



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

SORAIA SANTANA DE MOURA

**Avaliação de toxicidade aguda e subaguda de um novo protótipo
candidato a fármaco cardiovascular**

**Goiânia
2012**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Soraia Santana de Moura

Título do trabalho: Avaliação da toxicidade aguda e subaguda de um novo protótipo candidato a fármaco cardiovascular

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

1. Identificação

2. Identificação



Nome do autor: Soraia Santana de Moura

Data: 08/fevereiro/2017

Título do trabalho
a fármaco cardiovascular

3. Informações

Concorda com

envio do(s) arquivo(s)

em formato digital

PDF da tese ou

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

SORAIA SANTANA DE MOURA

**Avaliação de toxicidade aguda e subaguda de um novo protótipo
candidato a fármaco cardiovascular**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profª Drª Marize Campos Valadares

**Goiânia
2012**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Moura, Soraia Santana de

Avaliação de toxicidade aguda e subaguda de um novo protótipo candidato a fármaco cardiovascular [manuscrito] / Soraia Santana de Moura. - 2012.

xvii, 118 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Marize Campos Valadares.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina (FM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Goiânia, 2012.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Análise toxicológica. 2. Derivado pirazolínico. 3. Fármaco cardiovascular. I. Valadares, Marize Campos, orient. II. Título.

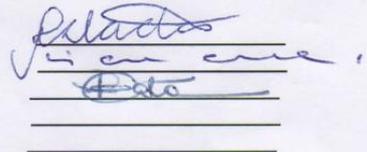
CDU 615

Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado realizada por **Soraia Santana de Moura**. Aos vinte oito dias do mês de novembro de 2012, às 08:00 horas, reuniu-se na Faculdade de Medicina/UFG, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA DE UM NOVO PROTÓTIPO CANDIDATO A FÁRMACO CARDIOVASCULAR", como parte de requisitos necessários à obtenção do título de Mestre, área de concentração **Patologia, Clínica e Tratamento das Doenças Humanas**. A Presidente da Comissão julgadora, **Profª. Drª. Marize Campos Valadares**, iniciando os trabalhos concedeu à palavra a candidata, para exposição em até 50 minutos do seu trabalho. A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir a candidata durante o prazo máximo de 30 minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata aprovada ou reprovada.

Banca Examinadora

Aprovado(a)/Reprovado(a)

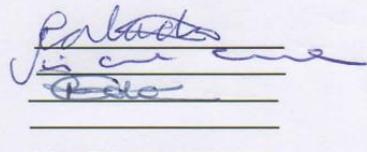
Profª. Drª. Marize Campos Valadares - Presidente
Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha – Membro
Profª. Drª. Renata Mazaro e Costa – Membro
Profª. Drª. Alane Pereira Cortez – Suplente
Profª. Drª. Eliane Martins Lima – Suplente



Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou a candidata **Soraia Santana de Moura** Habilitada () Não habilitada. Nada mais havendo a tratar, eu, **Profª. Drª. Marize Campos Valadares**, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

Assinatura:

Profª. Drª. Marize Campos Valadares - Presidente
Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha – Membro
Profª. Drª. Renata Mazaro e Costa – Membro
Profª. Drª. Alane Pereira Cortez – Suplente
Profª. Drª. Eliane Martins Lima – Suplente



A banca examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Fazer as considerações da Banca



Soraia Santana de Moura

Dedico este trabalho à minha família. Mãe e irmã, meu porto seguro, espelho e orgulho. Aos meus amigos que me tiram sorrisos e olhares de admiração e à minha orientadora Marize Campos Valadares que me ensinou que vírgulas são importantes, mas que ponto final é fundamental.

AGRADECIMENTOS

Acredito que escrever os agradecimentos seja um desafio tão grande quanto a redigir esta dissertação. Talvez pela limitação de linhas e espaço ou por simplesmente não saber, até então, como realmente agradecer a todos que colaboraram para o êxito deste trabalho.

Primeiramente, agradeço imensamente à minha orientadora Prof^a Dr^a Marize Campos Valadares pela oportunidade de desenvolver este trabalho e aprender todos os ensinamentos científicos que, generosamente, me repassou durante os últimos anos. Mas não somente por isso. Com carinho, registro aqui a minha gratidão à todos os ensinamentos de vida que, a duras penas ou não, me fizeram hoje uma pessoa mais forte e capaz.

Meus sinceros agradecimentos à minha amiga Polyana Rosa Benfica, responsável por me abrir as portas para este mundo grandioso da pesquisa e por me ensinar lições preciosas de pró-atividade e liderança.

À Prof^a Dr^a Alane Pereira Cortez, pelos ensinamentos científicos e sugestões valiosas referidas ao meu trabalho, mas também pela forma delicada e atenta que sempre me recebeu.

Com muito orgulho de tê-los ao meu lado, agradeço profundamente aos meus amigos queridos Marcelo Vieira, Alexandre Santos e Larissa Cleres. Vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e pela Soraia que hoje sou.

Aos estimados colegas de bancada, Renato Ivan de Ávila, Paulo Henrique Ávila, Bruna Rodrigues, Mariana Mota, Wanessa Andrade e demais companheiros, pelo apoio e troca de conhecimentos de sempre. E mais que isso. Meu 'muito obrigada' pela companhia, pelo incentivo e pelas risadas que fizeram com que todo esse processo se desse de forma mais leve e divertida.

Um agradecimento do tamanho dos sonhos dessas meninas que ainda vão abraçar o mundo: Lara Barroso Brito, aluna de iniciação e amiga, peça chave do desenvolvimento prático deste trabalho, a quem chamo carinhosamente de 'minha pupila'; Aline Carlos, amiga generosa, que me ofereceu ajuda quando precisei tanto e Thainá Rodrigues, juntas sempre. Obrigada pelo suporte.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Cunha, integrante da Faculdade de Farmácia da UFG, que generosamente nos cedeu as gaiolas metabólicas para o desenvolvimento dos testes com animais.

À Profª Draª Aline Carvalho Batista da Faculdade de Odontologia da UFG, pela parceria e orientação na análise histopatológica deste trabalho.

Em especial, registro aqui o meu agradecimento eterno à minha mãe, Lucília Santana Agapito, grande mulher, responsável por toda grande loucura que eu queira fazer um dia. Meu espelho, minha rota e a pessoa que mais incentiva os saltos que minha alma dá para fora do corpo, sonhando alto. E não menos importante, à minha irmã, Sarah Santana de Moura. Meu porto seguro, que finjo proteger, mas que é forte igual pedra e que, sobretudo, me aplaude quando ninguém mais o faz. Amo muito vocês. Obrigada por tudo.

Obrigada ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular da Faculdade de Farmácia (UFG) o qual tenho orgulho de fazer parte e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Às instituições CNPq, Funape, Finep, Capes e Universidade Federal de Goiás pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos a todos vocês. Meus olhos sempre estarão atentos quando estiverem por perto.

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1.	Fármacos inotrópicos	21
1.2.	Efeitos adversos	24
1.3.	Desenvolvimento de novos fármacos	27
1.4.	Estudos de segurança	30
1.4.1.	Testes de toxicidade	33
1.4.1.1.	<i>In vitro</i>	33
1.4.1.2.	<i>In vivo</i>	36
2.	OBJETIVOS	42
2.1.	Objetivo geral	42
2.2.	Objetivos específicos	42
3.	MÉTODOS	43
3.1.	Solubilização dos compostos	43
3.2.	MTT	43
3.3.	Azul de tripano	45
3.4.	Teste de captação do corante vermelho neutro (<i>NRU assay</i>)	46
3.4.1.	Cultivo celular e determinação da concentração inicial de plaqueamento	46
3.4.2.	Plaqueamento	47
3.4.3.	Exposição	48
3.5.	Animais	49
3.6.	Condições Ambientais e alimentação	50
3.7.	Observação dos animais	51
3.8.	Toxicidade oral aguda – Método de Classes (OECD 423)	52
3.8.1.	Seleção da dose	52
3.8.2.	Administração	52
3.9.	Toxicidade oral subaguda de doses repetidas – 28 dias (OECD 407)	53
3.9.1.	Seleção das doses	53
3.9.2.	Exposição à substância teste	54
3.9.3.	Condições do experimento	54
3.9.4.	Parâmetros hematológicos	56
3.9.5.	Parâmetros bioquímicos	56
3.9.6.	Histopatológico	57
3.10.	Micronúcleo (OECD 474)	57
3.10.1.	Seleção da dose	57
3.10.2.	Exposição à substância teste	57
3.11.	Análise estatística	59

4.	RESULTADOS	60
4.1.	Teste de MTT	60
4.2.	Azul de tripano	61
4.3.	Teste de captação do corante vermelho neutro	62
4.4.	Toxicidade oral aguda – Método de Classes (OECD 423)	64
4.5.	Toxicidade oral subaguda de doses repetidas – 28 dias (OECD 407)	68
4.5.1.	Triagem hipocrática	68
4.5.2.	Ganho de massa corporal	69
4.5.3.	Consumo de ração x produção de fezes	70
4.5.4.	Relação massa dos órgãos	72
4.5.5.	Parâmetros hematológicos	74
4.5.6.	Parâmetros bioquímicos	77
4.5.7.	Análise histopatológica	81
4.5.7.1.	Avaliação renal	81
4.5.7.2.	Avaliação hepática	88
4.6.	Micronúcleo (OECD 474)	93
5.	DISCUSSÃO	97
6.	CONCLUSÕES	106
7.	REFERÊNCIAS	107

TABELAS, FIGURAS E APÊNDICES

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Categorias-padrão de toxicidade aguda e valores de toxicidade aguda estimada que definem as respectivas categorias	35
Tabela 2	Percentual de inibição do crescimento de células tumorais HL60 frente à exposição a 10 µg/mL dos compostos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 pelo teste de MTT após 72 horas de exposição.	58
Tabela 3	Valores de IC ₅₀ obtidos pelos compostos LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 no ensaio de exclusão do corante azul de tripano com células K562 após 24 horas de exposição.	60
Tabela 4	Valores de IC ₅₀ encontrados no teste de captação do corante vermelho neutro, DL ₅₀ estimadas e peso molecular dos compostos em estudo.	62
Tabela 5	Sinais de toxicidade apresentados pelos animais no teste de toxicidade oral aguda – método de classes – OECD 423 baseada na triagem hipocrática proposta por Malone e Robichaud (1962).	64
Tabela 6	Parâmetros hematológicos dos grupos expostos ao composto LQFM021 e grupo controle no teste de toxicidade subaguda de doses repetidas por 28 dias.	73
Tabela 7	Parâmetros bioquímicos dos grupos expostos a ao composto LQFM021 e grupo controle no teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias.	77
Tabela 8	Principais alterações encontradas na análise histopatológica dos rins dos animais expostos à molécula LQFM021 no teste	81

de toxicidade oral aguda de doses repetidas por 28 dias.

Tabela 9	Principais alterações encontradas na análise histopatológica do fígado dos animais expostos à molécula LQFM021 no teste de toxicidade oral aguda de doses repetidas por 28 dias.	88
Tabela 10	Frequência de reticulócitos, reticulócitos micronucleados, eritrócitos maduros e eritrócitos maduros micronucleados (Q4) em sangue periférico de camundongos expostos a três diferentes doses (300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg) do composto LQFM021 por 48 horas (n=3 por grupo).	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação de Feldman para os agentes inotrópicos.	20
Figura 2	Estrutura química dos fármacos a) Milrinona e b) Cilostazol.	22
Figura 3	Principais efeitos adversos associados ao uso clínico de fármacos.	24
Figura 4	Fármacos em desenvolvimento pela <i>Pharmaceutical Research and Manufactures of America</i> para doenças do coração e ataque cardíaco no ano de 2011.	26
Figura 5	Compostos pirazolínicos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Ricardo Menegatti (Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal/LQFM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG).	27
Figura 6	Desenho esquemático do testes de MTT.	43
Figura 7	Desenho esquemático dos testes de azul de tripano.	44
Figura 8	Desenho esquemático da etapa de plaqueamento da suspensão de células 3T3 em placa de 96 poços no teste de captação do vermelho neutro.	45

Figura 9	Desenho esquemático da etapa de exposição das células 3T3 às oito concentrações seriadas da substância em estudo no teste de captação do vermelho neutro.	46
Figura 10	Desenho esquemático dos testes de captação do corante vermelho neutro.	47
Figura 11	Esquema de classificação de risco tóxico segundo sistema GHS a partir do teste de toxicidade oral aguda OECD 423.	51
Figura 12	Fotografia das gaiolas metabólicas utilizadas no teste de toxicidade oral subaguda com o composto LQFM021 ilustrando as condições ambientais, arquitetura e funcionalidade da gaiola metabólica no teste de toxicidade subaguda com ratas <i>Wistar</i> .	53
Figura 13	Desenho esquemático do experimento de micronúcleo em sangue periférico de camundongo após 48 horas de exposição ao composto LQFM021.	57
Figura 14	Viabilidade das células K562 frente à exposição aos compostos LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 no ensaio de exclusão do corante azul de tripano após 24 de exposição.	59
Figura 15	Viabilidade das células 3T3 frente à exposição aos compostos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 (602 a 4,7 µg/mL) no ensaio de captação do corante vermelho neutro (<i>NRU assay</i>).	61
Figura 16	Interpretação dos principais eventos tóxicos apresentados durante o teste de toxicidade oral aguda – método de classes (OECD 423) em camundongos (n = 3 por grupo) após exposição de uma única dose (2000 mg/kg) dos compostos LQFM020, LQFM021, LQFM023 e LQFM024 e suas respectivas classificações no sistema GHS.	65
Figura 17	Evolução ponderal dos grupos (n=5 por grupo) de animais expostos às diferentes doses do composto LQFM021 ao longo das semanas do teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias e dos grupos satélites por mais 14 dias após a exposição.	68
Figura 18	Relação do consumo de ração e a produção de fezes dos animais dos grupos de exposição (n=5 por grupo) à três	69

diferentes doses do composto LQFM021 e grupo controle ao longo das semanas do teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias e dos grupos satélites por mais 14 dias após a exposição.

Figura 19	Massa relativa dos órgãos isolados dos animais dos grupos expostos à três diferentes doses do composto LQFM021 e grupo controle no teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias (n=5 por grupo).	71
Figura 20	Parâmetros hematológicos relacionados à série vermelha dos grupos expostos à três diferentes doses do composto LQFM021 e grupo controle no teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias (n=5 por grupo).	72
Figura 21	Parâmetros hematológicos dos grupos expostos à três diferentes doses do composto LQFM021 e grupo controle no teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias (n=5 por grupo).	74
Figura 22	Parâmetros de série branca dos grupos expostos à três diferentes doses do composto LQFM021 e grupo controle no teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias (n=5 por grupo).	75
Figura 23	Parâmetros bioquímicos dos grupos expostos a três diferentes doses do composto LQFM021 e grupo controle no teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias (n=5 por grupo).	78
Figura 24	Imagens de corte histológico dos rins de animais expostos ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral subaguda por 28 dias.	82
Figura 25	Imagens de corte histológico dos rins de animais expostos ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral subaguda por 28 dias.	83
Figura 26	Imagens de corte histológico dos rins de animais expostos ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral subaguda por 28 dias.	84

Figura 27	Imagens de corte histológico dos rins de animais expostos ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral subaguda por 28 dias	85
Figura 28	Imagens de corte histológico dos rins de ratas expostas ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral subaguda por 28 dias.	86
Figura 29	Imagens de corte histológicos do fígado de animais expostos ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral subaguda por 28 dias.	89
Figura 30	Imagens de corte histológicos do fígado de animais expostos ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral subaguda por 28 dias.	89
Figura 31	Imagens de corte histológicos do fígado de ratas expostas ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral subaguda por 28 dias.	90
Figura 32	Fluorescência de dupla marcação com anti-CD71-FITC e iodeto de propídio de eritrócitos de sangue periférico de camundongos após 48 horas de exposição a três diferentes doses do composto LQFM021 (300 mg/mL, 600 mg/mL e 900 mg/mL) (n=3 por grupo) por citometria de fluxo.	93

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Asparato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CNS	Conselho Nacional de Saúde
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CSGMT	<i>Collaborative Study Group for the Micronucleus Test</i>
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica
DL ₅₀	Dose letal para 50% da população de animais
DMEM	<i>Dullbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
DVPS	Doenças vasculares periféricas
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético,
EMEA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GHS	<i>Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals</i>
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
HCM	Hemoglobina corpuscular média
IC	Insuficiência cardíaca

IC ₅₀	Concentração inibitória e 50% da população de células
ICCVAM	<i>Interagency Coordination Committee on the Validation of Alternative Methods</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
JEMS	<i>Environmental Mutagen Society of Japan</i>
LFTC	Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular
MN	Micronúcleo
MO	Medula óssea
MTT	Brometo de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio)
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS-BSA	<i>Phosphate buffered saline with bovine serum albumin</i>
PDEs	Fosfodiesterases
IP	Iodeto de propídio
PHRMA	<i>Pharmaceutical Research and Manufactures of America</i>
RC	<i>Registry of Citotoxicity</i>
RDW	<i>Red cell distribution width</i>
RET	Reticulócito
SFB	Soro fetal bovino
SP	Sangue periférico
UFG	Universidade Federal de Goiás
VCM	Volume corpuscular médio
WHO	<i>World Health Organization</i>

As doenças cardiovasculares estão entre as doenças de maior letalidade no Brasil e no mundo. Em contrapartida, vê-se um quadro redução das mortes atribuídas às enfermidades cardiovasculares devido, em grande parte, à produção de medicamentos capazes de controlar seus fatores de risco, porém, o vasto relato de efeitos colaterais e contraindicações persistem e interferem negativamente no quadro de morbimortalidade dessas doenças. Neste sentido, é imprescindível buscar novos fármacos mais efetivos e seguros. O processo de desenvolvimento de um novo fármaco exige numerosos estudos pré-clínicos que geram informações quanto ao seu perfil de segurança *in vivo*, determinantes para a tomada de decisão de se iniciar os estudos clínicos. Embora seja uma prática convencional, o uso de animais em pesquisas científicas deve ocorrer de forma consciente, considerando sempre as questões éticas de experimentação animal. Neste trabalho, investigou-se a citotoxicidade basal frente as células 3T3 de sete compostos pirazolínicos (LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024) e suas classificações no sistema GHS. Considerando que o composto LQFM021 demonstrou ser o mais eficaz nos ensaios realizados em paralelo de farmacodinâmica, investigou-se toxicidade oral aguda, subaguda e mutagenicidade do composto. Os resultados mostraram que os compostos possuem perfil de baixa citotoxicidade em linhagem basal (3T3). Os valores de DL₅₀ estimados para os compostos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 foram 548, 551, 568, 533, 457, 482, 565 mg/kg, respectivamente. Os compostos LQFM020, LQFM023 e LQFM024 foram classificadas na categoria 5 do sistema GHS e o composto LQFM021 foi classificado na categoria 4. A investigação toxicológica subaguda por 28 dias do composto LQFM021 mostrou que este composto não interferiu nos parâmetros metabólico, hematológico e bioquímico dos animais em nenhuma das doses de exposição. No entanto, o estudo histopatológico indicou potencial nefrotóxico e hepatotóxico deste composto e interferência sobre o processo de hematopoiese, entretanto, não apresentou potencial mutagênico. Diante do exposto, consideramos que o composto LQFM021 apresenta um baixo perfil de toxicidade e os estudos de continuidade devem ser encorajados.

Palavras-chave: Análise toxicológica. Derivado pirazolínico. Fármaco cardiovascular.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are among the diseases of higher mortality rates in Brazil and worldwide . In contrast, it is reducing deaths of cardiovascular diseases due, in large part, to the production of drugs that can control their risk factors, but the wide reporting of side effects and contraindications persist and interfere negatively in the context of mortality these diseases. In this point, it is necessary to develop new drugs more effective and safer. The process of development of new drug requires numerous preclinical studies that generate information regarding safety profile *in vivo* determinants for making the decision to start clinical trials. Although it is a conventional practice, the use of animals in scientific research should happen consciously, always considering the ethical issues of animal experimentation. In this study, we investigated the basal cytotoxicity against 3T3 cells of seven pyrazole compounds (LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, and LQFM023 LQFM024) and classified then in GHS system. Whereas the compound LQFM021 proved to be the most effective in the tests performed in parallel pharmacodynamic study, we investigated whether acute oral toxicity, subacute and mutagenicity of this compound. The results showed that the compounds have low cytotoxicity profile in basal cell line (3T3). The estimated LD50 values for compounds LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, and LQFM023 LQFM024 were 548, 551, 568, 533, 457, 482, 565 mg / kg, respectively. The compounds LQFM020, LQFM023 LQFM024 were classified in category 5 GHS system and LQFM021 was classified in category 4. The subacute toxicological research for 28 days LQFM021 the compound showed that this compound did not affect the metabolic, hematological and biochemical animal parameters in any of the doses of exposure However, the histopathology indicated hepatotoxic and nephrotoxic potential of this compound and interference in the process of hematopoiesis, but did not indicate mutagenic potential. . Given the above, we consider that the compound LQFM021 has a low toxicity profile and studies continue to be encouraged.

