do composto 4bc em função do pH do meio

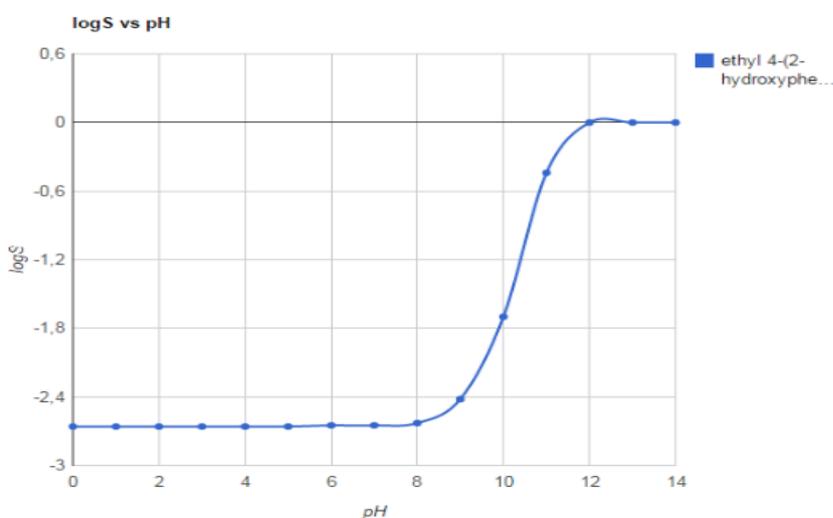


Figura 16. Predição da solubilidade do composto 4p em função do pH do meio

5.1.3.2. Determinação experimental da solubilidade

O resultado de solubilidade do composto 4bc foi obtido a partir do método espectrofotométrico previamente validado.

A curva padrão (Figura 17) traçada para a determinação das concentrações do composto 4bc solubilizado foi realizada nas concentrações de 0,01 mg/mL; 0,005 mg/mL; 0,0025 mg/mL; 0,00125 mg/mL e 0,001 mg/mL e dados estão expressos na Tabela 8.

Tabela 8- Dados da curva analítica espectrofotométrica do composto 4bc

Pontos	Média ± Desvio padrão
0,01 mg/mL	0,480 ± 0,002
0,005 mg/mL	0,247 ± 0,006
0,0025 mg/mL	0,086 ± 0,003
0,00125 mg/mL	0,061 ± 0,003
0,001 mg/mL	0,051 ± 0,002

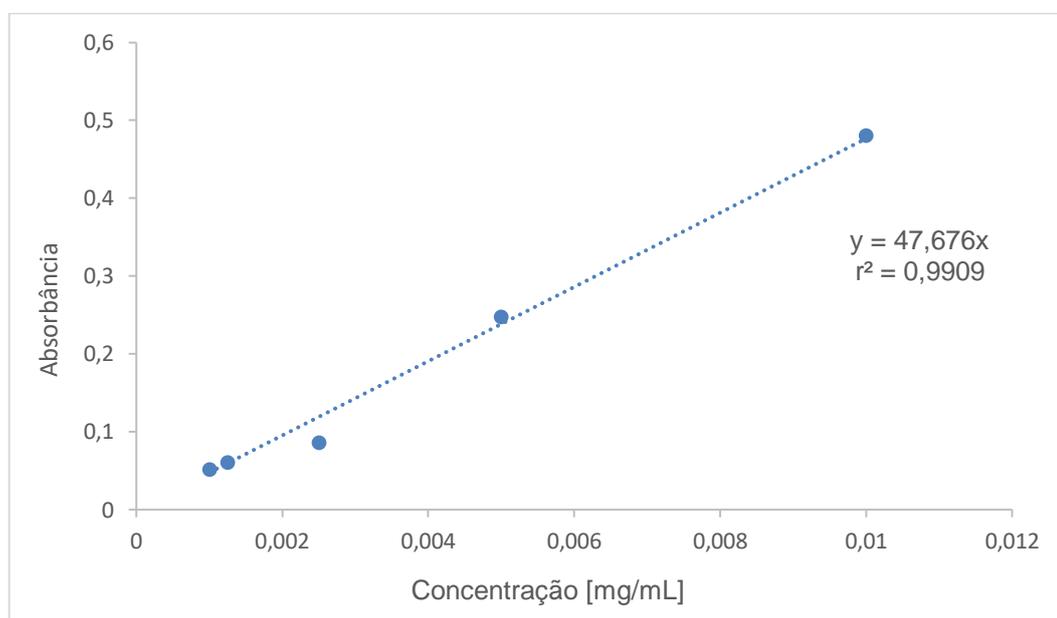


Figura 17. Curva padrão do composto 4bc, onde y é a equação da reta.

De acordo com o termo de descrição de solubilidade proposto por Manadas et al., 2002¹³⁵ e pela Farmacopeia Brasileira de 2010¹¹⁷, o composto 4bc é descrito como praticamente insolúvel em tampão fosfato pH 7 e pouco solúvel em pH 12, como apresentado na Tabela 9. Em termos quantitativos, podemos afirmar que a solubilidade do composto 4bc encontra-se próxima a 0,01 mg/mL, em pH 12.

Tabela 9 - Resultado da solubilidade do composto 4bc em meios de pH 7 e 12

Concentração planejada	Concentração aferida Tampão fosfato - pH 7	Concentração aferida Tampão fosfato - pH 12
4bc [0,1mg/mL]	[0,00857 mg/mL]	[0,0102 mg/mL]
4bc [0,01mg/mL]	[0,00611mg/mL]	[0,00951 mg/LmL]

A Figura 18 demonstra o aspecto das soluções em pH 7 e 12 do composto 4bc.

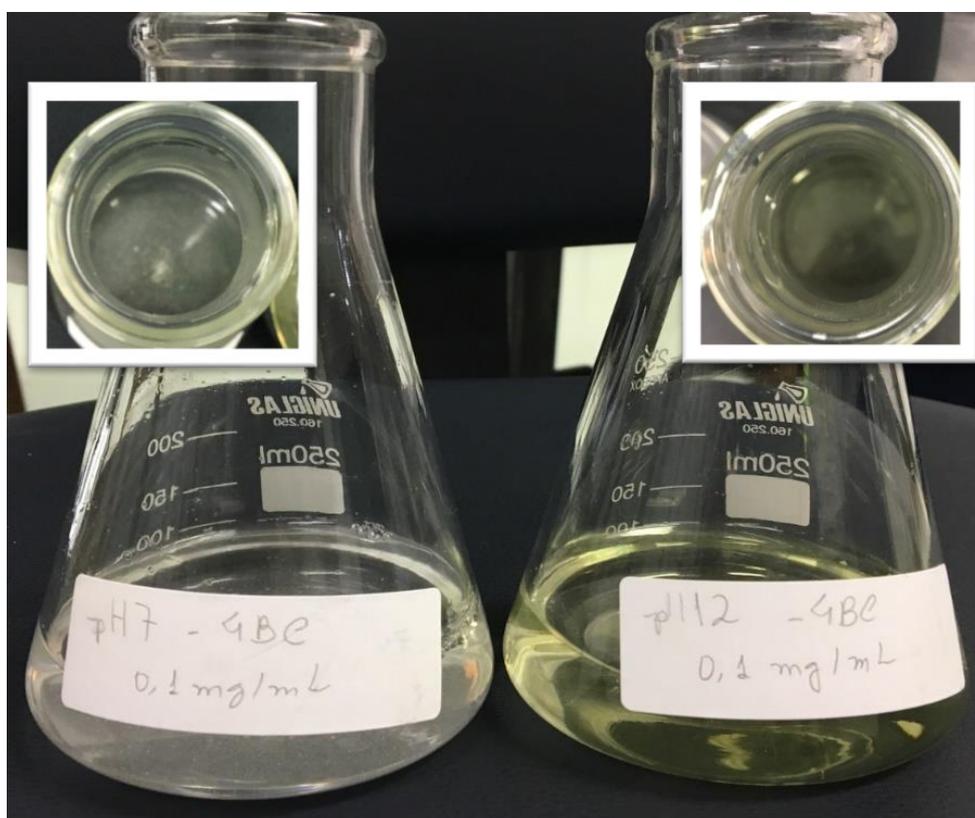


Figura 18. Composto 4bc após 24 horas de agitação e temperatura controladas em tampões de pH 7 e 12 respectivamente.

Para o composto 4p, levando em conta que não houve solubilização total nem mesmo na concentração inferior (0,01mg/mL), não foi possível realizar a metodologia para a aferição da solubilidade. Consideramos, portanto, que independente do pH, o composto 4p é praticamente insolúvel em água, como apresentado na Figura 19.

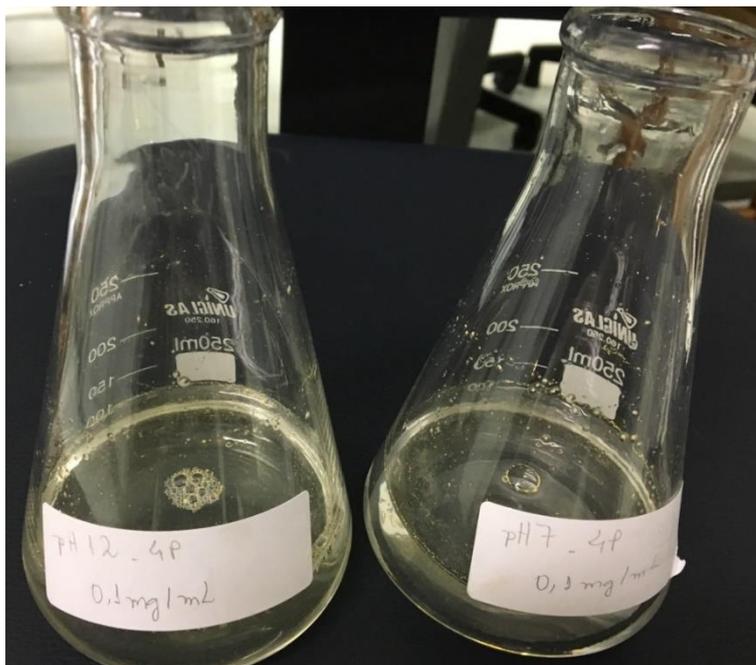


Figura 19. Composto 4p após 24 horas de agitação e temperatura controladas em tampões de pH 12 e 7 respectivamente.

A ação dos fármacos está relacionada à farmacocinética e existem fatores que determinam a liberação e a cinética dos compostos no organismo, sendo as propriedades físico-químicas cruciais para a conclusão dessa etapa sendo os principais a: como ionização (ácido/base), coeficiente de partição e a solubilidade. Além disso, as características de liberação do composto são importantes, a exemplo desintegração/ desagregação e a dissolução do fármaco ^{3 29 107}.

Os resultados apresentados estão em consonância com a literatura, que descreve a baixa solubilidade dos derivados diidropirimidinona ⁹. No trabalho de Ramos (2012) foi descrito que os compostos 4p e 4bc somente foram solúveis em solventes orgânicos polares como o dimetilsulfóxido (DMSO) e a dimetilformamida (DMF), sendo estes inviáveis para a administração *in vivo*, já que nas quantidades que seriam necessárias para dissolver o material a ser administrado esses solventes sozinhos poderiam mostrar-se tóxicos demais para os animais, interferindo no resultado da análise. ^{10 136; 137 138}. Diante dessa característica físico-química fez-se necessária a incorporação desses compostos em veículos estruturados, nas formas farmacêuticas de xarope (oral) e suspensão (intravenoso).

Essa limitação de solubilidade é também descrita para o Monastrol ¹³⁹ e para o Paclitaxel (Taxol) ¹⁴⁰ e foi um dos fatores para a descontinuidade de ensaios

clínicos para esses compostos e estímulo para a química medicinal desenvolver derivados com um melhor perfil de solubilidade ^{9 141}.

A solubilidade está diretamente relacionada à biodisponibilidade de substâncias no organismo, pois antes que eles possam atravessar as membranas que dividem o sítio de absorção da circulação precisam estar em forma de solução, dessa forma a dissolução é um pré-requisito para o movimento através da parede intestinal, em casos que essa etapa é incompleta ocorre uma baixa penetração nas membranas intestinais e conseqüentemente baixa biodisponibilidade ¹⁰⁷.

5.2. TOXICIDADE AGUDA

5.2.1. Toxicidade oral aguda – 4p e 4bc

5.2.1.1. Avaliação da toxicidade sistêmica

5.2.1.1.1. Mortalidade

Após o tratamento agudo com a menor dose (300mg/kg) para os dois compostos, 4p e 4bc, nenhum dos três animais apresentou morbidade ou mortalidade nas primeiras 24 horas após o tratamento. Dessa maneira, foi repetido o teste nesta mesma dose em outros três animais e o resultado anterior foi confirmado. Seguiu-se para a maior dose (2000mg/kg), que também não gerou morbidade ou mortalidade em nenhum dos três animais expostos. A repetição dessa dosagem confirmou a ausência de letalidade nessa dose. Nos 13 dias subsequentes às doses nenhum óbito foi registrado.

O objetivo do guia OECD 423 não é a determinação precisa do valor da DL50, ⁹⁹, mas sim determinar o potencial de novas substâncias causarem danos à saúde ^{142 143} e assim as classifica em categorias de risco segundo GHS (The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals).

O ensaio de toxicidade aguda descrito pelo Guia 423 ¹⁰² preconiza que caso não ocorra óbito de mais de um animal dos seis que foram expostos a dose de 2000mg/kg, o valor da DL50 pode ser considerado como o intervalo entre 2000mg/kg e 5000mg/kg. Ambos os compostos se enquadram nessa faixa, que de acordo com o GHS, pode-se chamar de Categoria 5 de toxicidade.

O resultado mantém uma correlação positiva com os ensaios *in vitro* realizados com esses compostos, que indicam atividade citotóxica significativa para células de adenocarcinoma mamário MCF-7 e MDA-MB-231, mas efeitos pouco significativos

em células normais (fibroblastos), mesmo sendo exportas a elevadas doses por 72 horas ⁹.

Existem diversos trabalhos que avaliam a citotoxicidade e atividade antitumoral dos derivados DHPMs em ensaios *in vitro* ^{42 144 145 146 147}, no entanto os estudos de toxicidade *in vivo* estão ainda em fase inicial ^{56 96}.

Nesse contexto o estudo da avaliação toxicológica e toxicocinética desenvolvido por Torres (2014) têm sido utilizados como um bom comparativo para no nosso trabalho tendo em vista a similaridade estrutural e do perfil citotóxico do composto LaSOM 65, que também não apresentou morte durante os 14 dias de ensaio. Diferentemente do nosso trabalho, Torres e colaboradores testaram doses mais baixas (50, 100 e 150 mg/kg) do que as preconizadas pelo protocolo OECD 423 ⁹⁶.

5.2.1.1.2. *Sinais clínicos de toxicidade*

O screening hipocrático é um ensaio clínico prévio útil na avaliação das atividades fármaco-toxicológicas de compostos em ensaios agudos, subcrônicos e crônicos ^{148 149; 150}.

Dentre os vinte parâmetros avaliados (frênto vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta aperto cauda, convulsão, tremores finos e grosseiros, contorção, ereção de cauda, tremor, pouca motilidade, diarreia, chiados, coçar focinho, salivação excessiva, hiperatividade, dilatação ou contração da pupila, lagrimação, piloereção, hipotermia, hipertermia, cianose e coma) apenas a piloereção e a diarreia foram observados.

A Tabela 10 descreve quantos animais por grupo apresentaram os sinais clínicos de toxicidade, a intensidade e o período que foram observados sendo analisados à temperatura ambiente.

Tabela 10 - Número de animais que apresentaram os sinais clínicos de toxicidade e a intensidade

Intensidade (0= ausente, 1=raro, 2= pouco, 3=moderado, 4=intenso) nos diferentes grupos do experimento de toxicidade aguda via oral.

		Toxicidade aguda oral (4bc e 4p)																																		
Sinal clínico	Tempo	Controle Salina					Controle xarope					4p 300 mg/kg					4p 2000 mg/kg					4bc 300 mg/kg					4bc 2000 mg/kg									
Intensidade		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4					
Piloereção	15min			3						3				3						3										3				1	2	
	30min		3					1	2				1	2				1	2				1	2									1	2		
Diarreia	15min	3						2	1				3					1	2				1	2				1	2				1	2		
	30min	3						3						3				2	1				3										2	1		
	60min	3						3					3					3					3										2	1		

Analisando o parâmetro de eriçamento de pelo todos os animais dos grupos tratados e controles apresentaram-no nos primeiros 5 minutos após a administração, cessando após 30 minutos em intensidade rara ou pouco. Diante disso é plausível acreditar que esse efeito ocorreu em virtude do estresse gerado pela manipulação dos animais durante o procedimento da gavagem ¹⁵¹.

O parâmetro da diarreia foi presente nos animais dos grupos tratados e no controle xarope de forma rara, apresentando as excreções com consistência diminuída e aquosa. Como esse sinal clínico foi apresentado por no mínimo dois animais de cada grupo não é possível correlacioná-lo com a exposição aos compostos 4p e 4bc, mas sim a algum componente do xarope, pois esse efeito também foi presente no grupo desse controle.

Na avaliação dos sinais clínicos após administração oral do LaSOM 65 não foi observado nenhum efeito adverso significativo. No entanto, como já comentado, o LaSOM 65 foi administrado em doses bem menores (50, 100 e 150 mg/kg) e o veículo utilizado não foi um xarope ⁹⁶.

5.2.1.2. Avaliação ponderal

O monitoramento da massa corporal dos animais durante o ensaio de toxicidade aguda é um importante indicativo de toxicidade. Se a redução de peso for acima de 10% em relação ao peso anterior ao tratamento considera-se como indicativo de toxicidade presente ^{152 153 154}.

A massa corporal dos animais foi avaliada diariamente durante os 14 dias de tratamento, sendo que entre o dia 0 e 1 os animais ficaram em jejum cerca de 4 horas anteriores e posteriores às administrações e por 12 horas entre o dia 13 e 14 como medida prévia da eutanásia.

Foi observada diminuição da massa corporal apenas no grupo controle salina, pela avaliação da distribuição empírica dos dados através dos *box plots* apresentados na Figura 20.

O ganho de peso dos grupos de tratamento apresentou perfil semelhante, inclusive as medianas estão bem próximas, no entanto os grupos controles tiveram menor ganho de peso em comparação com o grupo 4p 2000mg/kg, sendo assim apresentada diferença estatística entre esses grupos.

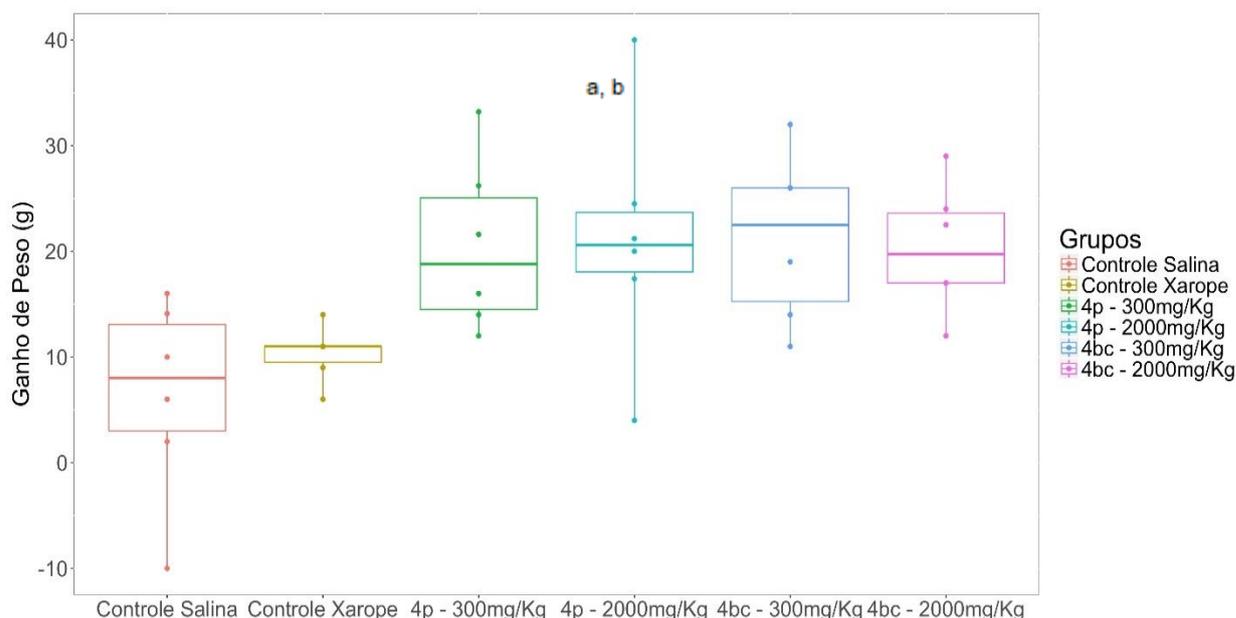


Figura 20. Ganho de peso dos ratos nos diferentes grupos experimentais (oral) durante os 14 dias de ensaio, representado por *box plot* dos intervalos interquartis (Q1-Q3) e mediana

*Teste Kruskal-Wallis. $p(<0,05)$.

^aDiferença estatisticamente significativa em relação ao controle salina ($p<0,05$).

^bDiferença estatisticamente significativa em relação ao controle veículo ($p<0,05$).

Os dados também foram expressos no gráfico de linhas (Figura 21), que representa a evolução ponderal dos grupos em função do tempo, onde se pode observar que entre o 13º e 14º dia ocorreu uma redução do peso em todos os grupos devido ao período de jejum de 12 horas. Não houve redução de massa acima de 10%, indicando que a exposição aos compostos não gerou efeito negativo no desenvolvimento corporal.

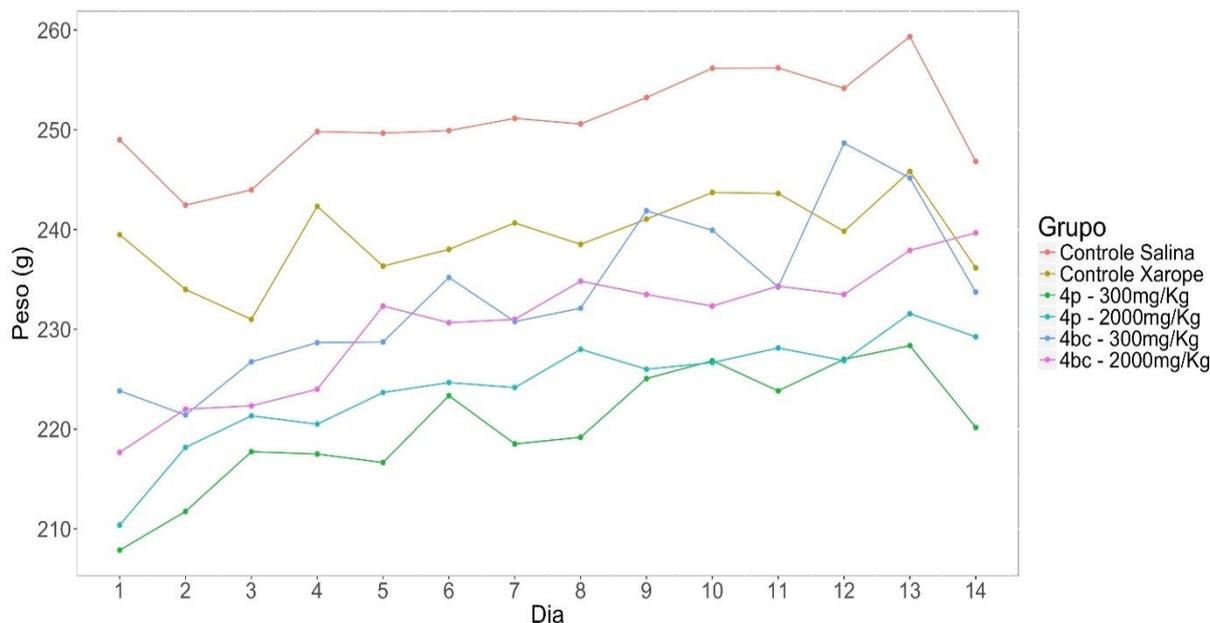


Figura 21. Evolução da massa corporal dos ratos nos diferentes grupos experimentais durante o teste de toxicidade oral aguda

Realizou-se a análise de ganho de massa total, entre o 1º e 14º dia, a fim de se obter as diferenças entre os grupos. Foi encontrada diferença significativa entre o grupo Controle Salina e o grupo de tratamento do 4p maior dose ratificando que o grupo controle salina foi o que se comportou de forma diferente, com menor ganho de massa, em relação aos animais expostos aos compostos 4p e 4bc.

O menor ganho de peso encontrado no grupo salina pode estar relacionado a maior massa inicial encontrada para os animais desse grupo, na qual o crescimento corpóreo tende a estabilizar, ganhando massa de forma mais lenta.

5.2.1.3. Avaliação do consumo de ração e água

A análise de consumo hídrico e de alimentos em experimentação animal é avaliada como parâmetro de segurança das substâncias testadas, pois a redução de

peso em geral apresenta-se como efeito da redução desses consumos, portanto esse controle foi realizado para avaliar possível toxicidade dos compostos 4p e 4bc

155 156.

As relações de consumo estão intimamente ligadas à massa do animal, dessa forma para a avaliação estatística foi analisada a média do consumo diária, relativa ao somatório da massa diária dos animais. Assumiu-se que os períodos de maiores ganhos de peso coincidem com aqueles de maior energia metabolizável ingerida. No presente estudo não foi realizada a mensuração do consumo individual dos animais e sim dos grupos, portanto os dados apresentados nos gráficos foram plotados com o somatório dos consumos dos três animais pertencentes ao grupo.

Conforme os resultados descritos na Figura 22 não houve diferença significativa no consumo de ração entre os grupos experimentais.