Keywords: Toxicological analysis. Pyrazole derivative. Cardiovascular drug.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são a maior causa de mortalidade no mundo, provocando 17,1 milhões de óbitos no ano de 2004 (WHO, 2004) e este quadro ainda persiste na atualidade. No Brasil, essa realidade não é diferente. As desordens do sistema circulatório ocupam a primeira posição das doenças que levam a óbito (33%) superando enfermidades como o câncer, problemas respiratórios crônicos e acidentes combinados (OMS, 2011). São responsáveis por cerca de 20% da taxa de mortalidade em indivíduos acima de 30 anos. Em 2009, segundo o Ministério da Saúde, ocorreram 962.931 mortes em indivíduos acima de 30 anos, levando as doenças cardiovasculares ao topo da lista de mortalidade no Brasil (MANSUR; AVARATO, 2012).

O termo “doenças cardiovasculares” agrupa diversas desordens do sistema cardíaco e vascular no organismo como a doença coronária cardíaca, o acidente vascular cerebral (AVC), a insuficiência cardíaca (IC), as doenças vasculares periféricas (DVPS), as doenças de causas congênitas e as doenças cardíacas reumáticas (LAMONTE, 2008). Na literatura, muitos fatores de risco estão associados à etiologia das doenças cardiovasculares. Idade, sexo e genética são fatores imutáveis mais comumente vinculados à sua evolução. Contudo, existem outros fatores relacionados ao estilo de vida, que desempenham um importante papel no desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Normalmente, indivíduos que possuem uma dieta pouco saudável, não praticam exercícios físicos e fumam, por exemplo, estão mais pré-dispostos a desenvolver algum problema cardíaco ou vascular. Soma-se a isso, a coexistência de doenças como a hipertensão e hiperlipidemia não-tratada, diabetes, e o sobrepeso/obesidade (GAZIANO, 2007). O estresse psico-social, *status* sócio-econômico e o histórico de uso de pílulas contraceptivas são outros fatores de risco envolvidos neste processo (KAYANI et al., 2010; OMS, 2006).

O comprometimento do sistema cardiovascular implica em risco de morte potencial e/ou iminente e o tratamento deve se basear em dois pilares: (i) no

tratamento não farmacológico dos fatores mutáveis (dieta, tabagismo, atividade física e medidas antiestresse) que visam, sobretudo, a melhora na qualidade de vida dos pacientes e (ii) no amplo tratamento farmacológico voltado à recuperação das desordens já estabelecidas (BOCCHI et al., 2009). Grande parte do suporte farmacológico cardiovascular baseia-se na melhoria da circulação sanguínea, aumentando a obtenção e o transporte de oxigênio para os tecidos. Este mecanismo é uma das funções vitais do organismo e um dos principais papéis do sistema cardiovascular (BALCELLS, 2005).

No sistema cardiovascular, a pressão sanguínea é regulada por contração e relaxamento do músculo liso vascular em associação com funções do endotélio vascular. A contração de miócitos cardíacos é controlada com precisão para bombear o sangue para fora do coração rumo a outras partes do corpo de acordo com as condições ambientais. Estes eventos na hemodinâmica são engenhosamente regulados por estimulação extracelular para a alteração da concentração de nucleotídeos cíclicos citoplasmáticos, os quais são determinados por um balanço entre sua produção e sua degradação por meio de enzimas fosfodiesterases (PDEs) (BENDER; BEAVO, 2006; COTE, 2004; GIACHINI et al., 2011). Neste sentido, os fármacos com atividade inotrópica (relativo à força de contração) se destacam, principalmente, nos casos de insuficiência cardíaca e vascular (NIEMINEN, et al., 2005).

1.1. FÁRMACOS INOTRÓPICOS

O inotropismo e o cronotropismo representam força de contração e a frequência cardíaca, respectivamente. Assim, quando aumentam o desempenho cardíaco, diz-se que o inotropismo ou o cronotropismo é positivo e, quando menor, negativo. Os agentes inotrópicos positivos têm por finalidade aumentar a contratilidade miocárdica e o volume da ejeção, possibilitando uma maior eficácia cardíaca (SANTOS, 2008).

Os fármacos com atividade inotrópica melhoram o aporte hemodinâmico a partir da modulação de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), íons e cálcio

intracelulares (LEHTONEN, 2004). Segundo a classificação de Feldman (1993), os fármacos inotrópicos podem ser classificados em 4 classes, como ilustra a Figura 1:

Figura 1: Classificação de Feldman para os agentes inotrópicos. Fonte: Feldman (1993) adaptado pela autora.

Classificação de Feldman para os agentes inotrópicos	
Classe I:	Agentes que aumentam adenosina monofosfato cíclico intracelular (AMPc) (agonistas β -adrenérgicos, inibidores de fosfodiesterase)
Classe II:	Agentes que afetam íons, bombas e canais de sarcolema (digoxina)
Classe III:	Agentes que modulam os mecanismos de cálcio intracelular pela liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático ou por incremento da sensibilização das proteínas contráteis ao cálcio
Classe IV:	Agentes que têm múltiplos mecanismos de ação (pimobendan, vesnarinone)

Os inibidores de PDE demonstram ação vasodilatadora, cardiotônica, anti-agregante plaquetária e de inibição da proliferação vascular. As fosfodiesterases (PDEs) são uma superfamília de enzimas que catalizam a hidrólise de nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc aos seus correspondentes inativos. Os nucleotídeos cíclicos atuam sobre a regulação de funções celulares importantes e, portanto, a inibição de PDE pode oferecer vários benefícios terapêuticos (DAL-PIAZ ; GIOVANNONI, 2000).

Atualmente, são conhecidas cerca de 11 famílias diferentes de isoenzimas PDEs com características diferentes quanto à especificidade de substrato (AMPc e GMPc), propriedades cinéticas e distribuição tecidual. Os inibidores de PDE 3 e 4 são utilizados, atualmente, no tratamento das doenças cardiovasculares e asma, provavelmente por atuarem sobre a concentração de AMPc intracelular (SOUNESS et al., 2000; EVANS, 1989). PDE 3, diferentemente da PDE 4, também pode ser inibida por GMPc (MUSIALEK et al., 2000). Os inibidores de PDE 5, tais como dipiridamol e sildenafil, aumentam a concentração intracelular de GMPc e são utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares e disfunções sexuais, respectivamente (WANG et al., 2001). Os bloqueadores dos canais de cálcio promovem o aumento do fluxo sanguíneo local e a redução da pressão arterial e

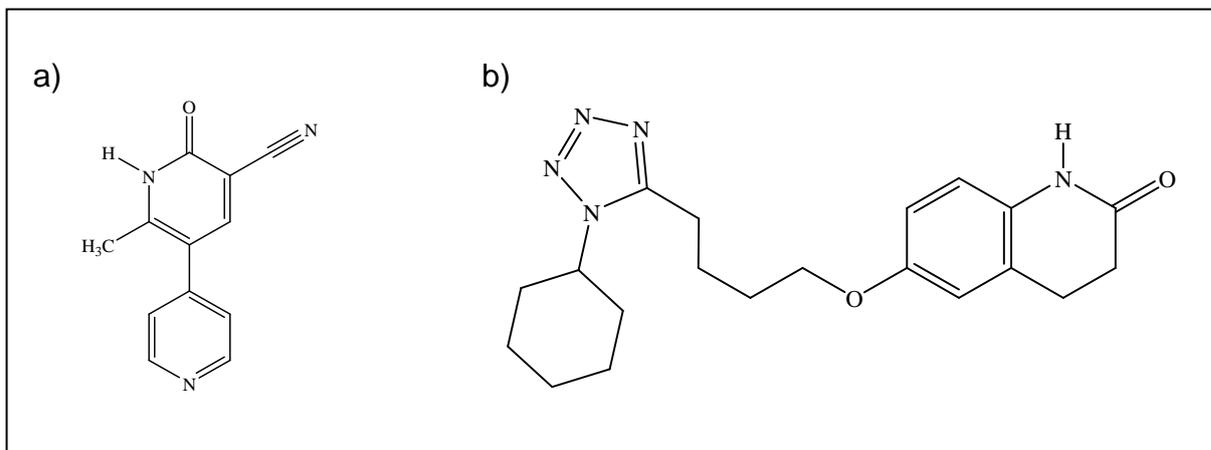
venosa central (MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2010). O efeito inotrópico desses agentes sugere valioso uso clínico nas doenças cardiovasculares, seja como terapia primária ou coadjuvante (CONTI et al., 1995).

Para o tratamento, por exemplo, da insuficiência cardíaca congestiva, incluindo os estados de baixo débito cardíaco subsequentes à cirurgia, é utilizado um fármaco denominado milrinona (Figura 2a) (BALCELLS, 2005). A milrinona é um agente inotrópico positivo e vasodilatador, possuindo pouca atividade cronotrópica (referente à frequência cardíaca). Em concentrações adequadas, atua como um inibidor seletivo da enzima PDE 3, aumentando a concentração de AMPc na musculatura cardíaca e vascular. Em consequência, ocorre aumento da concentração de cálcio intracelular ionizado e da força de contração do miocárdio (ARBEUS, 2009; HARRISON et al., 1986; SHIPLEY et al., 1996; THACKRAY, 2000). Em contrapartida, por ser um vasodilatador, a milrinona pode causar redução da pressão arterial sistêmica, disritmia cardíaca e vasodilatação excessiva. Alguns estudos sugerem que, em pacientes com severa insuficiência cardíaca, este fármaco pode não induzir efeito inotrópico positivo apesar da melhora das condições hemodinâmicas (BALCELLS, 2005). Além disso, efeitos adversos como trombocitopenia, reações gastrointestinais e hepatotoxicidade já foram relatados (AROSON, 2005).

Outro agente com grande potencial inibidor de PDE 3 e vasodilatador é o cilostazol (Figura 2b). Atualmente, este fármaco é usado no tratamento da claudicação intermitente em pacientes diabéticos e na doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) (REGENSTEINER et al., 2002) Em estudos realizados por Rosa et al. (2006), o uso do cilostazol é recomendado no tratamento da aterosclerose por apresentar interferência positiva em vários momentos do processo aterosclerótico. Com a supressão da degradação da AMPc e consequente aumento de sua concentração nas plaquetas e nos vasos sanguíneos, a agregação plaquetária fica diminuída, atribuindo ao cilostazol a atividade antitrombótica e antiagregante plaquetária (KIMURA et al., 1985; ROSA et al., 2006). No entanto, assim como a milrinona, o cilostazol apresenta alguns efeitos indesejados. Os mais frequentes incluem cefaleia, taquicardia, palpitações, fezes amolecidas e diarreia (SORKIN; MARKHAM, 1999) sendo contraindicado na insuficiência cardíaca congestiva em

pacientes com ejeção do ventrículo esquerdo menor que 40% (MUKHERJEE; YADAV, 2001; REGENSTEINER; HIATT, 2002).

Figura 2: Estrutura química dos fármacos a) Milrinona e b) Cilostazol.



Desta maneira, a escolha dos fármacos ou a combinação deles na terapêutica das doenças cardiocirculatórias deve contemplar uma análise prévia do quadro clínico do paciente e considerar, de forma expressiva, os efeitos adversos atribuídos a eles. De forma geral, todos os agentes inotrópicos, assim como as demais classes de fármacos cardiovasculares, apresentam efeitos colaterais indesejáveis e contraindicações diversas. Este fato limita a sua indicação a uma parcela dos pacientes que apresentam enfermidades cardiocirculatórias (BOCCHI et al., 2009).

1.2. EFEITOS ADVERSOS

Assim como os efeitos colaterais relatados ao uso da milrinona, cilostazol e demais fármacos cardiovasculares, mais de 90% das reações adversas clínicas já foram associadas aos medicamentos mais comumente utilizados, tais como analgésicos, anticoagulantes, antitumorais, antimicrobianos, antidiabéticos, diuréticos e corticóides. Na maioria dos casos, eles se relacionam com efeitos exagerados no alvo primário, dosagem, uso prolongado ou permanente, citotoxicidade, em particular hepatotoxicidade e toxicidade da medula óssea, seja do composto em si ou por seus metabólitos ativos. Podem ocorrer, também, alterações

individuais, polimorfismos ou diferenças na expressão enzimática, além é claro, de efeitos idiossincráticos associados a alvos moleculares específicos. A Figura 3 mostra os principais efeitos adversos associados ao uso clínico de fármacos e, em destaque, os que afetam o sistema cardiovascular: arritmias, hipotensão, hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva e angina e/ou dor no peito (WHITEBREAD et al., 2005).

É importante ressaltar que a gravidade dos efeitos colaterais frequentemente relatados varia bastante e vão desde aqueles que podem oferecer risco de morte (arritmia) àqueles que são apenas inconvenientes toleráveis (mínimas reações na pele). A gravidade permitida do perfil de efeitos colaterais à qualquer fármaco depende da sua indicação (WHITEBREAD et al., 2005). No âmbito dos fármacos cardiovasculares, o vasto relato de efeitos colaterais e contraindicações, juntamente com as questões relativas aos fatores de risco, interferem negativamente no quadro de morbimortalidade global, principalmente nos países em desenvolvimento, pois apresentam altos índices de doenças crônico-degenerativas não transmissíveis (EYKEN; MORAES, 2009).

Atualmente, os países em desenvolvimento são responsáveis por 76% dos óbitos por doenças cardiovasculares. De acordo com as projeções, estima-se que em 2020, o número de óbitos provocados por doenças cardiovasculares atinja valores entre 35 e 40 milhões em todo o mundo. Este fato representa umas das questões de saúde pública mais relevantes no momento, gerando um custo associado absurdamente alarmante (STEFANINI et al., 2006).

Em contrapartida, vê-se um quadro de redução das mortes atribuídas às enfermidades cardiovasculares devido, em grande parte, à produção de medicamentos capazes de controlar os fatores de risco como a pressão arterial e os níveis de colesterol ou no tratamento das doenças associadas, ratificando, desta forma, a busca por novos medicamentos que se apresentem mais efetivos, seguros, com menos efeitos colaterais e menos contraindicações quando comparados aos disponíveis atualmente no mercado (PHRMA, 2011).

Figure 3: Principais efeitos adversos associados ao uso clínico de fármacos e, em destaque (em vermelho), os cardiovasculares, Fonte: Whitebread et al. (2005) adaptado pela autora.

Principais efeitos adversos associados ao uso clínico de fármacos		
TGI	<u>Pericardite</u>	Ginecomastia
Hepatite e/ou dano hepatocelular	<u>Cardiomiopatia</u>	Síndrome de Addison
Constipação		Galactorreia
Diarreia	Metabólica	
Náuseas / vômitos	Hiper e hipoglicemia	Neurológico
Ulceração	Hiper e hipocalemia	Convulsões
Pancreatite	Acidose metabólica	Tremores
Boca seca	Hiperuricemia	Desordens de sono
	Hiponatremia	Neuropatia periférica
Hematologia		Dor de cabeça
Agranulocitose	Respiratória	Efeitos extrapiramidais
Anemia hemolítica	Obstrução das vias aéreas	
Pancitopenia	Infiltrações pulmonares	Psiquiátricos
Trombocitopenia	Edema pulmonar	Delírio, convulsão
Anemia megaloblástica	Depressão respiratória	Depressão
Coagulação e/ou hemorragia	Congestão Nasal	Alucinação
Eosinofilia		Sonolência
	Musculoesquelética	Esquizofrenia e/ou
Dermatologia	Mialgia e/ou miopatia	paranoia
Eritemas	Rabdomiólise	Distúrbios do sono
Hiperpigmentação	Osteoporose	
Fotodermatite		Oftálmico
Eczema	Renal	Visão distorcida
Urticária	Nefrite	Catarata
Acne	Nefrose	Neurite ótica
Alopecia	Necrose tubular	Retinopatia
	Disfunção renal	Glaucoma
Cardiovascular	Disfunção da bexiga	Opacidade da córnea
<u>Arritmias</u>	Disfunção da bexiga	
<u>Hipotensão</u>	Nefrolitíase	Otológico
<u>Hipertensão</u>		Surdez
<u>Falência Cardíaca Congestiva</u>	Endócrino	Desordens vestibulares
<u>Angina e/ou dor no peito</u>	Disfunção tireoidiana	
	Disfunção sexual	

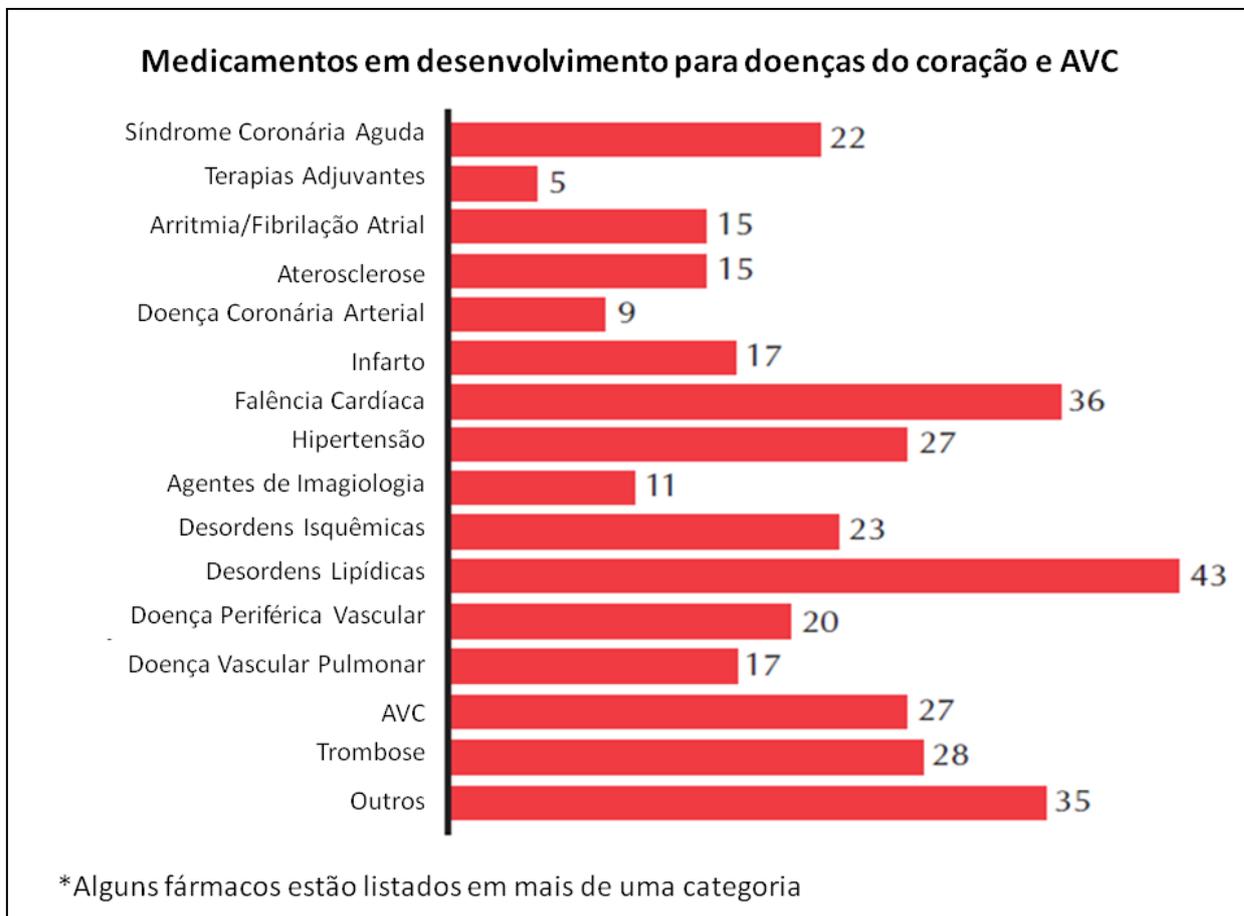
1.3. DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Nos últimos anos, o mercado farmacêutico mundial cresceu consideravelmente devido ao aumento da demanda por novos medicamentos. A previsão para as vendas globais do mercado farmacêutico é de crescimento de 4 a 7% sobre o crescimento anual até 2013, atingindo 1,3 trilhão de dólares até 2020. Com isso, a indústria farmacêutica se vê desafiada a aumentar sua produtividade em pesquisa e desenvolvimento de novos protótipos farmacológicos para capitalizar as oportunidades (PHRMA, 2010).

Exemplo disso, no ano de 2011, a *Pharmaceutical Research and Manufactures of America* (PHRMA) publicou uma lista com 299 candidatos a protótipos de fármacos para o tratamento de doenças do coração e acidente vascular cerebral, os quais se encontram em fase clínica ou em curso para aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Dentre esses, 27 candidatos se encontram em pesquisa para o tratamento da hipertensão (Figura 4), sendo a quarta classe mais pesquisada de fármacos para o tratamento de doenças que acometem o sistema cardiovascular (PHRMA, 2011).

Neste mesmo ano, 35 novos medicamentos desenvolvidos pela *America's Biopharmaceutical Research* foram aprovados pelo FDA, sendo três deles para o tratamento de doenças cardiovasculares. Destes, um foi desenvolvido para o tratamento da síndrome coronária aguda e um para prevenção da trombose de veias profundas (PHRMA, 2012).

Figure 4: Fármacos em desenvolvimento pela *Pharmaceutical Research and Manufactures of America* para doenças do coração e ataque cardíaco no ano de 2011 (PHRMA, 2011). Adaptado pela autora.

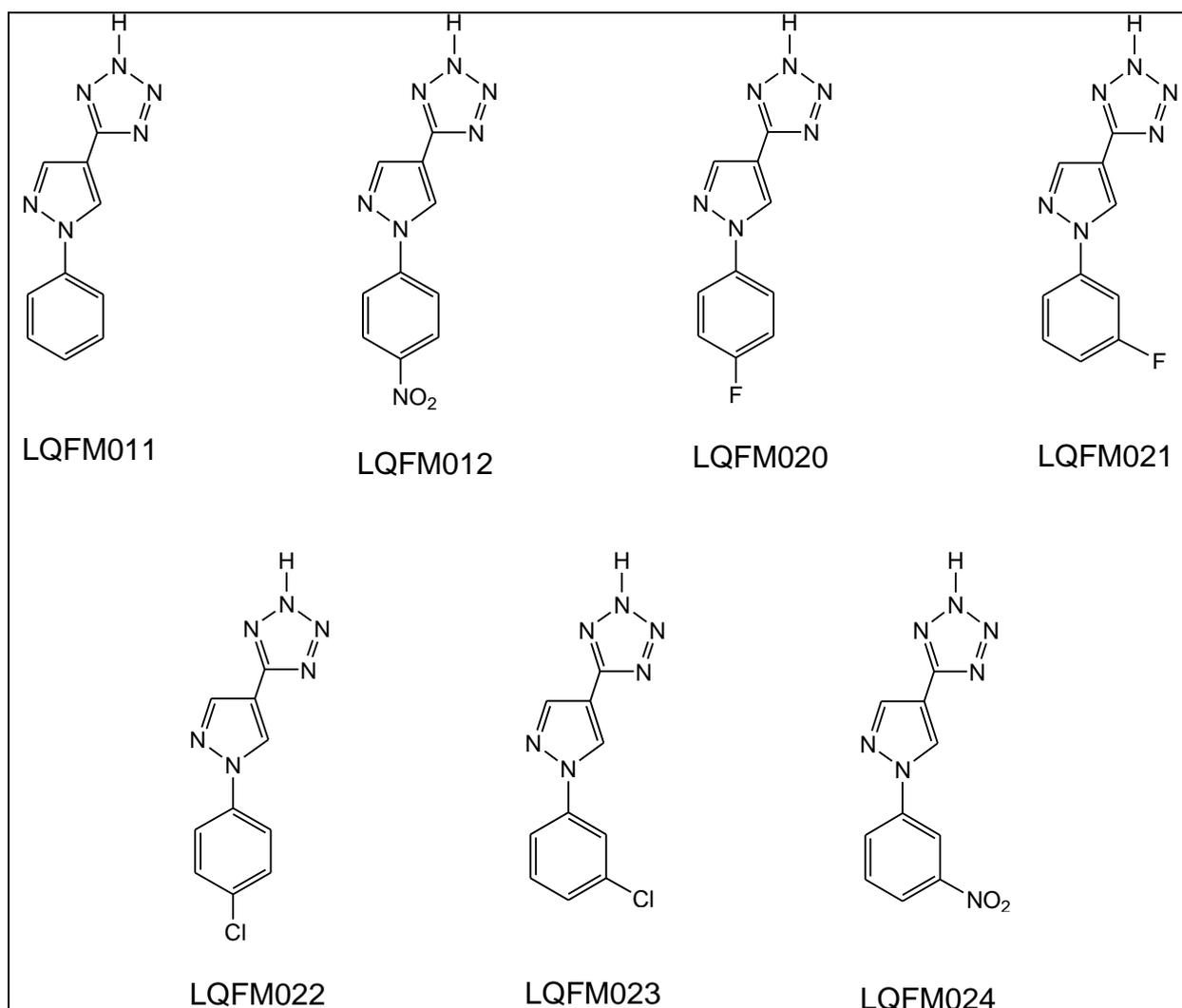


Oportunamente, muitos fármacos têm sido desenvolvidos nessa promessa de limitar os efeitos colaterais tóxicos observados na geração de fármacos anterior. Uma parcela considerável dos fármacos cardiovasculares em desenvolvimento tem sido voltada à ideia de que diferentes isoenzimas PDEs, por terem sequências distintas de regulação e sítios catalíticos, possam vir a ser agentes terapêuticos capazes de modular nucleotídeos cíclicos específicos em um número limitado de tipos celulares (BEAVO et al., 1994).

Nesta perspectiva, o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Ricardo Menegatti (Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal/LQFM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG), desenvolveu sete compostos pirazólicos à partir dos modelos estruturais moleculares dos fármacos milrinona e cilostazol

(Figura 5). Os compostos pirazolínicos, ou pirazóis, são substâncias de origem sintética que possuem em sua estrutura um anel pirazolínico, que é um heterociclo de cinco membros com dois átomos de nitrogênio adjacentes e três de carbono. Vários derivados pirazóis têm demonstrado atividade em diferentes classes farmacológicas, das quais destacam-se: anti-inflamatória (ELGUERO et al., 2002; SZABO et al., 2008), antibacteriana e antifúngica (TANITAME et al., 2004; TANITAME et al., 2005), hipoglicêmico (CHO et al., 2009; DUGI et al., 2009), anti-hiperlipidêmico (MOMOSE et al., 2001), anti-angiogênico (ABADI et al., 2003) e antitumoral (BALBIA et al., 2011). Isto ocorre porque o anel pirazolínico representa uma escolha vantajosa na síntese de compostos farmacêuticos, pois apresenta atividade variada e um bom perfil de segurança (MICHAELIDES, 2010).

Figura 5: Compostos pirazolínicos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Ricardo Menegatti (Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal/LQFM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG).



Dentre os compostos pirazolínicos sintetizados na UFG, o composto denominado LQFM021, apresentou excelentes resultados como fármaco relaxante vascular. No estudo, o relaxamento provocado em artérias isoladas de ratos ocorreu com participação das vias do GMPc e AMPc e apesar dos mecanismos de ação não estarem completamente definidos, os resultados preliminares apontam que esse composto é um possível inibidor de PDE 3 (MARTINS, 2012). No entanto, a toxicidade deste composto ainda não foi estudado.

É importante considerar que a inovação em fármacos e medicamentos representa um processo de características multidisciplinares, demandando competências em diversas áreas do conhecimento. O processo de desenvolvimento de um novo fármaco associa-se, normalmente, a uma sequência hierárquica de estudos onde uma imensa gama de ferramentas é empregada nos vários estágios. Neste âmbito, destaca-se a identificação de alvos farmacológicos, a seleção inicial de compostos bioativos, a caracterização de compostos protótipos e seus metabólitos, o esclarecimento do mecanismo de ação, seu perfil farmacocinético e sobretudo a segurança de utilização do composto (PHRMA, 2010).

1.4. ESTUDOS DE SEGURANÇA

De 1991 a 2000, apenas 11% dos protótipos de novos fármacos foram registrados com sucesso (KOLA; LANDIS, 2004). As questões relacionadas com a toxicidade são atribuídas a aproximadamente 30% das perdas, sendo a falta de eficácia clínica outra grande responsável do insucesso do lançamento de novos medicamentos durante os anos 90. Qualquer descoberta na fase de avaliação toxicológica de um novo fármaco pode interferir no curso do seu desenvolvimento, aumentando os custos associados ou mesmo inviabilizando a sua produção em decorrência dos efeitos adversos intoleráveis (WHITEBREAD et al., 2005).

A liberação de um novo fármaco para uso assistencial exige numerosos estudos pré-clínicos (modelos celulares e animais) que geram informações quanto ao seu perfil toxicológico, carcinogênico, de tolerância e cinético capazes de predizer o seu comportamento *in vivo* antes de iniciar os estudos clínicos em seres humanos (ICH, 1996; MROSS; MARZ, 2001). A Resolução CNS 251/97 promulga que os

resultados obtidos em ensaios pré-clínicos devem, essencialmente, justificar a próxima etapa de ensaios clínicos de um fármaco promissor (GOLDIM, 2007).

A premissa máxima do uso dos ensaios pré-clínicos no processo de desenvolvimento de novos fármacos é recolher o maior número de informações sobre o potencial de uma nova substância e/ou seus metabólitos em causar danos à saúde humana ou a órgãos específicos. Ademais, eles fomentam dados para identificação da toxicocinética e da dose-resposta de um composto, a fim de rotulá-lo frente a sua letalidade e toxicidade como estabelecido pela legislação (BRASIL, 2010; BLAAUBOER, 2003; COECKE et al, 2005).

Para tal, a investigação toxicológica pré-clínica é conduzida, em sua maior parte, por meio de modelos animais (mamíferos roedores e não roedores) criados em laboratório. Embora seja uma prática convencional, o uso de animais em pesquisas científicas deve acontecer de forma consciente, abraçando sempre as questões éticas de experimentação animal (BRASIL, 2010; SCHECHTMAN, 2002).

Aliás, essa preocupação não é hodierna. Na década de 50, Russel e Burch publicaram o livro "*The Principles of Humane Experimental Technique*" (1959) onde estabeleceram o princípio dos três "Rs" da pesquisa em animais: *Replace* (substituir), *Reduce* (reduzir) e *Refine* (refinar) com a proposta de adequar a experimentação animal em estudos científicos, no sentido de humanizá-la (BALLS, 1994; PURCHASE, 1998; RUSSEL; BURCH, 1959; SCHECHTMAN, 2002).

Lamentavelmente, no Brasil, ainda não foi definida uma legislação efetivamente regulamentada quando à utilização de animais para fins didáticos e de pesquisa. Entretanto, a sociedade científica, juntamente com a supervisão dos comitês de ética voltados para essa questão, valem-se do princípio dos três "Rs" para se nortear nos estudos que demandam o uso de animais (PAIVA; MAFFILI; SANTOS, 2005).

Neste sentido, métodos alternativos tal qual o cultivo de células, modelos matemáticos e simuladores estão sendo convenientemente desenvolvidos e validados com o intuito de substituir ou, pelo menos, reduzir a quantidade de animais nos estudos, sobretudo de segurança (PAIVA; MAFFILI; SANTOS, 2005).

Sabe-se que a substituição por completo ainda não é possível, todavia, os modelos alternativos propostos atualmente reduzem consideravelmente o número de animais nos experimentos e, além disso, o planejamento criterioso dos ensaios, quando cimentados nos preceitos éticos supracitados, aprimora o uso dos animais nas pesquisas científicas (VALADARES, 2006).

Sob essa perspectiva, Spielmann et al. (1999) desenvolveram um método de citotoxicidade basal utilizando linhagens celulares para estimar as doses iniciais nos testes de toxicidade aguda oral em roedores. A partir dos dados do *Registry of Citotoxicity* (RC), foi possível prever, por meio de sistemas *in vitro*, a DL₅₀ (dose letal em 50% da população) de diversas substâncias e direcionar as doses de início dos testes de toxicidade oral aguda *in vivo*, e posteriormente, padronizá-las em categorias GHS de risco no *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* (ONU, 2009).

Em 2002, a *Interagency Coordination Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) definiu e validou métodos *in vitro* para estudos da toxicidade aguda oral que contemplou o refinamento e a substituição dos animais em estudos de segurança *in vivo*, aplicáveis também à toxicidade dérmica e inalatória (ICCVAM, 2001).

Visando orientar os estudos pré-clínicos de segurança, a ANVISA elaborou um guia que reúne os principais testes de toxicidade baseados nos documentos das agências regulamentadoras internacionais (FDA e EMEA) e das instituições de interesse na área (ICH, OECD, NCL, WHO). Este guia é composto do teste de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local, carcinogenicidade e toxicocinética. Dessa forma, a execução dos testes se dá de forma racional, evitando duplicidade e o uso desnecessário de animais sem comprometer a obtenção e a confiabilidade das informações referentes à segurança da substância testada (BRASIL, 2010).

1.4.1. Testes de toxicidade

1.4.1.1. *In vitro*

Os testes *in vitro* baseiam-se no uso de linhagens celulares basais para avaliar o perfil de toxicidade de substâncias. Os mais eficientes são capazes de analisar parâmetros associados a eventos bioquímicos que sustentam a viabilidade celular ou evidenciam mudanças na integridade da membrana (LEIST; JÄÄTTELÄ, 2001; RISS; MORAVEC, 2004). A redução da atividade celular após a um período de exposição quando comparado ao controle é o resultado da citotoxicidade que avalia o grau de morte celular. Nessas circunstâncias, é importante considerar a distinção prática entre medida de citotoxicidade e medida de viabilidade celular.

O termo citotoxicidade foi definido por Ekwall (1983) como sendo os efeitos adversos resultados da interferência em estruturas e/ou processos essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou funções celulares. No entanto, muitas vezes, ele tem assumido um significado amplo e mal definido no processo de descoberta de um novo fármaco. Para sistemas de cultivo de células, um composto é considerado citotóxico se interferir na adesão celular, alterar significativamente a morfologia, afetar negativamente o crescimento celular ou causar a morte da célula (HORVATH, 1980).

A viabilidade celular está relacionada com metabolismo e produção de adenosina trifosfato (ATP), onde a atividade é proporcional ao número de células viáveis. Dessa forma, durante a condução dos experimentos *in vitro* de toxicologia, a viabilidade celular e a citotoxicidade são inversamente proporcionais. Isto é, a medida de viabilidade é alta quando a medida de citotoxicidade é baixa (RISS; MORAVEC, 2004)

A diferença fundamental entre as duas abordagens se torna pronunciada dependendo da duração da exposição das células a um composto químico. Por exemplo, exposições de curta duração (4 horas ou menos) podem causar efeitos adversos no metabolismo ou no conteúdo de ATP antes das mudanças mensuráveis de integridade de membrana. Exposições prolongadas (24 horas ou mais), particularmente após a necrose primária precoce, podem subestimar a citotoxicidade

devido à degradação da atividade do marcador enzimático depois da liberação para o ambiente extracelular (RISS; MORAVEC, 2004).

Visando abranger os possíveis alvos *in vivo* de um novo composto químico, uma série de ensaios *in vitro* baseados no perfil de citotoxicidade em diferentes linhagens celulares (basais e tumorais, resistentes ou não) são propostos durante a triagem de seleção de fármacos potenciais (BUGELSKI et al., 2000; EVANS et al., 2001).

Atualmente, o método de MTT de redução do tetrazólio (3 - (4,5-dimetiltiazol) -2,5 - difeniltetrazólio) tem sido amplamente utilizado para estimar a viabilidade das células com base em parâmetros do metabolismo celular, sendo considerado o método referência na triagem de novos fármacos (MOSMANN, 1983). O MTT é um ensaio relativamente simples, realizado em microplacas de 96 poços, que avalia a inibição/proliferação celular mediante exposição a um composto desconhecido. A citotoxicidade é obtida pela medida colorimétrica proporcional à quantidade de cristal de formazam, azulados e insolúveis, resultantes da redução metabólica do corante tetrazólio em células com atividade mitocondrial íntegra (ALLEY et al., 1988; BERRIDGE et al., 2005).

Na triagem farmacológica de grande escala utilizada pelo *National Cancer Institute* (NCI), o MTT é um dos testes preconizado para avaliar o desempenho de um novo fármaco após exposição de 72 horas a uma única concentração pré-estabelecida, sobre um painel que apresenta 60 diferentes linhagens celulares tumorais, entre elas a derivada leucêmica HL60 (SHOEMAKER, 2006). No processo de seleção de fármacos antitumorais, um composto puro é considerado promissor quando apresenta IC_{50} (inibição do crescimento em 50% da população de células) menor que 10 μ M (WHITEBREAD et al., 2005). De acordo com Bugelski et al. (2000), na triagem farmacológica é preciso adotar valores de IC_{50} entre 0,01 e 10 μ M como *cut-off* para definir substâncias de alto poder citotóxico.

Esta abordagem é pertinente durante o processo inicial de seleção de fármacos de alto rendimento e se baseia no IC_{50} dos principais fármacos já estabelecidos na terapêutica do câncer. No entanto, para avaliar o mecanismo de morte celular, é interessante investigar o comportamento concentração-resposta das

substâncias desconhecidas a fim de melhor caracterizar os seus efeitos tóxicos. Neste sentido, o uso de ensaios com concentrações decrescentes adicionais é bastante empregado (XIA et al., 2008)

A linhagem celular K562 se torna muito interessante como modelo de estudo pela resistência que essas células apresentam aos protocolos convencionais de quimioterapia antineoplásica (COOPER, 2001; MARTINS et al., 1997). Geralmente, células K562 são resistentes a todos os quimioterápicos nas primeiras 24 horas, em estudos *in vitro* (MARTINS et al., 1997). Uma metodologia comumente utilizada para avaliar a resposta de fármacos antitumorais promissores é a exclusão do corante azul de tripano que avalia, essencialmente, a integridade da membrana celular.

Nos estudos de segurança, para identificar o comportamento tóxico de novos compostos químicos frente à células de metabolismo basal, o teste de captação do corante vermelho neutro com células 3T3 é, atualmente, a metodologia *in vitro* de referência das principais agências regulatórias. Além disso, os efeitos letais de compostos desconhecidos sobre células de mamíferos são capazes de prever a DL₅₀ (dose letal em 50% da população em estudo) da substância testada e dessa forma, direcionar a dose inicial dos futuros testes de toxicidade oral aguda em roedores (ICCVAM, 2001).

O teste de captação do vermelho neutro é baseado na habilidade das células viáveis em incorporar e se ligar ao corante vermelho neutro. Isto ocorre porque este é um tipo de corante catiônico fraco com capacidade de ultrapassar as membranas plasmáticas por difusão não iônica (transporte passivo) e se acumular nos lisossomos, se ligando aos sítios aniônicos na matriz lisossomal. Quando expostas a um composto químico, as células podem sofrer alterações na membrana plasmática e/ou na membrana dos lisossomos, resultando no decréscimo da captação e ligação do corante vermelho neutro aos sítios aniônicos lisossomais, tornando-se possível a distinção entre as células viáveis e as não-viáveis. Uma substância tóxica, independentemente do local ou mecanismo de ação, irá interferir neste processo, o que resulta na redução da taxa de crescimento tal como no número de células. A citotoxicidade é obtida a partir da redução da captação do corante vermelho neutro de forma concentração-dependente após a exposição e fornece, assim, um valor de IC₅₀ específico (ICCVAM, 2006).

Entretanto, o teste de captação do vermelho neutro não fornece informações sobre os efeitos tóxicos dos respectivos metabólitos ativos. O conhecimento sobre as vias metabólicas e produção de metabólitos ativos de um composto desconhecido é um passo crucial na interpretação farmacológica e toxicológica e deve ser extensivamente estudada nas fases preliminares de desenvolvimento (COECKE et al., 2006).

Uma forte correlação entre a citotoxicidade *in vitro* e a tolerância *in vivo* já é atualmente estabelecida, o que reduz consideravelmente os gastos e o tempo durante o desenvolvimento de novos compostos (BENBOW et al., 2010). Uma vez alcançada a correlação entre a citotoxicidade *in vitro* e a letalidade ou dano a algum órgão específico, torna-se possível identificar, preliminarmente, compostos farmacêuticos com menor potencial citotóxico com maiores níveis de segurança nos estudos de toxicidade em roedores, reduzindo, assim, o número de animais nos testes pré-clínicos *in vivo* futuros (GOODWIN et al., 2012).

O ensaio de captação do vermelho neutro com células 3T3 recomendado pelo ICCVAM (2006) já é uma metodologia padronizada e validada no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular – LFTC - onde foram realizados todos os experimentos descritos neste trabalho.