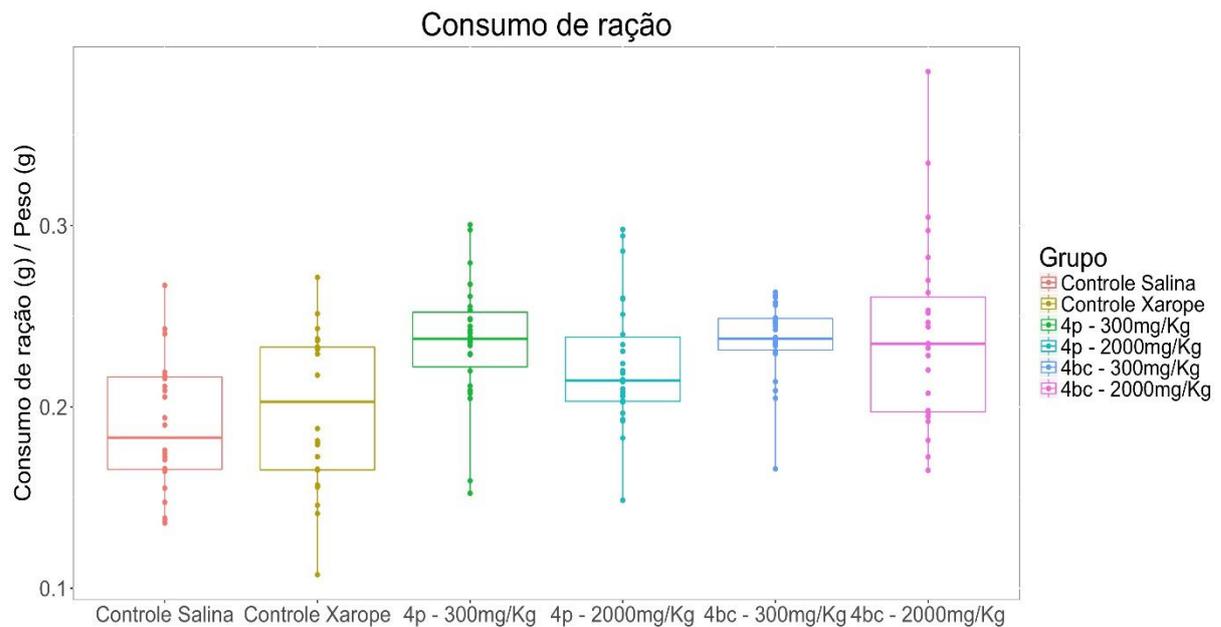


Figura 22. Relação de consumo de ração por peso corporal dos três animais pertencentes aos grupos experimentais (oral) durante os 14 dias de ensaio, representado por *box plot* dos intervalos interquartis (Q1-Q3) e mediana

Os dados foram expressos em gráfico de linhas para representar a evolução do consumo de ração entre os grupos durante os 14 dias de estudo (Figura 23). Os animais ficaram em jejum de ração por 12 horas anteriores a eutanásia, portanto não foi contabilizado o consumo entre o dia 13 e 14.

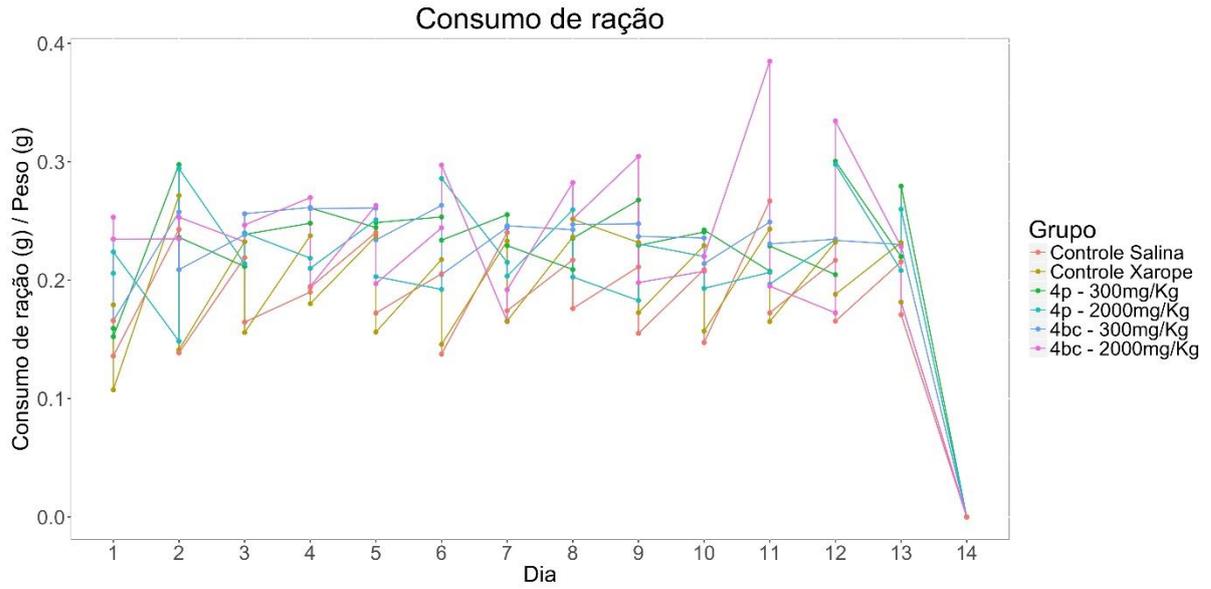


Figura 23. Evolução do consumo de ração por peso corporal dos diferentes grupos experimentais ao longo de 14 dias (oral)

Conforme os resultados descritos na Figura 24 não houve diferença significativa no consumo de água entre os grupos experimentais.

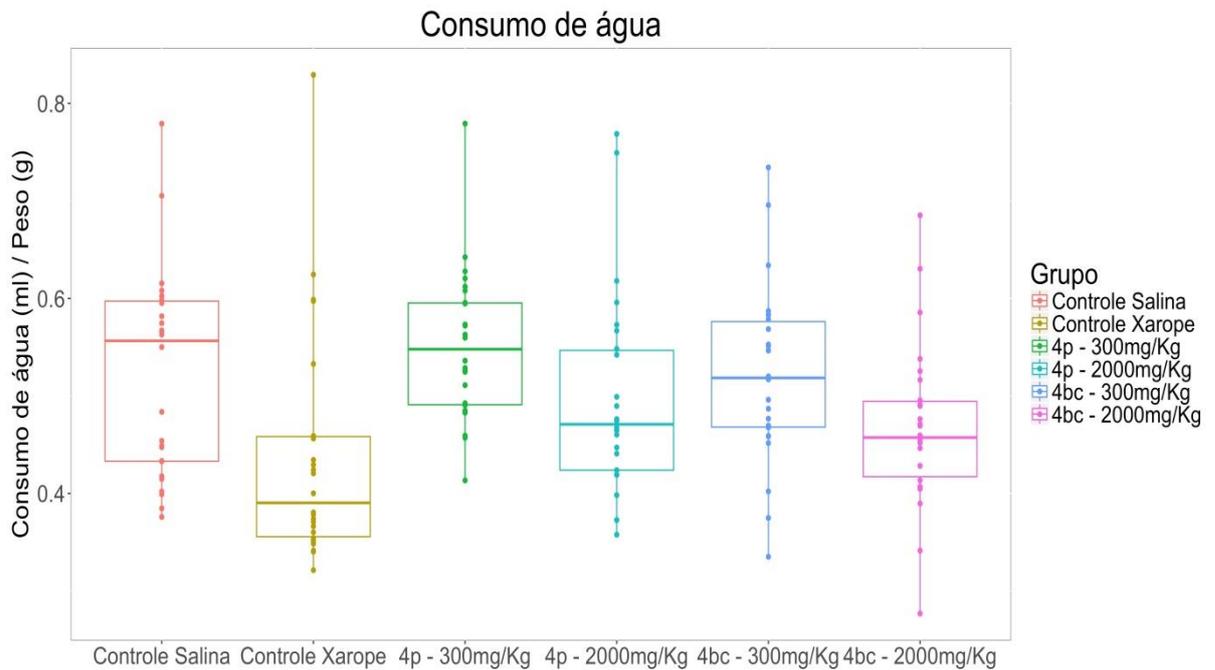


Figura 24. Consumo de água por peso corporal dos três animais pertencentes aos grupos experimentais (oral) durante os 14 dias de ensaio, representado por *box plot* dos intervalos interquartis (Q1-Q3) e mediana

Os dados foram expressos em gráfico de linhas para representar a evolução do consumo hídrico entre os grupos, no decorrer do tempo total de avaliação, Figura 25.

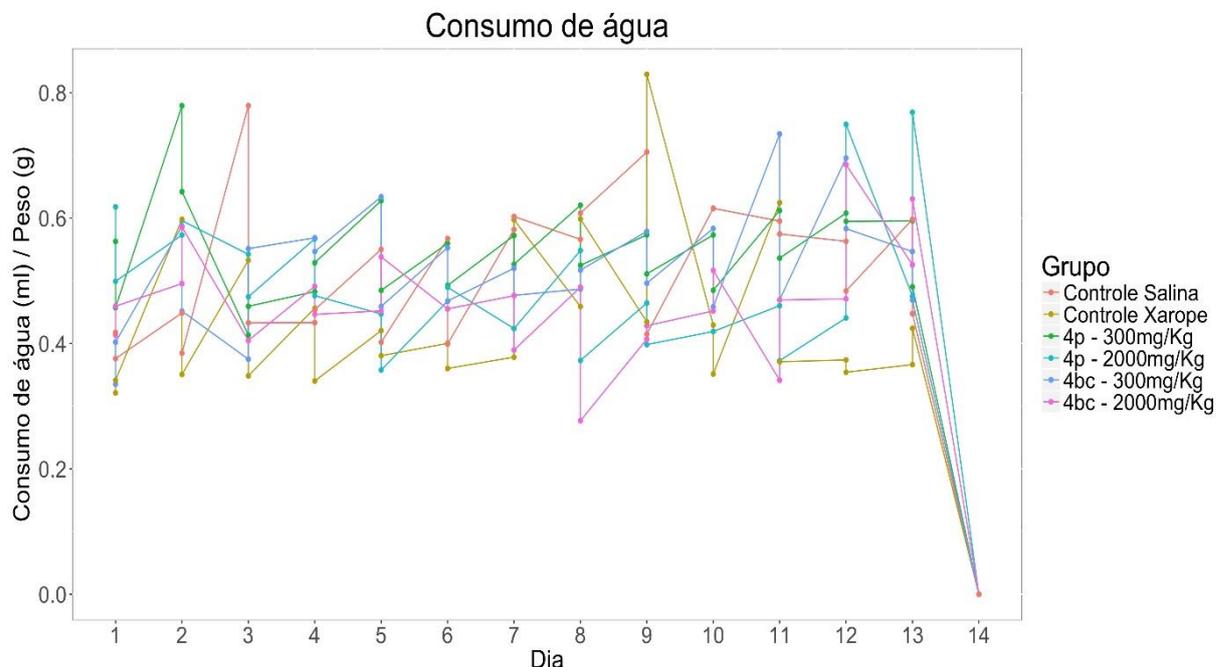


Figura 25. Evolução do consumo de água por peso corporal dos diferentes grupos experimentais ao longo de 14 dias (oral)

A literatura relata o consumo médio de ração de ratos adultos entre 10 e 20 gramas, consumo hídrico entre 20 e 45 mL por dia. Observando a média dos consumos dos animais/grupo todos estão dentro da faixa de normalidade^{151 157} esse resultado indica que a exposição aguda oral dos compostos 4p e 4bc não foi capaz de gerar efeitos sobre a ingestão hídrica e alimentar.

5.2.1.4. Avaliação anatomopatológica

A avaliação da toxicidade macroscópica foi realizada por análise durante as necropsias dos animais no 14º dia após a administração dos compostos. O exame macroscópico incluiu a avaliação da toxicidade hematopoética (timo e baço), toxicidade de órgãos centrais (pulmões, coração, fígado, trato gastrointestinal, rins e cérebro) e outros órgãos analisados devido à ação sistêmica dos antitumorais (pâncreas, tireoide, ovário, útero, cérebro e músculo). Embora essa análise não seja exigida pela ANVISA na avaliação aguda de toxicidade, este perfil preliminar auxilia

no conhecimento das doses toleradas, os órgãos alvos de toxicidade e o potencial de recuperação dos efeitos tóxicos ^{99,158}

No estudo anatomopatológico nenhuma alteração dos órgãos foi observada nos animais tratados com o 4p e 4bc nas doses 300mg/kg e 2000mg/kg, bem como nos animais do controle que receberam o salina e o xarope. Única exceção faz-se ao aumento do volume de alguns órgãos (fígado, timo e pulmão) após o procedimento de fixação por perfusão.

Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Torres (2014) para os rins, fígado, pulmão, coração e adrenal ⁹⁶.

O fígado possui importância ímpar, devido à sua alta atividade enzimática, na maioria dos processos de biotransformação e conseqüentemente é o maior responsável pelos processos de degradação e bioativação de compostos. Por isso, é também um órgão muito suscetível às intoxicações. No caso dos antineoplásicos convencionais, o quadro de disfunção hepática frequentemente é reversível com a interrupção da quimioterapia ¹⁵⁹, apesar de poder chegar a desenvolver lesões graves como a cistite hemorrágica que é um efeito tóxico das ciclofosfamidas ¹⁶⁰. No presente estudo não foram reportadas lesões macroscópicas ou sinais de inflamação nesse órgão.

Os rins são órgãos essenciais na manutenção da homeostase, pois são responsáveis pela filtração do sangue, secreção de substâncias e regulação do volume líquido corporal. Não foram encontradas lesões renais e esse resultado é positivo, considerando que vários antineoplásicos como metotrexato ¹⁶¹, docetaxele e ciplastina causam lesões renais em animais de experimentação e em humanos ¹⁶².

Os ensaios conduzidos nesse estudo são os primeiros *in vivo* para os derivados 4p e 4bc, portanto foi realizada uma análise exploratória dos diversos órgãos, não sendo direcionada apenas ao fígado e aos rins. Os resultados indicaram que de forma geral as diidropirimidinonas testadas não causaram alterações macroscópicas nos múltiplos órgãos, conforme Figura 26.

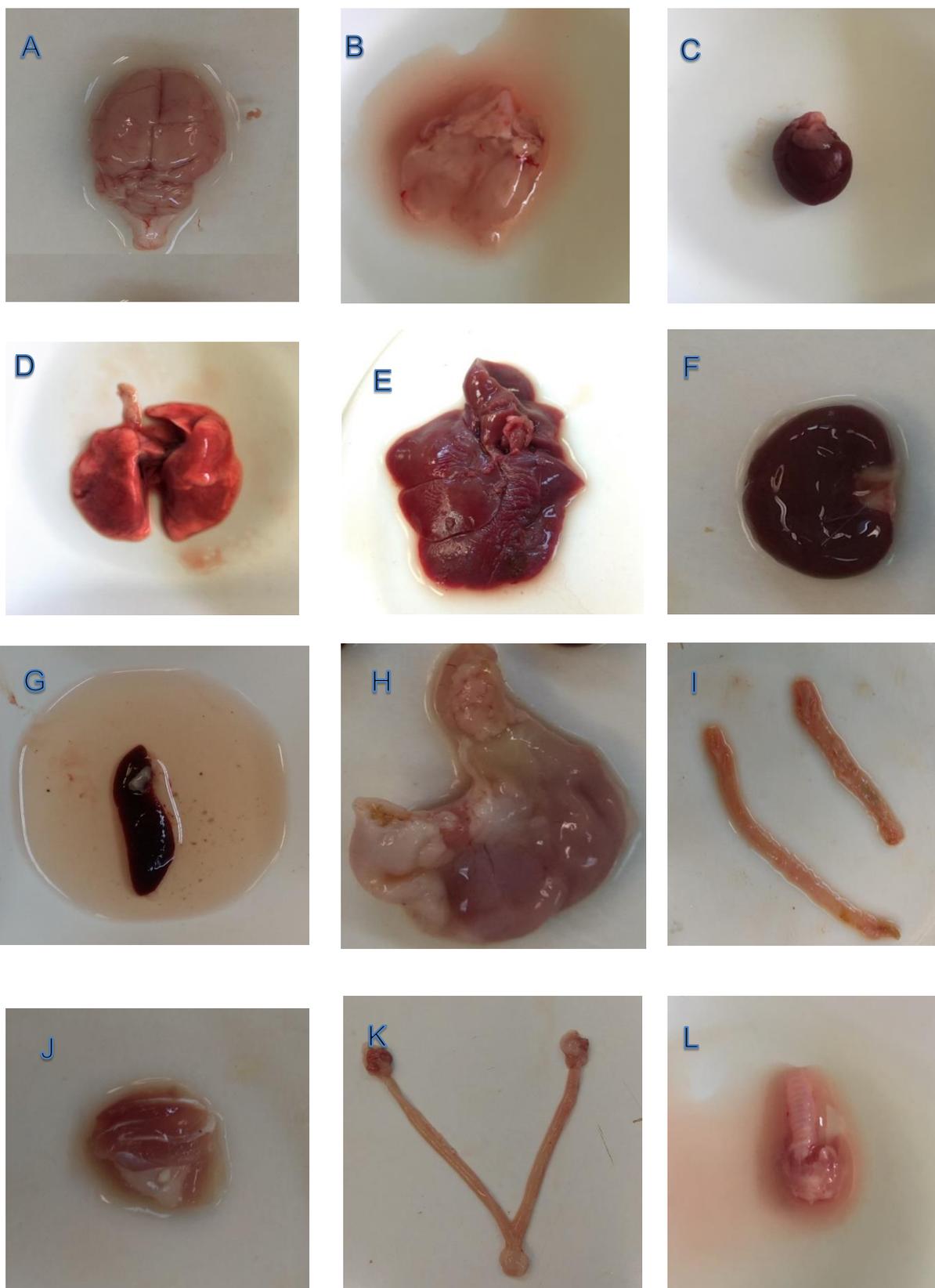


Figura 26. Fotografia dos órgãos dos diferentes grupos experimentais (oral).

A=Cérebro 4p (2000mg/kg) ; B=Timo 4p (2000mg/kg); C= Coração 4bc (2000mg/kg) ; D=Pulmão 4bc (2000mg/kg); E= Fígado 4p (2000mg/kg); F= Rim 4bc (2000mg/kg); G= Baço 4p (2000mg/kg); H= Estômago 4p (2000mg/kg); I= Intestino Delgado 4p (300mg/kg); J= Músculo 4bc (300mg/kg); K= Útero e ovário; L=Tireóide 4bc (2000mg/kg)

5.2.1.5. Avaliação dos índices dos órgãos

Foram avaliadas as massas relativas da tireóide, coração, timo, fígado pulmão (direito e esquerdo), rins (direito e esquerdo), estômago, útero e ovário e baço.

As massas dos órgãos, normalizadas pela massa corporal dos ratos estão expressos na Tabela 11 e não foi encontrada diferença significativa no índice de massa da tireóide, coração, rins, baço, útero e ovário.

No momento da perfusão apesar de se tomar todos os cuidados referentes à pressão exercida na injeção dos fluídos (PBS e Formalina) a distribuição pelos órgãos não foi igual em todos os animais, assim o timo, fígado e pulmão aumentaram de volume após o processo de fixação por perfusão, dessa forma foi gerado um importante interferente nos resultados do índice desses órgãos, já que eles só foram pesados após a completa fixação. O uso de bomba para perfusão poderia ter diminuído esse interferente, e é uma sugestão para trabalhos futuros que visem realizar esse tipo de avaliação.

O estudo dos órgãos linfoides é de fundamental importância na demonstração das alterações dos compartimentos imunológicos quando expostos a agentes estranhos ao organismo. O timo é a glândula responsável pela maturação de linfócitos T, importantes na resposta imunitária do organismo. Dessa forma sua avaliação anatomopatológica e histológica é interessante ¹⁶⁴. Em relação ao peso relativo apresentou diferença significativa entre o grupo 4p 300 mg/kg e os controles do veículo - xarope (CX) e salina (CS) e com o 4p 2000 mg/kg. A diferença foi decorrente de um aumento no tamanho desse órgão nos animais tratados com a menor dose do 4p. Credita-se à perfusão esse resultado, tendo em vista que o grupo tratado com a maior dose não apresentou nenhuma alteração nesse parâmetro.

No fígado a diferença significativa foi atribuída apenas entre os grupos 4bc 2000 mg/kg e o CX. O valor médio do grupo controle é maior que do tratado, portanto esse leve aumento reportado não está relacionado com a exposição ao composto e provavelmente está vinculado ao procedimento de perfusão.

Foram encontradas diferenças significativas nas massas relativas dos pulmões, mas não houve o aumento em ambos os lados, nem mesmo observou-se o efeito nos grupos de maior dose, ratificando a hipótese que a fixação por perfusão

aumentou o volume do órgão em animais de diferentes grupos gerando algumas diferenças estatísticas, mas que não são clinicamente significantes.

Para o estômago, a diferença significativa apresentada entre os grupos tratados e controle, foi somente encontrada entre o grupo 4p 300 mg/kg e o CS.

Tabela 11- Valores médios dos índices dos órgãos (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via oral com 4p e 4bc na dose de 300 mg/kg e 200mg/kg e grupos controles

	Controle Salina (CS)	Controle Xarope (CX)	4p 300 mg/kg	4p 2000 mg/kg	4bc 300 mg/kg	4bc 2000 mg/kg
Tireóide	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01
Coração	0,26 \pm 0,05	0,2 \pm 0,06	0,29 \pm 0,04 ^b	0,25 \pm 0,04	0,28 \pm 0,05 ^b	0,22 \pm 0,06
Timo	0,37 \pm 0,02	0,35 \pm 0,06	0,43 \pm 0,03 ^{a,b,c}	0,34 \pm 0,03	0,42 \pm 0,07 ^d	0,32 \pm 0,05
Fígado	0,66 \pm 0,23	0,65 \pm 0,17	0,67 \pm 0,36	0,62 \pm 0,19	0,38 \pm 0,19	0,41 \pm 0,07 ^b
Pulmão direito	0,37 \pm 0,12	0,41 \pm 0,11	0,61 \pm 0,12 ^{a,b,c}	0,33 \pm 0,08	0,62 \pm 0,24 ^{a,b,d}	0,23 \pm 0,06
Pulmão esquerdo	0,37 \pm 0,04	0,33 \pm 0,07	0,4 \pm 0,03	0,36 \pm 0,04	0,43 \pm 0,02 ^{a,b,d}	0,35 \pm 0,03
Rim direito	3,50 \pm 0,06	3,60 \pm 0,09	3,80 \pm 0,03 ^d	3,40 \pm 0,03	4,20 \pm 0,02	3,40 \pm 0,03
Rim esquerdo	3,28 \pm 0,7	3,66 \pm 1,56	3,58 \pm 0,26	3,85 \pm 0,42	3,40 \pm 0,25	3,45 \pm 0,23
Estômago	0,62 \pm 0,07	0,65 \pm 0,1	0,72 \pm 0,06 ^{a,c}	0,57 \pm 0,07	0,68 \pm 0,03	0,63 \pm 0,03
Útero e ovário	0,41 \pm 0,15	0,39 \pm 0,07	0,33 \pm 0,09	0,28 \pm 0,05	0,41 \pm 0,08	0,32 \pm 0,11
Baço	0,26 \pm 0,03	0,21 \pm 0,02	0,25 \pm 0,02	0,24 \pm 0,04	0,24 \pm 0,04	0,24 \pm 0,04

*Teste Kruskal-Wallis. $p(<0,05)$.

^a Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle salina ($p<0,05$).

^b Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle veículo ($p<0,05$).

^c Diferença estatisticamente significativa em relação ao 4p 2000 mg/kg ($p<0,05$).

^d Diferença estatisticamente significativa em relação ao 4bc 2000 mg/kg ($p<0,05$).

5.2.1.6. Avaliação histológica

Os dados histopatológicos revelaram que os grupos tratados com os derivados DHPMs 4p e 4bc mantiveram a integridade tecidual do cérebro, timo, tireóide, coração, pulmão, fígado, rins, pâncreas, baço, intestino grosso e delgado, estômago, útero, ovário e músculo, como apresentado na Figura 27. Os resultados destes animais não revelaram lesões, sinais de inflamação ou necrose que podem ser associadas ao uso das diferentes doses dos compostos.

Estes dados corroboram os resultados hematológicos e bioquímicos, que indicam que compostos quando exposto de forma aguda e pela via oral não geram importantes alterações clínicas fisiológicas.

Os órgãos considerados vitais como cérebro, coração e pulmão se mantiveram sem alterações, e foram avaliados, pois é comum ao antitumoral doxorrubicina a cardiotoxicidade ^{165 166 167}, já a avaliação do cérebro foi buscada porque a neuropatia periférica é a síndrome neurológica mais comum secundária à terapêutica com oxaliplatina, taxanos, alcalóides de vinca, e bortezomib, além das alterações centrais manifestadas por confusões mentais, ataxia cerebelar e convulsão ^{168 169}.

Alteração na função renal é comum efeito tóxico do uso de substâncias antitumorais, e a ausência de lesão após a exposição dos compostos 4p e 4bc é animadora, já que vários antineoplásicos como metotrexato ¹⁶¹, docetaxele e causam lesões nefrotóxicas em animais e em humanos ^{162 163}. Sendo o exemplo mais grave o gerado pela cisplastina um agente quimioterapêutico amplamente utilizado é capaz de causar lesão renal aguda em 20-30% dos pacientes, em que através dos ensaios histológicos foi detectada necrose tubular aguda juntamente com azotemia ^{170; 171}. Diante disso fica clara a importância da inclusão da avaliação histológica nos ensaios de toxicidade aguda no estudo de promissores antitumorais.

A toxicidade hepática está associada à utilização de vários quimioterápicos em graus variados, desde elevações transitórias de enzimas hepáticas até cirrose e fibrose hepáticas, esses efeitos foram descritos principalmente em pacientes em uso do metotrexato ou a mercaptopurina ^{5; 172; 173}. A preservação da arquitetura hepática após exposição dos compostos 4p e 4bc é um indicativo de baixa toxicidade hepática, mas que precisa ser comprovada em ensaios com doses repetidas.

A agressividade da terapia antitumoral incide particularmente sobre o aparelho gastrointestinal, uma vez que este tecido apresenta alta atividade mitótica, sendo o intestino, estômago e pâncreas alvos, porém para os derivados DHPM avaliados nesse estudo não foram encontrados efeitos tóxicos sobre esses órgãos

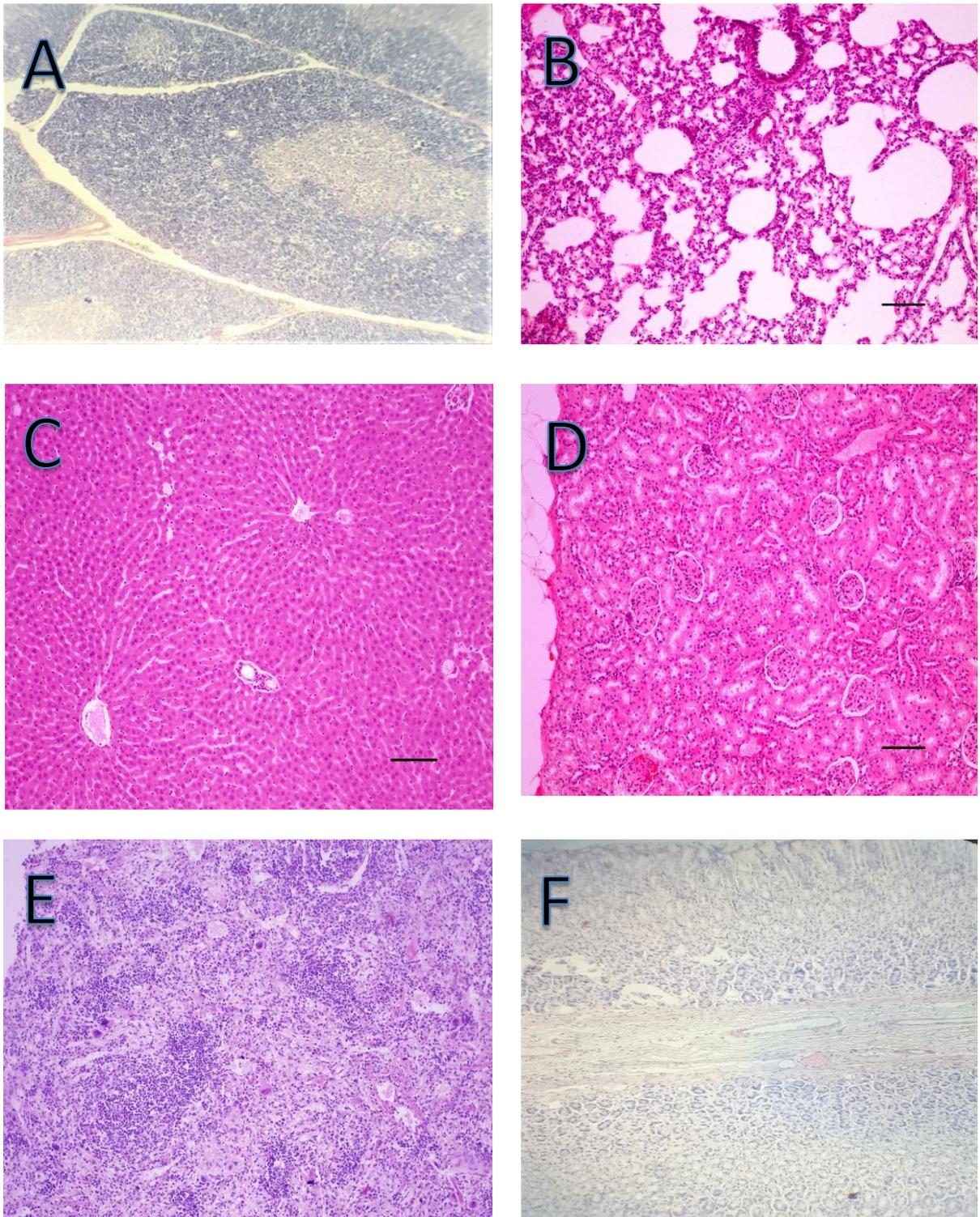


Figura 27 (**Parte 1**) - Fotomicrografia dos tecidos avaliados nos diferentes grupos experimentais (oral)
 A =Timo 4p(2000 mg/kg); B=Pulmão 4bc (2000 mg/kg); C= Fígado 4p (2000 mg/kg); D= Rim 4bc (2000 mg/kg); E= Baço 4p(2000 mg/kg); F= Estômago 4p(2000 mg/kg); G= Intestino Delgado 4p(300 mg/kg); H= Músculo 4bc(300 mg/kgpc); I= Útero, J= Ovário; K =Tireóide 4bc(2000 mg/kg,pc); L= Pâncreas4p(300 mg/kg,pc); Barra = 20 μ m.

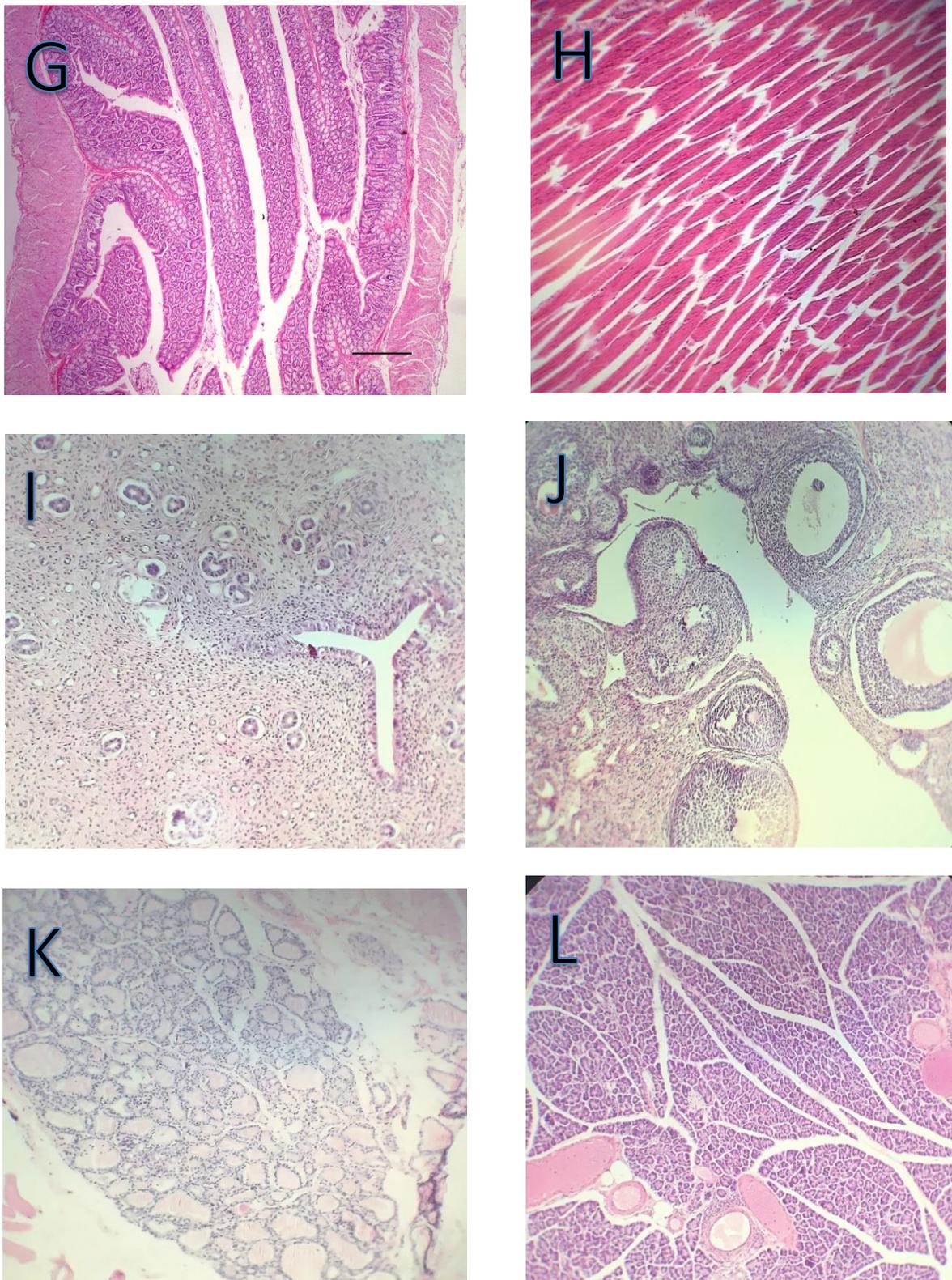


Figura 27 (**Parte 2**) - Fotomicrografia dos tecidos avaliados nos diferentes grupos experimentais (oral) A =Timo 4p(2000 mg/kg); B=Pulmão 4bc (2000 mg/kg); C= Fígado 4p (2000 mg/kg); D= Rim 4bc (2000 mg/kg); E= Baço 4p(2000 mg/kg); F= Estômago 4p(2000 mg/kg); G= Intestino Delgado 4p(300 mg/kg); H= Músculo 4bc(300 mg/kg,pc); I= Útero, J= Ovário; K =Tireóide 4bc(2000 mg/kg,pc); L= Pâncreas4p(300 mg/kg,pc); Barra = 20 μ m.

5.2.1.7. Avaliação dos parâmetros hematológicos

O hemograma é um método destinado ao diagnóstico e a avaliação de prognóstico de doenças e indicar o estado de saúde dos animais ¹⁷⁵. O exame de sangue é constituído pela série vermelha (eritrograma), série branca (leucograma) e contagem de plaquetas (plaquetograma) ¹⁷⁶.

A toxicidade ocasionada pelos quimioterápicos tradicionais está relacionada com a não especificidade desses compostos às células tumorais, fazendo com que as células de rápida divisão tornem-se também alvo. O tecido hematopoético pode ser afetado de forma precoce ou tardia, aguda ou crônica, reversível ou irreversível ¹⁷⁴, por isso a importância da avaliação dos parâmetros hematológico em ensaios pré-clínicos.

Os animais testados do grupo de avaliação toxicológica dos compostos 4p e 4bc nas doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg, administrado por via oral, tiveram seus resultados comparados com os animais dos grupos controles e também com as referências de normalidade da literatura ^{159 175 177 178 179}.

A Tabela 12 apresenta a avaliação comparativa entre os grupos tratados e controles.

A avaliação da série vermelha é feita pela contagem de hemácias, determinação do hematócrito, dosagem de hemoglobina, cálculo dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM e RDW%) e visualização microscópica dos eritrócitos ¹⁷⁶.

A contagem de células vermelhas apresentou-se mais variável nos grupos controle (CS e CX) e estatisticamente acima (CS) dos grupos tratados com o compostos 4p. Segundo a literatura é considerado normal para esse parâmetro a faixa de $7,21 - 7,94 \cdot 10^{12}/L$, desse modo os grupos tratados, mesmo aqueles que apresentaram diferença estatística em relação ao controle, estão com a contagem clinicamente normal, mas os animais dos grupos controles apresentam resultados acima dessa faixa ^{177 178 180 181}. Aumento de eritrócitos (policitemia relativa) pode ser atribuído a perda de líquidos por desidratação severa ou diarreia, além de outras condições patológicas como alterações genéticas que levam à policitemia vera (primária). Considerando que trabalhamos com ratos de uma mesma linhagem, onde não há descrição de casos de policitemia primária, a hipótese da policitemia relativa

deitaria de uma menor ingestão de água ou de uma diarreia acentuada nos grupos controles. Nenhuma das duas condições foi observada, o que nos leva a deduzir que a variabilidade eritrocitária da linhagem é o principal responsável pelas diferenças ¹⁷⁶.

O parâmetro RDW % é o parâmetro que representa quanto as células vermelhas diferem em tamanho entre si, e auxilia na diferenciação dos tipos de anemia quando outros parâmetros estão alterados (Hemoglobina, VCM, HCM) e pode indicar a presença de eritrócitos imaturos, que são liberados durante estímulo medular, por exemplo, em resposta aos mediadores inflamatórios ^{182 183}. A diferença considerada significativa para esse parâmetro foi encontrada entre os grupos 4p nas doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg comparado com o CS e entre 4p 2000 mg/kg e o CX. No entanto na análise do esfregaço sanguíneo não foi constatada diferença visual no tamanho das hemácias e de acordo com a literatura os dados encontrados para todos os grupos estão dentro da faixa de normalidade (10,6% a 13,16%), denotando que as diferenças estatísticas não são clinicamente relevantes neste caso ¹⁸³. Além disso, não houve diferença significativa dos índices hematimétricos entre os grupos tratados e os controles.

Na série branca foi observada uma forte redução na contagem global de leucócitos (referência 9,78-12,90 $10^9/L$) de todos os grupos do estudo caracterizando uma leucopenia inespecífica ^{175 177 184 185}, essa redução não foi encontrada na avaliação da toxicidade aguda do derivado DHPM, LaSOM 65, e maiores estudos na leucopoese seriam necessários para entender esse fenômeno. Como não houve diferença entre os grupos controle e os grupos tratados, consideramos que não foi influência dos derivados avaliados ⁹⁶.

O equipamento utilizado para a análise do hemograma faz somente as contagens diferenciais de linfócitos, monócitos e granulócitos. Foi realizado também um esfregaço onde as células foram avaliadas em relação à sua morfologia (série vermelha e série branca) e sua contagem relativa (série branca). Não houve diferença estatística na contagem relativa realizada manualmente, que apresentou também maior variabilidade. Considera-se na literatura, a contagem automatizada como sendo normalmente mais precisa ¹⁷⁵.

Em relação à contagem diferencial de leucócitos automatizada, houve alteração de todos os grupos em relação à contagem de monócitos. Os monócitos

se diferenciam em macrófagos nos tecidos, e têm função de fagocitose de restos celulares, bactérias, fungos e protozoários ¹⁷⁶. A porcentagem de monócitos apresentou-se acima do padrão de referência de normalidade (1,40-3,30%) para todos os grupos experimentais, incluindo controles. É possível que todos os animais tenham sido expostos a microrganismos presentes no ambiente de biotério, levando a este resultado, que não guarda relação com a exposição aos compostos testados. ¹⁷⁷.

Em relação à contagem automatizada de linfócitos, seus valores relativos considerados normais estão entre 62,2 - 90%. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12 para todos os grupos experimentais esse parâmetro apresenta-se normal ^{177 181}. Uma diferença estatisticamente significativa (em relação ao CS) no grupo 4bc 2000 mg/kg foi encontrada, mas não é clinicamente significativa. Os resultados dos compostos estudados neste trabalho diferenciam-se da linfopenia comumente causada pelos antitumorais da classe das colchicina ¹⁸⁶, por exemplo.

Sob o ponto de vista qualitativo foi realizada a avaliação do esfregaço sanguíneo com o objetivo de se observar alterações morfológicas e para confirmação da contagem de células registradas pelo método automático. Não foram encontradas alterações morfológicas nas lâminas avaliadas dos diferentes grupos experimentais.

Os granulócitos, avaliados conjuntamente na contagem automatizada, são subdivididos em basófilos, eosinófilo e neutrófilos (segmentados e bastonetes).

Na contagem automatizada, assim como na manual, não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos avaliados, e os parâmetros de contagem de granulócitos encontram-se dentro dos limites de normalidade (faixa do valor absoluto $0,16-0,62 \times 10^3 / \mu\text{L}$ e faixa do valor relativo 2,4-9,15%).

Não foram encontrados basófilos em nenhuma das distensões sanguíneas analisadas. De acordo com Charlie e Lang (2006) é considerada normal para a espécie a contagem de basófilos ser zero, ou não detectável ¹⁷⁷. São as células mais infrequentes dentre os leucócitos e as mais raras de serem encontradas em esfregaços ¹⁷⁸.

As plaquetas desempenham funções hemostáticas insubstituíveis envolvidas no mecanismo de coagulação sanguínea, sua redução pode estar atribuída à aplasia

medular, que é efeito tóxico comum dos quimioterápicos tradicionais ^{187 188 189}. Todos os animais, de todos os grupos, apresentaram valores abaixo dos valores de referência para contagem de plaquetas (785-1021 x10⁹/L). Como os animais não apresentaram outras disfunções como esplenomegalia (resultado apresentado mais a frente), que poderia gerar uma diminuição nas plaquetas ^{190 191}, atribui-se que esses valores sejam normais para os animais estudados neste trabalho.

O volume plaquetário médio é uma variável biológica que determina função e atividade das plaquetas ¹⁹². A faixa de normalidade para espécie avaliada está entre 6,2 – 9,8 fL ^{177 181 175} e todos os animais encontram-se nessa faixa, porém houve diferença significativa entre o grupo do composto 4bc nas duas doses em relação ao grupo controle salina, na qual para o último os valores estão relativamente menores. No estudo apresentado por Priya e colaboradores (2010) foi demonstrado que o DHPM etil 4-(4-heptanoil-oxifenil)-6-metil-3,4-diidropirimidin-2-ona-5-carboxilato foi capaz de inibir eficazmente a agregação de plaquetas, o que poderia causar uma diminuição em seu volume médio e o efeito clínico seria a inibição da formação de trombos, esses candidatos apresentaram promissora atividade antiplaquetária *in vitro* e *in vivo* ¹⁹³.

Tabela 12 - Valores médios dos parâmetros hematológicos (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via oral com 4p e 4bc na dose de 300 mg/kg e 2000 mg/kg e grupos controles

	Controle Salina (CS)	Controle Xarope (CX)	4p 300 mg/kg	4p 2000 mg/kg	4bc 300 mg/kg	4bc 2000 mg/kg	Valores de Referência ^{177; 179}
Eritrócitos ($\times 10^{12}/L$)	10,07 \pm 2,83	10,36 \pm 2,46	7,83 \pm 0,42 ^a	7,5 \pm 0,3 ^a	7,91 \pm 0,86	7,93 \pm 1,33	7,89 - 8,90
Hemoglobina (g/dL)	14,73 \pm 0,6	14,45 \pm 0,55	14,55 \pm 0,19	14,2 \pm 0,89	14,9 \pm 0,77	14,6 \pm 0,43	14,70 - 16,60
Hematócrito (%)	47,27 \pm 3,11	45,57 \pm 1,13	46,7 \pm 0,77	44,87 \pm 2,38	46,75 \pm 1,57	44,02 \pm 4,05	28,30 - 49,20
VCM (fL)	56,33 \pm 1,03	55,83 \pm 1,17	57,67 \pm 1,37	56,67 \pm 1,63	56,17 \pm 0,98	55,67 \pm 1,21	51,70 - 58,40
HCM (pg)	17,65 \pm 0,92	17,7 \pm 0,57	17,9 \pm 0,53	17,92 \pm 0,43	17,98 \pm 0,59	17,82 \pm 0,51	17,00 - 19,00
CHCM (g/dL)	31,3 \pm 1,29	31,73 \pm 0,83	31,13 \pm 0,63	31,63 \pm 0,43	31,92 \pm 0,87	31,92 \pm 0,5	31 - 40
RDW (%)	12,22 \pm 0,27	11,93 \pm 0,39	12,52 \pm 0,35 ^a	12,92 \pm 0,35 ^{a,b}	12,75 \pm 1,1	12,27 \pm 0,31	10,6 - 13,16
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	681,17 \pm 86,17	595,17 \pm 115,15	623,5 \pm 30,57	574,83 \pm 126,57	652,67 \pm 61,34	568 \pm 86,64	785-1021
VPM (fL)	7,47 \pm 0,23	6,98 \pm 0,37 ^a	7,07 \pm 0,28	7,12 \pm 0,42	6,87 \pm 0,2 ^a	6,88 \pm 0,34 ^a	5,5 - 8,05
Leucócitos ($10^9/L$)	2,27 \pm 0,82	2,02 \pm 0,48	3,1 \pm 0,66	2,68 \pm 1,29	1,95 \pm 1,08	2,78 \pm 1,1	9,78 - 12,90
Linfócitos (%) ($10^9/L$)	65,82 \pm 7,57 1,3 \pm 0,55	65,6 \pm 5,09 1,27 \pm 0,33	73,78 \pm 5,63 2,17 \pm 0,57	64,82 \pm 9,17 1,7 \pm 0,94	73,5 \pm 7,83 1,48 \pm 0,75	74,83 \pm 1,03 ^a 2 \pm 0,83	62,2 - 90 0,82 - 5,66
Monócitos (%) ($10^9/L$)	15,73 \pm 3,19 0,28 \pm 0,12	16,63 \pm 3,85 0,25 \pm 0,05	12,17 \pm 1,93 0,32 \pm 0,12	15,1 \pm 2,96 0,37 \pm 0,19	12,87 \pm 2,97 0,23 \pm 0,15	12,43 \pm 1,58 0,32 \pm 0,17	1,10 - 9,15 0,16 - 0,62
Granulócitos (%) ($10^9/L$)	18,12 \pm 6,93 0,33 \pm 0,14	17,8 \pm 3,14 0,47 \pm 0,12	13,83 \pm 4,52 0,52 \pm 0,12	20,08 \pm 7,92 0,62 \pm 0,28	13,13 \pm 5,51 0,4 \pm 0,25	12,73 \pm 2,3 0,47 \pm 0,12	2,4 - 9,15 0,16-0,62

*Teste Kruskal-Wallis. $p(<0,05)$.

^a Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle salina ($p<0,05$).

^b Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle xarope ($p<0,05$).

Tabela 13 - Valores médios da contagem de células (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via oral com 4p e 4bc na dose de 300 mg/kg e 2000 mg/kg e grupos controles

	Controle Salina (CS)	Controle Xarope (CX)	4p 300 mg/kg	4p 2000 mg/kg	4bc 300 mg/kg	4bc 2000 mg/kg	Valores de referência ^{177 179}
Monócito	2,67 \pm 1,63	3,67 \pm 2,42	5 \pm 1,26	3,33 \pm 0,82	3,5 \pm 1,38	2,83 \pm 0,98	1,10 - 4,10
Eosinófilo	0,33 \pm 0,52	0,33 \pm 0,52	0,83 \pm 1,60	0,33 \pm 0,52	0,67 \pm 0,52	0,33 \pm 0,52	0,06 - 0,20
Basófilo	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,0 - 0,06
Segmentados	22,67 \pm 10,13	34,5 \pm 11,11	16,33 \pm 6,38	20,83 \pm 11,03	21,67 \pm 9,47	18,67 \pm 6,25	6,2 - 26,7
Linfócitos	74,33 \pm 9,14	61,17 \pm 10,42	78,33 \pm 6,77	74,67 \pm 11,34	73,5 \pm 6,41	77 \pm 8,6	62,2 - 90

5.2.1.8. Avaliação dos parâmetros bioquímicos

A análise dos indicadores bioquímicos séricos permite uma avaliação sistêmica da interferência de xenobióticos nas funções fisiológicas de um organismo modelo ¹⁹⁴.

Foram avaliados os parâmetros bioquímicos após o término dos 14 dias de estudo após a exposição aos compostos 4p e 4bc e os controles e então analisados em comparação com os valores de referências descritos por Charlie et al., 2006, Charlie et al., 2008, Lang et al., 1993 e Lima et al., 2014.

Os parâmetros avaliados foram referentes à atividade hepática, renal, e marcadores de função metabólica (albumina, bilirrubina, cálcio, proteínas totais, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, colesterol total, HDL, LDL e glicose).

A ureia plasmática é eliminada pelos rins, por filtração glomerular e sofre reabsorção tubular. A quantidade excretada é influenciada por estas funções, além de ser, de acordo com Harmeyer & Martens (1980), alterada principalmente pelas condições dietéticas ¹⁹⁶.

A concentração de albumina sérica é afetada pelo funcionamento hepático, pela quantidade de proteína presentes na dieta, por doenças renais, lesões glomerulares e tubulares. Os resultados obtidos indicam que os animais expostos aos compostos 4p e 4bc não apresentaram hipo ou hiperalbuminemia.

A bilirrubina é produto de degradação da hemoglobina dos eritrócitos através do sistema reticuloendotelial. Em condições normais as hemácias velhas são destruídas em uma taxa constante, a hemoglobina é convertida a bilirrubina no fígado e ela é então transportada pela albumina e também secretada nos canalículos biliares para o intestino delgado. Em doenças hemolíticas a concentração sérica pode ser aumentada, bem como na perda da função hepatocelular ¹⁹⁵. No presente estudo não foram encontrados valores que indicassem desordens como hemólise bem como no exame anatomopatológico e histológico não foram encontrados sinais de lesão, necrose ou inflamação no fígado, mas na avaliação estatística foi constatada diferença significativa entre os grupos tratados com o 4p e 4bc nas duas doses e o controle salina, na qual para os grupos tratados os níveis séricos estão aumentados,

mas não clinicamente relevante já que mesmo com o aumento estão dentro da faixa de normalidade para a espécie.

Nesse contexto foi observado que os valores médios de ureia apresentados na Tabela 14 para todos os grupos os valores fora da faixa considerada como normal, apresentando valores elevados (13,2 – 27,1 mg/dL) ¹⁷⁷. Antes da eutanásia e coleta do sangue os animais foram submetidos a jejum prolongado, que estimula a proteólise endógena para utilizar os aminoácidos como fonte energética, o que pode ter causado aumento na concentração de ureia sérica ¹⁹⁷. Para melhor investigação da função renal seria necessário à avaliação conjunta com o parâmetro creatinina que não é afetada pela dieta nem pelo catabolismo proteico, diferentemente da ureia ¹⁹⁸. Mas como não houve diferença entre os controles e os grupos tratados, consideramos que as substâncias testadas não afetaram esse parâmetro bioquímico.

Não houve diferença significativa nem clínica para todos os outros parâmetros avaliados.

Tabela 14 - Valores médios dos parâmetros bioquímicos (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via oral com 4p e 4bc na dose de 300 mg/kg e 2000 mg/kg e grupos controles

Parâmetro	Controle Salina	Controle Xarope	4p 300 mg/kg	4p 2000 mg/kg	4bc 300 mg/kg	4bc 2000 mg/kg	Valores de Referência ¹⁷⁷ ¹⁷⁹
Albumina (g/dL)	3,4 \pm 0,22	3,65 \pm 0,22	3,62 \pm 0,16	3,77 \pm 0,17	3,47 \pm 0,15	3,5 \pm 0,2	3,50 – 5,30
ALT (U/L)	33,52 \pm 6,22	32,65 \pm 5,49	32,02 \pm 3,86	34,47 \pm 6,54	31,17 \pm 4,73	38,02 \pm 3,81	25,00 – 45,00
AST (U/L)	145 \pm 69,79	102,93 \pm 41,12	107,77 \pm 31,02	103,28 \pm 57,13	91,95 \pm 11,46	113,48 \pm 25,05	72,00 – 116,00
Cálcio (mg/dL)	10,43 \pm 0,39	11,03 \pm 0,51	11,36 \pm 0,89	11,57 \pm 0,7	11,14 \pm 0,58	10,94 \pm 0,28	9,10 – 11,90
Bilirrubina total (mg/dL)	0,13 \pm 0,01	0,21 \pm 0,08	0,27 \pm 0,04 ^a	0,26 \pm 0,09 ^a	0,27 \pm 0,11 ^a	0,36 \pm 0,07 ^{a,b}	0,20 – 2,00
Fosfatase alcalina (U/L)	50,78 \pm 28,29	58,97 \pm 30,51	67,15 \pm 7,29	78,27 \pm 31,26	60,72 \pm 12,35	54,28 \pm 5,11	36,00 - 131,00
Glicose (mg/dL)	134,5 \pm 74,3	103,83 \pm 38,61	129,83 \pm 20,79	118 \pm 29,37	131 \pm 18,99	141,67 \pm 12,36	120,00 – 186,00
Colesterol (mg/dL)	63,17 \pm 10,76	54,5 \pm 4,23	61,97 \pm 4,05	59,67 \pm 18,24	67,83 \pm 12,83	58,83 \pm 7,94	23,00 – 97,00
HDL (mg/dL)	39,38 \pm 5,02	35,94 \pm 10	32,72 \pm 12,23	33,23 \pm 14,12	47,74 \pm 6,66	37,23 \pm 9,75	30,60 – 59,40
LDL (mg/dL)	10,72 \pm 2,69	7,58 \pm 1,09	9,11 \pm 1,25	9,93 \pm 2,77	9,6 \pm 1,73	7,79 \pm 2,36	
Triglicerídeos (mg/dL)	52,5 \pm 22,77	55,12 \pm 32,02	53,5 \pm 18,68	122,83 \pm 105,85	81,5 \pm 47,37	70,67 \pm 16,98	27,00 – 160,00
Proteínas totais (g/dL)	6,39 \pm 0,34	7,23 \pm 1,31	6,46 \pm 0,52	6,76 \pm 0,26	6,24 \pm 0,43	6,29 \pm 0,35	6,40 – 7,50
Ureia (mg/dL)	47,28 \pm 5,23	50,55 \pm 4,54	52,37 \pm 6,79	53,7 \pm 6,72	44,62 \pm 6,16	42,4 \pm 4,93	13,20 – 27,10

*Teste Kruskal-Wallis. $p < 0,05$.