1.4.1.2. *In vivo*

A avaliação toxicológica *in vivo* de um composto químico pode ser dividida basicamente em 4 estágios de acordo com o tempo de exposição: toxicidade aguda (24 horas), toxicidade subaguda de doses repetidas (até 30 dias) e crônica (90 dias ou mais) (GOLDIM, 2007).

Os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração (BRASIL, 2010).

Em 2000, a *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) revisou e adotou definitivamente as diretrizes 420 (Dose Fixa), 423 (Método

de classe) e 425 (“*Up and Down*”) como estratégia para avaliar a toxicidade oral aguda de substâncias desconhecidas e identificar a menor dose que cause toxicidade evidente, identificar a menor dose que cause mortalidade e estimar a DL_{50} , respectivamente. Essas diretrizes utilizam, como critério prioritário, o bem-estar animal, a fim de reduzir substancialmente o número e o nível de sofrimento e dor dos animais em estudo (BOTHAM, 2002). O teste de toxicidade oral aguda de dose única – métodos de classe (OECD 423) - ainda permite a classificação da substância testada nos padrões estabelecidos GHS (Tabela 1) (OECD, 2001).

Tabela 1: Categorias-padrão de toxicidade aguda e valores de toxicidade aguda estimada que definem as respectivas categorias (EC, 2011).

Classificação	Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3	Categoria 4	Categoria 5
Toxicidade Oral Aguda	<5 mg/kg	5-50 mg/kg	50-300 mg/kg	300-2000 mg/kg	>2000 mg/kg
					Nenhum
Significado	Perigo	Perigo	Perigo	Cuidado	Nenhum
Advertência	muito tóxico	tóxico	tóxico	nocivo	Nenhuma

Fonte: EC (2011), adaptado pela autora

A princípio, este método (OECD 423) não se destina a encontrar um valor exato de DL_{50} , e sim, em determinar a letalidade de um composto frente às doses de exposição aguda pré-definidas, sendo preciso pontuar que os animais moribundos ou que apresentam sinais evidentes de dor ou sofrimento intenso são sacrificados e considerados, na interpretação dos resultados, da mesma forma que os animais vieram a óbito durante o experimento (OECD, 2001).

Para uma avaliação da toxicidade subaguda, são utilizados estudos de toxicidade de doses repetidas que caracterizam o perfil toxicológico da substância frente à exposição contínua por um período relativamente curto, geralmente de 28 dias. A partir deles é possível a obtenção de informações sobre possíveis riscos à saúde, identificação de órgãos alvos, efeitos nas funções fisiológicas,

hematológicas, bioquímicas, anátomo e histopatológicas, além de informações sobre alterações de comportamento e a indicação das doses de tolerância em roedores (BRASIL, 2010)

Dessa forma, os dados da observação funcional obtidos nos testes de toxicidade aguda e subaguda de doses repetidas, além de gerar informações preciosas sobre o potencial tóxico de uma substância, também podem ser usados como ferramenta preliminar ao estudo de maior período, ou seja, subcrônico e crônico (BOTHAM, 2002).

Como proposto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2010) no guia para a condução de estudos não clínicos de segurança, além dos testes de toxicidade acima descritos, os novos compostos químicos devem passar por estudos de genotoxicidade para avaliar se são capazes de produzir danos ao DNA e conseqüentemente, aberrações cromossômicas e/ou mutações genéticas.

Para investigação de toxicidade genética *in vivo*, o teste do micronúcleo (MN) em eritrócitos de mamíferos é o teste primário na bateria de ensaios de genotoxicidade e têm sido amplamente empregado e aceito por agências reguladoras e pela comunidade científica (VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2007; KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Quando uma substância causa dano citogenético, seja ele estrutural ou numérico, há chances de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros perderem a capacidade de se anexar ao fuso mitótico e, dessa forma, são deixados para trás quando o núcleo principal é expelido durante o processo de maturação das células vermelhas, num processo denominado cariorrexe (BOWEN et al., 2011; OECD, 1997). Os fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros remanescentes no citoplasma são denominados micronúcleos e são indicativos de perdas irreversíveis de dano ao DNA. Como não existe núcleo principal, a presença de micronúcleos é facilmente identificada (FIEDLER; WEINER; SCHULER, 2010)

A frequência do número de MN pode ser averiguada em amostras de células de sangue periférico (SP) e medula óssea (MO) de mamíferos a partir da quantificação de eritrócitos imaturos micronucleados após a exposição à doses

escolhidas a partir da DL₅₀ da substância a ser testada ou de resultados de estudos de toxicidade previamente realizados (OECD, 1995).

Em camundongos, duas subpopulações de eritrócitos – imaturos (reticulócitos - RETs) e maduros – podem apresentar MN, dependendo da dose e do tempo de exposição. Por microscopia, RET e eritrócitos maduros podem ser facilmente distinguidos pela presença ou ausência de RNA residual, respectivamente, por meio de colorações específicas. Por conta da cinética da produção e maturação dos eritrócitos, os RET sinalizam os efeitos de dano induzido recentemente (24 - 48 h) e quando obtidos apropriadamente, o aparecimento de MN pode ser detectado tanto em MO como em SP (MACGREGOR et al., 1990). Em ratos, devido à rápida e eficiente ação do baço em remover eritrócitos micronucleados da circulação periférica, a presença de MN é visualizada preferencialmente em MO para eliminar a influência da filtração esplênica na frequência de reticulócitos micronucleados (SCHLEGEL; MACGREGOR, 1984).

Contudo, a quantificação de células micronucleadas em ambos os testes ocorre de forma trabalhosa. As células são dispostas adequadamente em lâminas e submetidas a uma coloração citológica. Para este fim, a coloração pelo Giemsa tem sido empregada com sucesso. Quando bem realizada, os eritrócitos policromáticos (imaturos), em tom azulado, diferenciam-se dos eritrócitos normocromáticos (maduros) que apresentam coloração rósea. A leitura em microscópio óptico para classificação das células, todavia, requer a subjetiva análise decisiva do investigador. Além disso, a presença de artefatos como, por exemplo, grânulos de mastócitos na medula óssea e as inclusões de agregados de RNA induzidas por algumas substâncias, dificulta sua distinção dos micronúcleos na coloração por Giemsa. Por conta disso, essa metodologia pode apresentar variações intra e interlaboratoriais em demasia, diminuindo o poder estatístico dos experimentos. Nos testes em SP, especificamente, a leitura se torna especialmente trabalhosa em vista da pequena fração de eritrócitos jovens liberados na corrente periférica, reduzindo consideravelmente a sensibilidade destes ensaios (HEDDLE et al., 2011).

Com este cenário, a citometria de fluxo ganhou bastante espaço nos últimos anos, sendo uma das metodologias alternativas de automação recomendadas pela OECD (MUGHAL, A. et al., 2011). Esta metodologia foi validada pelo *Collaborative*

Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) of the Mammalian Mutagenesis Study Group (MMS) of the Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS) nos testes que avaliam a frequência de MN em reticulócitos por meio de marcadores de superfície, como o receptor de transferrina CD71 (ROTHFUS et al., 2011).

O receptor de transferrina CD71 é um marcador de superfície celular específico e ativo nos RETs por um curto período de tempo após deixar a medula óssea (DERTINGER et al., 2004). A análise da frequência de MN por citometria de fluxo se baseia na dupla marcação de eritrócitos maduros e RETs do sangue periférico, usando um anticorpo anti-CD71 específico marcado com um fluorocromo (FITC) que diferencia as células maduras dos RETs (SERKE; HUHN, 1992). Para evidenciar a presença de MN em ambas as populações, a amostra é submetida à marcação com iodeto de propídio (IP) que marca, especificamente, material genético (DNA). Uma vez que o MN é o único elemento que contém DNA nos eritrócitos de mamíferos, essa metodologia permite distinguir reticulócitos micronucleados entre as populações de células analisadas (FIEDLER; WEINER; SCHULER, 2010).

O desenvolvimento da citometria de fluxo como metodologia de avaliação da frequência de MN em eritrócitos representa um avanço tecnológico sobre o ensaio manual e tem grande potencial para aumentar a sensibilidade, reprodutibilidade e o rendimento dos testes *in vivo* tradicionais em roedores, baseados na coleta de dados por microscopia (DERTINGER et al., 2004; TOROUS et al., 2005; WITT et al., 2008). Além de ser mais rápida, barata e sensível, a citometria de fluxo elimina viés, pois permite a avaliação de um número muito maior de células por animal, elimina a subjetividade do investigador e a interferência de artefatos durante o processo de análise microscópica, reduzindo significativamente a variabilidade da amostragem.

Dessa forma, a citometria de fluxo incorpora melhorias de forma quantitativa e qualitativa nos estudos de frequência de micronúcleo, mesmo em espécies que possuem atividade esplênica íntegra que reduzem substancialmente o número de células micronucleadas na corrente sanguínea, incluindo os seres humanos (HEDDLE et al., 2011; ROTHFUS et al., 2011). Embora a OECD indique a automação como alternativa à leitura microscópica manual, nenhuma recomendação clara para validação automática foi determinada. No entanto, a citometria de fluxo promete ser a metodologia padrão nos próximos anos (MUGHAL et al., 2010).

Baseado no que foi exposto, este trabalho visou identificar o perfil de citotoxicidade dos derivados pirazolínicos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 e investigar o potencial tóxico agudo, subagudo e mutagênico do candidato a fármaco cardiovascular LQFM021. Além disso, o potencial citotóxico dos derivados pirazolínicos frente células tumorais também foi investigado.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o potencial citotóxico dos compostos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024. Também foi investigado a toxicidade aguda, subaguda e potencial mutagênico do composto LQFM021.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Investigar o potencial citotóxico dos compostos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 frente à célula leucêmica HL60.
- Investigar o potencial citotóxico dos compostos LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 frente à célula leucêmica K562.
- Investigar o potencial citotóxico dos compostos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 frente as células de metabolismo basal (3T3) e estimar doses iniciais para estudos *in vivo*.
- Realizar o estudo da toxicidade aguda e classificar as substâncias de estudo dentro do GHS.
- Realizar o estudo de toxicidade subaguda com o composto LQFM021.
- Realizar o estudo do potencial mutagênico do composto LQFM021.

3.1 SOLUBILIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

Para os testes de citotoxicidade *in vitro* vermelho neutro, MTT e azul de tripano, os compostos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024, os quais apresentam baixa solubilidade em água, foram preparados em suspensão micelar com 2% (p/v) de fosfatidilcolina de soja, 10% (v/v) de dimetilsufóxido (DMSO), 10% de etanol e 0,5% (v/v) de taurodeoxicolato em água ultrapura. Em todos os experimentos, a concentração final de etanol e DMSO não ultrapassou 0,5% (v/v). Para os controles, foi utilizada suspensão micelar do veículo de solubilização.

Para os testes com animais, os compostos testados foram solubilizados em óleo de girassol nas concentrações determinadas para cada experimento. No processo de solubilização dos compostos, para evitar a formação de eventuais grumos, a suspensão sofreu ultrassonificação por 4h e agitação constante em vórtex. Para os controles, utilizou-se óleo de girassol puro.

O processo de solubilização dos compostos foi realizado sob as condições máximas de esterilidade quando possível, utilizando para isso, excipientes estéreis (água, meio de cultura, óleo de girassol, reagentes químicos, etc) e as suspensões foram preparadas e filtradas no dia ou, no máximo, um dia antes dos experimentos para evitar precipitação demasiada. Ademais, durante o processo de exposição das células ou administração aos animais, as suspensões foram constantemente homogeneizadas.

3.2 MTT

Para avaliar atividade mitocondrial das células expostas à toxicidade de alguma substância, é importante verificar seu potencial citotóxico frente a uma linhagem leucêmica a fim de estimar seus efeitos antitumorais. Para isso, foi usado

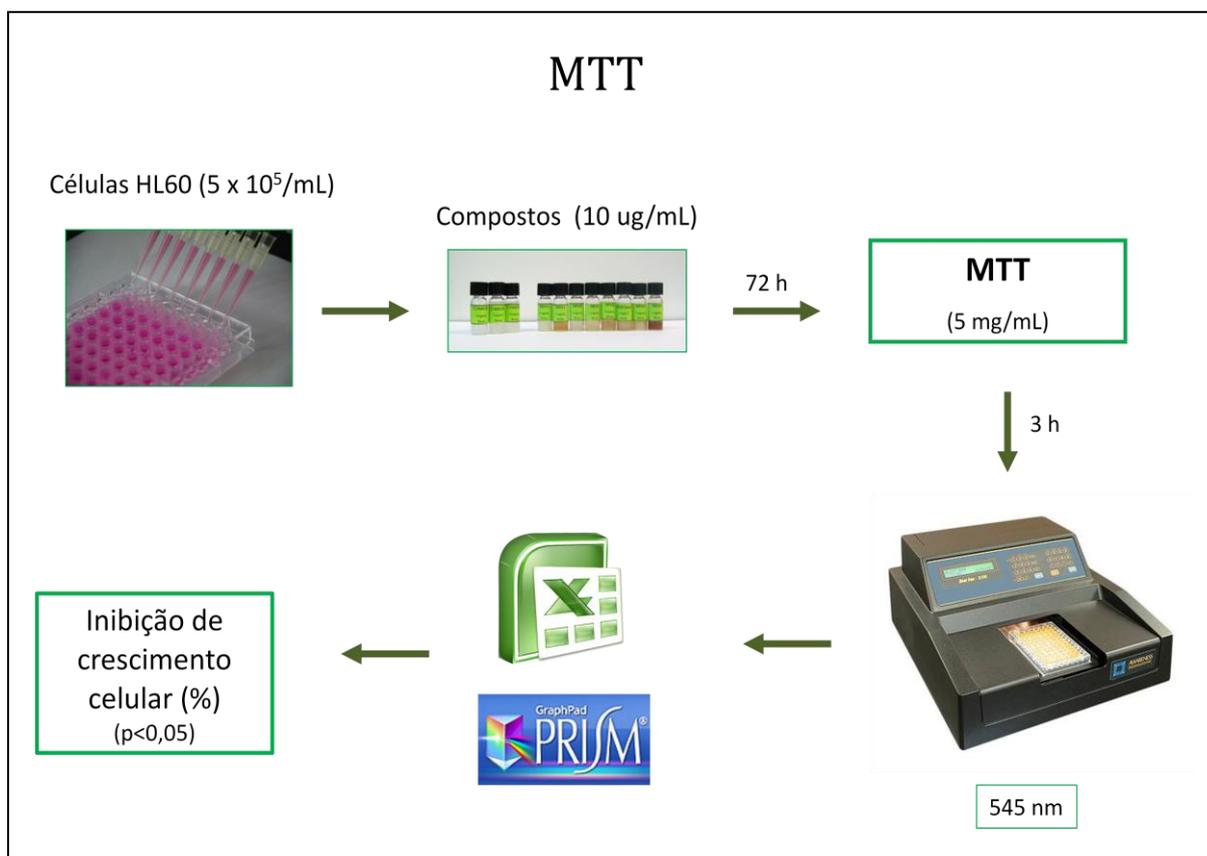
como modelo padrão o ensaio de redução do MTT (MOSMANN, 1983), que avalia atividade mitocondrial a partir da absorção do sal {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio]} pelas células viáveis, que o reduzem a cristais de formazan pela ação da enzima succinato desidrogenase no interior das mitocôndrias.

Os cristais de formazan são azuis e insolúveis e se acumulam dentro das células viáveis. Para visualização, são solubilizados pela adição de um solvente apropriado (DMSO) formando uma coloração de intensidade proporcional à quantidade de células com integridade de atividade mitocondrial que é então medida por espectrofotometria (545 nm).

As células HL-60 células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e distribuídas em placas de 96 poços (90 µL/poço) numa concentração 5×10^5 células/mL. Em seguida, as células foram expostas a 10 µL dos compostos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 na concentração única de 10 µg/mL e incubadas em estufa de cultivo celular (37 °C, 5% de CO₂) por 72 horas. Para o controle de células foi utilizado somente RPMI e para o controle do veículo, foi utilizado suspensão micelar preparada com os mesmo reagentes do veículo dos compostos. Todos os procedimentos realizados para obtenção da suspensão dos compostos também foram empregados nos controles. Depois deste período, foram adicionados 10 µL de solução MTT (5 mg/mL) em cada poço da placa que novamente foi incubada, agora por 4 horas. Em seguida, a placa foi centrifugada por 10 minutos numa velocidade de 1000 rpm e o sobrenadante foi retirado cuidadosamente, evitando a suspensão dos cristais de formazan e então, descartado. Por fim, para solubilização dos cristais, foram adicionados 100 µl de DMSO em todos os poços e a placa foi submetida a 20 minutos de homogeneização lenta (20 rpm). A viabilidade celular foi determinada pela leitura da absorbância (545 nm) do controle (células não expostas aos compostos). O desenho esquemático deste estudo está ilustrado na Figura 6.

Importante ressaltar que para garantir a concentração dos compostos desejada no teste, uma solução-mãe dez vezes concentrada foi preparada, visto que durante esta etapa do protocolo, 10 µL de cada concentração é diluída em 90 µL da suspensão celular já disposta na placa.

Figura 6: Desenho esquemático do testes de MTT.



3.3 AZUL DE TRIPANO

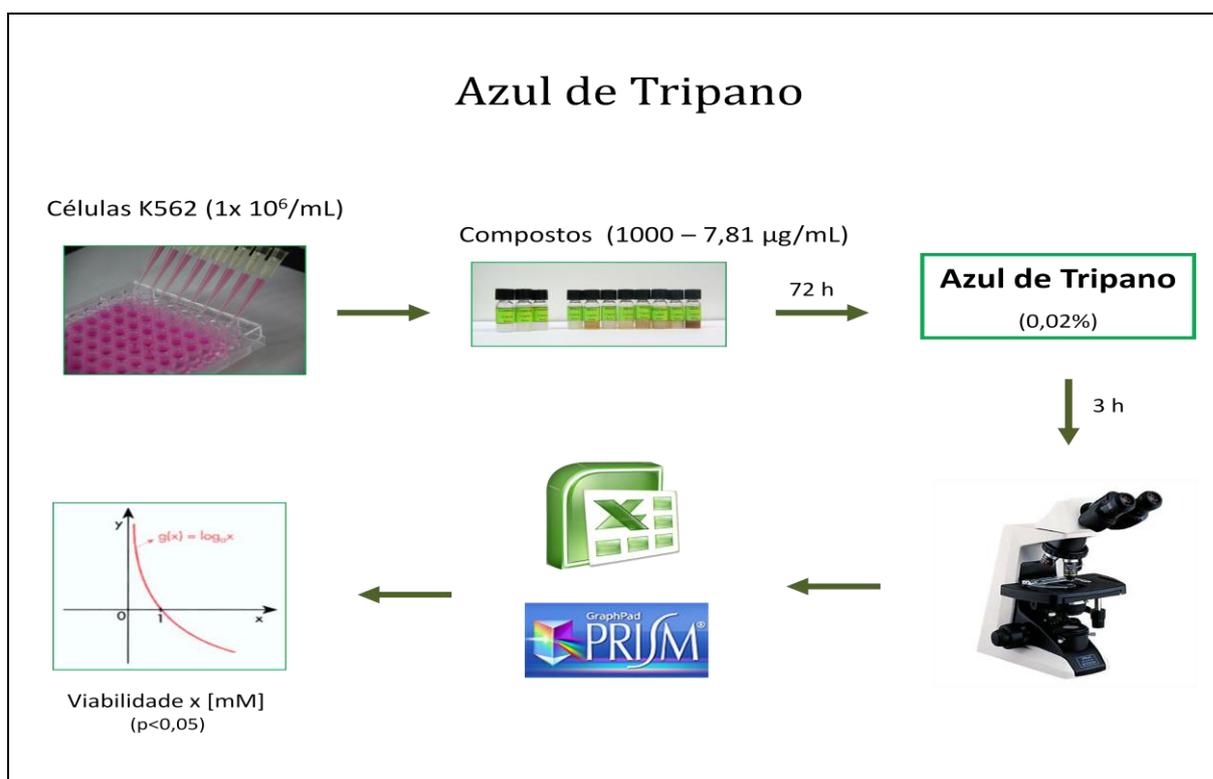
As formulações contendo os compostos LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 foram preparadas no dia de exposição às células conforme item 3.1 e testadas individualmente em oito concentrações ($1000 - 7,81 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$), diluídas de forma seriada ($f = 2$) em meio de cultura RPMI 1640.