^aDiferença estatisticamente significativa em relação ao controle salina ($p < 0,05$).

^bDiferença estatisticamente significativa em relação ao controle xarope ($p < 0,05$).

5.2.2. Toxicidade intravenosa aguda – 4bc

5.2.2.1. Avaliação da toxicidade sistêmica

5.2.2.1.1. Mortalidade

Segundo o guia *Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals* (FDA, 1996) os ensaios de toxicidade aguda devem ser conduzidos pelo menos em duas vias de administração, sendo uma a via preconizada para o uso em humanos que no caso do nosso trabalho foi a oral e a outra que garanta pleno acesso à circulação sistêmica sendo escolhida a via endovenosa ¹⁹⁹.

O Guia OECD 423 indica as doses a serem administradas na avaliação da toxicidade oral aguda, mas não para a via intravenosa, dessa forma foi necessária a adaptação do protocolo baseando-se no estudo de Torres (2014) as doses administradas foram 1,0 mg/kg, 2,5 mg/kg e 5,0 mg/kg, sendo cinco animais testados por dose.

Após o tratamento agudo pela via intravenosa do composto 4bc não foi verificada a morte de nenhum dos animais pertencentes aos grupos experimentais durante os 14 dias do estudo.

Torres e colaboradores observaram que na avaliação aguda intravenosa do Diidropirimidinona LaSOM 65 não foi reportada morte de nenhum dos animais expostos, resultado semelhante ao encontrado no estudo do composto 4bc. As doses utilizadas foram as mesma do presente trabalho ⁹⁶.

5.2.2.1.2. Sinais clínicos de toxicidade

Foi observado apenas a piloereção como sinal clínico de toxicidade, que persistiu pelo período máximo de 30 minutos e de forma rara (Tabela 15), período que coincidiu com a retirada dos animais da área de manipulação para a área de alojamento no biotério. O sinal foi presente em no mínimo dois animais por grupo experimental, incluindo os controles, resultado também encontrado durante a avaliação aguda oral.

No *screening hipocrático* realizado para o LaSOM 65 (DHPM) também houve relato de piloereção quando administrada a dose de 5mg/kg do composto que perdurou 3 horas, e também outros efeitos como diarreia, letargia e dispneia ⁹⁶.

A literatura revela que a administração intravenosa pela veia caudal em ratos é um procedimento que pode gerar estresse no animal, principalmente por ser

necessária a contenção física do mesmo ^{151 200}. Dessa forma é possível que o sinal tenha sido gerado pela manipulação, pois esta técnica dispensa o uso de sedativos e anestésicos ²⁰¹.

Tabela 15 - Número de animais que apresentaram os parâmetros de toxicidade e a intensidade

Intensidade (0= ausente, 1= raro, 2= pouco, 3= moderado, 4= intenso) nos diferentes grupos do experimento de toxicidade aguda via intravenosa

		Toxicidade aguda intravenosa																								
Sinal clínico	Tempo	Controle salina					Controle veículo					4bc														
												1,0 mg/kg					2,5 mg/kg					5,0 mg/kg				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Piloereção	15min	3	1	1			1	2	2			1	2	1			2	2	1			2	2	1		
	30min	5					4	1				5					5					4	1			

5.2.2.2. Avaliação ponderal

A massa corporal dos animais foi mensurada diariamente durante os 14 dias de estudo. Não foi observada diminuição da massa corporal em nenhum dos grupos.

É possível observar que os dados do grupo 4bc dose 5,0 mg/kg apresentam distribuição assimétrica e grande dispersão, conforme Figura 28. Os dados se correlacionam positivamente com os resultados de consumo de ração, na qual o *box plot* para esse grupo apresentou mesmas características, mas de forma geral verificou-se que não houve diferença significativa estatisticamente de acordo com o teste de Teste Kruskal-Wallis. $p(<0,05)$ entre os grupos em relação ao ganho de massa corporal, apesar da distribuição dos valores entre os grupos ser bastante diversificada.

Muitos efeitos adversos são comuns à maioria dos medicamentos empregados na quimioterapia tradicional contra o câncer, por afetar as células de rápida divisão encontrados no revestimento da boca e dos intestinos, dessa forma é comum a redução do peso dos pacientes por deficiência na absorção dos nutrientes. Tal efeito sobre o peso foi reportado por Heidelberg (1958) para pirimidinas em ratos e por Bertazzoli (1985) para 4'-epidoxorubicina em cães, ratos e camundongos, avaliados como promissores fármacos antitumorais ^{202 203}. Ademais, a perda de

peso é tipicamente associada à toxicidade como descrito por Talmadge e colaboradores (2007) ¹⁵⁸.

No trabalho desenvolvido por Torres (2014) foi realizada a avaliação do ganho de massa corporal dos animais exposto ao LaSOM 65, sem verificar diferenças entre os grupos tratados e controles ⁹⁶.

A redução de massa corporal apresentada em todos os grupos na Figura 29 entre os dias 13 e 14 é consequência do jejum de 12 horas que precedeu a eutanásia dos animais.

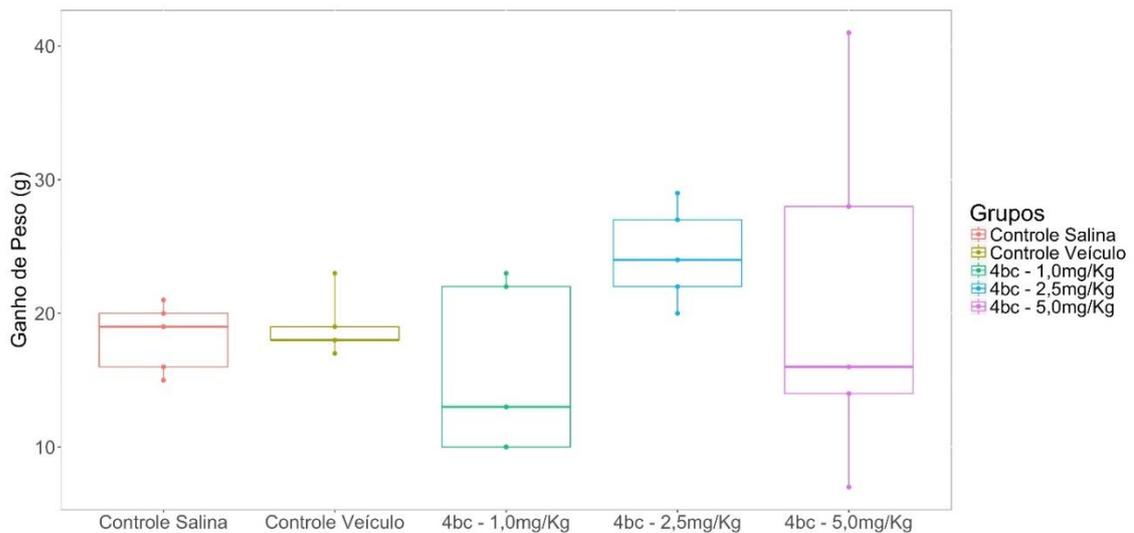


Figura 28. Ganho de peso dos ratos nos diferentes grupos experimentais (intravenoso) durante os 14 dias de ensaio, representado por *box plot* dos intervalos interquartis e mediana

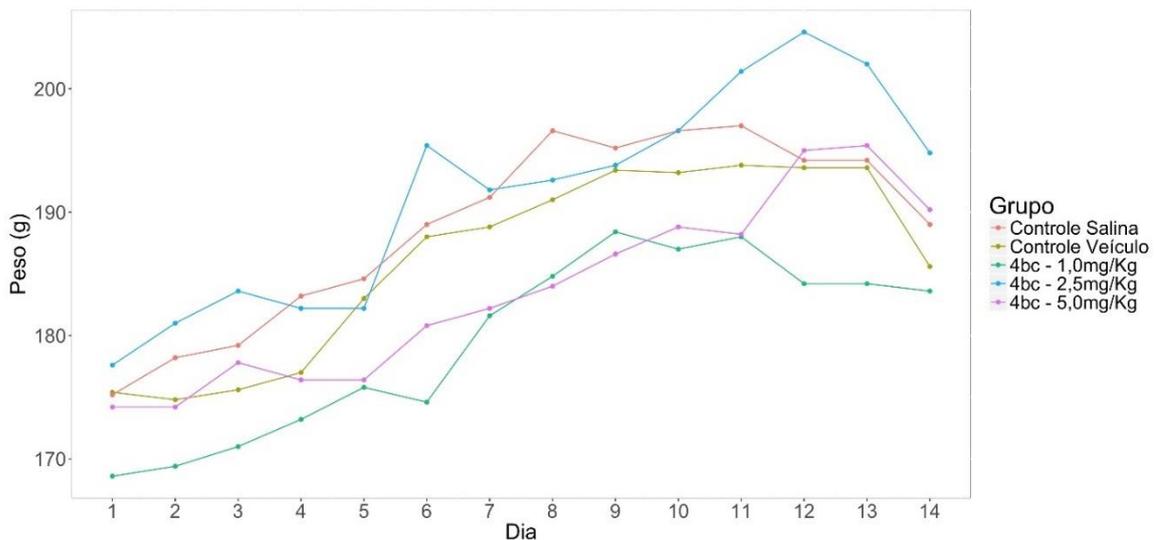


Figura 29. Evolução da massa corporal dos ratos nos diferentes grupos experimentais durante o ensaio de toxicidade intravenosa aguda

5.2.2.3. Avaliação do consumo de ração e água

As análises de controle de consumo de água e ração foram realizadas visando detectar uma possível toxicidade do composto 4bc quando administrado de forma intravenosa, sendo os dados apresentados nos gráficos plotados com o somatório dos consumos dos cinco animais pertencentes ao grupo.

O consumo de ração dos animais dos grupos experimentais ao longo do estudo foi similar ao dos grupos controles, conforme Figura 30.

A incidência de diminuição de consumo energético em pacientes durante tratamento quimioterápico varia de 40 a 80%, interferindo na massa e na qualidade de vida destas pessoas ²⁰⁴. Diante disso o fato do tratamento agudo com o 4bc não ter gerado esse efeito é um bom indicativo para a adesão da terapia por parte dos usuários. No entanto é preciso submeter os animais a um ensaio de longo prazo para confirmar se os resultados positivos irão persistir.

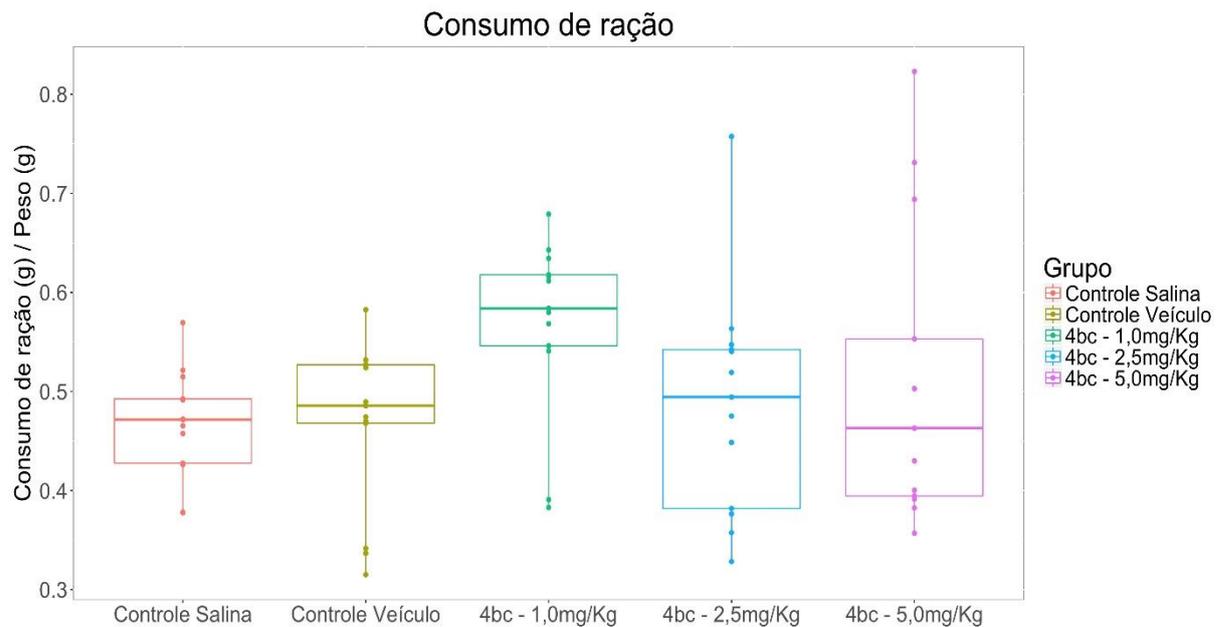


Figura 30. Consumo de ração por peso corporal dos cinco animais pertencentes aos grupos experimentais (intravenoso) durante os 14 dias de ensaio, representado por *box plot* dos intervalos interquartis e mediana

A evolução do consumo de ração apresentada na Figura 31 indica um padrão de variação aleatorizado, mas permanecendo dentro dos limites de normalidade do que se espera do padrão de alimentação da espécie, a análise também foi realizada com o somatório do consumo dos cinco animais pertencentes aos grupos.

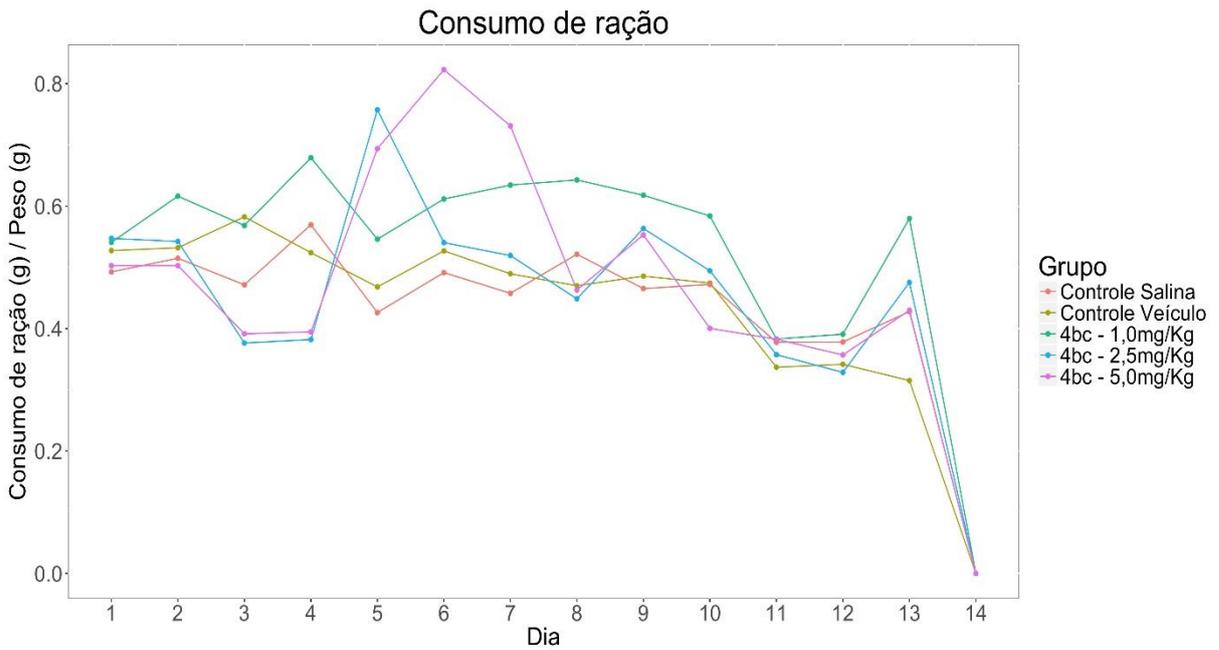


Figura 31. Evolução do consumo de ração dos diferentes grupos experimentais ao longo de 14 dias (intravenoso)

A administração intravenosa do composto 4bc nas doses 1,0 mg/kg, 2,5 mg/kg e 5,0 mg/kg não causou redução no consumo hídrico dos animais tratados em relação aos controles, e a ingestão apresentou dispersão significativa, conforme Figura 32.

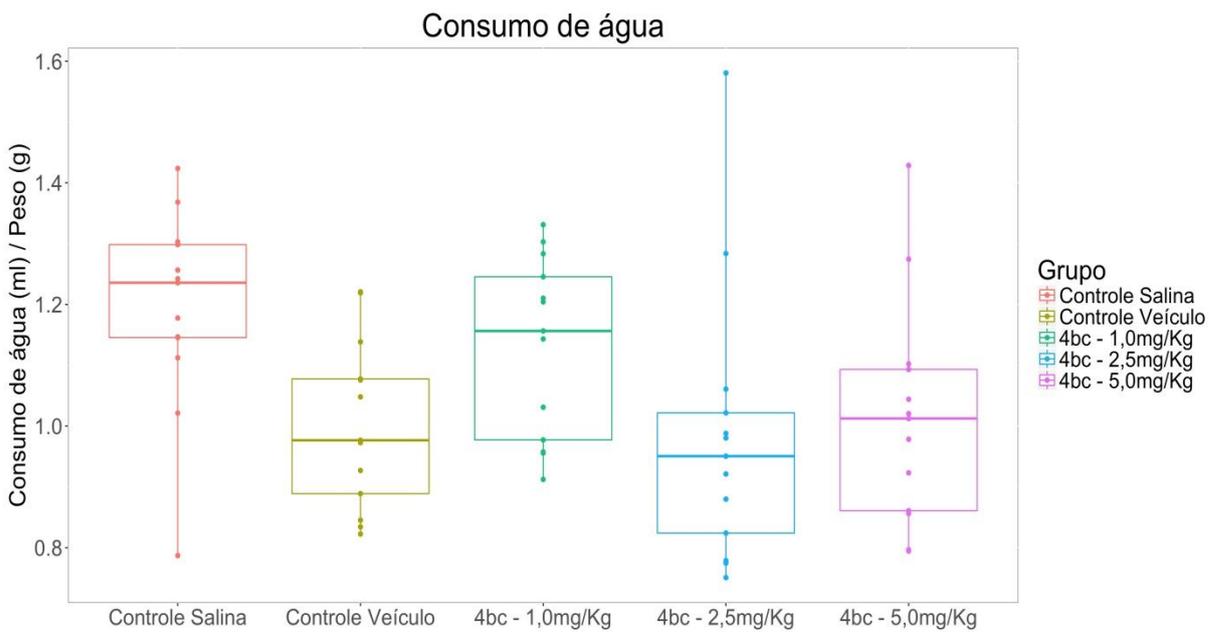


Figura 32. Consumo de água por peso corporal dos cinco animais pertencentes aos grupos experimentais (intravenoso) durante os 14 dias de ensaio, representado por *box plot* dos intervalos interquartis e mediana

Os resultados também foram expressos no gráfico de linhas na qual é possível observar que entre a evolução do consumo ao longo dos 14 dias de experimento, observando-se oscilações dentro do perfil de normalidade, conforme Figura 33.

São escassos os estudos de toxicidade realizados *in vivo* para derivados DHPM e o trabalho desenvolvido por Torres (2014) não foi realizada a avaliação do consumo de ração e água.

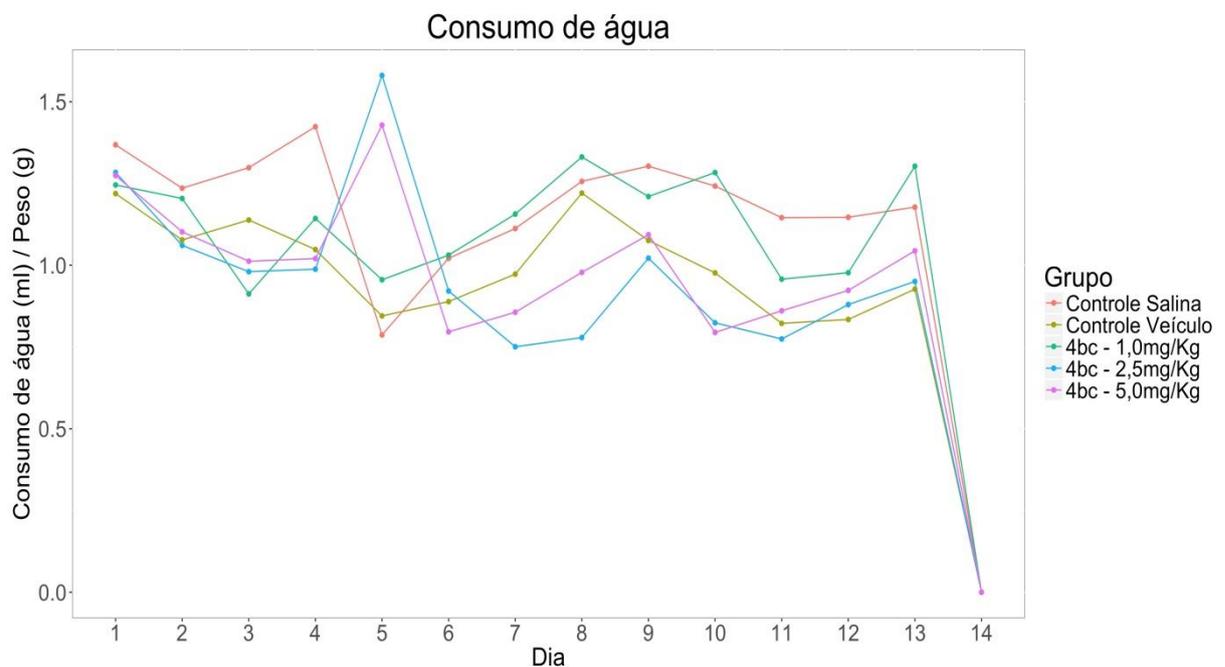


Figura 33. Evolução do consumo de água dos diferentes grupos experimentais ao longo de 14 dias (intravenoso)

5.2.2.4. Avaliação anatomopatológica

De forma semelhante ao estudo de toxicidade oral aguda não foi observada alteração macroscópica dos órgãos (cérebro, timo, tireoide, coração, pulmão, fígado, rins, baço, pâncreas, útero, ovário, estômago, intestino grosso e delgado) após administração intravenosa do 4bc nas doses 1,0 mg/kg, 2,5 mg/kg e 5,0 mg/kg, bem como nos animais do controle que receberam o salina e o veículo. Esses resultados indicam que a via de administração intravenosa não gerou mudança no perfil de toxicidade sobre os órgãos analisados, em comparação com a via oral.

Resultado semelhante foi apresentado por Torres et al., na qual para o derivado diidropirimidinona LaSOM 65, estrutura química análoga ao 4bc, também

não foram reportadas lesões graves nos tecidos expostos a esse derivado pela via intravenosa ⁹⁶.

Vale ressaltar que para melhor investigação sobre os efeitos hepáticos, renais, pancreáticos, endócrinos, gastrointestinais e cerebrais da exposição intravenosa do composto 4bc se faz necessário a análise histológica dos tecidos, que não foi abarcada nesse estudo, e está em desenvolvimento junto ao laboratório de patologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

5.2.2.5. Avaliação dos índices dos órgãos

Foram avaliadas as massas relativas do cérebro, tireóide, coração, timo, fígado pulmão (direito e esquerdo), rins (direito e esquerdo), estômago, útero e ovário e baço. Os índices estão expressos na Tabela 16.

Nesse estudo foi observada diferença significativa no peso relativo do fígado. A média do índice do grupo controle veículo apresentou-se maior que o 4bc 2,5 mg/kg e o grupo 4bc 1mg/kg foi maior que o de dose 2,5 mg/kg e 5,0 mg/kg. Esse resultado não demonstra correlação entre a exposição ao 4bc, bem como com a dose administrada. A perfusão, assim como ocorreu nos grupos tratados com o composto por via oral, é a provável responsável por essa diferença.

Após o procedimento da perfusão foi observado visualmente o aumento do tamanho do pulmão esquerdo em dois animais do grupo salina. Na análise estatística a diferença significativa foi entre o grupo CS e o 4bc 2,5 mg/kg e entre CS e o 5,0 mg/kg, o que ser explicado pela interferência do processo de fixação.

No estudo de Torres (2014) com exceção do baço, nenhuma diferença biológica foi observada nos pesos dos órgãos em qualquer dos grupos de tratamento quando comparado aos grupos controle (solução salina e veículo).

O aumento significativo no peso relativo do baço observado no estudo do LaSOM 65 foi encontrada para os grupos tratados e o controle veículo, mas não no grupo salino, e autor atribui o efeito aos constituintes do veículo ⁹⁶, esse resultado era esperado também no nosso tendo em vista que o veículo utilizado para nossa avaliação foi o mesmo, no entanto esse aumento não foi reproduzido.

Tabela 16 – Valores médios dos índices dos órgãos (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via intravenosa com 4bc na dose de 1,0 mg/kg, 2,50 mg/kg e 5,0 mg/kg e grupos controles

	Controle Salina (CS)	Controle Veículo (CV)	4bc 1,0 mg/kg	4bc 2,5 mg/kg	4bc 5,0 mg/kg
Cérebro	0,98 \pm 0,08	0,96 \pm 0,24	1,09 \pm 0,04	1,05 \pm 0,04	1 \pm 0,1
Tireóide	0,1 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02	0,12 \pm 0,03	0,1 \pm 0,03
Coração	0,4 \pm 0,05	0,43 \pm 0,07	0,41 \pm 0,05	0,44 \pm 0,08	0,39 \pm 0,06
Timo	0,33 \pm 0,07	0,28 \pm 0,07	0,35 \pm 0,05	0,42 \pm 0,07	0,34 \pm 0,05
Fígado	4,24 \pm 0,42	4,15 \pm 0,52	3,85 \pm 0,56 ^{c,d}	3,64 \pm 0,18 ^b	3,32 \pm 0,47
Pulmão Direito	0,32 \pm 0,14	0,36 \pm 0,12	0,21 \pm 0,03	0,32 \pm 0,08	0,26 \pm 0,08
Pulmão esquerdo	0,6 \pm 0,13	0,56 \pm 0,12	0,4 \pm 0,06	0,48 \pm 0,07 ^a	0,42 \pm 0,08 ^a
Rim direito	0,41 \pm 0,05	0,42 \pm 0,06	0,41 \pm 0,03	0,44 \pm 0,05	0,35 \pm 0,09
Rim esquerdo	0,42 \pm 0,05	0,41 \pm 0,05	0,4 \pm 0,05	0,39 \pm 0,03	0,38 \pm 0,03
Estômago	0,78 \pm 0,07	0,79 \pm 0,06	0,88 \pm 0,25	0,8 \pm 0,13	0,71 \pm 0,13
Útero e ovário	0,35 \pm 0,03	0,48 \pm 0,12	0,46 \pm 0,14	0,44 \pm 0,07	0,39 \pm 0,14
Baço	0,3 \pm 0,04	0,31 \pm 0,05	0,3 \pm 0,03	0,31 \pm 0,03	0,26 \pm 0,07

*Teste Kruskal-Wallis, $p(<0,05)$

^aDiferença estatisticamente significativa em relação ao controle salina ($p<0,05$).

^bDiferença estatisticamente significativa em relação ao controle veículo ($p<0,05$).

^cDiferença estatisticamente significativa em relação ao 4bc 2,5 mg/kg ($p<0,05$).

^dDiferença estatisticamente significativa em relação ao 4bc 5,0 mg/kg ($p<0,05$).

5.2.2.6. Avaliação dos parâmetros hematológicos

O hematócrito representa a porcentagem em volume de células vermelhas no sangue e de acordo com a literatura todos os grupos experimentais estão com esse índice normal, porém foram encontradas diferenças significativas entre grupos, inclusive entre o grupo controle salina e veículo. Diante dos resultados não é conclusivo indicar efeito tóxico do 4bc sobre as células vermelhas, já que as diferenças foram aleatórias e possivelmente surgiram em virtude da variabilidade interindividual dos animais testados ^{205; 206}.

O índice que indica a variação do volume das hemácias (RDW) revelou a presença de leve anisocitose (diferença estatística e fora dos parâmetros de normalidade) nos grupos tratados, em relação aos controles.

A interpretação clínica do RDW é realizada em conjunto com o VCM, na qual os níveis aumentados de RDW associado a nível normal de VCM são indicativos de deficiência de ferro, vitamina B12, hemorragias recentes ou síndromes

mielodisplásicas ^{197 176}. Lowenthal e colaboradores 1997 indicam a quimioterapia tradicional como um fator predisponente para surgimento de síndromes mielodisplásicas e conseqüentemente de aumento do RDW ²⁰⁷.

Os resultados referentes ao volume corpuscular médio dos grupos testados indicaram que as hemácias estão normocíticas (53,50 - 58,50 fL), porém foi encontrado diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e os grupos controles, de tal forma que consideramos como clinicamente irrelevante ¹⁷⁷.

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) é avaliada em associação ao VCM para auxiliar nos diagnósticos das anemias, os resultados encontrados para os animais tratados indicaram que a exposição não gerou alterações na normalidade deste parâmetro, apesar de encontrar-se com diferenças estatisticamente significativas.

A contagem de plaquetas, assim como observado na administração oral, foi reduzida em todos os grupos e também não foi reportada esplenomegalia. Desta forma entende-se como parâmetro normal da linhagem.

O VPM reportou-se dentro da normalidade para todos os grupos, porém foi encontrado um aumento estatisticamente significativo desse parâmetro, em relação ao CS e ao CX, para os animais expostos ao 4bc na dose de 5mg/kg. Resultado conflitante com o descrito por Priya e com o obtido na administração oral do composto 4bc, na qual o grupo tratado com a maior dose causou uma redução no volume plaquetário ¹⁹³.

De forma semelhante ao resultado encontrado na contagem global de leucócitos no teste de toxicidade oral aguda, todos os grupos (controles e testes) apresentaram valores abaixo da referência de normalidade, mas sem diferenças estatísticas entre si.

A porcentagem de monócitos apresentou-se acima do padrão de referência de normalidade (1,40-3,30%) para todos os grupos experimentais, ratificando a hipótese que os animais foram expostos a algum microrganismo ambiental. ¹⁷⁷.

Outra hipótese para esse aumento foi descrita por Powles-Glover e colaboradores que atribuíram o aumento dos níveis de monócitos e neutrófilos ao trauma físico gerado pela punção ou pela administração de compostos através da veia caudal, na qual em seu trabalho ele relatou que ratos machos apresentavam mais lesões por sua cauda ser mais escamosa e a porcentagem de monócitos para esse sexo conseqüentemente foi maior ²⁰⁸, dessa forma a punção também poderia

ter contribuído para o aumento dos níveis de monócitos, hipótese a se comprovar ainda, considerando que no presente trabalho obtivemos aumento de monócitos tanto na administração oral quanto pela via intravenosa.

A contagem automatizada de granulócitos apresentou diferenças estatísticas entre grupos tratados e controles, mas dentro de parâmetros de normalidade.^{197 183.}

De forma semelhante aos resultados obtidos na administração oral do composto 4bc a contagem de basófilos no esfregaço sanguíneo também foi não detectável na administração intravenosa, resultado esperado e bem descrito pela literatura^{177 178 197.}

As contagens diferenciais relativas de leucócitos realizadas pelo esfregaço sanguíneo também não demonstraram diferenças ou parâmetros fora dos valores de referência, conforme Tabela 17.

Tabela 17 - Valores médios da contagem de células (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via intravenosa com 4bc na dose de 1,0 mg/kg, 2,50 mg/kg e 5,0 mg/kg e grupos controles

Tipo celular ($\times 10^{12}/L$)	Controle Salina (CS)	Controle Veículo (CV)	4bc 1,0 mg/kg	4bc 2,5 mg/kg	4bc 5,0 mg/kg	Valores de Referência
Monócito	2 \pm 1,41	5,2 \pm 2,59	1,8 \pm 0,84	2,8 \pm 1,92	2,6 \pm 1,52	1,10 - 4,10
Basófilo	0	0	0	0	0	0,0 - 0,06
Eosinófilo	0	0	0,2 \pm 0,45	0,6 \pm 0,89	0,2 \pm 0,45	0,06 - 0,20
Segmentados	12,2 \pm 8,76	27,8 \pm 14,22	12,8 \pm 5,97	13,2 \pm 4,66	14,2 \pm 5,54	6,2 - 26,7
Linfócitos	85,8 \pm 9,58	67 \pm 13,62	85,2 \pm 6,46	82 \pm 3,74	82,4 \pm 6,84	62,2 - 90

Tabela 18 - Valores médios dos parâmetros hematológicos (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via intravenosa com 4bc na dose de 1,0 mg/kg, 2,50 mg/kg e 5,0 mg/kg

Parâmetro	Controle Salina	Controle Veículo	4bc 1,0 mg/kg	4bc 2,5 mg/kg	4bc 5,0 mg/kg	Valores de Referência 177-179
Eritrócitos ($10^{12}/L$)	7,86 \pm 0,51	7,45 \pm 0,52	7,21 \pm 2,46	7,45 \pm 0,52	6,28 \pm 1,46	7,89 - 8,90
Hemoglobina (g/dL)	15,08 \pm 1,51	15,08 \pm 1,04	14,86 \pm 1,18	13,6 \pm 1,2	13,02 \pm 1,54	14,70 - 16,60
Hematócrito (%)	45,5 \pm 5,17	46,28 \pm 2,76 ^a	48,3 \pm 3,41 ^a	42,1 \pm 3,03 ^c	38,62 \pm 4,94 ^{b,c}	28,30 - 49,20
VCM (fL)	52,6 \pm 1,52	51,4 \pm 1,14	56,4 \pm 1,52 ^{a,b}	55,6 \pm 1,52 ^{a,b}	52,8 \pm 1,92 ^{a,b}	51,70 - 58,40
HCM (pg)	17,58 \pm 0,49	16,7 \pm 0,4	17,24 \pm 0,54	17,98 \pm 0,64	17,88 \pm 0,3	17,00 - 19,00
CHCM (g/dL)	33,28 \pm 0,79	32,58 \pm 0,73 ^a	30,78 \pm 0,57 ^{a,b}	32,26 \pm 0,71 ^a	33,74 \pm 0,79 ^a	31 - 40
RDW%	13,10 \pm 0,62	12,8 \pm 0,29	15 \pm 0,6 ^{a,b}	14,92 \pm 0,29 ^{a,b}	13,86 \pm 0,92 ^{a,b,c,d}	10,6 - 13,16
Plaquetas ($10^9/L$)	377,2 \pm 301,16	491 \pm 60,23	477,8 \pm 197,94	504 \pm 116,28	426,4 \pm 248,98	781-1021
VPM (fL)	7,48 \pm 0,55	6,84 \pm 0,46	7,96 \pm 0,82	7,82 \pm 0,55	8,26 \pm 0,54 ^{a,b,c}	5,5 - 8,05
Leucócitos ($10^9/L$)	2,76 \pm 1	3,6 \pm 1,08	4,2 \pm 2,67	2,02 \pm 1,08	2,18 \pm 1,68	9,78 - 12,90
Linfócitos (%)	83,9 \pm 4,34	63,08 \pm 14,14	80,66 \pm 3,36	81,76 \pm 3,24	80,26 \pm 9,51	62,2 - 90
($10^9/L$)	2,26 \pm 0,89	2,18 \pm 0,77	3,34 \pm 2,24	1,58 \pm 0,81	1,64 \pm 0,91	0,82 - 5,66
Monócitos (%)	10 \pm 1,8	13,74 \pm 4,52	9,84 \pm 1,9	9,3 \pm 3,75	10,7 \pm 3,8	1,10 - 9,15
($10^9/L$)	0,24 \pm 0,11	0,44 \pm 0,27	0,38 \pm 0,23	0,18 \pm 0,13	0,2 \pm 0,28	0,16 - 0,62
Granulócitos (%)	6,1 \pm 2,95	23,18 \pm 10,92	9,4 \pm 1,82	7,54 \pm 2,69	8,44 \pm 6,59	2,4 - 9,15
($10^9/L$)	0,24 \pm 0,11	0,98 \pm 0,53	0,48 \pm 0,24	0,26 \pm 0,15 ^b	0,4 \pm 0,45 ^{b,c,d}	0,16-0,62

*Teste Kruskal-Wallis, $p < 0,05$. VCM (volume corpuscular médio); HCM (hemoglobina corpuscular média); CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média); VPM (volume plaquetário médio). ^a Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle salina ($p < 0,05$). ^b Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle veículo ($p < 0,05$). ^c Diferença estatisticamente significativa em relação ao 4bc 1,0 mg/kg ($p < 0,05$). ^d Diferença estatisticamente significativa em relação ao 4bc 2,5 mg/kg ($p < 0,05$).

5.2.2.7. Avaliação dos parâmetros bioquímicos

O exame bioquímico realizado da amostra de plasma obtido após o tratamento agudo intravenoso do composto 4bc em três diferentes doses é uma ferramenta importante para avaliar o funcionamento hepático, renal e metabólico dos animais submetidos a essa exposição e assim indica possíveis efeitos tóxicos.

As aminotransferases AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) são enzimas associada às células parenquimais do fígado que catalisam a transferência reversível dos grupos amino dos aminoácidos para o α -cetoglutarato, formando cetoácido e ácido glutâmico, atuando assim na síntese e degradação dos aminoácidos ²⁰⁹.

De acordo com Kaneko et al (2008) lesões, destruição, necrose das células hepáticas ou alterações na permeabilidade da membrana celular alteram os níveis séricos destas enzimas ¹⁹⁸.

Para a interpretação clínica de doenças hepáticas a relação entre as enzimas é importante, pois o AST encontra-se internamente nas mitocôndrias e a ALT no citoplasma, em casos de lesão leve prevalece ALT, já nas graves a enzima mitocondrial predomina ^{209 210}.

Na avaliação da toxicidade aguda do composto 4bc quando administrado pela via intravenosa foi verificado que para todos os grupos houve uma elevação dos níveis séricos da AST, fazendo com que os níveis encontrados estivessem fora da faixa de normalidade (72-116 U/L), mas não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos. Resultado semelhante foi relatado por Torres na avaliação aguda do composto LaSOM 65, na qual ratos machos foram exposto de forma aguda e também pela via intravenosa nas mesmas doses do nosso estudo e os resultados para AST apresentaram elevação em todos os grupos ⁹⁶.

Em continuidade com a investigação sobre possíveis efeitos hepatotóxicos foi avaliada a ALT que no grupo controle salina apresentou-se em maiores níveis que os animais tratados, resultado não esperado. No entanto de acordo com a literatura essa adversidade pode estar associada ao fato da ALT declinar mais rapidamente por ter sido primeiramente lançadas na corrente sanguínea, permanecendo, portanto, os valores de AST por mais tempo elevados ²¹¹.

Outra enzima utilizada no acompanhamento de distúrbios hepáticos é a fosfatase alcalina, apesar de não ser exclusivamente encontrada nesse órgão, ela reflete danos nas células dos ductos biliares. Os resultados estão dentro da

normalidade (65-117 U/L), exceto para o grupo controle salina que está um pouco acima, gerando diferenças estatísticas em comparação com os grupos tratados, mas que não demonstram relevância clínica, já que os grupos tratados encontram-se dentro dos parâmetros de normalidade ^{177 209}.

Na avaliação da função renal os resultados dos valores séricos de ureia mostraram-se semelhante entre a exposição oral e exposição intravenosa, no qual os dados estão acima da faixa de normalidade (13,2 – 27,1 mg/dL) para todos os grupos experimentais ¹⁷⁷. Diante desse resultado não se pode atribuir o aumento ao tratamento, visto que ele também estava presente nos grupos controles.

O parâmetro triglicérides apresentou-se dentro da faixa de normalidade (27 – 160mg/dL) para todos os grupos. Foram reportadas diferenças significativas entre os grupos 4bc dose 2,5 com o controle salina e o veículo, assim como 4bc dose 5,0 mg/kg com os controles, isso porque os valores nos tratados apresentam-se menores.

Blackburn e colaboradores estudaram uma série de 4-aryl-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas que foram identificadas como inibidoras de uma proteína (FATP4), que pertence à família de proteínas de transporte de ácido graxo, essa proteína medeia o transporte de ácidos graxos do intestino para enterócitos tanto *in vitro* como *in vivo*, e o seu bloqueio gera o acúmulo de ácidos graxos livres em vez de triglicérides ⁶³. É possível que assim como os derivados aril descritos por Blackburn o composto 4bc cause algum bloqueio em FATP4, sendo uma justificativa plausível para a redução sérica de triglicérides encontrada após administração intravenosa do composto 4bc.

A administração intravenosa do composto 4bc abaixou de forma clinicamente e estatisticamente significativa a taxa de glicose mostrou-se diferente apenas nos grupos controles. De acordo com Charles et al., (2006) valores entre 113 e 186 mg/dL são considerados normais para o modelo animal utilizado nesse estudo, no entanto os animais tratados com 4bc nas três doses pela administração intravenosa apresentam valores abaixo dos esperados em relação aos dados observados na literatura. Em 2014 Dhumaskar e colaboradores descreveram a atividade antidiabética de derivados DHPMs, na qual a inibição da α -amilase foi testada *in vitro* e o derivado 3,4-diidropirimidin-2-(1H)-thione (1k) apresentou atividade a 300ug/Kg ⁶⁴. Os DHPMs são conhecidos pelo seu amplo espectro de atividade

biológica, e os resultados podem indicar que 4bc apresenta alguma ação sobre a enzima α -amilase, além da Eg5⁹.

Os outros parâmetros avaliados não foram clinicamente relevantes, mesmo que apresentando diferenças estatísticas entre os grupos.

Tabela 19- Valores médios dos parâmetros bioquímicos (\pm desvio padrão) em ratos fêmeas tratadas por via intravenosa com 4bc na dose de 1,0 mg/kg, 2,50 mg/kg e 5,0 mg/kg e grupos controles

	Controle salina	Controle suspensão	4bc 1,0 mg/kg	4bc 2,5 mg/kg	4bc 5,0 mg/kg	Valores de Referência 177 179
Albumina (g/dL)	3,78 \pm 0,21	3,85 \pm 0,12	3,45 \pm 0,39	3,61 \pm 0,22	3,63 \pm 0,1	3,50 – 5,30
ALT (U/L)	46,06 \pm 8,22	43,98 \pm 4,82	40,78 \pm 27,86 ^{d, e}	33,84 \pm 9,52	24,68 \pm 7,15	25,00 – 45,00
AST (U/L)	168,16 \pm 57,85	164,04 \pm 52,72	160,7 \pm 62,83	195,48 \pm 84,57	145,66 \pm 34,65	72,00 – 116,00
Cálcio (mg/dL)	11,84 \pm 0,46	11,47 \pm 1,07	10,81 \pm 0,46	10,72 \pm 0,39 ^{a,b,c}	11,18 \pm 0,3	9,10 – 11,90
Colesterol (mg/dL)	73,8 \pm 16,35	64 \pm 7,42	64 \pm 10,72	65,8 \pm 8,47	67,4 \pm 11,06	23,00 – 97,00
Bilirrubina total (mg/dL)	0,39 \pm 0,05	0,4 \pm 0,06	0,31 \pm 0,1	0,30 \pm 0,05	0,36 \pm 0,03	0,20 – 2,00
Fosfatase alcalina (U/L)	141,56 \pm 17,25	92,5 \pm 30,71	78,84 \pm 19,89	69,24 \pm 21,42 ^{a,b,c,e}	89,06 \pm 22,83	36,00 – 131,00
Glicose (mg/dL)	117 \pm 15,1	150 \pm 21,02	57,6 \pm 53,54	50,4 \pm 12,46	78,2 \pm 8,53	120,00 – 186,00
HDL (mg/dL)	42,14 \pm 16,75	35,22 \pm 12,11	37,81 \pm 7,93	36,25 \pm 11,5	36,82 \pm 11,25	30,60 – 59,40
LDL (mg/dL)	9,89 \pm 5,25	6,94 \pm 1,32	9,06 \pm 4,18	11,32 \pm 7,05	8,69 \pm 3,97	-
Triglicerídeos (mg/dL)	109,4 \pm 31,89	127,4 \pm 41,33	58,6 \pm 30,76	70,8 \pm 15,16 ^{a,b}	58,8 \pm 29,26 ^{a,b,c}	27,00 – 160,00
Proteínas totais (g/dL)	6,4 \pm 0,61	6,57 \pm 0,34	6,25 \pm 0,54	6,13 \pm 0,39	6,1 \pm 0,37	6,40 – 7,50
Ureia (mg/dL)	48,2 \pm 4,17	46,44 \pm 5,61 ^a	56,9 \pm 4,22 ^a	46,84 \pm 4,67 ^a	41,84 \pm 4,82 ^a	13,20 – 27,10

*Teste Kruskal-Wallis, $p(<0,05)$ ^aDiferença estatisticamente significativa em relação ao controle salina ($p<0,05$).^bDiferença estatisticamente significativa em relação ao controle veículo ($p<0,05$).^cDiferença estatisticamente significativa em relação ao 4bc 1,0 mg/kg ($p<0,05$). ^d Diferença estatisticamente significativa em relação ao 4bc 2,5 mg/kg ($p<0,05$). ^eDiferença estatisticamente significativa em relação ao 4bc 5,0 mg/kg ($p<0,05$).

5.3. AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE

5.3.1. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foram realizadas três curvas independentes, em solvente, com as respectivas concentrações escolhidas para cada composto e a partir das médias das áreas dos picos das três curvas de cada composto, foi determinada a equação da reta utilizando o software Microsoft Excel® 2010.

Dessa forma a linearidade na faixa de trabalho para o 4p (4 µg/mL – 500µg/mL) e para o 4bc (0,25 – 100ug/mL) refletiu coeficientes de correlação dentro do exigido pela RE 899/2003, acima de 0,99, indicando proporcionalidade entre as áreas dos picos e as concentrações dos compostos.

A curva analítica do composto 4p e seu cromatograma estão registrados na Figura 34 e 35 respectivamente, já a curva e o cromatograma do 4bc estão consignados na Figura 36 e 37 respectivamente.

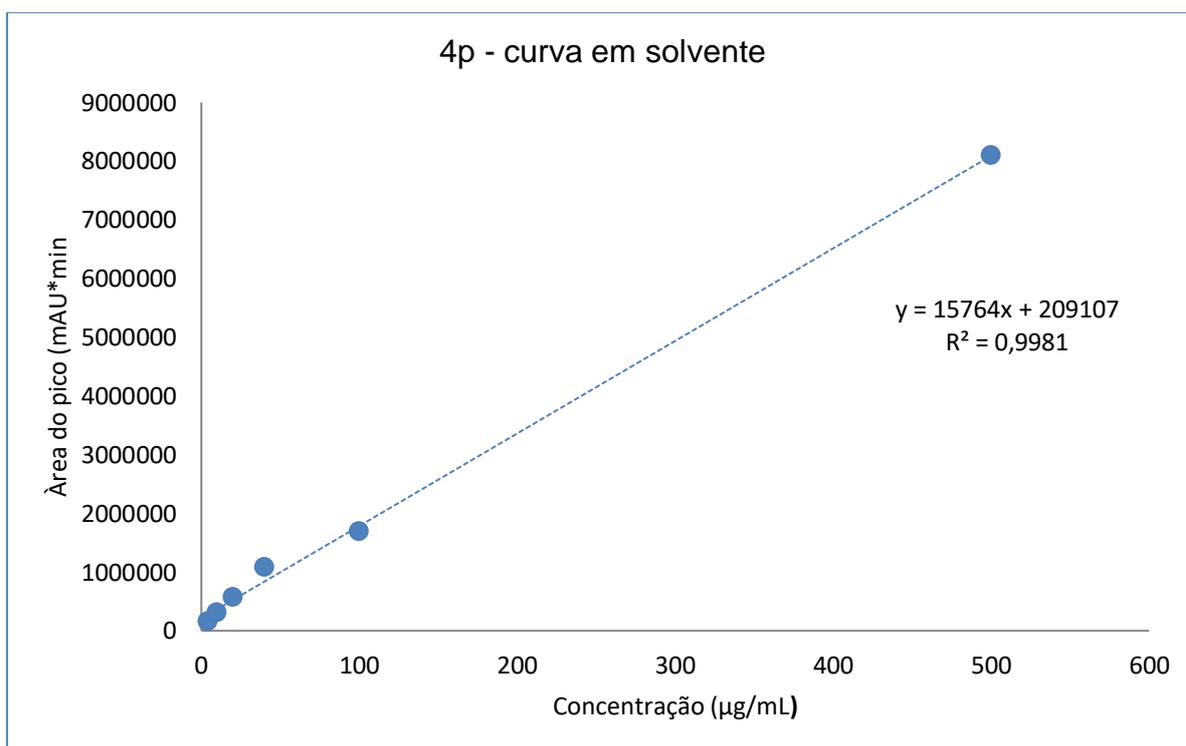


Figura 34. Curva analítica do 4p realizada em solvente.

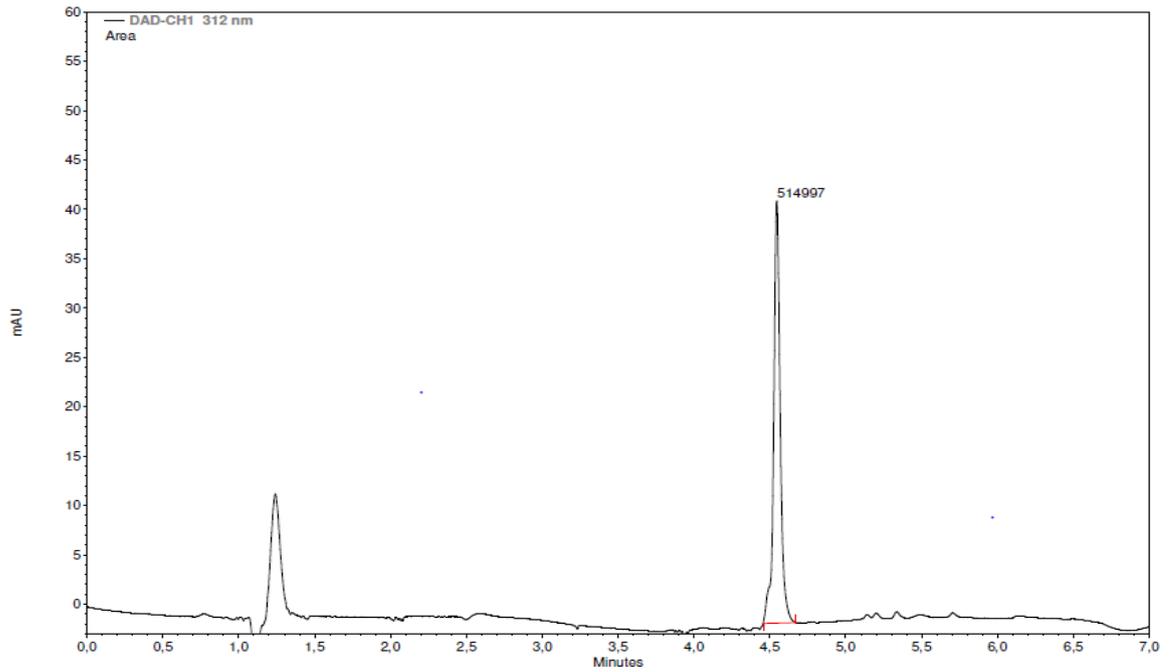


Figura 35. Perfil Cromatográfico do 4p (20ug/mL) a 312 nm

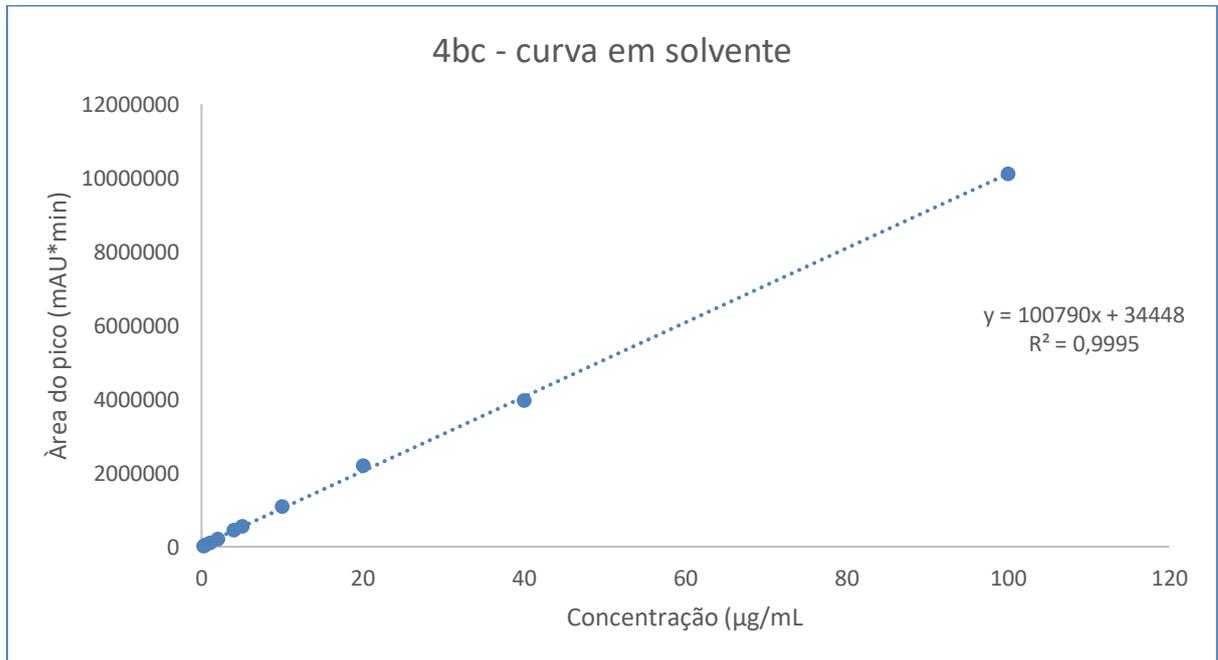


Figura 36. Curva analítica do 4bc realizada em solvente.