As células K562 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e distribuídas em placas de 96 poços ($90 \text{ } \mu\text{L}/\text{poço}$) numa densidade de 1×10^6 células/mL. Em seguida, $10 \text{ } \mu\text{L}$ das diferentes concentrações dos compostos foram adicionados aos seus poços correspondentes e a placa foi incubada em estufa ($37 \text{ } ^\circ\text{C}$, 5% de CO_2). Para o controle de células foi utilizado somente RPMI e para o controle, suspensão micelar preparada com os mesmo reagentes do veículo dos compostos. Todos os procedimentos realizados para obtenção da suspensão dos compostos também foram empregados nos controles.

Após 24 horas, uma alíquota de 20 μL da suspensão de células foi homogeneizada e retirada de cada poço e diluída em 180 μL de azul de tripano (0,2%). A leitura foi feita com câmara de Neubauer em microscópio óptico a partir da análise das alterações morfológicas e do número de células que excluíram o corante (translúcidas) ou não (azuladas).

A viabilidade celular ou citotoxicidade foi determinada a partir do percentual da média de células viáveis translúcidas de cada concentração dos compostos em relação ao controle. O desenho esquemático deste estudo está ilustrado na Figura 7.

Figura 7: Desenho esquemático dos testes de azul de tripano.



3.4 TESTE DE CAPTAÇÃO DO CORANTE VERMELHO NEUTRO (NRU ASSAY)

3.4.1 Cultivo Celular e Determinação da Concentração Inicial de Plaqueamento

Foi utilizada a linhagem basal de fibroblastos de camundongos Balb/c 3T3 cultivadas em *Dullbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com alto teor de glicose (4500 mg/L), suplementado com 10% de SFB, 100 UI/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de

estreptomicina e 2 mM de glutamina. As células foram examinadas em microscópio invertido antes da exposição aos compostos para identificar qualquer alteração na sua morfologia. A desagregação das células da garrafa de cultivo celular (75 cm² de superfície) foi realizada quimicamente utilizando 3 mL de solução de tripsina e EDTA (0,25% e 0,03%, respectivamente) quando a confluência celular se encontrava em torno de 50 – 80%. A enzima foi inativada por adição de 10 mL de solução de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. A suspensão celular foi lavada com 15 mL de tampão PBS (*phosphate buffered saline*, pH 7,2) e centrifugada (5000 rpm/10 minutos) para obtenção do botão celular. Este processo foi repetido duas vezes. O PBS, então, foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 1 mL de DMEM. A viabilidade celular foi determinada pela diluição prévia (1:10) em corante azul de tripan (0,02%) e a concentração celular para início dos testes (3×10^4 células/mL) foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

3.4.2. Plaqueamento

Uma vez determinada a concentração de células 3T3 (3×10^4 células/mL), 50µL da suspensão celular foram dispostos em cada poço da placa de 96 poços, conforme mostra a Figura 8.

Figura 8: Desenho esquemático da etapa de plaqueamento da suspensão de células 3T3 em placa de 96 poços no teste de captação do vermelho neutro. Fonte: Protocolo NRU assay (ICCVAM). Adaptado pela autora.

Onde: MC = meio de cultura; C = suspensão de células.

MC											
MC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	MC
MC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	MC
MC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	MC
MC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	MC
MC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	MC
MC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	MC
MC											

3.4.3 Exposição

Os compostos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 foram testados individualmente em oito concentrações (602 a 4,7 ug/mL), diluídos de forma serial ($f = 2$) em meio de cultura DMEM. Foram dispostos 50 μ L de cada uma das oito concentrações nos poços com e sem células, conforme ilustrado na Figura 9. Para garantir a concentração dos compostos desejada no teste, uma solução-mãe duas vezes concentrada foi preparada, visto que durante esta etapa do protocolo, 50 μ L de cada concentração é diluída em 50 μ L da suspensão celular já disposta na placa.

Figura 9: Desenho esquemático da etapa de exposição das células 3T3 às oito concentrações seriadas da substância em estudo no teste de captação do vermelho neutro. Fonte: Protocolo *NRU assay* (ICCVAM). Adaptado pela autora.

Onde: B = branco sem células apenas meio; C0 = Controle células expostas apenas ao meio de cultura;
C1-8 = Concentrações do composto; C1b-8b = Composto + meio de cultura SEM células;

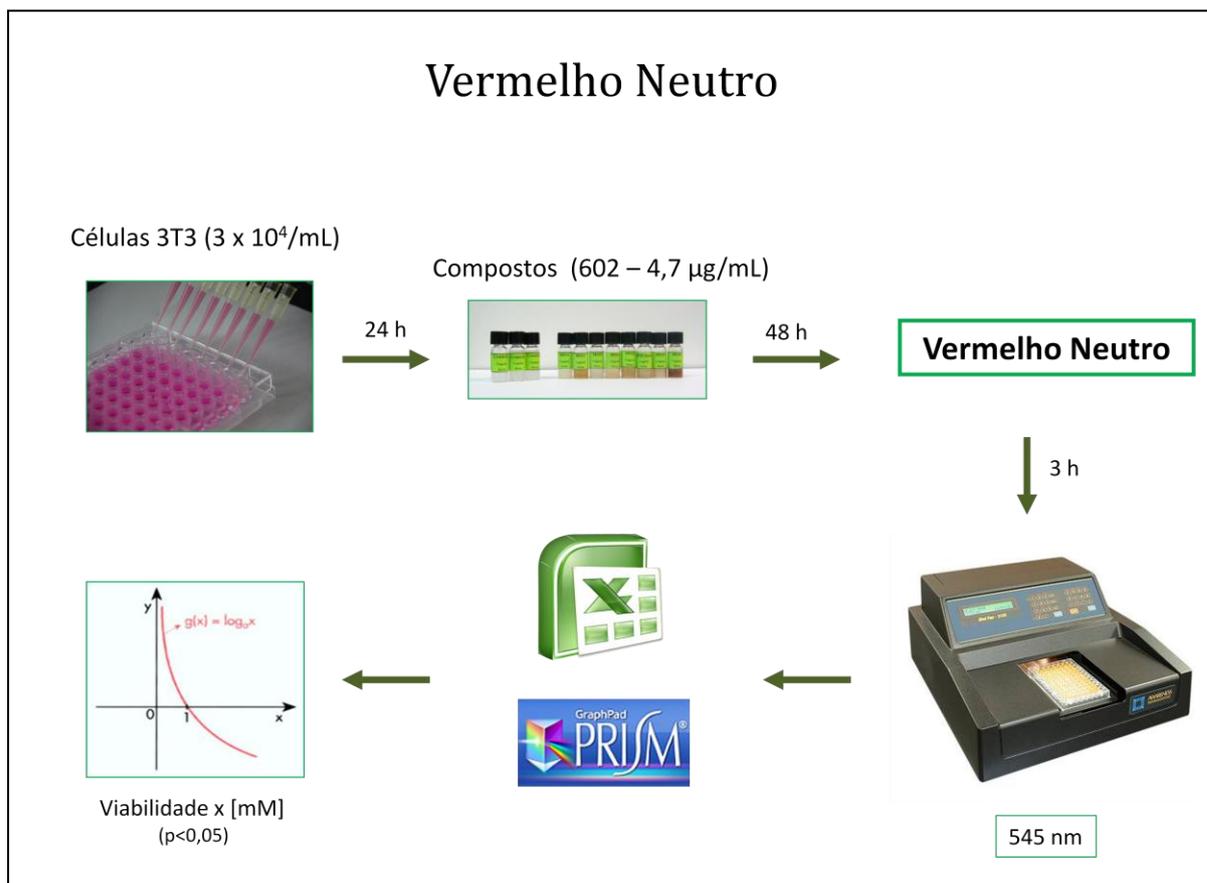
B	B	C _{1b}	C _{2b}	C _{3b}	C _{4b}	C _{5b}	C _{6b}	C _{7B}	C _{8B}	B	B
B	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₀	B
B	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₀	B
B	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₀	B
B	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₀	B
B	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₀	B
B	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₀	B
B	B	C _{1b}	C _{2b}	C _{3b}	C _{4b}	C _{5b}	C _{6b}	C _{7B}	C _{8B}	B	B

A viabilidade celular foi determinada a partir dos valores de absorvância (545 nm), utilizando o controle de células como referencial. A correlação IC₅₀ e DL₅₀ foi determinada a partir da equação:

$$\log (LD_{50}) = 0,435 \times \log (IC_{50}) + 0,628).$$

O desenho esquemático deste experimento está ilustrado na Figura 10.

Figura 10: Desenho esquemático dos testes de captação do corante vermelho neutro.



3.5 ANIMAIS

Todos os animais utilizados nos testes foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás. Para os testes de toxicidade oral aguda e micronúcleo, foram utilizados camundongos BALB/c machos e fêmeas saudáveis, com idade de 7 a 10 semanas e com massa corporal em torno de 30 gramas, sendo todas as fêmeas nulíparas e não grávidas.

Para os testes de toxicidade subaguda de doses repetidas de 28 dias, foram utilizadas ratas *Wistar* saudáveis, nulíparas e não grávidas com idade de 6 a 9 semanas e com massa corporal de 130 a 190 gramas.

A massa corporal individual dos animais em todos os testes não excedeu 20% da média do grupo e foi averiguada imediatamente antes da administração das substâncias-testes.

Os testes foram desenvolvidos seguindo as normas éticas de bem estar animal e biossegurança propostas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (FRAJBLAT et. al, 2006) e sob parecer favorável do comitê de ética da Universidade Federal de Goiás (Protocolo 137/2009).

3.6 CONDIÇÕES AMBIENTAIS E ALIMENTAÇÃO

Os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas (temperatura ambiente $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, umidade relativa do ar 50 – 70% e o ciclo claro/escuro de 12 horas) e passaram por um período de adaptação de 7 dias antes do início dos experimentos para avaliação do comportamento, hábitos alimentares e fisiológicos.

Para os testes de toxicidade oral aguda e micronúcleo, os animais foram devidamente separados por grupos em caixas de prolipropileno forradas com maravalha peneirada e autoclavada, respeitando a quantidade recomendada. Para alimentação, foi oferecido ração de boa qualidade adequada às necessidades dos mesmos e água estéril, de forma *ad libitum*, até o fim dos experimentos.

Para o teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas, as ratas foram devidamente separadas por grupo e mantidas individualmente em gaiolas metabólicas. Em relação à alimentação, foi oferecida ração de boa qualidade em quantidades controladas e idênticas para cada animal, sendo ajustadas de acordo com a necessidade metabólica à medida que ganhavam massa corporal e água estéril de modo *ad libitum* até o fim do experimento.

Antes da eutanásia, os animais foram privados de alimentação 2 horas antes e 2 horas depois da administração oral, não interrompendo a oferta de água durante esse período.

3.7 OBSERVAÇÃO DOS ANIMAIS

Para os testes de toxicidade oral aguda, os animais foram assistidos individualmente, observando as alterações comportamentais sistemáticas de acordo com teste hipocrático descrito por Malone e Robichaud (1962): atividade geral, frênito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto da cauda, contorção, posição trem inferior, reflexo, endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, *straub*, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte.

Depois da administração oral, os animais foram observados em intervalos variados (0', 15', 30', 45', 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 12h e 24h) e em seguida, diariamente, respeitando o horário de administração, por 14 dias corridos. Ao final deste período os animais sobreviventes foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, utilizando-se para isso, anestesia com cetamina (100 mg/mL) e xilazina (100 mg/mL) (1:1 v/v, 1µL/g) de acordo com o protocolo da *Cornell University/Cornell Center for Animal Resources and Education* a fim de reduzir o sofrimento animal (FLECKNELL, 1996). Para verificar se os animais estavam anestesiados antes de proceder com a eutanásia, foi utilizado o critério de resposta negativa ao aperto da pata traseira.

A intensidade dos eventos foi semiquantificada numa escala de zero a 4, correspondendo gradualmente à presença de sinais e sintomas clínicos, conforme proposto por Malone e Robichaud (1962). A duração dos sinais e sintomas, bem como a ocorrência de eventos adicionais associados à toxicidade como alterações na pele e pelos, olhos e mucosas, do aparelho respiratório, circulatório, autônomo e sistema nervoso central, e atividade motora, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma também foram registradas e citadas quando presentes.

Para o teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas, os animais foram assistidos individualmente, todos os dias, conforme protocolo hipocrático descrito acima, até o fim do experimento e respeitando sempre o mesmo horário. Ao final dos 28 dias, os animais foram submetidos à eutanásia por esgotamento

sanguíneo por punção cardíaca, utilizando-se anestesia com cetamina e xilazina (1:1 v/v, 1µL/g).

3.8 TOXICIDADE ORAL AGUDA – MÉTODO DE CLASSES (OECD 423)

O teste de toxicidade oral aguda foi realizado segundo protocolo experimental *Guideline* 423 recomendado pela OECD (2001).

3.8.1. Seleção da Dose

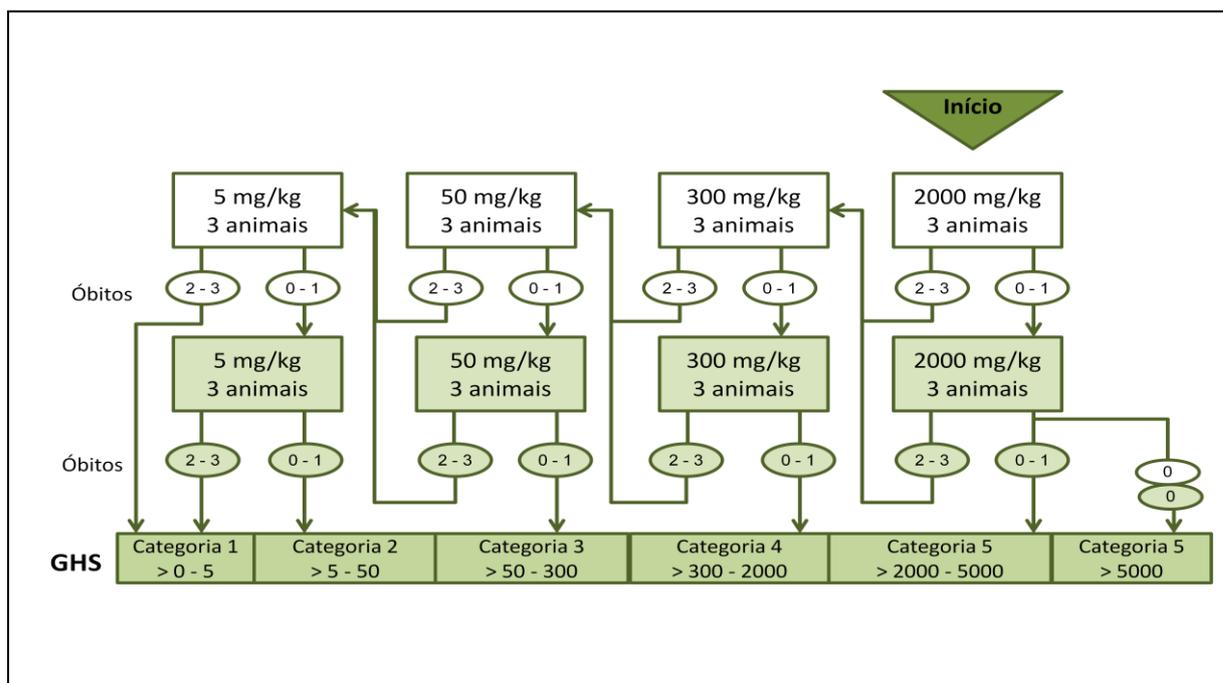
A dose de início dos testes de toxicidade oral aguda (2000 mg/kg) foi selecionada a partir dos valores de DL_{50} estimados nos testes *in vitro* de citotoxicidade (vermelho neutro).

3.8.2. Administração

Foram distribuídos grupos de 3 animais/sexo para cada substância testada e para o controle. As suspensões dos compostos LQFM020, LQFM021, LQFM023 e LQFM024 (2000 mg/kg) foram administradas oralmente com ajuda de uma cânula esofágica (nº 8) e o volume administrado aos animais não excedeu 1 mL/100g de massa corporal.

Os resultados alcançados ao fim dos experimentos de toxicidade oral aguda foram utilizados para classificar os compostos LQFM020, LQFM021, LQFM023 e LQFM024 quanto ao seu risco tóxico de acordo com o sistema GHS de classificação, seguindo o esquema da Figura 11.

Figura 11: Esquema de classificação de risco tóxico segundo sistema GHS a partir do teste de toxicidade oral aguda OECD 423. Fonte: OECD 423, adaptado pela autora.



3.9 TOXICIDADE ORAL SUBAGUDA DE DOSES REPETIDAS – 28 DIAS (OECD 407)

Considerando as orientações da ANVISA para os estudos de segurança de um candidato a fármaco, após obtidos os resultados de toxicidade oral aguda, demos sequência com o teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas, segundo protocolo experimental *Guideline* OECD 407, por 28 dias consecutivos.

3.9.1 Seleção das Doses

Para o experimento de toxicidade subaguda, levou-se em consideração os resultados dos estudos de citotoxicidade e toxicidade anteriormente realizados. Dessa forma, a partir do valor de DL_{50} do composto LQFM021 (533 mg/kg) estimado no experimento de citotoxicidade basal e considerando o resultado obtido no teste de toxicidade aguda, entende-se que 50% do valor da DL_{50} atende às prerrogativas de seleção de doses do teste de toxicidade subaguda e, então, as doses de 250 mg/kg/dia, 125 mg/kg/dia e 62,5 mg/kg/dia foram selecionadas para estabelecer o

potencial tóxico subagudo deste composto durante o período de exposição de 28 dias.

Um grupo controle e um grupo da maior dose (250 mg/kg), denominados satélites, foram adicionados ao experimento e foram observados por mais 14 dias após fim da exposição. O objetivo principal de inserir os grupos satélites neste estudo foi identificar a presença de efeitos tóxicos tardios ou a continuidade/reversibilidade dos efeitos tóxicos já apresentados durante o período de exposição, ou seja, a partir do momento em que os animais não são mais expostos ao composto LQFM021.

3.9.2 Exposição à substância teste

Para a exposição oral, as ratas foram divididas em 6 grupos de 5 animais cada (62,5 mg/kg/dia, 125 mg/kg/dia, 250 mg.kg/dia, controle, controle satélite e 250 mg/kg/dia satélite) e privadas de alimentação 1 a 2 horas antes do processo de gavagem, não sendo interrompida a oferta de água em nenhum momento. A suspensão do composto LQFM021 foi administrada oralmente com ajuda de uma cânula esofágica (nº 10) e o volume administrado aos animais não excedeu 1 mL/100g de massa corporal. Para tanto, a massa corporal dos animais foi verificada semanalmente e as doses foram ajustadas aos grupos ao longo dos 28 dias de exposição. Os grupos controle e controle satélite receberam apenas o excipiente (óleo de girassol) em que o composto LQFM021 foi veiculado.

3.9.3 Condições do experimento

A pesagem dos animais foi feita semanalmente. A cada três dias, eram oferecidos aos animais, de forma individual, 50 gramas de ração e água. Ao final deste período, a ração remanescente era pesada e os valores eram devidamente registrados. As fezes produzidas eram coletadas e pesadas no mesmo dia da ração remanescente e os valores registrados.

O consumo de ração foi calculado pela diferença da quantidade de ração ofertada a cada 3 dias e a quantidade de ração remanescente no terceiro dia. A pesagem da quantidade de fezes também foi realizada no terceiro dia para que fosse possível correlacionar esses dois parâmetros (consumo e eliminação).

As gaiolas metabólicas onde os animais foram mantidos (Figura 12) possuem um assoalho vazado, uma peneira e uma bandeja em forma de funil e, dessa forma, possibilitam aquisição de fezes e urina separadamente e de forma individual. No entanto, o assoalho vazado das gaiolas metabólicas pode provocar certo desconforto aos animais. Para minimizá-lo, foi inserido um pedaço de cano (“joelho”) de PVC no interior das gaiolas metabólicas como medida de enriquecimento ambiental.

Figura 12: Fotografia das gaiolas metabólicas utilizadas no teste de toxicidade oral subaguda com o composto LQFM021 ilustrando as condições ambientais, arquitetura e funcionalidade da gaiola metabólica no teste de toxicidade subaguda com ratas *Wistar*. (a) visão ampla das gaiolas metabólicas; (b) visão aproximada de uma gaiola metabólica mostrando o coletor de urina, a peneira para coleta de fezes, recipiente para ração e disposição da mamadeira de água; (c) interação do animal com o cano (“joelho”) de PVC no interior da gaiola metabólica.



O sangue coletado no momento da eutanásia foi destinado a exames laboratoriais hematológicos e bioquímicos, enquanto os órgãos vitais (coração, rim, fígado, baço, estômago e pulmão) extraídos durante a necropsia foram pesados (massa relativa) e analisados macroscopicamente. Ainda foi realizado o exame histopatológico do rim e do fígado de todos os grupos para averiguar a presença de eventuais sinais tóxicos provocados pela exposição ao composto LQFM021.