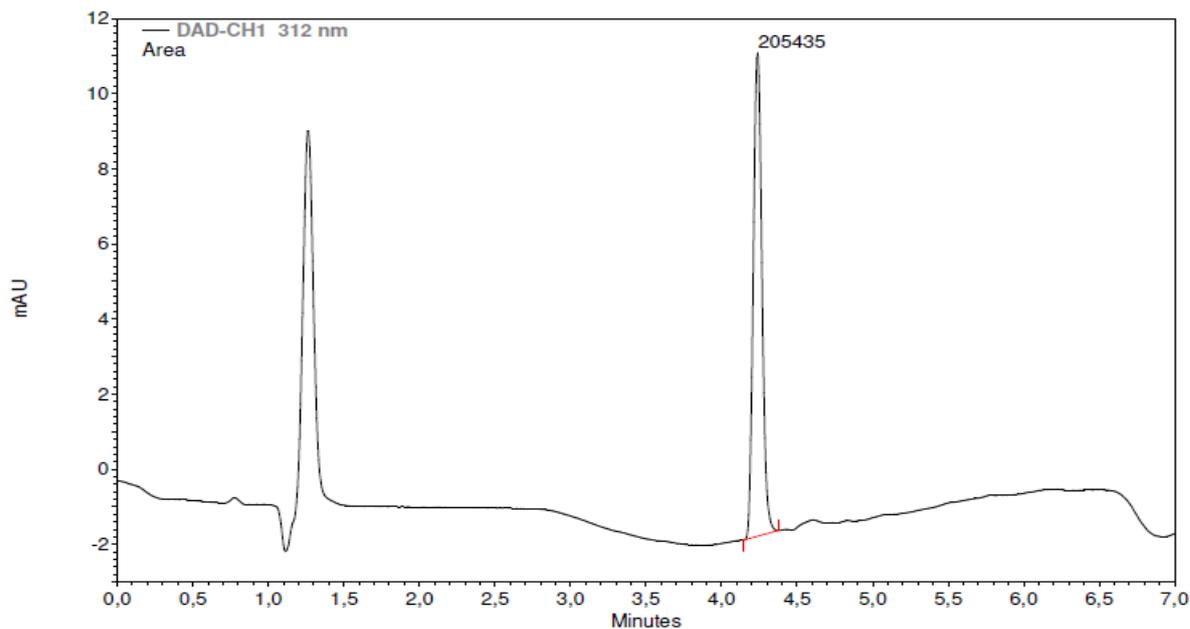


Figura 37. Perfil Cromatográfico do 4bc (4ug/mL) a 312 nm

O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva extraída do plasma, após adição dos padrões, as concentrações avaliadas foram: 1,0 µg/mL, 2,0 µg/mL, 4,0 µg/mL, 8,0 µg/mL, 20,0 µg/mL.

Para o 4p o método não foi capaz de extrair o composto (Figura 38), sendo necessários mais estudos para a avaliação da biodisponibilidade desse derivado.

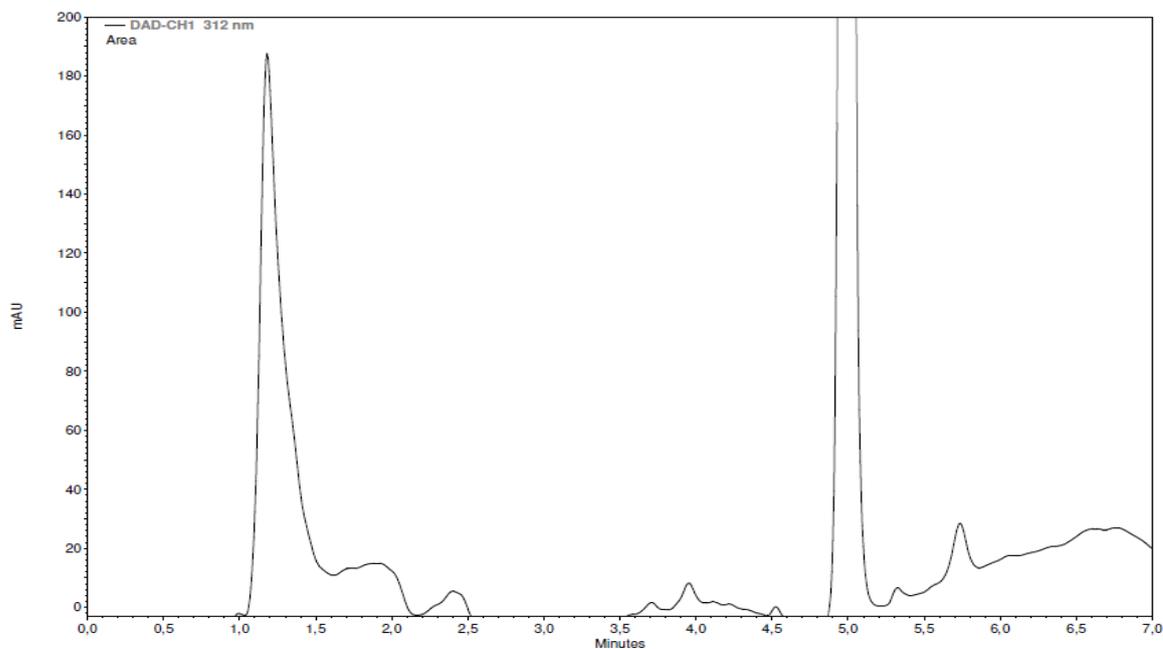


Figura 38. Perfil Cromatográfico do 4p após método de extração a 312 nm, realizado por técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para o composto 4bc o método de extração foi eficaz e conseguimos identificá-lo (Figura 39).

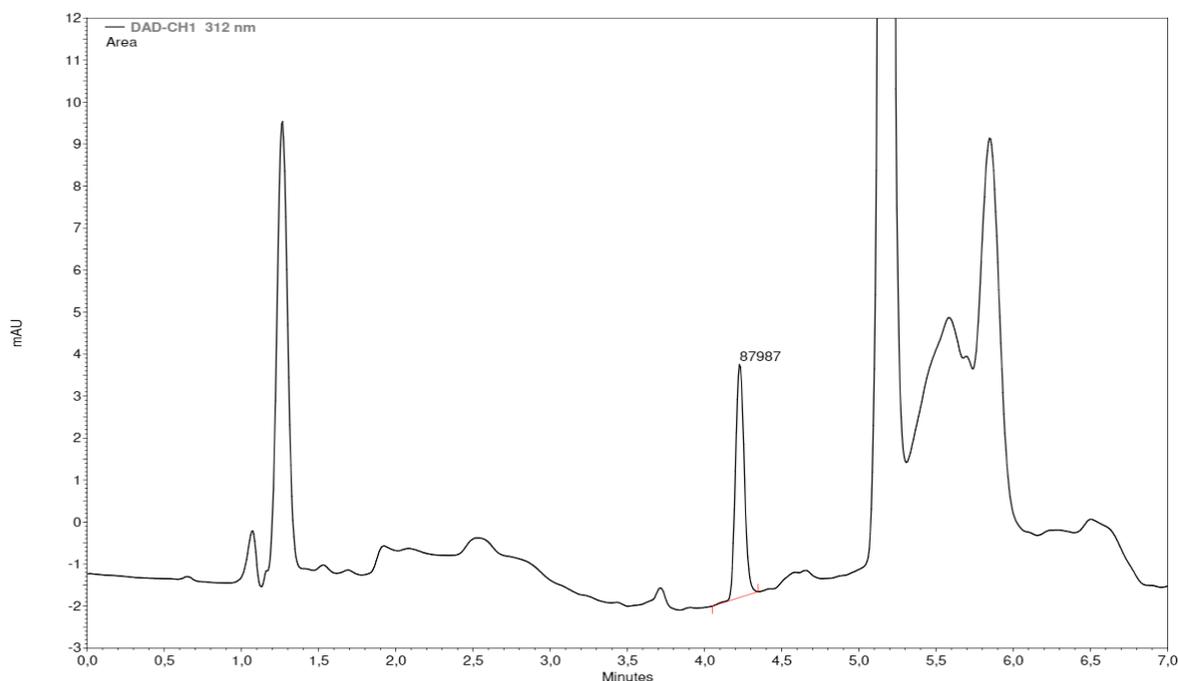


Figura 39. Perfil Cromatográfico do 4bc após método de extração a 312 nm, realizado por técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A taxa de recuperação do composto 4bc pelo método de extração foi entre 66,7% e 92,9%, dependendo da concentração, ratificando que o método pode ser utilizado na continuidade dos estudos farmacocinéticos para dosagem do composto no plasma.

A justificativa para a diferença de eficácia no método de preparo de amostra encontrado entre os compostos 4p e 4bc pode ser devido às diferenças em sua estrutura química, ou mesmo do polimorfismo cristalino, que conferem ao 4bc uma maior estabilidade. É possível que o composto 4p tenha sido de alguma forma hidrolisado no plasma ou no próprio método de extração, na qual foi utilizado o ácido tricloroacético.

A hipótese mais plausível devido a abrangência do método de extração é que o composto tenha sido degradado. A técnica utilizada por Torres (2014) para extração do DHPM LaSOM 65 não utilizou ácidos, apenas acetonitrila como solvente extrator⁹⁵. Tal método não se mostrou eficaz com os compostos testados neste estudo, o que nos levou a desenvolver o método apresentado.

Com a curva analítica extraída padronizada, a determinação do composto 4bc no plasma dos animais expostos por via oral (50mg/kg) e intravenosa (2,5mg/kg)

após a administração nos tempo de 15 min, 30 min, 45min, 1h30min, 3h e 4h30min. No entanto, em nenhum dos tempos, para nenhuma das vias, foi possível sua detecção, conforme cromatograma apresentado na Figura 40.

Para a administração oral o resultado encontrado poderia ser explicado por uma baixa biodisponibilidade do composto, fazendo com que as concentrações na corrente sanguínea estivessem abaixo do limite de quantificação estabelecido. Porém para a administração intravenosa é esperado a biodisponibilidade de 100% e a concentração no sangue é máxima após o final da perfusão, já que o composto é administrado diretamente na corrente sanguínea, e assim era esperada sua detecção ^{3 135}.

Nos exames hematológicos e bioquímicos não foram detectadas alterações clinicas na contagem das células da série branca, porém a coleta do sangue foi realizada 14 dias após a administração sendo possível que alterações tenham acontecido logo após a administração da substância e após os 14 dia os valores tenham se normalizado ^{130 107}.

Uma possibilidade para a não detecção dos compostos poderia ser sua ligação covalente a algum componente celular (série branca ou vermelha) ou às proteínas séricas impedindo sua partição no plasma. Outra possibilidade seria a formação de agregados impedindo também a partição no plasma.

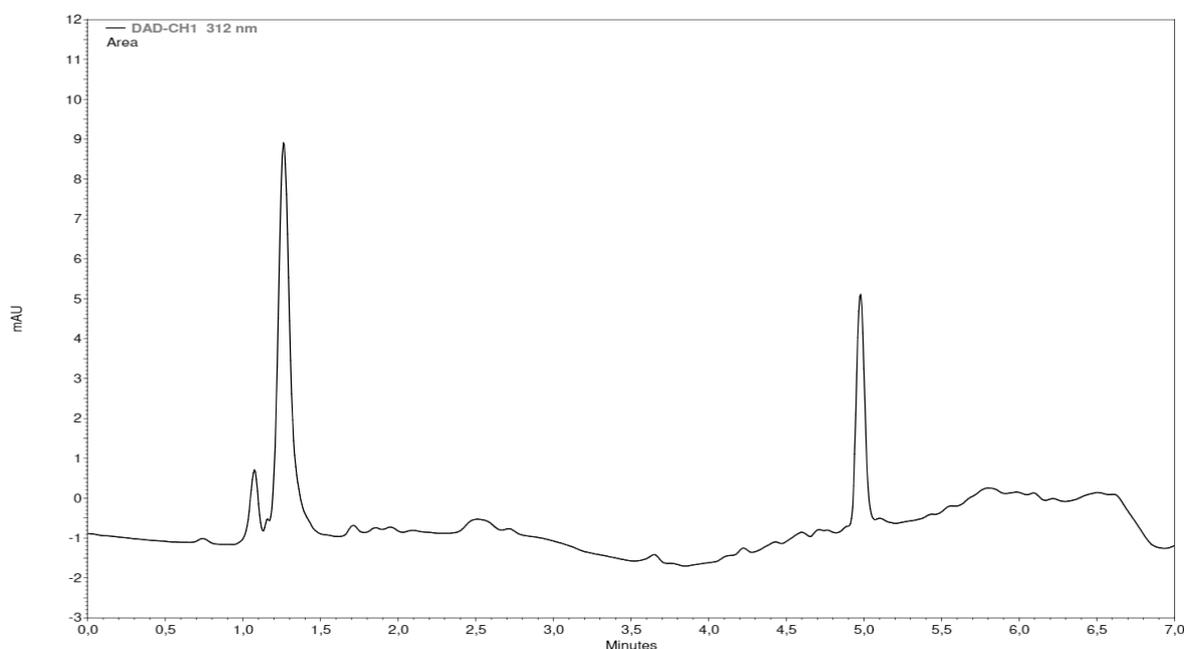


Figura 40. Perfil Cromatográfico do composto 4bc extraído após 1h 30 da administração intravenosa a 312 nm, realizado por técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência

5.3.2. Fluorescência

A bioluminescência avaliada pelo equipamento IVIS Lumina XR em primeiro momento foi usada no monitoramento dos modelos animais com indução de tumores, na qual as células cancerígenas são expressas juntamente com luciferina e são capazes de emitir luz em comprimentos de onda específicos captados pelo equipamento, sendo assim com o tratamento era possível a verificação da redução das células tumorais em virtude dos tratamentos propostos ^{212 213 214}.

No estudo realizado por Moura (2017) foi utilizada a técnica para avaliar a biodisponibilidade endovenosa de nanoformulações de ftalocianina de cloro alumínio, composto utilizado no tratamento de câncer ¹³¹.

Não foram realizados testes fotofísicos do composto 4bc fluorescente para determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão, pois são técnicas destrutivas e o material sintetizado era limitado, mas através do *software Living Image* foi possível avaliar os comprimentos de onda de excitação e emissão do derivado DHPM, sendo respectivamente 420nm e 670nm.

Após o intervalo da administração respectivo da via observou-se que mesmo com a retirada prévia dos pelos todo o animal estava emitindo autofluorescência, não sendo possível a visualização do composto, conforme Figura 41.

Uma avaliação empírica foi realizada para confirmar se o composto emitia fluorescência em contato com os tecidos e se de fato a emissão seria a mesma gerada por eles, sendo assim foi adicionado uma porção da formulação oral sob a região depilada do animal e dessa forma foi possível observar que o pelo era um importante interferente em nossas análises, conforme Figura 42. O mesmo resultado foi obtido com a formulação intravenosa incorporada ao 4bc fluorescente.

Foi realizada a retirada de todo o pelo do animal, no entanto ainda assim não foi possível a visualização do composto, pois a presença do sangue também impedia a visualização. Esses resultados são característicos da autofluorescência que é a fluorescência de um tecido devido aos seus fluoróforos endógenos ²¹⁵.

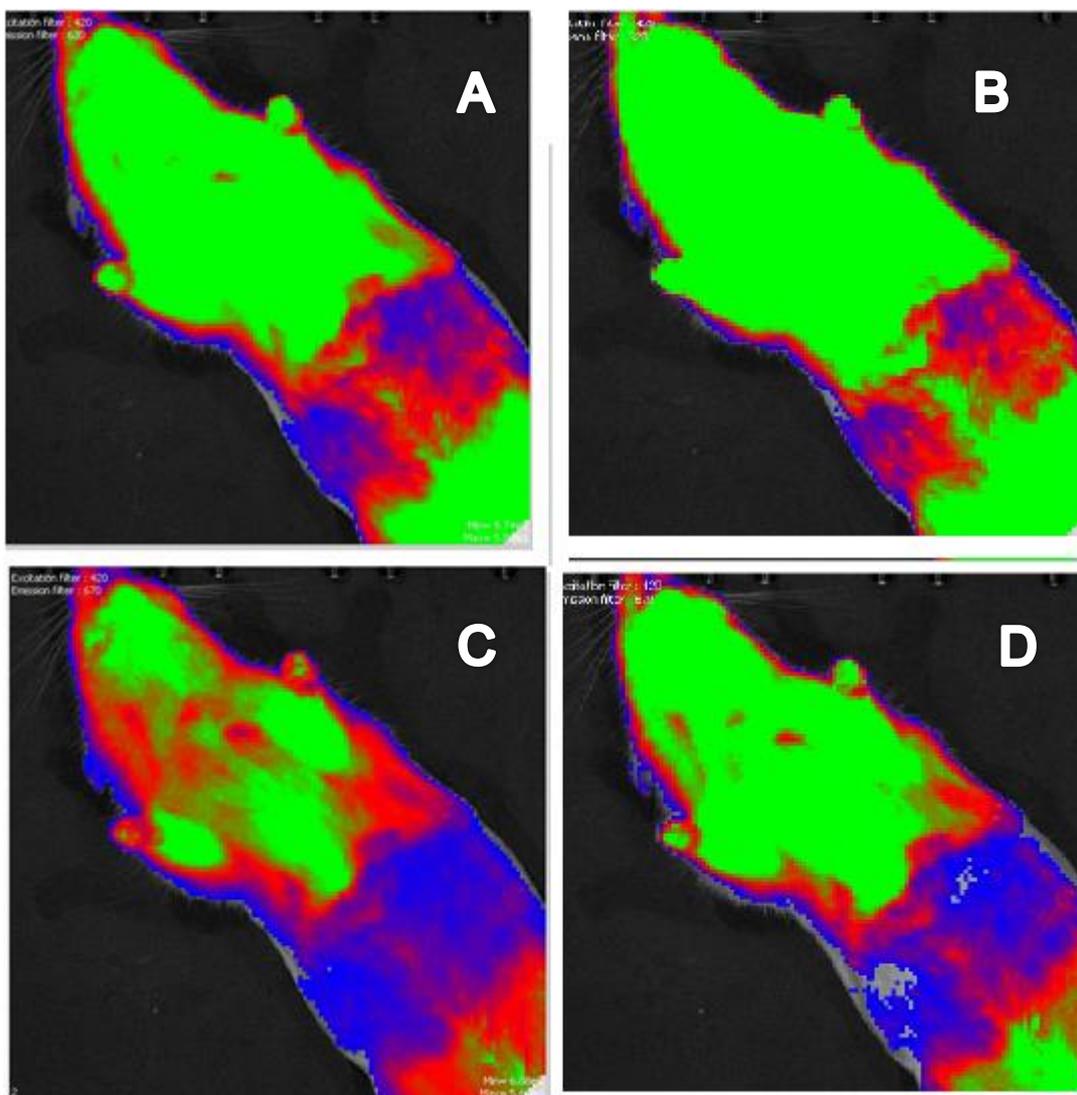


Figura 41. Análise da biodistribuição *in vivo* pelo equipamento IVIS Lumina XR. (A) Controle Xarope, (B) Composto 4bc administrado pela via oral, (C) Controle suspensão e (D) Composto 4bc administrado pela via intravenosa

As análises dos testes de distribuição *in vivo* não permitiram a observação da circulação endovenosa do composto 4bc através das imagens geradas pelo imageamento em tempo real no IVIS 73 Lumina XR, pois o grupamento fluorescente adicionado ao composto 4bc tem emissão em comprimento de onda similar ao emitido pelo sangue ²¹⁶. De acordo com a literatura o comprimento de onda de excitação pela pele e sangue são 260 e 400nm respectivamente e de emissão 610 e 675, ratificando que as emissões estão próximas do comprimento de onda emitido pelo composto 4bc fluorescente ^{217 216 218}.

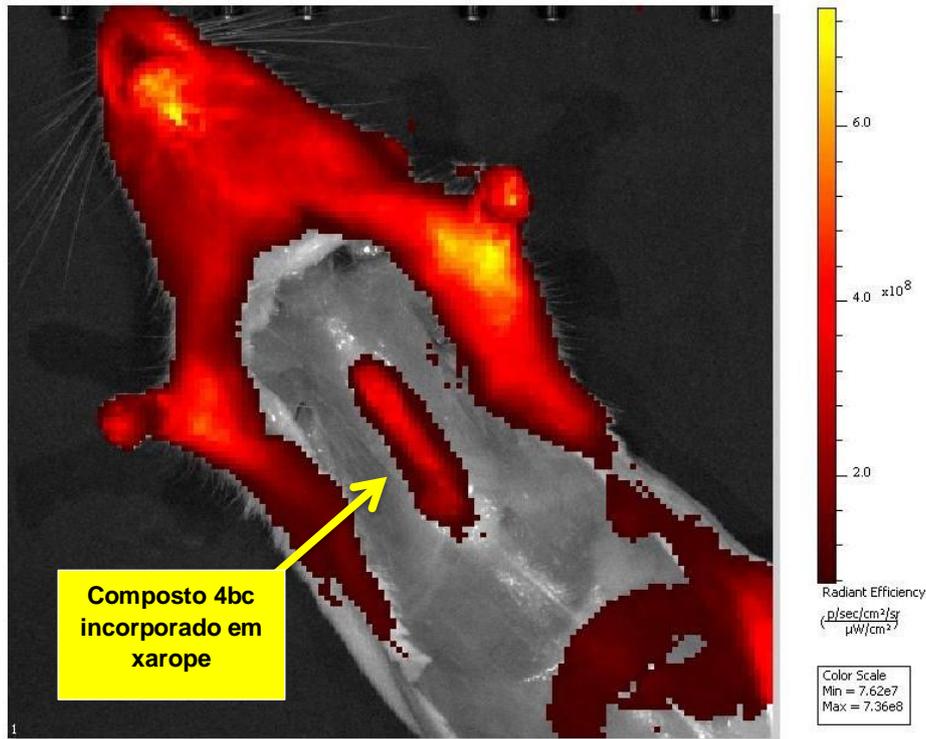


Figura 42. Avaliação empírica da emissão de fluorescência pelo composto 4bc.

Assim, a partir dos dados obtidos *in vivo* se fez necessária a análise *ex vivo* com objetivo de se observar a presença do composto 4bc nos rins, fígado, coração e cérebro. No entanto não houve diferença entre animais controle e tratados, tanto para a administração oral (Figura 43) como para a intravenosa (Figura 44).