3.9.4 Parâmetros Hematológicos

Cerca de 3 mL do sangue coletado durante a eutanásia das ratas foi reservado em tubos com anticoagulante EDTA para análise dos seguintes parâmetros hematológicos: contagem de hemácias, dosagem de hemoglobina, hematócrito, RDW, índices hematimétricos (volume corpuscular médio – VCH; hemoglobina corpuscular média – HCM; e concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM), contagem de plaquetas, contagem global de leucócitos, contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos e eosinófilos)

Para análise microscópica das células sanguíneas, foram confeccionadas duas lâminas de esfregaço que foram submetidas à coloração de Romanovisk (Newprov). Com exceção da contagem diferencial dos leucócitos, realizada em microscópio óptico, os demais parâmetros foram analisados pelo equipamento *Micros 60 - ABX*[®].

3.9.5. Parâmetros Bioquímicos

Cerca de 3 mL do sangue coletado durante a eutanásia das ratas foi reservado em tubos sem anticoagulante. Logo após o sangue ter coagulado, o soro foi separado por centrifugação (1500 rpm/5 minutos), devidamente congelado (freezer – 80 °C) e reservado para análise dos seguintes parâmetros bioquímicos: glicose, amilase, ureia, creatinina, aminotransferases (AST e ALT), albumina e proteínas totais. As dosagens bioquímicas foram realizadas em analisador automático *Biosystems*[®] A-25.

3.9.6 Histopatológico

Neste trabalho, os rins, fígado, coração, pulmão, estômago e baço de cada animal foram extraídos no momento da necropsia e processados de acordo com a técnica desenvolvida por Junqueira e Junqueira (1983) no laboratório de anatomia patológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás. As alterações encontradas nas lâminas dos grupos expostos ao composto LQFM021 nas três concentrações foram devidamente registradas, fotografadas e comparadas ao grupo controle. Tal análise teve como objetivo avaliar a integridade tecidual e a ocorrência de lesões celulares reversíveis (degeneração) e irreversíveis (necrose e apoptose), além da presença de infiltração leucocitária, congestão, extravasamento de líquidos e fibrose. As alterações encontradas foram avaliadas de forma semi-quantitativa, utilizando o parâmetro gradual de zero a quatro cruces (0, +, ++, +++ e +++/4+). As cruces equivalem-se à presença dos eventos de forma gradual, utilizando o controle e o grupo exposto à maior dose como parâmetros de comparação.

3.10. MICRONÚCLEO (OECD 474)

3.11.1 Seleção da dose

A dose de início dos testes de micronúcleo foi baseada na faixa de risco encontrada no teste de toxicidade oral aguda (entre 300 e 2000 mg/kg), seguindo os critérios do protocolo OECD 474. Dessa forma, foram utilizadas as doses de 300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg.

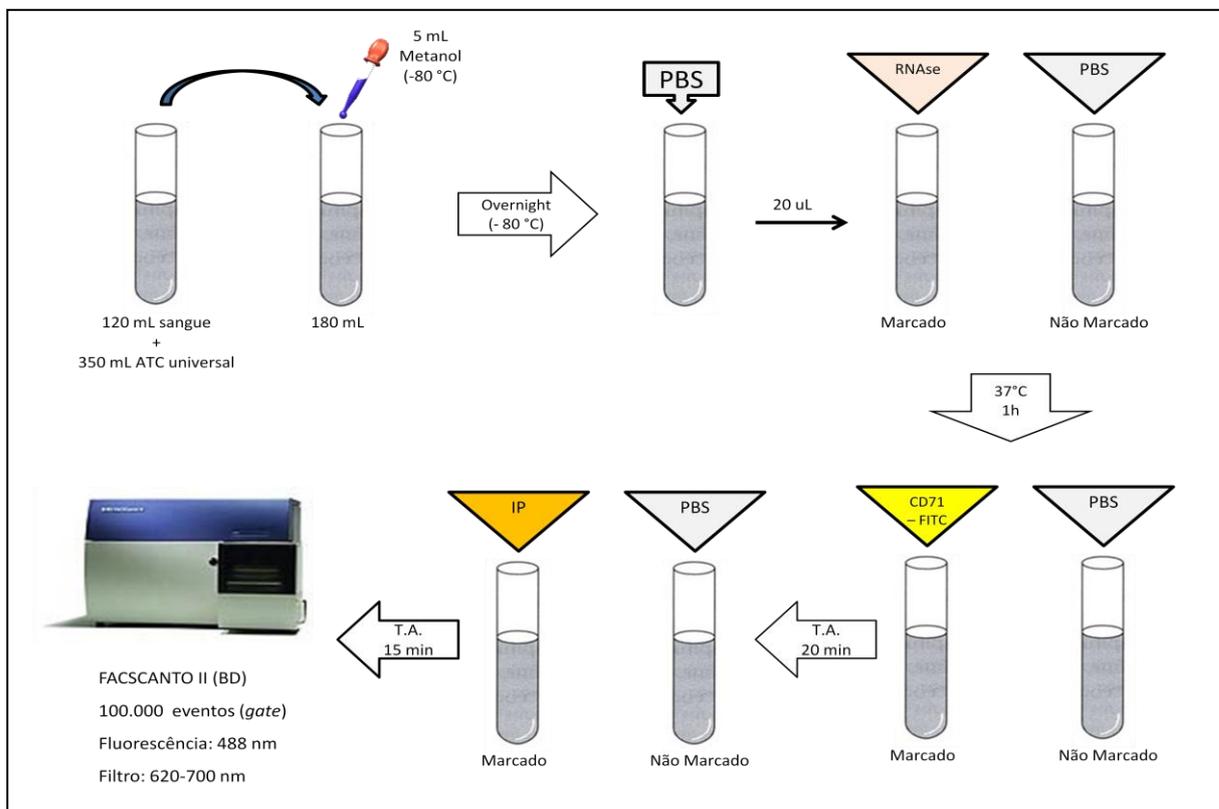
3.10.2 Exposição à substância teste

A suspensão do composto LQFM021 foi administrada oralmente com ajuda de uma cânula esofágica (nº 8) e o volume administrado aos animais não excedeu 1 mL/100g de massa corporal.

Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (1:1; v/v) e o sangue periférico foi coletado por punção cardíaca. Após a coleta, cerca de 120 µL do sangue periférico de cada animal foi transferido para um tubo contendo 350 µL de

anticoagulante universal (Doles®). Desse volume, foram transferidos 180 µL para um único tubo falcon. Para a fixação, foram adicionados lentamente 5 mL de metanol (-80 °C) e os tubos foram armazenamento *overnight* em freezer -80 °C. No dia da análise, as amostras fixadas foram retiradas do freezer -80 °C e homogeneizadas suavemente. A elas, foram adicionados 12 mL de PBS e o conteúdo foi centrifugado por 5 minutos (1500 rpm). O sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi ressuscitado em 1 mL de PBS. Uma alíquota de 20 µL de cada grupo foi submetida à marcação (100 µL de RNase 1mg/mL) e não marcação (100 µL de PBS) e incubados por 1h, a 37 °C em tubos de citometria de fluxo. Na sequência, todas as amostras foram lavadas com 2 mL PBS-BSA e àquelas submetidas à marcação, foi adicionado 20 µL CD71-FITC e às amostras não marcadas, foi adicionado 20 µL PBS. Todas as amostras foram reservadas em temperatura ambiente por 20 minutos em local livre de claridade. Em subsequente, foram lavadas com 2 mL de PBS-BSA, centrifugadas e o pellet foi ressuscitado com 2 mL de IP (1,25 µg/mL) às amostras marcadas e 2 mL de PBS às não marcadas e todas foram reservados por mais 15 minutos em temperatura ambiente e longe de claridade. Findo este período, foi feita a leitura em Citômetro de Fluxo FACSCANTO II (Becton Dickinson, San Jose, CA), com aquisição de 100.000 eventos numa população previamente determinada (*gate*). A fluorescência do IP e FITC foi determinada em comprimento de onda de 488 nm e detectada no filtro a 620-700 nm. A Figura 13 ilustra, em resumo, estes procedimentos.

Figura 13: Desenho esquemático do experimento de micronúcleo em sangue periférico de camundongo após 48 horas de exposição ao composto LQFM021.



3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram inseridos em planilha do programa *Microsoft Office Excel 2007*[®] e a análise estatística foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism 5*[®]. Os experimentos de citotoxicidade foram realizados em sextuplicata e 3 experimentos independentes.

4.1. TESTE DE MTT

Investigou-se o potencial citotóxico dos sete compostos (LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024) objetos deste trabalho frente à células leucêmicas HL-60. A investigação foi realizada utilizando a concentração de 10 µg/mL, tendo em vista que a maioria das substâncias citotóxicas com utilização clínica como antitumoral ou ainda aquelas consideradas promissoras, atingem concentrações *in situ* inferiores a 10 µg/mL. Nesta investigação preliminar, os compostos testados não foram capazes de inibir o crescimento tumoral de forma satisfatória (50% da população celular). O composto LQFM011 apresentou a maior capacidade de inibição, entretanto, inibiu apenas 37,1% do crescimento celular, inferior ao esperado na triagem de novos protótipos antitumorais. O percentual de inibição de todos os compostos é mostrado na Tabela 2

Tabela 2: Percentual de inibição do crescimento de células tumorais HL60 frente à exposição a 10 µg/mL dos compostos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 pelo teste de MTT após 72 horas de exposição.

	INIBIÇÃO (%)
LQFM011	37,1
LQFM012	7,3
LQFM020	0
LQFM021	1,5
LQFM022	0
LQFM023	13,3
LQFM024	0

Os ensaios foram realizados em sextuplicata e em três experimentos independentes.

4.2. AZUL DE TRIPANO

A citotoxicidade dos compostos LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 também foram testadas em células tumorais K562 pela metodologia de exclusão do corante azul de tripano que analisa a integridade de membrana celular. A Figura 14 mostra o percentual de viabilidade celular *versus* concentração dos compostos (mM), onde foi possível obter os valores de IC₅₀ dessas substâncias após 24 horas de exposição, exibidos na Tabela 3.

Figura 14: Viabilidade das células K562 frente à exposição aos compostos LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 no ensaio de exclusão do corante azul de tripano após 24 de exposição. Os testes foram realizados em sextuplicata e em três experimentos independentes.

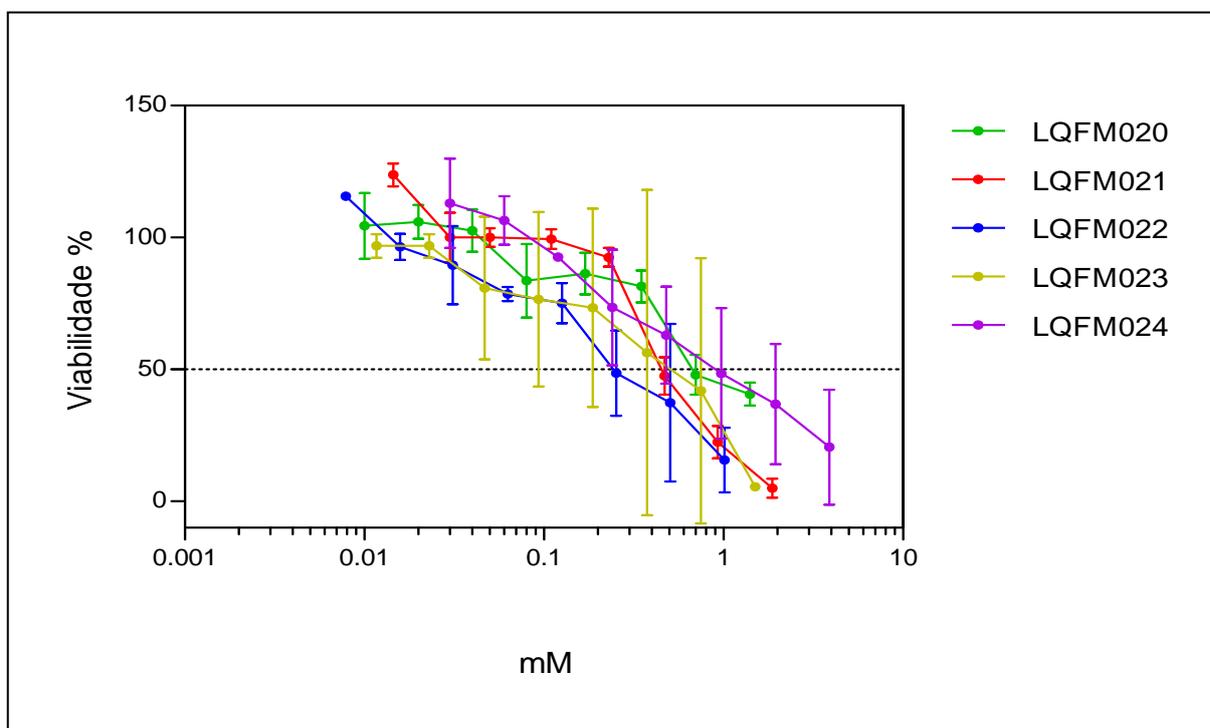


Tabela 3: Valores de IC₅₀ obtidos pelos compostos LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 no ensaio de exclusão do corante azul de tripano com células K562 após 24 horas de exposição.

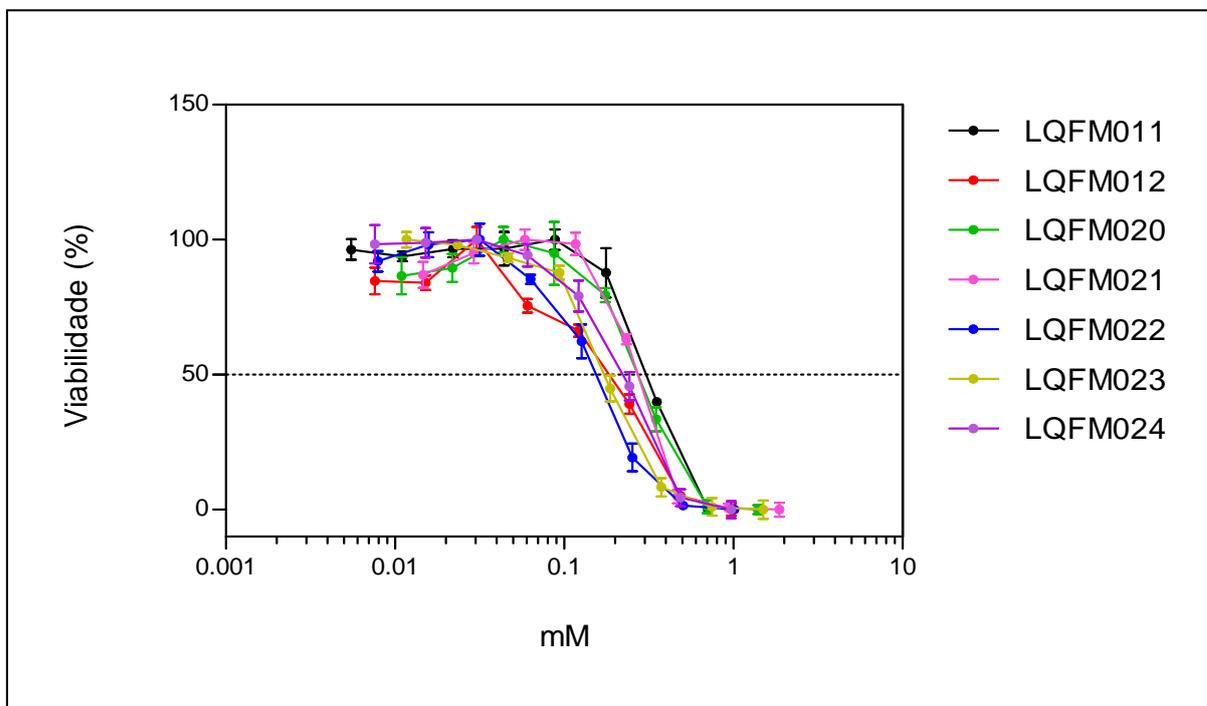
	IC ₅₀	
	mMol	µg/mL
LQFM020	0,659	152
LQFM021	0,443	105
LQFM022	0,191	47
LQFM023	0,97	239
LQFM024	2,18	560

Os resultados obtidos pelo método azul de tripano corroboram com aqueles obtidos pelo método MTT, confirmando o baixo potencial dos compostos em inibir o crescimento de células tumorais. Esses achados, num primeiro momento, desestimulam a continuidade dos seus estudos como potenciais candidatos a fármacos antitumorais.

4.3. TESTE DE CAPTAÇÃO DO CORANTE VERMELHO NEUTRO

A exposição das células 3T3 aos compostos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 provocou uma redução da viabilidade celular de maneira concentração-dependente (4,7– 602 µg/mL), quando comparadas ao controle não exposto. A Figura 15 mostra um gráfico de regressão não linear confeccionado a partir do percentual de viabilidade celular *versus* concentração dos compostos (mM).

Figura 15: Viabilidade das células 3T3 frente à exposição aos compostos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 (602 a 4,7 µg/mL) no ensaio de captação do corante vermelho neutro (NRU assay). Os testes foram realizados em sextuplicata e em três experimentos independentes.



Os valores de IC_{50} encontrados foram LQFM011 = 0,334 mM, LQFM012 = 0,218 mM, LQFM020 = 0,302 mM, LQFM021 = 0,261 mM, LQFM022 = 0,157 mM, LQFM023 = 0,177 mM e LQFM024 = 0,231 mM. Estes valores foram utilizados para o cálculo da estimativa da DL_{50} (mmol/kg) a partir da equação de regressão linear proposta pelo protocolo da ICCVAM para substâncias puras:

$$(\log DL_{50} [mg/kg] = 0,435 \times \log IC_{50})$$

Para encontrar os valores de DL_{50} em mg/kg, multiplicamos a média do valor de IC_{50} (mM) de cada composto pelo seu peso molecular. A Tabela 4 mostra os valores de IC_{50} (mM e µg/mL), os valores de DL_{50} estimados (mg/mL) e os pesos moleculares dos respectivos compostos. O composto LQFM011 (70,8 µg/mL) apresentou o maior valor de IC_{50} , se mostrando a menos citotóxica dentre as demais. Já o composto LQFM22 apresentou a maior citotoxicidade (38,7 µg/mL) neste experimento.

Tabela 4: Valores de IC₅₀ encontrados no teste de captação do corante vermelho neutro em células basais 3T3, DL₅₀ estimadas e peso molecular dos compostos em estudo.

	IC ₅₀		DL ₅₀	PM
	mM	µg/mL	(mg/kg)	
LQFM011	0,334 ± 0,05	70,8	548	212,08
LQFM012	0,218 ± 0,09	56	551	257,06
LQFM020	0,302 ± 0,01	69	568	230,07
LQFM021	0,261 ± 0,04	59,8	533	230,07
LQFM022	0,157 ± 0,01	38,7	457	246,66
LQFM023	0,177 ± 0,02	43,6	482	246,66
LQFM024	0,231 ± 0,04	59,4	565	257,21

Os valores estimados de DL₅₀ se encontraram entre 300 mg/kg e 2000 mg/kg, faixa preconizada pelo GHS como categoria 4. Ao analisar os dados de citotoxicidade basal, pudemos concluir que as substâncias LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 apresentaram um perfil de baixa toxicidade. Além disso, esses dados foram usados para a escolha da dose inicial (2000 mg/kg) dos testes de toxicidade oral aguda *in vivo*, de acordo com o protocolo OECD 423.

4.4. TOXICIDADE ORAL AGUDA – MÉTODO DE CLASSES (OECD 423)

Após a análise dos resultados *in vitro*, iniciou-se os experimentos *in vivo* pelo teste de toxicidade oral aguda de dose única - método de classes. Para tal, usou-se os valores de DL₅₀ estimados no teste de citotoxicidade para direcionar a escolha das doses iniciais dos compostos LQFM020, LQFM021, LQFM023 e LQFM024. Considerando o método de classe, e as estimativas das DL₅₀ obtidas (568 mg/kg, 533 mg/kg, 482 mg/kg e 565 mg/kg, respectivamente), a dose de 2000 mg/kg foi

escolhida para iniciar a administração nos animais, conforme orientação do guia OECD 423.

Não foram observadas diferenças no resultado deste experimento quando comparamos o sexo dos animais. Dessa forma, a observação dos sinais de toxicidade foi baseada na triagem hipocrática de todos os grupos e está ilustrada na Tabela 5. A Figura 16 ilustra um quadro da análise comportamental com as principais interpretações dos eventos tóxicos observados nos animais, bem como a classificação de cada composto segundo o sistema GHS.

Tabela 5: Observação dos sinais de toxicidade apresentados pelos animais (camundongos: n=3 por grupo) no teste de toxicidade oral aguda –método de classes – OECD 423 baseada na triagem hipocrática proposta por Malone e Robichaud (1962).

	LQFM020								LQFM021								LQFM023								LQFM024							
	0'	15'	30'	60'	4 h	1d	3 d	14ºd	0'	15'	30'	60'	4 h	1d	3 d	14ºd	0'	15'	30'	60'	4 h	1d	3 d	14ºd	0'	15'	30'	60'	4 h	1d	3 d	14ºd
Frênilo Vocal	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Irritabilidade	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	4	3	3	3	3	3
Resposta ao toque	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Resposta ao aperto cauda	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Contorção	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Posição trem posterior	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo endireitamento	2	2	2	2	2	2	2	2	4	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tonus do corpo	3	3	3	3	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	4	2	2	3	3	3	3	2	2	2	2
Força para agarrar	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
Ataxia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo auricular	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Reflexo corneal	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Tremores	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	1	0	0	0	0	3	3	2	2	1	1	1	1
Convulsões	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Straub	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Anestesia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacriminação	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ptosis	4	4	4	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3	3	2	2	2	2
Micção	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Defecção	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Letargia	3	3	3	3	2	1	1	0	2	2	2	2	3	0	0	0	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloereção	4	4	4	3	2	2	2	2	3	3	3	3	3	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	2
Respiração	4	3	2	2	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	2	4	4	4	3	2	2	2	2	4	4	4	4	3	3	3	3
Cianose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Morte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Os animais foram observados nos tempos 0', 15', 30', 45', 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 12h e 24h e em seguida, diariamente até o 14º dia, quando foram sacrificados. Alguns dos tempos de observação não foram exibidos nesta tabela porque os sinais de toxicidade apresentados nos tempos que não foram contemplados nessa tabela equivalem-se ao tempo imediatamente anterior. Não foram observadas diferenças no resultado deste experimento quando comparamos o sexo dos animais.

Figura 16: Interpretação dos principais eventos tóxicos apresentados durante o teste de toxicidade oral aguda – método de classes (OECD 423) em camundongos (n = 3 por grupo) após exposição de uma única dose (2000 mg/kg) dos compostos LQFM020, LQFM021, LQFM023 e LQFM024 e suas respectivas classificações no sistema GHS. Não foram observadas diferenças no resultado deste experimento quando comparamos o sexo dos animais.

	DL ₅₀ estimada <i>in vitro</i> (mg/kg)	Dose inicial no teste de toxicidade oral aguda (mg/kg)	Sinais de toxicidade	Classe GHS
LQFM020	568	2000	Os animais apresentaram tremores corporais moderados, ptose moderada nos primeiros 30', desaparecendo após a primeira hora subsequente à administração. Os animais se mantiveram levemente letárgicos, encolhidos e contraídos (tônus do corpo) e com os pelos pouco eriçados, sinais que desapareceram logo após a segunda hora do experimento. Nenhum animal foi a óbito.	5
LQFM021	533	2000	Os animais apresentaram poucas alterações comportamentais até as primeiras 2 horas de experimento, limitando-se a uma moderada letargia neste período. Houve comprometimento moderado dos movimentos das patas traseiras (paresia posterior) em todos os animais, agravando-se em dois deles após a 3ª hora e levando um animal a óbito. Em 24 h, foi observada recuperação completa nos dois animais que sobreviveram.	4
LQFM023	482	2000	Os animais apresentaram tremores corporais de forma leve a moderada, ptose leve nas primeiras 3 horas, desaparecendo após esse período, bem como os outros sintomas. Com 24 horas, foi observada mudança brusca no comportamento de um dos animais, com demasiada letargia e fraqueza dos movimentos respiratórios e musculares e óbito subsequente. Os dois animais sobreviventes se recuperaram completamente após 48 h.	5
LQFM024	565	2000	Os animais apresentaram comportamento agitado e arisco, irritação acentuada, com tremores moderados, além de ptose moderada a partir dos primeiros 15' de experimento. Houve redução dos sinais de tremores e ptose logo após a primeira hora. Porém, a irritabilidade, agitação e o comportamento arisco dos animais permaneceram até o fim do experimento. Nenhum animal foi a óbito.	5

Uma vez investigados os sinais de toxicidade e os episódios de óbito frente à exposição única aos compostos, foi possível classificá-los quanto ao risco tóxico no sistema GHS de classificação. Posto isso, consideramos pertinente classificar o composto LQFM021 na classe 4 por desencadear sinais de comprometimento grave da atividade motora das patas traseiras dos camundongos ainda que tenha advindo o óbito de um único animal durante o experimento. Os animais expostos à esse

composto apresentaram acentuada paresia posterior, fundamentada pela ausência de movimentos nesses membros embora tenha sido preservada a resposta positiva aos estímulos dolorosos. Os demais compostos (LQFM020, LQFM023 e LQFM024) foram enquadradas na categoria 5.

Relacionando os dados de toxicidade aguda e citotoxicidade basal, podemos inferir uma correlação entre os achados *in vivo* e *in vitro* que indicavam um perfil de baixa toxicidade dos compostos testados. É importante ressaltar que, apesar da maioria dos compostos terem sido classificadas na categoria 5 em função da ocorrência de 0-1 morte, os sinais de toxicidade vinculados à sua exposição não devem ser ignorados.

4.5. TOXICIDADE ORAL SUBAGUDA DE DOSES REPETIDAS – 28 DIAS (OECD 407)

Em estudos de triagem na busca de novos fármacos cardiovasculares realizados pelo grupo do Prof. Dr. Matheus Lavoranti Rocha (2012), o composto LQFM021 apresentou excelentes resultados como relaxante vascular isolado e provável inibidor de PDE 3. Diante disso, optamos por prosseguir os estudos de toxicidade deste grupo de candidatos a fármacos com este composto e realizamos o estudo da sua toxicidade oral subaguda em ratos, durante 28 dias consecutivos, conforme protocolo OECD 407. Neste estudo, conseguimos resultados mais detalhados sobre a interferência deste composto sobre o comportamento, ganho de massa corporal, parâmetros hematológicos e bioquímicos e como afetaram órgãos específicos em ratos frente a três doses diferentes. Além disso, pudemos observar as alterações que este composto provocou quando a sua administração foi interrompida.

4.5.1. Triagem hipocrática

Sob o mesmo ponto de vista, os eventos de toxicidade observados no teste de toxicidade subaguda de doses repetidas (62,5 mg/kg/dia; 125 mg/kg/dia; 250 mg/kg/dia e 250 mg/kg/dia satélite) foram baseados na triagem hipocrática. Durante o experimento, pudemos notar que os animais apresentaram um quadro de hipoatividade e letargia nos primeiros trinta minutos após a administração do

composto LQFM021, em todos os grupos de exposição. No entanto, foi averiguado um grau letárgico mais acentuado nos animais que receberam 62,5 mg/kg/dia. Ainda, após a gavagem, os grupos tratados, controle e satélites apresentaram piloereção.

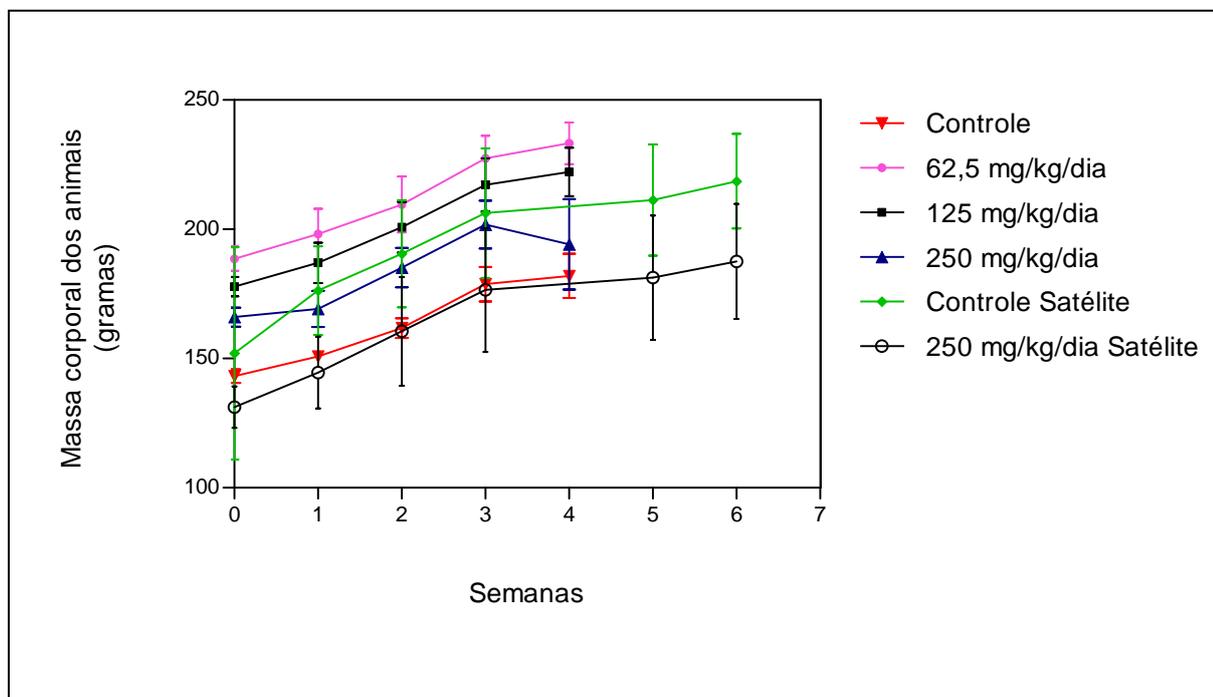
Além disso, uma leve fraqueza nas patas traseiras, o que reduziu a força de agarrar-se, foi observada nos grupos tratados, em contraste com grupos controles. Porém, a intensidade desse sinal foi similar entre todos os grupos de exposição.

4.5.2. Ganho de massa corporal

A análise dos efeitos do composto LQFM021 sobre o metabolismo foi realizada cruzando os dados de ganho de massa corporal dos animais ao longo do tempo de experimentação em relação ao grupo controle. A Figura 17 mostra essa evolução, onde a semana de número “0” indica o início do experimento e a semana “4” indica o dia da eutanásia dos animais do grupo controle e de doses de exposição. A semana “6” indica o dia de eutanásia dos animais dos grupos satélites (controle e maior dose).

Todos os grupos, ao longo da exposição, apresentaram ganho de massa corporal progressivo, ou seja, o ganho de massa corporal do grupo controle (27,22% ± 4,35) foi similar ao ganho de massa corporal dos grupos expostos ao composto LQFM021 nas doses de 62,5 mg/kg/dia; 125 mg/kg/dia; 250 mg/kg/dia e 250 mg/kg/dia satélite (23,71% ± 4,05; 24,97% ± 5,59; 17,10% ± 11,33; 29,62% ± 5,57 e 43,75% ± 13,53, respectivamente). Esses dados mostram que a exposição ao composto não interferiu no ganho de massa corporal dos animais expostos ($p > 0,05$).

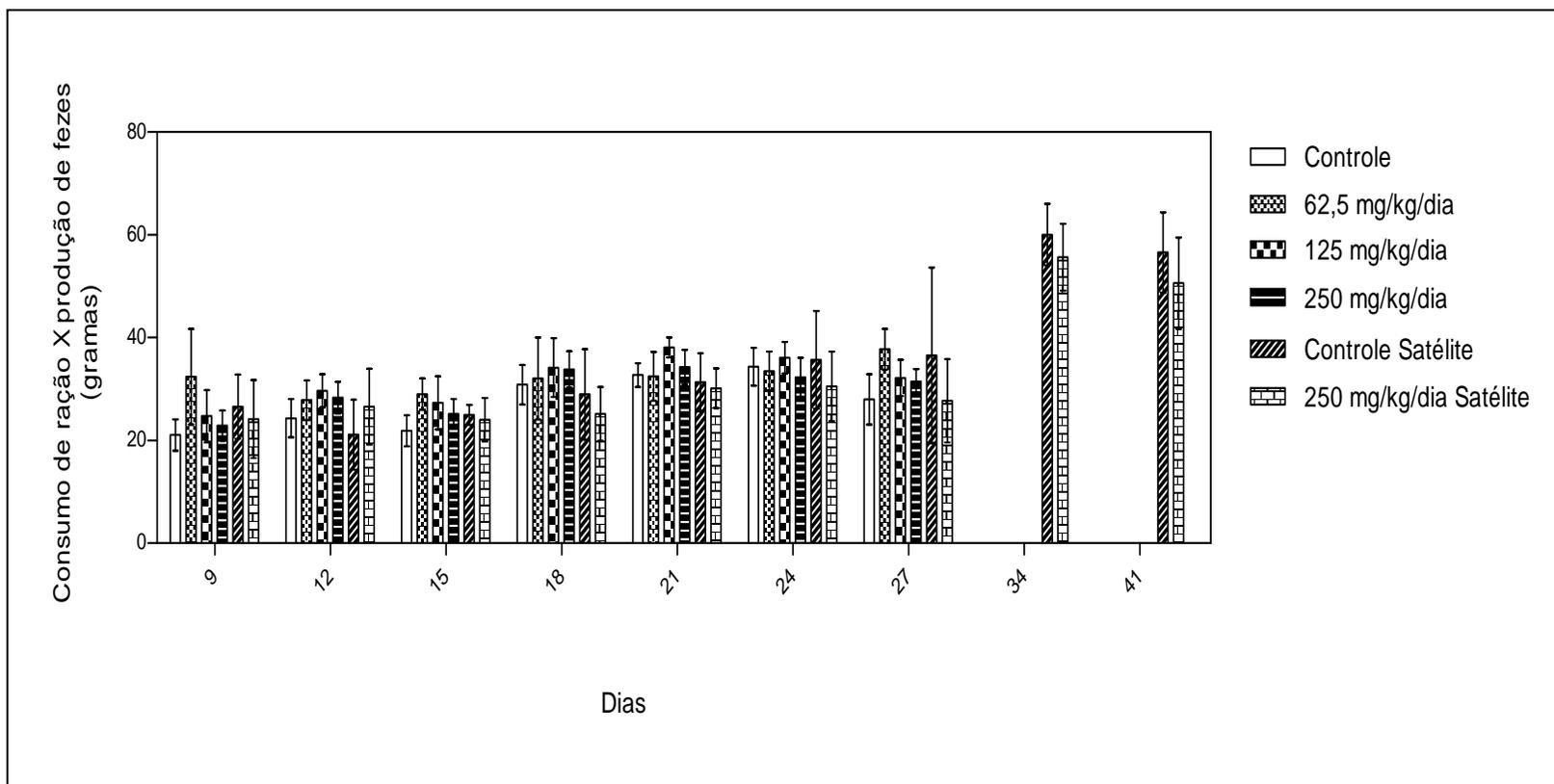
Figura 17: Evolução ponderal dos grupos (n=5 por grupo) de animais expostos às diferentes doses do composto LQFM021 ao longo das semanas do teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias e dos grupos satélites por mais 14 dias após a exposição. Valores obtidos a partir da média da massa corporal de cada grupo ($p > 0,05$).



4.5.3. Consumo de ração x produção de fezes

Ao analisar os dados de consumo de ração e produção de fezes dos animais, não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os grupos tratados quando comparados ao grupo controle ao longo de todo o experimento, como demonstrado na Figura 18. A pesagem foi realizada em todos os grupos a cada três dias, durante 28 dias consecutivos, e a cada sete dias nas duas semanas subsequentes com os grupos satélites. A quantidade de ração era ajustada ao consumo dos animais à medida que iam aumentando a massa corporal.

Figura 18: Relação do consumo de ração e a produção de fezes dos animais dos grupos de exposição (n=5 por grupo) à três diferentes doses do composto LQFM021 e grupo controle ao longo das semanas do teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias e dos grupos satélite por mais 14 dias após a exposição. Valores obtidos a partir da diferença da média do peso de ração remanescente e o peso das fezes de cada grupo ($p > 0,05$).

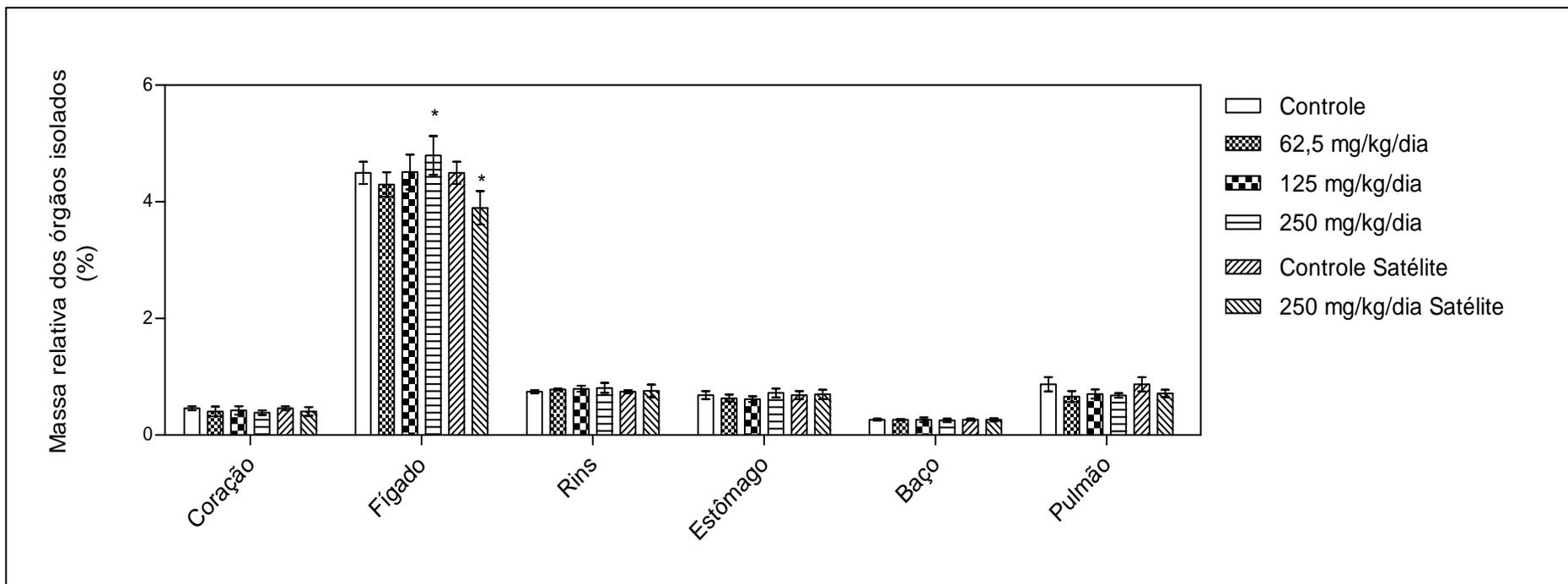


Os altos desvios padrões apresentados na Figura 18 demonstram a interferência da variação de massa corporal dos animais por grupo, que apesar de não ser maior que 20% no início do experimento, se alargou no decorrer das semanas. Além disso, para devida coleta de fezes, o assoalho da gaiola metabólica é vazado, motivo de perdas consideráveis de ração à medida que iam diminuindo de tamanho quando roídas. A ração roída, por muitas vezes, caiu para fora do coletor de fezes, impedindo, dessa forma, identificar a qual grupo pertencia.

4.5.4. Relação massa dos órgãos

Durante a necropsia, foi registrado a massa absoluta dos órgãos dos animais (dados não mostrados). Coração, fígado, rins, estômago, baço e pulmão foram pesados e a relação percentual (massa relativa) destes órgãos frente à massa corporal total (absoluta) dos animais é demonstrada na Figura 19. Quando comparados ao controle, o grupo exposto à dose de 250 mg/kg/dia do composto LQFM021 apresentou aumento de massa relativa do fígado, o que aparentemente é reversível, considerando que o grupo satélite de mesma dose apresentou redução da massa relativa deste órgão quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

Figura 19: Massa relativa dos órgãos isolados dos animais dos grupos expostos à três diferentes doses do composto LQFM021 e grupo controle no teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias (n=5 por grupo). Valores obtidos a partir da relação percentual da média da massa dos órgãos isolados e a média da massa corporal total de cada grupo (*p<0,05).