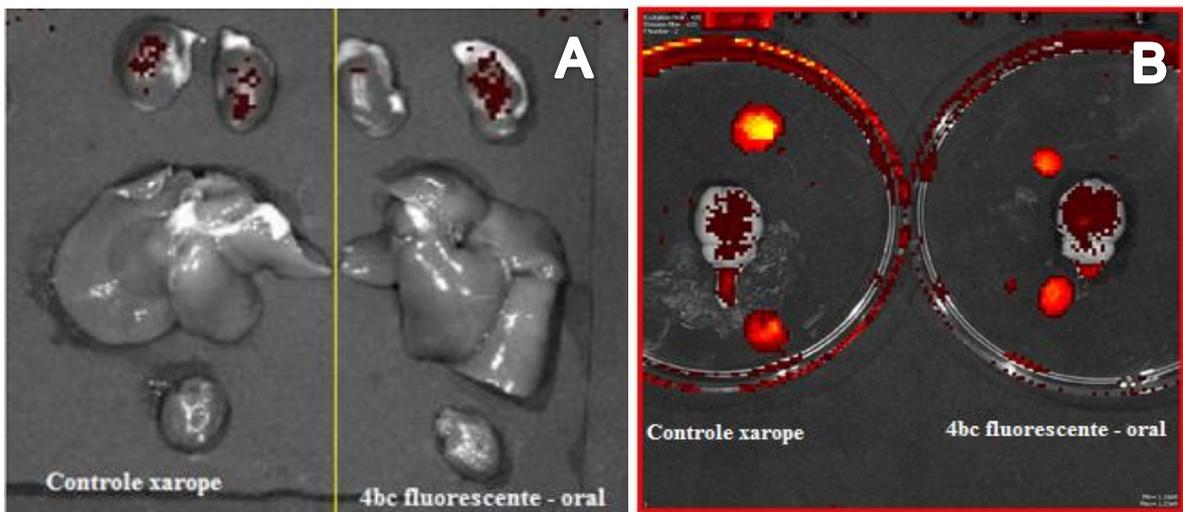


Figura 43. Análise *ex vivo* dos animais expostos ao 4bc fluorescente pela via oral (dose 50mg/kg) em comparação com o controle xarope. A- rins, fígado e coração. B- cérebro

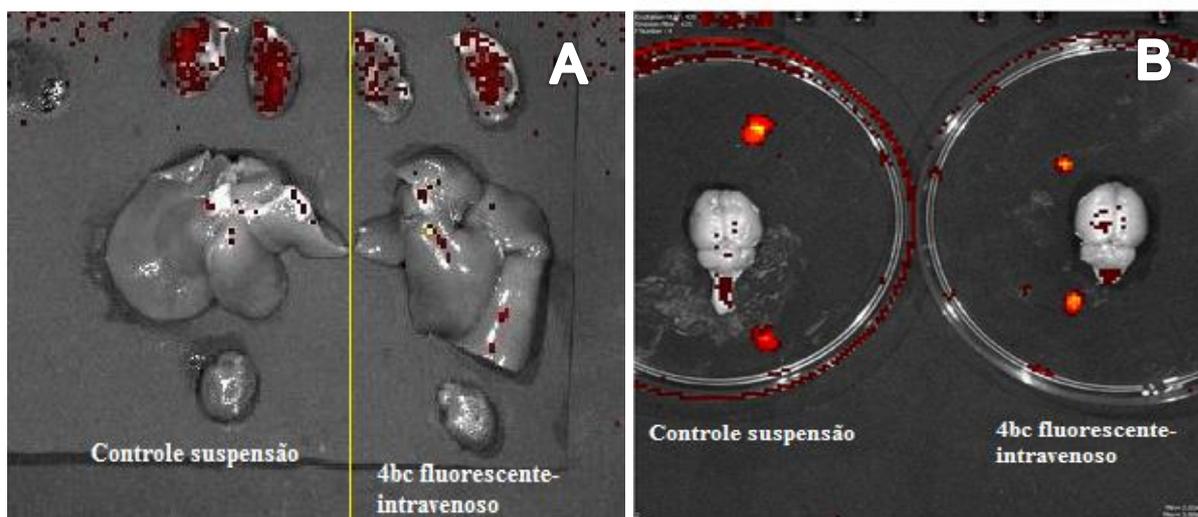


Figura 44. Análise *ex vivo* dos animais expostos ao 4bc fluorescente pela via intravenosa (dose 2,5 mg/kg) em comparação com o controle suspensão. A- rins, fígado e coração. B- cérebro

A última etapa do experimento consistiu-se na análise das extensões sanguíneas preparadas com o sangue coletado por punção cardíaca dos animais do grupo controle (xarope e suspensão) bem como os tratados (oral e intravenoso), a fim de tentar observar a presença do composto 4bc no interior de alguma célula sanguínea por fluorescência. E não foram constatadas diferenças entre os grupos controle com os grupos tratados pela via oral e intravenosa, conforme Figuras 45 e 46 respectivamente.

Diante dos resultados é possível que a biodisponibilidade do composto 4bc seja bem baixa, diferentemente do relato para outro DHPM por Torres (2014), mesmo o LaSOM 65 sendo considerado também com insolúvel ou praticamente insolúvel⁹⁶. A baixa solubilidade do composto pode estar diretamente relacionada a esses resultados, sendo possível que os grânulos do composto 4bc em suspensão nas formulações tenham sido fagocitados e assim foram entendidos pelo sistema imunitário como corpos estranhos, porém essa hipótese não foi confirmada qualitativamente pelas extensões sanguíneas, potencialmente pelo fato de a técnica utilizada não ser a mais propícia para a detecção do composto fluorescente, que infelizmente apresentou espectros de excitação e emissão em comprimentos de onda semelhantes aos da autofluorescência dos animais¹⁵⁹.

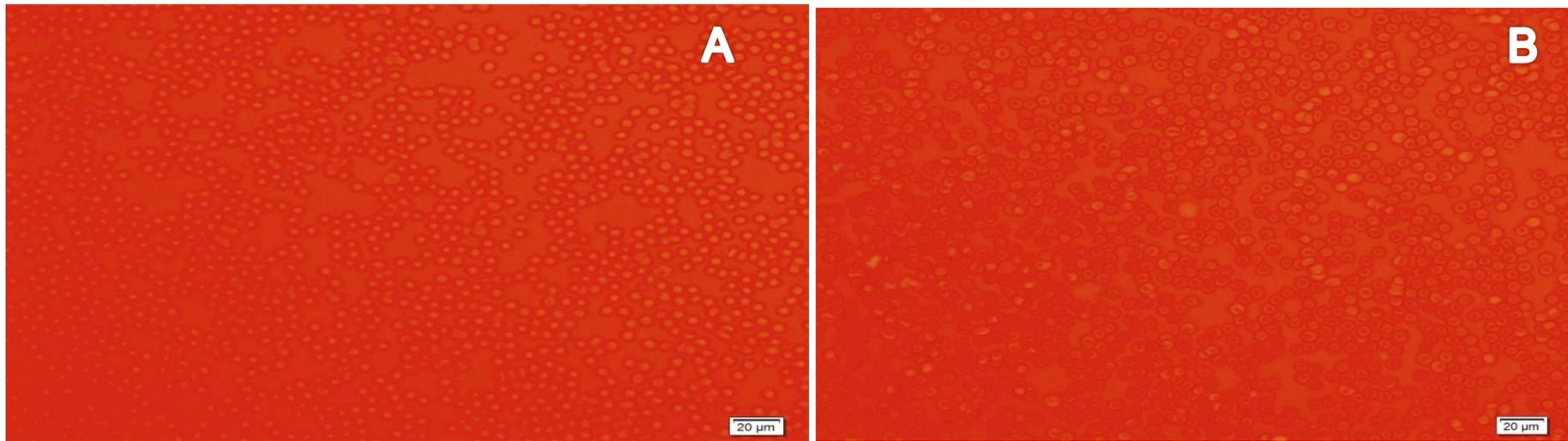


Figura 45. Esfregaço sanguíneo avaliado por microscopia de fluorescência. A - Controle Xarope e B – composto 4bc fluorescente (50mg/kg) administração oral

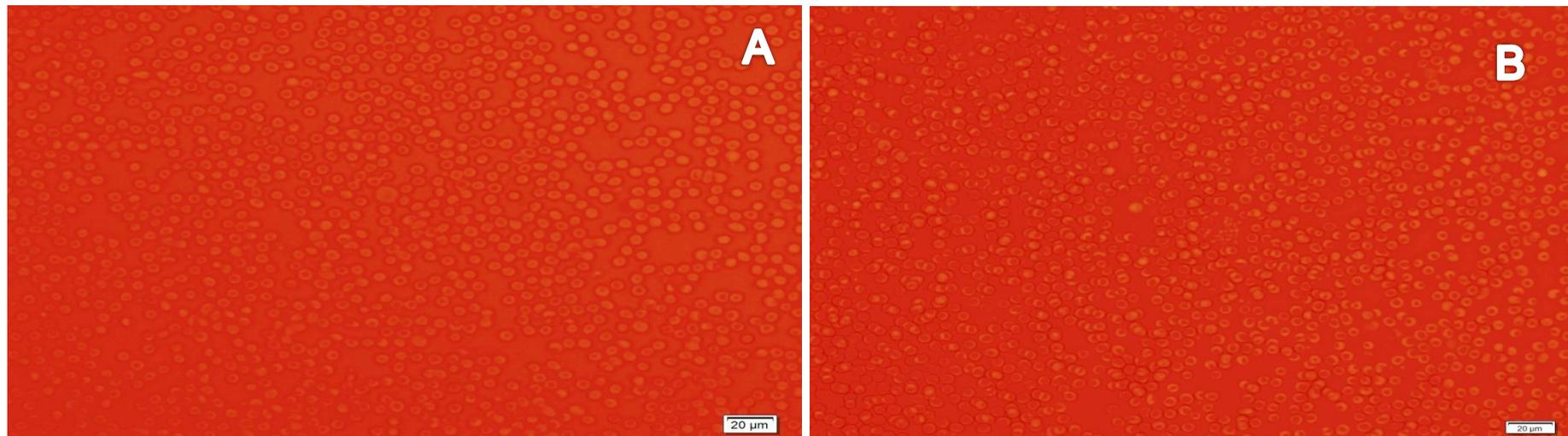


Figura 46. Esfregaço sanguíneo avaliado por microscopia de fluorescência. A – Controle Suspensão e B – composto 4bc fluorescente (2,5 mg/kg) administração intravenosa

6. CONCLUSÃO

Os resultados do estudo de toxicidade aguda demonstraram que a administração oral dos compostos 4p e 4bc em ratas Wistar não causou mortalidade e/ou morbidade até a dose testada de 2000 mg/kg pc no período de 14 dias. Dessa forma, os compostos foram classificados como “categoria 5”, o que indica que a DL50 é maior que 2000 mg/kg. Os resultados de toxicidade aguda intravenosa do composto 4bc quando administrado nas doses 1,0 mg/kg, 2,5 mg/kg e 5,0 mg/kg também não causaram mortalidade e/ou morbidade.

Os sinais clínicos apresentados pelos animais logo após as administrações não foram consequência de intoxicação, pois também foram apresentados pelos grupos controle.

Não foi encontrada qualquer alteração histológica e anatomopatológica significativa no cérebro, timo, tireoide, coração, pulmão, fígado, rins, baço, pâncreas, útero, ovário, estômago, intestino grosso e delgado, sugerindo uma segurança relativa quando utilizado de forma aguda e oral para o 4p e 4bc e intravenosa para o 4bc.

As diferenças encontradas no índice do peso dos órgãos entre os grupos tratados e controle foram em detrimento da interferência do processo de perfusão.

Não foram apresentadas diferenças no ganho de peso, consumo de ração e água entre os grupos tratados e controles.

A partir dos ensaios realizados no presente estudo não foi possível definir o perfil de biodisponibilidade dos compostos 4p e 4bc através do CLAE e do 4bc pela fluorescência.

Notável foi a redução dos níveis de glicose nos animais tratados, que fornecem base para mais pesquisas com estes compostos para estes parâmetros.

Na administração oral aguda os índices que ficaram fora da faixa de normalidade também foram reportados para os grupos controle, sendo improvável que os efeitos adversos sejam induzidos pelos compostos.

A continuação do presente trabalho se faz necessária, primariamente para se compreender completamente a farmacocinética dos derivados estudados, e entender como estes fármacos se distribuem após a administração. Assim, o estudo da farmacocinética é indispensável para avaliar quantitativamente a cronologia dos

processos absorção, distribuição, biotransformação e eliminação dos derivados, e fornecer informações úteis na compreensão mecanística desses pretendidos fármacos.

Até o presente momento, existem poucos estudos que avaliam a atividade ou toxicidade *in vivo* dos derivados diidropirimidinonas e este é o primeiro estudo que avalia esses parâmetros para os protótipos 4p e 4bc.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 INCA. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro 2016.
- 2 SMITH, R. A.; COKKINIDES, V.; BRAWLEY, O. W. Cancer screening in the United States, 2009: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 59, n. 1, p. 27-41, 2009. ISSN 1542-4863.
- 3 KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**. Porto Alegre: 2010.
- 4 BLOOM, D. et al. **The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases**. Program on the Global Demography of Aging. 2012
- 5 RIUL, S.; AGUILLAR, O. M. Quimioterapia antineoplásica: revisão da literatura. **REME rev. min. enferm**, v. 3, n. 1/2, p. 60-67, 1999. ISSN 2316-9389.
- 6 GUIDO, B. C. **Avaliação da atividade antitumoral dos derivados da 3,4-dihidropirimidinona (DHPMs) sobre células do adenocarcinoma mamário humano**. 2014. 138 Tese de Doutorado Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília
- 7 MALIGA, Z. et al. Mechanism of the small molecule Eg5 inhibitor monastrol. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, p. 436A-436A, Nov 2001. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000172372502398 >.
- 8 KAPOOR, T. M. et al. Probing the spindle assembly checkpoint with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 97A-97A, Dec 2000. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165525900506 >.
- 9 RAMOS, L. M. et al. The Biginelli Reaction with an Imidazolium-Tagged Recyclable Iron Catalyst: Kinetics, Mechanism, and Antitumoral Activity. **Chemistry-a European Journal**, v. 19, n. 13, p. 4156-4168, Mar 2013. ISSN 0947-6539. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000316623200010 >.
- 10 RAMOS, L. M. **Reações de Biginelli promovidas por um novo catalisador de ferro ionicamente marcado**. 2012. 215 Tese de Doutorado Programa de Pós-Graduação em Química. , Universidade de Brasília Brasília.
- 11 GUIDO, B. C. et al. Impact of kinesin Eg5 inhibition by 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one derivatives on various breast cancer cell features. **Bmc Cancer**, v. 15, Apr 2015. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000353454300001 >.
- 12 WHO, W. H. O. **World Cancer Report**. Lyon: International Agency for Research on Cancer 2014.
- 13 STEWART, B.; WILD, C. P. World cancer report 2014. **Health**, 2017.
- 14 INCA. **Políticas e ações para prevenção do câncer no Brasil: alimentação, nutrição e atividade física**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Brasil). Coordenação-Geral de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro. 3: 20 p. 2012.

- 15 WEINBERG, R. A. Oncogenes and tumor suppressor genes. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 44, n. 3, p. 160-170, 1994. ISSN 1542-4863.
- 16 LOWE, S. W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 307-315, 11/18/print 2004. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature03098> >.
- 17 HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000. ISSN 0092-8674.
- 18 HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011. ISSN 0092-8674.
- 19 INCA. **ABC do câncer. Abordagens Básicas para o Controle do Câncer/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde.** Rio de Janeiro. 3: 108 p. 2017.
- 20 DEVITA, V. T.; LAWRENCE, T. S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: principles & practice of oncology: primer of the molecular biology of cancer.** Lippincott Williams & Wilkins, 2012. ISBN 1451156006.
- 21 WEINBERG, R. **The biology of cancer.** Garland science, 2013. ISBN 1317963466.
- 22 STEEG, P. S. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 1, p. 55-63, 01//print 2003. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrc967> >.
- 23 KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420, 2009.
- 24 YANG, J.; WEINBERG, R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. **Dev Cell**, v. 14, n. 6, p. 818-29, Jun 2008. ISSN 1878-1551 (Electronic)
1534-5807 (Linking).
- 25 THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 6, p. 442-54, Jun 2002. ISSN 1474-175X (Print)1474-175X (Linking).
- 26 COCK-RADA, A.; WEITZMAN, J. B. The methylation landscape of tumour metastasis. **Biology of the Cell**, v. 105, n. 2, p. 73-90, 2013. ISSN 1768-322X.
- 27 ELL, B.; KANG, Y. Transcriptional control of cancer metastasis. **Trends in cell biology**, v. 23, n. 12, p. 603-611, 2013. ISSN 0962-8924.
- 28 MARINHO, F. C. D. A.; TAKAGAKI, T. Y. Hypercoagulability and lung cancer. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 5, p. 312-322, 2008. ISSN 1806-3713.
- 29 BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12.** AMGH Editora, 2012. ISBN 858055117X.
- 30 ALMEIDA, V. L. D. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

- 31 ALEY, K.; REICHLING, D.; LEVINE, J. Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans. **Neuroscience**, v. 73, n. 1, p. 259-265, 1996. ISSN 0306-4522.
- 32 SHARMA, R. et al. Inflammatory (B) symptoms are independent predictors of myelosuppression from chemotherapy in Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) patients—analysis of data from a British National Lymphoma Investigation phase III trial comparing CHOP to PMitCEBO. **BMC cancer**, v. 9, n. 1, p. 153, 2009. ISSN 1471-2407.
- 33 LONGLEY, D.; JOHNSTON, P. Molecular mechanisms of drug resistance. **The Journal of pathology**, v. 205, n. 2, p. 275-292, 2005. ISSN 1096-9896.
- 34 HAYES, J. D.; WOLF, C. R. Molecular mechanisms of drug resistance. **Biochemical Journal**, v. 272, n. 2, p. 281, 1990.
- 35 DE FÁTIMA, Â. et al. A mini-review on Biginelli adducts with notable pharmacological properties. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 3, p. 363-373, 5// 2015. ISSN 2090-1232. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123214001295> >.
- 36 KAUR, R. et al. Recent synthetic and medicinal perspectives of dihydropyrimidinones: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017. ISSN 0223-5234.
- 37 BIGINELLI, P. Aldehyde-urea derivatives of aceto-and oxaloacetic acids. **Gazz. chim. ital**, v. 23, n. 1, p. 360-413, 1893.
- 38 BIGINELLI, P. The condensation reaction described by Biginelli. **Gazz. Chim. Ital**, v. 23, p. 360-416, 1893.
- 39 PRADO, A. G. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738-744, 2003. ISSN 0100-4042.
- 40 KAPPE, C. O. Biologically active dihydropyrimidinones of the Biginelli-type — a literature survey. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 12, p. 1043-1052, 12// 2000. ISSN 0223-5234. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523400011892> >.
- 41 ABDU, A. M. et al. Useful four-carbon synthons en route to monastrol analogs. **Tetrahedron**, v. 71, n. 1, p. 139-146, 1/7/ 2015. ISSN 0040-4020. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402014015804> >.
- 42 CANTO, R. F. et al. Synthesis of dihydropyrimidin-2-one/thione library and cytotoxic activity against the human U138-MG and Rat C6 glioma cell lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 7, p. 1379-1388, 2011. ISSN 0103-5053.
- 43 FIGUEIRO, F. et al. A Monastrol-derived Compound, LaSOM 63, Inhibits Ecto-5' Nucleotidase/CD73 Activity and Induces Apoptotic Cell Death of Glioma Cell Lines. **Anticancer Research**, v. 34, n. 4, p. 1837-1842, Apr 2014. ISSN 0250-7005. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000334089200045 >.
- 44 HOLLA, B. S. et al. One pot synthesis of thiazolodihydropyrimidinones and evaluation of their anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.

- 39, n. 9, p. 777-783, 9// 2004. ISSN 0223-5234. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523404001138> >.
- 45 BAHEKAR, S. S.; SHINDE, D. B. Synthesis and anti-inflammatory activity of some [4,6-(4-substituted aryl)-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidin-5-yl]-acetic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 7, p. 1733-1736, 4// 2004. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X04001180> >.
- 46 MISHRA, M. K.; GUPTA, A.; NEGI, S. Anti-inflammatory activity of some new dihydropyrimidines derivatives. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 8, p. 92, 2010. ISSN 0975-8232.
- 47 KWON, O. W. et al. A substituted 3,4-dihydropyrimidinone derivative (compound D22) prevents inflammation mediated neurotoxicity; role in microglial activation in BV-2 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 16, p. 5199-5203, 8/15/ 2012. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X12008426> >.
- 48 ATTRI, P. et al. Triethylammonium acetate ionic liquid assisted one-pot synthesis of dihydropyrimidinones and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. **Arabian Journal of Chemistry**, 2010. ISSN 1878-5352. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535214000835> >.
- 49 ELUMALAI, K. et al. Antimicrobial and in vitro cytotoxicity of novel sulphanilamide condensed 1,2,3,4-tetrahydropyrimidines. **Journal of Taibah University for Science**, 2015. ISSN 1658-3655. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1658365515000187> >.
- 50 ELUMALAI, K. et al. Microwave assisted synthesis of some novel acetazolamide cyclocondensed 1,2,3,4-tetrahydropyrimidines as a potent antimicrobial and cytotoxic agents. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 24-31, 3// 2014. ISSN 2314-8535. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2314853514000080> >.
- 51 CHHILLAR, A. K. et al. Microwave-assisted synthesis of antimicrobial dihydropyridines and tetrahydropyrimidin-2-ones: Novel compounds against aspergillosis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 973-981, 2/15/ 2006. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089605008576> >.
- 52 DUGUAY, D. R. et al. Synthesis, characterization and antifungal testing of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-(thio)ones containing boronic acids and boronate esters. **Central European Journal of Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 562-568, Dec 2008. ISSN 1895-1066. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260469000011 >.
- 53 SINGH, O. M. et al. Synthesis and in vitro evaluation of the antifungal activities of dihydropyrimidinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 24, p. 6462-6467, 12/15/ 2008. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X08012663> >.
- 54 KIM, J. et al. Discovery of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones with inhibitory activity against HIV-1 replication. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 5, p. 2119-2124, 3/1/ 2012. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X11017719> >.

- 55 MANOS-TURVEY, A. et al. Dihydropyrimidinones and -thiones with improved activity against human polyomavirus family members. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 20, p. 5087-5091, 10/15/ 2016. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X1630912X> >.
- 56 RAVENDRA BABU, K. et al. Identification of substituted [3, 2-a] pyrimidines as selective antiviral agents: Molecular modeling study. **Antiviral Research**, v. 95, n. 2, p. 118-127, 8// 2012. ISSN 0166-3542. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354212001258> >.
- 57 CHIANG, A. N. et al. Select pyrimidinones inhibit the propagation of the malarial parasite, Plasmodium falciparum. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 1527-1533, 2/15/ 2009. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089609000340> >.
- 58 RASHID, U. et al. Structure based medicinal chemistry-driven strategy to design substituted dihydropyrimidines as potential antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 115, p. 230-244, 6/10/ 2016. ISSN 0223-5234. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523416301969> >.
- 59 SINGH, N. et al. An orally effective dihydropyrimidone (DHPM) analogue induces apoptosis-like cell death in clinical isolates of Leishmania donovani overexpressing pteridine reductase 1. **Parasitology Research**, v. 105, n. 5, p. 1317-1325, Oct 2009. ISSN 0932-0113. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269914800016 >.
- 60 ATWAL, K. S. et al. Dihydropyrimidine calcium channel blockers. 3. 3-Carbamoyl-4-aryl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid esters as orally effective antihypertensive agents. **Journal of medicinal chemistry**, v. 34, n. 2, p. 806-811, 1991. ISSN 0022-2623.
- 61 ROVNYAK, G. C. et al. Dihydropyrimidine calcium channel blockers. 4. Basic 3-substituted-4-aryl-1, 4-dihydropyrimidine-5-carboxylic acid esters. Potent antihypertensive agents. **Journal of medicinal chemistry**, v. 35, n. 17, p. 3254-3263, 1992. ISSN 0022-2623.
- 62 PUTATUNDA, S. et al. Regioselective N1-alkylation of 3,4-dihydropyrimidine-2(1H)-ones: Screening of their biological activities against Ca²⁺-ATPase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 223-231, 8// 2012. ISSN 0223-5234. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523412002954> >.
- 63 BLACKBURN, C. et al. Identification and characterization of 4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones as inhibitors of the fatty acid transporter FATP4. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 13, p. 3504-3509, 7/1/ 2006. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X06004008> >.
- 64 DHUMASKAR, K. L. et al. Graphite catalyzed solvent free synthesis of dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones and their antidiabetic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 13, p. 2897-2899, 7/1/ 2014. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X14004569> >.

- 65 YAR, M. et al. Novel synthesis of dihydropyrimidines for α -glucosidase inhibition to treat type 2 diabetes: In vitro biological evaluation and in silico docking. **Bioorganic Chemistry**, v. 54, p. 96-104, 6// 2014. ISSN 0045-2068. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045206814000340> >.
- 66 BRYZGALOV, A. O. et al. Antiarrhythmic activity of 4,6-di(het)aryl-5-nitro-3,4-dihydropyrimidin-(1H)-2-ones and its effects on arterial pressure in rats. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 5, p. 1418-1420, 3/1/ 2006. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X0501454X> >.
- 67 BARBOSA, F. A. R. et al. Synthesis and evaluation of dihydropyrimidinone-derived selenoesters as multi-targeted directed compounds against Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 22, p. 5762-5770, 11/15/ 2016. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089616307180> >.
- 68 MANSOURI, M. et al. Synthesis and antioxidant evaluation of 4-(furan-2-yl)-6-methyl-2-thioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate esters. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 7, n. 4, p. 257, 2012.
- 69 DE VASCONCELOS, A. et al. Antioxidant capacity and environmentally friendly synthesis of dihydropyrimidin-(2H)-ones promoted by naturally occurring organic acids. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 26, n. 4, p. 155-161, 2012. ISSN 1099-0461.
- 70 BIGINELLI, P. Intorno ad uramidi aldeidiche dell'etere acetilacetico. **Gazz Chim Ital**, v. 21, p. 337-340, 1891.
- 71 MAYER, T. U. et al. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. **Science**, v. 286, n. 5441, p. 971-974, Oct 1999. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000083368500050 >.
- 72 MAYER, T. U. Chemical genetics: tailoring tools for cell biology. **Trends in Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 270-277, 5// 2003. ISSN 0962-8924. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892403000771> >.
- 73 SAWIN, K. E. et al. Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. **Nature**, v. 359, n. 6395, p. 540, 1992. ISSN 0028-0836.
- 74 BLANGY, A. et al. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1159-69, 1995. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking).
- 75 MALIGA, Z.; KAPOOR, T. M.; MITCHISON, T. J. Evidence that Monastrol Is an Allosteric Inhibitor of the Mitotic Kinesin Eg5. **Chemistry & Biology**, v. 9, n. 9, p. 989-996, 9// 2002. ISSN 1074-5521. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074552102002120> >.
- 76 COCHRAN, J. C. et al. Monastrol inhibition of the mitotic kinesin Eg5. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12658-12667, Apr 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000227922000072 >.
- 77 CHIN, G. M.; HERBST, R. Induction of apoptosis by monastrol, an inhibitor of the mitotic kinesin Eg5, is independent of the spindle checkpoint. **Molecular Cancer**

- Therapeutics**, v. 5, n. 10, p. 2580-2591, Oct 2006. ISSN 1535-7163. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241335600018 >.
- 78 HUSZAR, D. et al. Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1, p. 197-208, 2009. ISSN 0167-7659.
- 79 RUSSOWSKY, D. et al. Synthesis and differential antiproliferative activity of Biginelli compounds against cancer cell lines: Monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues. **Bioorganic Chemistry**, v. 34, n. 4, p. 173-182, Aug 2006. ISSN 0045-2068. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239290700002 >.
- 80 SVETLIK, J. et al. Monastrol analogs: A synthesis of pyrazolopyridine, benzopyranopyrazolopyridine, and oxygen-bridged azolopyrimidine derivatives and their biological screening. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 14, p. 4073-4076, 7/15/ 2010. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X10007262> >.
- 81 LEIZERMAN, I. et al. Differential effects of monastrol in two human cell lines. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 16, p. 2060-2070, Aug 2004. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223298300008 >.
- 82 ASRAF, H. et al. Mitotic slippage and expression of survivin are linked to differential sensitivity of human cancer cell-lines to the Kinesin-5 inhibitor monastrol. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129255, 2015. ISSN 1932-6203.
- 83 CHEN, Y.; CHOW, J. P. H.; POON, R. Y. C. Inhibition of Eg5 Acts Synergistically with Checkpoint Abrogation in Promoting Mitotic Catastrophe. **Molecular Cancer Research**, v. 10, n. 5, p. 626-635, May 2012. ISSN 1541-7786. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000305074200006 >.
- 84 LIU, M. et al. Validating the mitotic kinesin Eg5 as a therapeutic target in pancreatic cancer cells and tumor xenografts using a specific inhibitor. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 2, p. 169-178, 7/15/ 2008. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000629520800258X> >.
- 85 MULLER, C. et al. Inhibitors of kinesin Eg5: antiproliferative activity of monastrol analogues against human glioblastoma cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 59, n. 2, p. 157-164, Feb 2007. ISSN 0344-5704. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242419900002 >.
- 86 COCHRAN, J. C.; GILBERT, S. P. ATPase mechanism of Eg5 in the absence of microtubules: insight into microtubule activation and allosteric inhibition by monastrol. **Biochemistry**, v. 44, n. 50, p. 16633-48, Dec 20 2005. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960.
- 87 LUO, L. et al. Mechanism of inhibition of human KSP by monastrol: insights from kinetic analysis and the effect of ionic strength on KSP inhibition. **Biochemistry**, v. 43, n. 48, p. 15258-66, Dec 07 2004. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960.
- 88 AGBAJE, O. C. et al. Synthesis and in vitro cytotoxicity evaluation of some fluorinated hexahydropyrimidine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 3, p. 989-992, 2/1/ 2011. ISSN 0960-894X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X10017762> >.

- 89 AZIZIAN, J. et al. Microwave-Assisted Solvent-Free Synthesis of Bis(dihydropyrimidinone)benzenes and Evaluation of their Cytotoxic Activity. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 75, n. 4, p. 375-380, Apr 2010. ISSN 1747-0277. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274810400005 >.
- 90 BARIWAL, J. J. et al. Synthesis, characterization and anticancer activity of 3-aza-analogues of DP-7. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 12, p. 4002-4009, Dec 2012. ISSN 1054-2523. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000310030200008 >.
- 91 TERRACCIANO, S. et al. New dihydropyrimidin-2(1H)-one based Hsp90 C-terminal inhibitors. **Rsc Advances**, v. 6, n. 85, p. 82330-82340, 2016. ISSN 2046-2069. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000382776000109 >.
- 92 BHAT, M. A.; AL-DHFYAN, A.; AL-OMAR, M. A. Targeting Cancer Stem Cells with Novel 4-(4-Substituted phenyl)-5-(3,4,5-trimethoxy/3,4-dimethoxy)-benzoyl-3,4-dihydropyrimidine -2(1H)-one/thiones. **Molecules**, v. 21, n. 12, Dec 2016. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000392140100140 >.
- 93 EXERTIER, P. et al. Impaired angiogenesis and tumor development by inhibition of the mitotic kinesin Eg5. **Oncotarget**, v. 4, n. 12, p. 2302-16, Dec 2013. ISSN 1949-2553 (Electronic).
- 94 STUEPP, C. S. et al. Activity of LaSOM 65, a Monastrol-derived Compound, Against Glioblastoma Multiforme Cell Lines. **Anticancer Research**, v. 33, n. 10, p. 4463-4468, Oct 2013. ISSN 0250-7005. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000326204400040 >.
- 95 TORRES, B. G. et al. Pre-clinical pharmacokinetics and acute toxicological evaluation of a monastrol derivative anticancer candidate LaSOM 65 in rats. **Xenobiotica**, v. 44, n. 3, p. 254-63, Mar 2014. ISSN 1366-5928 (Electronic)0049-8254 (Linking).
- 96 TORRES, B. G. S. et al. Pre-clinical pharmacokinetics and acute toxicological evaluation of a monastrol derivative anticancer candidate LaSOM 65 in rats. **Xenobiotica**, v. 44, n. 3, p. 254-263, Mar 2014. ISSN 0049-8254. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000332737700007 >.
- 97 VELAZQUEZ GONZALEZ, A. J. A industria farmaceutica brasileira na decada de 90: mudanças na pesquisa & desenvolvimento, na produção de farmacos e de medicamentos. 1999.
- 98 BERTRAM G. KATZUNG, S. B. M., ANTHONY J. TREVOR. **Farmacologia Básica & Clínica**. Rio de Janeiro 2010. 57 - 60
- 99 ANVISA. **Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos**. Brasil 2010.
- 100 NEWELL, D. et al. The Cancer Research UK experience of pre-clinical toxicology studies to support early clinical trials with novel cancer therapies. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 6, p. 899-906, 2004. ISSN 0959-8049.
- 101 VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nature reviews Drug discovery**, v. 2, n. 3, p. 192-204, 2003. ISSN 1474-1776.

- 102 OECD. **Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method**. OECD Publishing, Disponível em: < /content/book/9789264071001-em <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071001-en> >.
- 103 VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006. ISSN 1808-0804.
- 104 SOBRAL, F. R. S. Proposta de Guia para a realização de estudos não clínicos de segurança, necessários ao desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos. 2015.
- 105 RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L.; HUME, C. W. The principles of humane experimental technique. 1959.
- 106 OECD. **Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**. OECD Publishing, Disponível em: < /content/book/9789264070684-en <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070684-en> >.
- 107 TOZER, T. N.; ROWLAND, M. **Introdução à farmacocinética e à farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica**. Artmed Editora, 2009. ISBN 8536320230.
- 108 DOS SANTOS LACERDA, D.; LIONZO, M. Aspectos atuais da biodisponibilidade de fármacos com baixa solubilidade: um enfoque sobre a sinvastatina. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 23, n. 5/6, p. 3-9, 2013. ISSN 2318-9312.
- 109 NAGARAJAIAH, H.; MUKHOPADHYAY, A.; MOORTHY, J. N. Biginelli reaction: an overview. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 47, p. 5135-5149, 11/23/ 2016. ISSN 0040-4039. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403916312060> >.
- 110 PATEL, D. V.; GORDON, E. M. Applications of small-molecule combinatorial chemistry to drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 1, n. 4, p. 134-144, 4// 1996. ISSN 1359-6446. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644696890623> >.
- 111 SZEGEZDI, J.; CSIZMADIA, F. **Method for calculating the pKa values of small and large molecules**. ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY: AMER CHEMICAL SOC 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA, 2007. p.
- 112 SZEGEDI, J.; CSIZMADIA, F. **Prediction of distribution coefficient using microconstants**: American Chemical Society National Meeting, 2004. p.
- 113 DANIEL SZISZ. **Solubility Predictor**. ChemAxon Docs 2015.
- 114 ZHOU, L. et al. Development of a high throughput equilibrium solubility assay using miniaturized shake-flask method in early drug discovery. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, n. 11, p. 3052-3071, 2007. ISSN 1520-6017.
- 115 BALA, I. et al. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 40, n. 1, p. 206-210, 2006. ISSN 0731-7085.

- 116 BAKA, E.; COMER, J. E.; TAKÁCS-NOVÁK, K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 46, n. 2, p. 335-341, 2008. ISSN 0731-7085.
- 117 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. 5ª Edição. **ANVISA**, 2010.
- 118 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira, 2ª edição Rev. 02. ANVISA. 2012.
- 119 TURNER, P. V. et al. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 600-613, 2011. ISSN 1559-6109.
- 120 JOVE. Science Education Database. Essentials of Lab Animal Research. Compound Administration I. **Jove-Journal of Visualized Experiments**, 2017.
- 121 MACHHOLZ, E. et al. Manual Restraint and Common Compound Administration Routes in Mice and Rats. n. 67, p. e2771, 2012/09/26/ 2012. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <https://www.jove.com/video/2771> >.
- 122 MALONE, M. H. The pharmacological evaluation of natural products—general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 127-147, 1983. ISSN 0378-8741.
- 123 MALONE, M. Pharmacological approaches to natural product screening and evaluation. In: (Ed.). **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**: Springer, 1977. p.23-53.
- 124 CUNHA, D. F. D. et al. Heart weight and heart weight/body weight coefficient in malnourished adults. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 78, n. 4, p. 385-387, 2002. ISSN 0066-782X.
- 125 GAGE, G. J.; KIPKE, D. R.; SHAIN, W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. n. 65, p. e3564, 2012/07/30/ 2012. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <https://www.jove.com/video/3564> >.
- 126 BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C. D. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. In: (Ed.). **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**, 2003. p.331-331.
- 127 CAPUTO, L. F. G.; DE BRITO GITIRANA, L.; DE ABREU MANSO, P. P. Técnicas histológicas. **Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos em Laboratórios de Saúde . EPSJV - Fiocruz**, p. 89, 2010.
- 128 JOVE. JoVE Science Education Database. Essentials of Lab Animal Research. Blood Withdrawal I. **Jove-Journal of Visualized Experiments**, 2017.
- 129 PARASURAMAN, S.; RAVEENDRAN, R.; KESAVAN, R. Blood sample collection in small laboratory animals. **Journal of pharmacology and pharmacotherapeutics**, v. 1, n. 2, p. 87, 2010. ISSN 0976-500X.

- 130 AMORIM, R. et al. Determinação de cetamina em plasma por HPLC: aplicação em um estudo de farmacocinética de associação medicamentosa em cães. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, p. 69-76, 2008. ISSN 1808-4532.
- 131 MOURA, L. D. D. **Tratamento de câncer de mama utilizando terapia fotodinâmica com nanoemulsões de Ftalocianina de cloro alumínio**. . Dissertação de mestrado (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)—Universidade de Brasília. Brasil. 2017
- 132 SRINIVAS, K.; DAS, B. Iodine catalyzed one-pot synthesis of 3, 4-dihydropyrimidin-2 (1H)-ones and thiones: a simple and efficient procedure for the Biginelli reaction. **Synthesis**, v. 2004, n. 13, p. 2091-2093, 2004. ISSN 0039-7881.
- 133 ZHENG, R. et al. Brønsted Acidic Ionic Liquid: An Efficient and Reusable Catalyst for the Synthesis of 3, 4-Dihydropyrimidin-2 (1 H)-ones. **Synthetic communications**, v. 36, n. 11, p. 1503-1513, 2006. ISSN 0039-7911.
- 134 MATOS, J. D. R. et al. Aspectos gerais relativos ao desenvolvimento farmacotécnico de medicamento: análise térmica aplicada a fármacos e medicamentos. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 32-65, 2009.
- 135 MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002. ISSN 1809-4562.
- 136 ROSEN, H. et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) as a solvent in acute toxicity determinations. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 120, n. 2, p. 511-514, 1965. ISSN 0037-9727.
- 137 VOGIN, E. E. et al. Chronic toxicity of DMSO in primates. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 16, n. 3, p. 606-612, 1970. ISSN 0041-008X.
- 138 TANAKA, K.-I. Toxicity of dimethylformamide (DMF) to the young female rat. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 28, n. 2, p. 95-105, 1971. ISSN 0340-0131.
- 139 CAVAZZINI, A. et al. Combining synthetic and analytical strategies for preparative HPLC enantioseparation of monastrol racemic mixture. **Biotechnology progress**, v. 20, n. 2, p. 603-612, 2004. ISSN 1520-6033.
- 140 HAIT, W. N. et al. Tubulin targeting agents. **Update on cancer therapeutics**, v. 2, n. 1, p. 1-18, 2007. ISSN 1872-115X.
- 141 ZHU, L. J. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Homocamptothecins Conjugating with Dihydropyrimidine Derivatives as Potent Topoisomerase I Inhibitors. **Archiv Der Pharmazie**, v. 344, n. 11, p. 726-734, Nov 2011. ISSN 0365-6233. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000297549200004 >.
- 142 VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50 “. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, 2007. ISSN 1808-0804.
- 143 BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity. **Ilar Journal**, v. 43, n. Suppl 1, p. S27-S30, 2002. ISSN 1084-2020.

- 144 MATIAS, M. et al. Synthesis, in vitro evaluation and QSAR modelling of potential antitumoral 3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-thiones. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016. ISSN 1878-5352. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535216302441> >.
- 145 SASHIDHARA, K. V. et al. Design, synthesis and anticancer activity of dihydropyrimidinone-semicarbazone hybrids as potential human DNA ligase 1 inhibitors. **Medchemcomm**, v. 7, n. 12, p. 2349-2363, 2016. ISSN 2040-2503. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000390552300013 >.
- 146 TREPTOW, T. G. M. et al. Novel hybrid DHPM-fatty acids: Synthesis and activity against glioma cell growth in vitro. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 552-562, 5/5/ 2015. ISSN 0223-5234. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523415002299> >.
- 147 REDDY, O. S. et al. Synthesis and Cytotoxic Evaluation for Some New Dihydropyrimidinone Derivatives for Anticancer Activity. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 10, n. 8, p. 699-705, Oct 2013. ISSN 1570-1808. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000323215300004 >.
- 148 CUNHA, L. C. D. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de Apeiba tibourbou Aubl (Tiliaceae), em camundongos e ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 357-362, 2013. ISSN 2179-443X.
- 149 CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de Synadenium umbellatum Pax. **Rev Bras. Farmacogn**, v. 19, n. 2A, p. 403-11, 2009.
- 150 BARBOSA, C. E. S. Avaliação da toxicidade oral aguda e da atividade antitumoral in vivo do látex e extratos de uma apocynaceae de uso popular. **Vita et Sanitas**, v. 8, n. 1, p. 119-137, 2017. ISSN 1982-5951.
- 151 ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; DE OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2006. ISBN 8575413864.
- 152 CARVALHO, V. D. S. Implicações nutricionais da quimioterapia no doente oncológico. 2002.
- 153 JOTHY, S. L. et al. Acute oral toxicity of methanolic seed extract of Cassia fistula in mice. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 5268-5282, 2011.
- 154 DE MENDONÇA SOARES, B. L. et al. Alterações gastrintestinais e ponderais em pacientes submetidos à quimioterapia. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 28, n. 2, p. 103-6, 2013.
- 155 TOFOVIC, S. P.; JACKSON, E. K. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 360-366, 1999. ISSN 0160-2446.
- 156 EL HILALY, J.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSEI, B. Acute and chronic toxicological studies of Ajuga iva in experimental animals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 43-50, 2004. ISSN 0378-8741.
- 157 HARKNESS, J.; WAGNER, J. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. Editora Roca, São Paulo, 1993.

- 158 TALMADGE, J. E. et al. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **The American journal of pathology**, v. 170, n. 3, p. 793-804, 2007. ISSN 0002-9440.
- 159 THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. Editora Roca, 2007. ISBN 8572416684.
- 160 STILLWELL, T. J.; BENSON, R. C. Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis: a review of 100 patients. **Cancer**, v. 61, n. 3, p. 451-457, 1988. ISSN 1097-0142.
- 161 VERSTAPPEN, S. et al. Adverse events and factors associated with toxicity in patients with early rheumatoid arthritis treated with methotrexate tight control therapy: the CAMERA study. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 69, n. 6, p. 1044-1048, 2010. ISSN 0003-4967.
- 162 THATISHETTY, A. V.; AGRESTI, N.; O'BRIEN, C. B. Chemotherapy-induced hepatotoxicity. **Clinics in liver disease**, v. 17, n. 4, p. 671-686, 2013. ISSN 1089-3261.
- 163 KING, P. D.; PERRY, M. C. Hepatotoxicity of chemotherapy. **The oncologist**, v. 6, n. 2, p. 162-176, 2001. ISSN 1083-7159.
- 164 ROTH, D. et al. Design and evaluation of immunotoxicity studies. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 57, n. 5, p. 367-371, 2006. ISSN 0940-2993.
- 165 LIPSHULTZ, S. E. et al. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 12, p. 808-815, 1991. ISSN 0028-4793.
- 166 C PEREIRA, G. et al. Drug-induced cardiac mitochondrial toxicity and protection: from doxorubicin to carvedilol. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 20, p. 2113-2129, 2011. ISSN 1381-6128.
- 167 TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from the cardiotoxic mechanisms to management. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 49, n. 5, p. 330-352, 2007. ISSN 0033-0620.
- 168 SIMÃO, D. A. D. S. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: review for clinical practice. **Revista Dor**, v. 16, n. 3, p. 215-220, 2015. ISSN 1806-0013.
- 169 DA NÓBREGA MARINHO, A. M. et al. Fatores de risco associados a neuropatia periférica induzida por quimioterapia. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 5, n. 3, p. 41-50, 2016. ISSN 2317-8469.
- 170 KOCIBA, R. J.; SLEIGHT, S. D. Acute toxicologic and pathologic effects of cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875) in the male rat. **Cancer Chemother Rep**, v. 55, n. 1, p. 1-8, Feb 1971. ISSN 0069-0112 (Print)0069-0112 (Linking).
- 171 MILLER, R. P. et al. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. **Toxins**, v. 2, n. 11, p. 2490-2518, 2010.
- 172 WOODLOCK, T.; LOUGHNER, J. Farmacologia clínica dos agentes antineoplásicos. **ROSENTHAL., S.; CARIGNAN, JR; SMITH, BD Oncologia prática: cuidados com o paciente**, v. 2, p. 41-64, 1995.

- 173 ANELLI, T. Princípios gerais de quimioterapia antineoplásica. **Curso básico de oncologia do Hospital AC Camargo**. Rio de Janeiro: Medsi, p. 117-131, 1996.
- 174 BONASSA, E. M. A.; SANTANA, T. R. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. Atheneu, 2005. ISBN 8573797622.
- 175 MESSIAS, J. Parâmetros hematológicos de *Rattus norvegicus* obtidos através de método automatizado e não automatizado. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 3, n. 2, p. 1-8, 2011.
- 176 HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. **Fundamentos em Hematologia-6ª Edição**. Artmed, 2012. ISBN 856585230X.
- 177 MARY, G.; CHARLES, C.; CLIFFORD, B. Clinical laboratory parameters for Crl: CD (SD) rats. **Charles river laboratories**, v. 18, 2006.
- 178 LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014. ISSN 1808-2793.
- 179 MARY, G. C., C.; CLIFFORFD, B. Clinical laboratory parameters for Crl: CD (SD) rats **Charles river laboratories**, 2008.
- 180 LILLIE, L. E.; TEMPLE, N. J.; FLORENCE, L. Z. Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: weight gain, hematology and clinical chemistry. **Human & experimental toxicology**, v. 15, n. 8, p. 612-616, 1996. ISSN 0960-3271.
- 181 LANG, P. Hematology parameters for the Crl: CD® BR rat. **Charles River Laboratories**, p. 1-25, 1993.
- 182 BECK, N. Anemia: General Considerations. In: (Ed.). **Diagnostic Hematology**: Springer, 2009. p.199-218. ISBN 1848002823.
- 183 SAID, N. M.; ABIOLA, O. Haematological profile shows that Inbred Sprague Dawley rats have exceptional promise for use in biomedical and pharmacological studies. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 37, p. 33, 2014. ISSN 2249-622X.
- 184 JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. 1993. ISBN 081211437X.
- 185 MARIZ, S. R. et al. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 372-378, 2006.
- 186 KILIC, S. C. et al. Acute colchicine intoxication complicated with extramedullary hematopoiesis due to filgrastim in a child. **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 36, n. 7, p. e460-e462, 2014. ISSN 1077-4114.
- 187 CHESON, B. D. et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. **Blood**, v. 87, n. 12, p. 4990-4997, 1996. ISSN 0006-4971.

- 188 MIRON, I. et al. Chemotherapy-related toxicity in childhood neoplasia. **Journal of BU ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 19, n. 4, p. 1070, 2014. ISSN 1107-0625.
- 189 JOBKE, B.; BLOEM, H. Bone marrow: chemotherapy. In: (Ed.). **Imaging of Complications and Toxicity following Tumor Therapy**: Springer, 2015. p.251-273.
- 190 BALALI-MOOD, M. et al. Toxicity evaluation of an antitumor marine compound (HESA-A) in mice and rats. **Journal of Birjand University of Medical Sciences**, v. 12, n. 1&2, 2005.
- 191 BERMAN, E. et al. Results of a randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. **Blood**, v. 77, n. 8, p. 1666-1674, 1991. ISSN 0006-4971.
- 192 WENDLAND, A. E.; FARIAS, M. G.; MANFROI, W. C. Volume plaquetário médio e doença cardiovascular. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 5, p. 371-8, 2009.
- 193 PRIYA, N. et al. Characterization of a unique dihydropyrimidinone, ethyl 4-(4'-heptanoyloxyphenyl)-6-methyl-3,4-dihydropyrimidin-2-one-5-carboxylate, as an effective antithrombotic agent in a rat experimental model. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 9, p. 1175-1185, Sep 2011. ISSN 0022-3573. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293699100007 >.
- 194 BLOOM JC, B. J. **Respostas Tóxicas do Sangue. In: Klaassen CD, Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)**. AMGC Editora, 2012. ISBN 8580551323.
- 195 MARTELLI, A. Síntese e metabolismo da bilirrubina e fisiopatologia da hiperbilirrubinemia associados à Síndrome de Gilbert: revisão de literatura. **Cep**, v. 13974, p. 345, 2012.
- 196 HARMEYER, J.; MARTENS, H. Aspects of Urea Metabolism in Ruminants with Reference to the Goat1. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 10, p. 1707-1728, 1980. ISSN 0022-0302.
- 197 GONZÁLEZ FELIX H. DÍAZ, S. S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- 198 KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic press, 2008. ISBN 0080568823.
- 199 FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, F. **Guidance for Industry - Single Dose Acute Toxicity for Pharmaceuticals**. : < www.fda.gov/cder/guidance/pt1.pdf>. Acesso em: 10 de junho de 2017. 1996.
- 200 BRIESE, E. Normal body temperature of rats: the setpoint controversy. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 22, n. 3, p. 427-436, 1998. ISSN 0149-7634.
- 201 HOCAYEN, P. D. A. S. Punção da veia caudal para análise glicêmica em ratos wistar: uma proposta de método de contenção. **UNINGÁ Review**, v. 15, n. 2, 2013. ISSN 2178-2571.

- 202 HEIDELBERGER, C. et al. Studies on fluorinated pyrimidines. **Cancer research**, v. 18, n. 3, p. 305-317, 1958. ISSN 0008-5472.
- 203 BERTAZZOLI, C. et al. Experimental systemic toxicology of 4'-epidoxorubicin, a new, less cardiotoxic anthracycline antitumor agent. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 79, n. 3, p. 412-422, 1985. ISSN 0041-008X.
- 204 OLIVEIRA, T. A importância do acompanhamento nutricional para pacientes com câncer. **Prática hospitalar**, v. 51, p. 150-154, 2007.
- 205 REECE, W. O. **Anatomia funcional e fisiologia dos animais domésticos**. Editora Roca, 2008. ISBN 8572417397.
- 206 REFINETTI, R. Variability of diurnality in laboratory rodents. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 192, n. 7, p. 701-714, 2006. ISSN 0340-7594.
- 207 LOWENTHAL, R.; MARSDEN, K. Myelodysplastic syndromes. **International journal of hematology**, v. 65, n. 4, p. 319-338, 1997. ISSN 0925-5710.
- 208 POWLES-GLOVER, N. et al. Assessment of toxicological effects of blood microsampling in the vehicle dosed adult rat. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 68, n. 3, p. 325-331, 2014. ISSN 0273-2300.
- 209 MOTTA, V. T. Bioquímica clínica: princípios e interpretações. **Editora: Médica Massau**, 2000.
- 210 BRUNS, D. E. et al. Evaluation of the IFCC-recommended procedure for serum aspartate aminotransferase as modified for use with the centrifugal analyzer. **Clinical chemistry**, v. 27, n. 1, p. 156-159, 1981. ISSN 0009-9147.
- 211 LIMA, A.; SOARES, J.; GRECO, J. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica-Técnica e Interpretação, Rio de Janeiro. 2001**: Guanabara Koogan.
- 212 NANJO, S. et al. In vivo imaging models of bone and brain metastases and pleural carcinomatosis with a novel human EML4-ALK lung cancer cell line. **Cancer Science**, v. 106, n. 3, p. 244-252, 2015. ISSN 1349-7006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/cas.12600>>.
- 213 SICOLI, D. et al. CCR5 Receptor Antagonists Block Metastasis to Bone of v-Src Oncogene-Transformed Metastatic Prostate Cancer Cell Lines. **Cancer research**, v. 74, n. 23, p. 7103-7114, 2014. ISSN 0008-5472.
- 214 HUANG, F.; MAZIN, A. V. A small molecule inhibitor of human RAD51 potentiates breast cancer cell killing by therapeutic agents in mouse xenografts. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100993, 2014. ISSN 1932-6203.
- 215 SVENSSON, J. **Optical spectroscopy in biomedicine-detection of embedded inclusions and in vivo pharmacokinetics**. Atomic Physics, Department of Physics, Lund University, 2007. ISBN 9162871285.
- 216 LOWNDES, S. **Blood interference in fluorescence spectrum: Experiment, analysis and comparison with intraoperativemeasurements on brain tumor** 2010.

- ²¹⁷ ZHENG, W. et al. Optimal excitation-emission wavelengths for autofluorescence diagnosis of bladder tumors. **International journal of cancer**, v. 104, n. 4, p. 477-481, 2003. ISSN 1097-0215.
- ²¹⁸ ROGGAN, A. et al. Optical properties of circulating human blood in the wavelength range 400-2500 nm. **Journal of biomedical optics**, v. 4, n. 1, p. 36-46, 1999.

ANEXO I

**Universidade de Brasília**Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 20 de novembro de 2015.

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA AGUDA, TOXICOLÓGICA DE DOSES REPETIDAS (28 DIAS) E TOXICOCINÉTICA DOS DERIVADOS DIIDROPIRIMIDINONAS (DHPM'S) COM ATIVIDADE ANTITUMORAL 4BC E 4P.", UnBDoC n.º 129356/2015, sob responsabilidade do Professor Maurício Homem de Mello foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Rattus norvegicus*: 228. A presente aprovação é válida pelo período de 16/11/2015 a 10/8/2017.

Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.