4.5.5. Parâmetros hematológicos

Foram analisados os parâmetros hematológicos de séries vermelha (hemácias), branca (leucócitos) e plaquetária. Os parâmetros relativos à série vermelha (a) número de hemácias; (b) hematócrito, (c) hemoglobina e (d) RDW estão apresentadas na Figura 20. A análise desta figura demonstra que os grupos de animais expostos às doses de 62,5 mg/kg/dia; 125 mg/kg/dia; 250 mg/kg/dia e 250 mg/kg/dia satélite não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) em relação ao grupo controle, aventando que o composto LQFM021 não interferiu nestes parâmetros no período em que os animais foram expostos ou nos 14 dias subsequentes à sua interrupção. Os valores registrados encontram-se dispostos na Tabela 6.

Figura 20: Parâmetros hematológicos relacionados à série vermelha dos grupos expostos à três diferentes doses do composto LQFM021 e grupo controle no teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias ($n=5$ por grupo): (a) Número de hemácias por mL de sangue total; (b) Hematócrito; (c) Dosagem de hemoglobina e (d) RDW ($p > 0,05$).

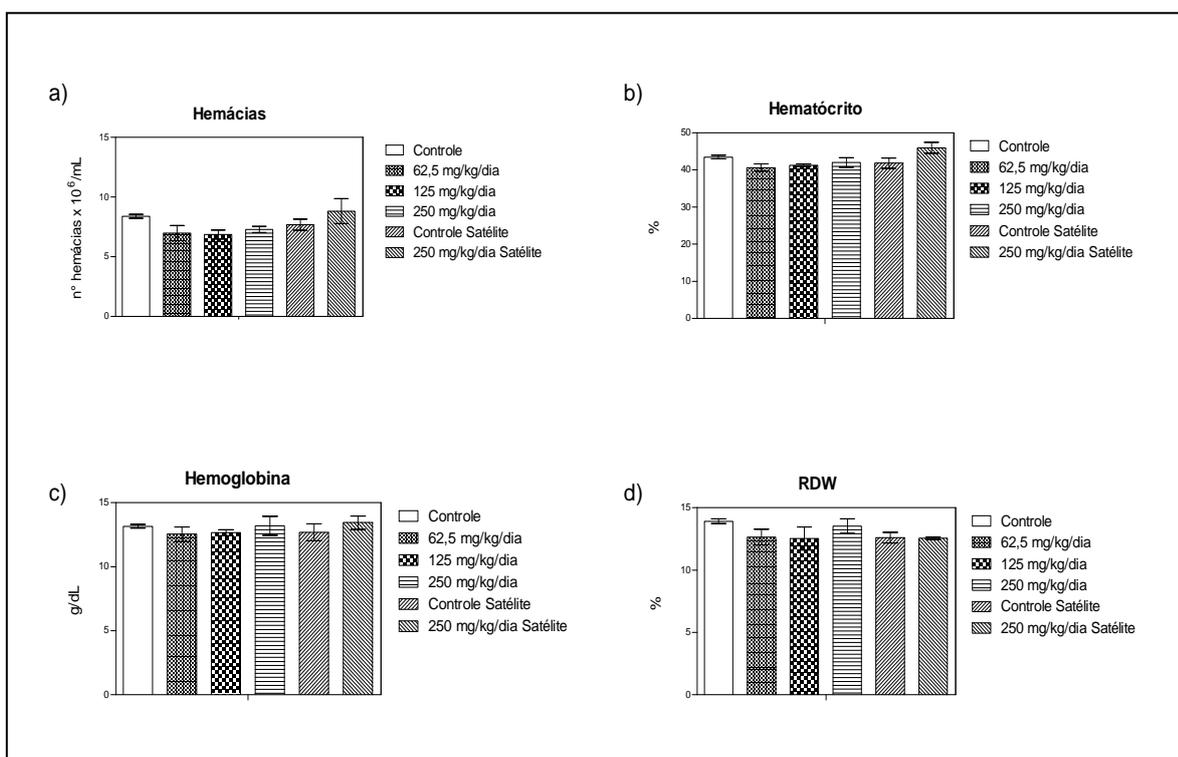


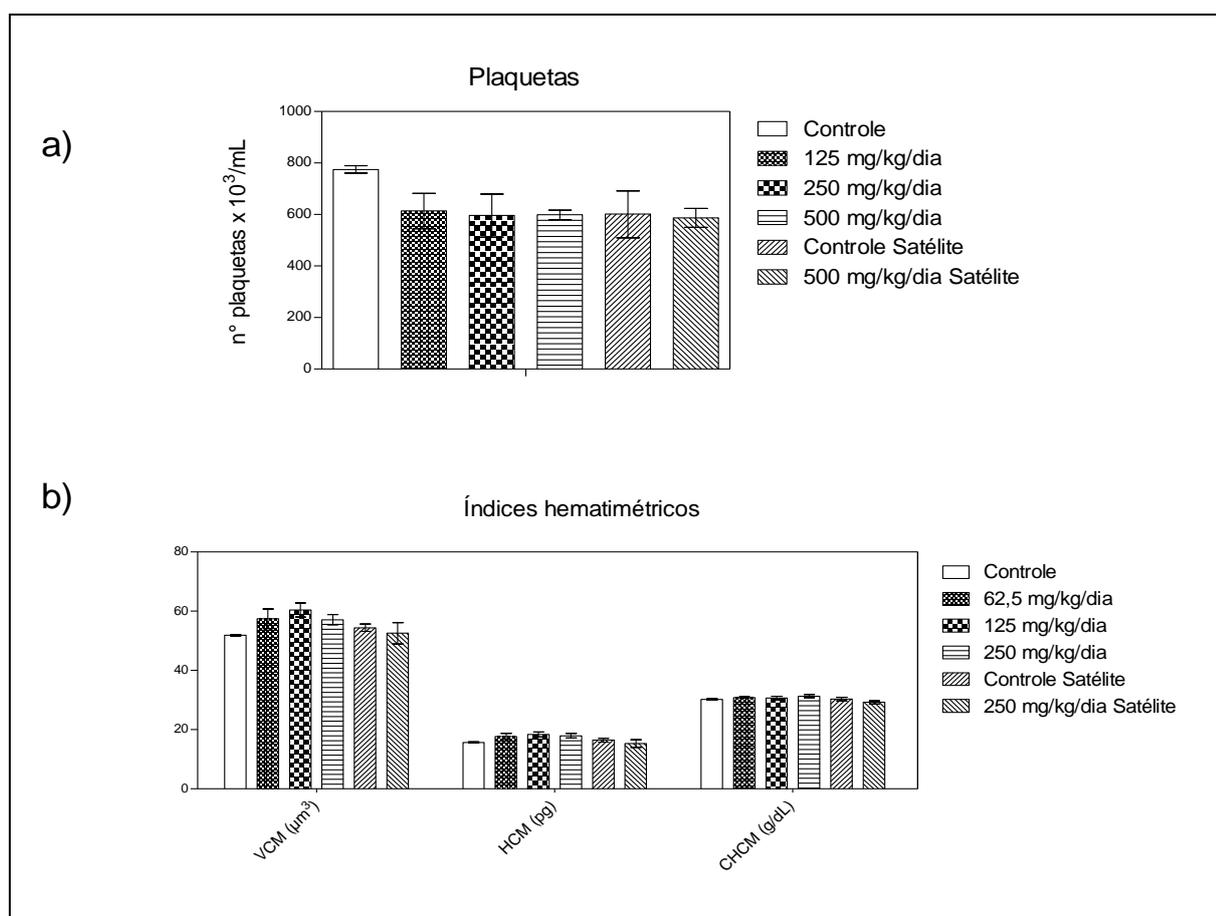
Tabela 6: Valores dos parâmetros hematológicos dos grupos expostos à três diferentes doses do composto LQFM021 e grupo controle no teste de toxicidade subaguda de doses repetidas por 28 dias (n=5 por grupo).

	Controle	62,5 mg/kg/dia	125 mg/kg/dia	250 mg/kg/dia	Controle Satélite	250 mg/kg/dia Satélite
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	8,37 \pm 0,16	6,98 \pm 0,64	6,86 \pm 0,38	7,29 \pm 0,26	7,69 \pm 0,47	8,82 \pm 1,04
Hemoglobina (g/dL)	13,15 \pm 0,14	12,54 \pm 0,57	12,65 \pm 0,24	13,18 \pm 0,74	12,68 \pm 0,65	13,43 \pm 0,53
Hematócrito (%)	43,47 \pm 0,67	40,61 \pm 1,94	41,25 \pm 0,75	42,01 \pm 2,21	41,83 \pm 2,39	45,97 \pm 2,54
VCM (μm)	51,87 \pm 0,18	57,42 \pm 3,30	60,40 \pm 2,38	57,17 \pm 1,76	54,44 \pm 1,26	52,56 \pm 3,60
HCM (pg)	15,72 \pm 0,18	17,73 \pm 1,03	18,41 \pm 0,76	17,96 \pm 0,74	16,51 \pm 0,64	15,33 \pm 1,30
VHCM (g/dL)	30,25 \pm 0,21	30,91 \pm 0,29	30,71 \pm 0,53	31,37 \pm 0,53	30,33 \pm 0,60	29,23 \pm 0,54
RDW (%)	13,91 \pm 0,19	12,66 \pm 0,63	12,54 \pm 0,92	13,54 \pm 0,59	12,61 \pm 0,43	12,57 \pm 0,09
Plaquetas	774,37 \pm 13,97	613,4 \pm 69,10	595,9 \pm 83,82	599 \pm 18,43	600,89 \pm 91,47	587,11 \pm 36,99
Leucócitos totais	6350 \pm 212,13	5000 \pm 1694,6	6540 \pm 1681,67	* 3594 \pm 1044,1	4688 \pm 2081,7	* 9800 \pm 1770,4
Segmentados (%)	16 \pm 0,00	21,75 \pm 14,38	21,6 \pm 5,59	24 \pm 4,58	24 \pm 1,73	16,33 \pm 5,51
Linfócitos (%)	77,5 \pm 0,71	72,5 \pm 16,38	72,6 \pm 7,64	72,33 \pm 4,93	71,67 \pm 1,53	75,67 \pm 9,02
Monócitos (%)	6,5 \pm 0,71	4,75 \pm 2,22	4,2 \pm 1,30	2,33 \pm 2,52	4 \pm 2,65	7,33 \pm 2,89
Eosinófilos (%)	0 \pm 0,00	1 \pm 0,00	1,6 \pm 2,07	0,33 \pm 0,58	0,33 \pm 0,58	0,67 \pm 1,15

Os parâmetros hematológicos foram analisados no equipamento ABX Micros 60 e a contagem diferencial foi realizada por microscopia óptica em lâminas de esfregaço sanguíneo dos animais submetidas à coloração pelo corante Panótipo rápido Laborclin®. $p < 0,05$.

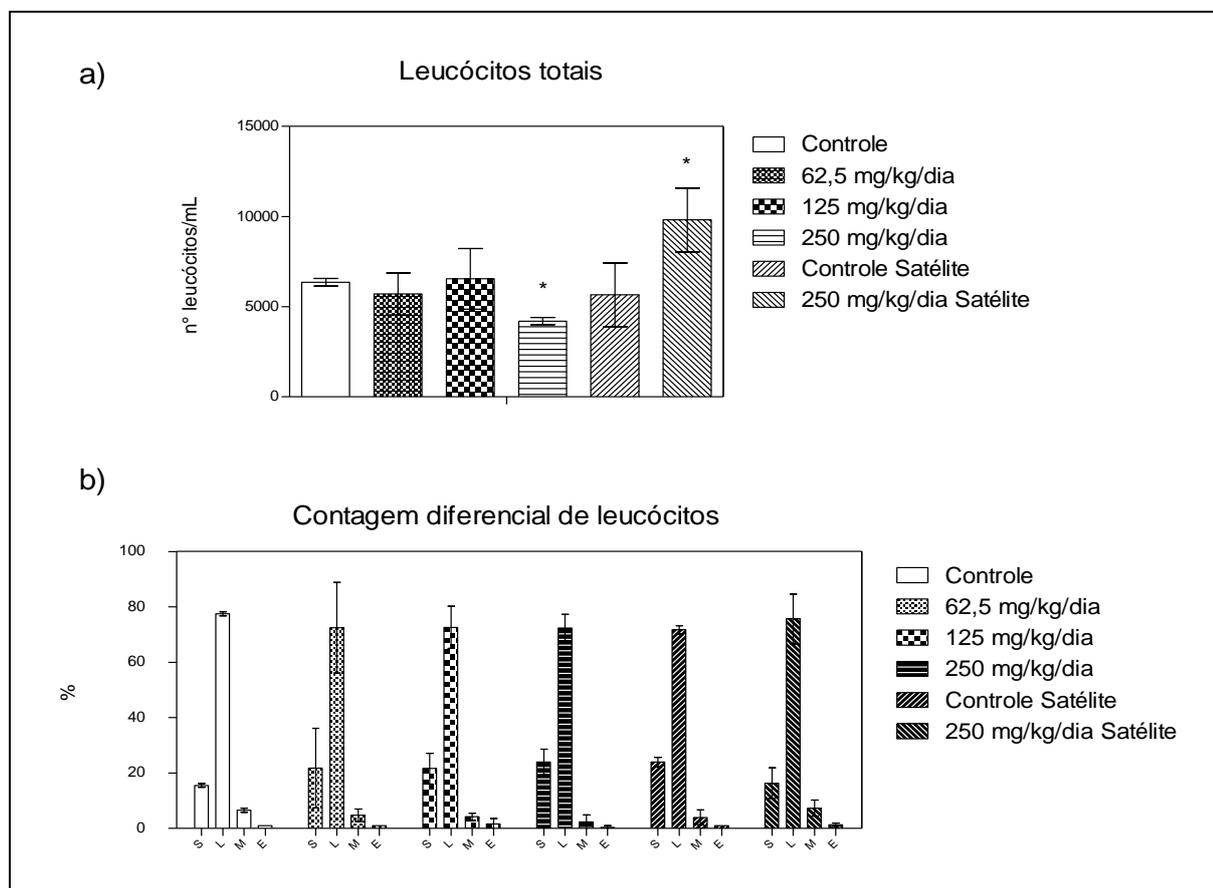
Ainda analisando a série vermelha, não observamos diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) nos índices hematimétricos de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), quando comparados aos resultados do grupo controle (Figura 21a). O mesmo comportamento foi observado em relação à série plaquetária dos grupos expostos às três doses do composto LQFM021 (Figura 21b), o que demonstra que este composto não interfere nesses parâmetros hematológicos.

Figura 21: Parâmetros hematológicos dos grupos expostos à três diferentes doses do composto LQFM021 e grupo controle no teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias ($n=5$ por grupo): (a) Número de plaquetas por mL de sangue total e (b) Índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM ($p > 0,05$).



Quando analisamos a série branca dos grupos de animais expostos, notamos que houve diferenças estatísticas ($p < 0,05$) no número total de leucócitos entre o grupo tratado com a maior dose (250 mg/kg/dia), incluindo o satélite, e o grupo controle (Figura 22a). No entanto, observamos que não houve alterações na relação percentual de células mononucleadas (monócitos e linfócitos) e polinucleadas (neutrófilos segmentados e eosinófilos) entre os grupos (Figura 22b).

Figura 22: Parâmetros de série branca dos grupos expostos à três diferentes doses do composto LQFM021 e grupo controle no teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias ($n=5$ por grupo): (a) Número de leucócitos por mL de sangue total e (b) Contagem diferencial dos leucócitos onde S = neutrófilos segmentados; L = linfócitos; M = monócitos e E = eosinófilos ($*p < 0,05$).



4.5.6. Parâmetros Bioquímicos

Para avaliar as funções metabólicas dos animais expostos, foi realizada a dosagem sérica de glicose, ureia, creatinina, aminotransferases (AST e ALT), amilase, albumina e proteínas totais (Tabela 7).

Os valores de glicose (Figura 23a) apresentados pelos grupos expostos à doses de 62,5 mg/kg/dia; 125 mg/kg/dia; 250 mg/kg/dia e 250 mg/kg/dia satélite não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$) em relação ao grupo controle. Isto demonstra que o composto LQFM021 não interferiu nos mecanismos de regulação glicêmica no período que os animais foram expostos. A função pancreática (Figura 23b) dos animais foi medida por meio da concentração de amilase sérica e também não apresentaram variações significativas em relação ao grupo controle ($p>0,05$).

Os parâmetros bioquímicos de função renal (ureia e creatinina) e hepática (AST e ALP) não apresentaram alterações em nenhum dos grupos expostos ao composto LQFM21 quando comparados ao grupo controle ($p>0,05$). Dessa forma, esses marcadores apontaram que, durante o período de exposição, não houve comprometimento dos rins e do fígado dos animais (Figura 23 c, d, e).

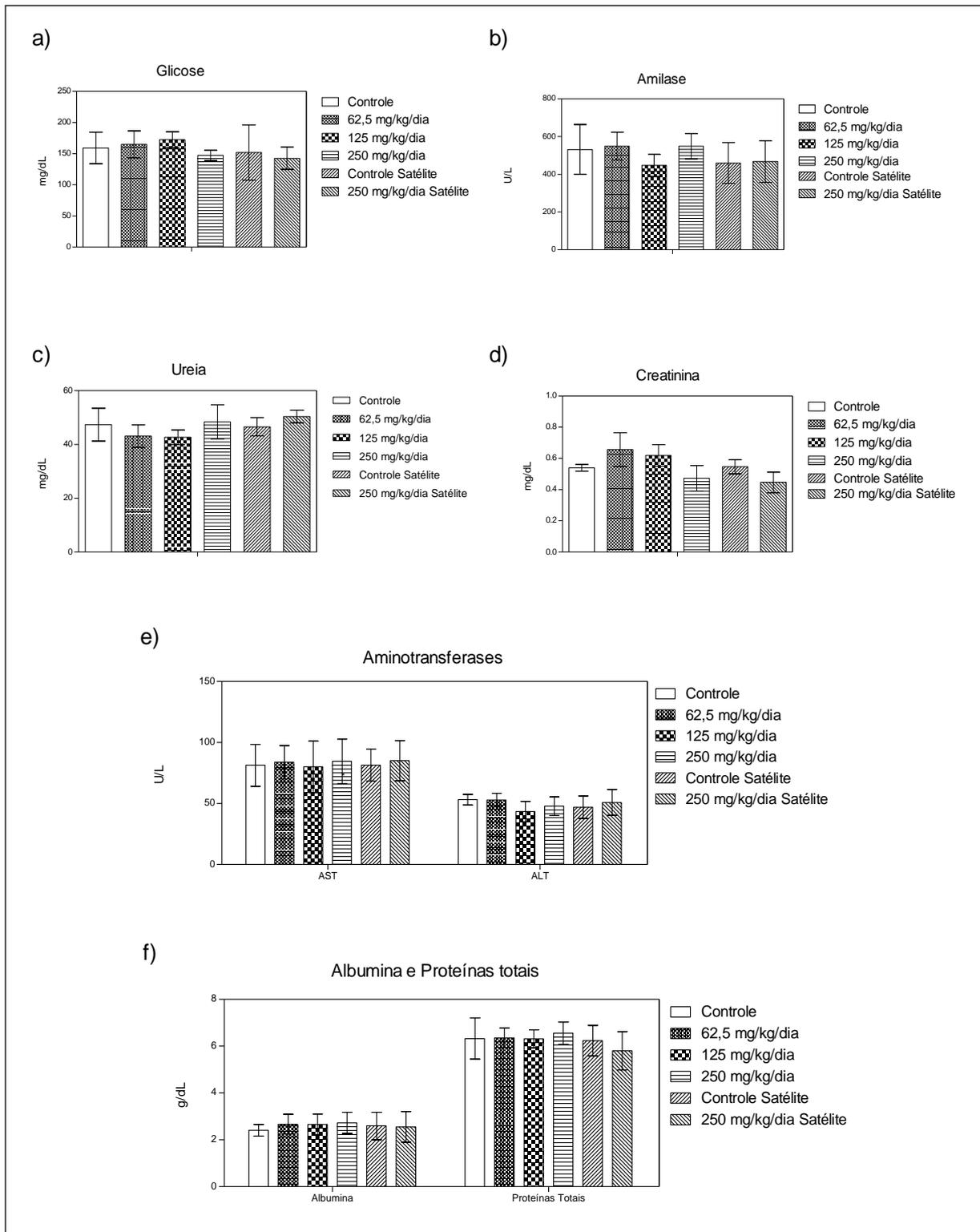
Por fim, ainda em comparação com o grupo controle, a análise das proteínas séricas dos animais realizada a partir das dosagens de proteínas totais e albumina (Figura 23f) revelaram que o composto LQFM021 não provocou alterações significativas nos grupos de 62,5 mg/kg/dia; 125 mg/kg/dia; 250 mg/kg/dia e 250 mg/kg/dia satélite no período a que foram expostos ($p>0,05$).

Tabela 7: Valores dos parâmetros bioquímicos dos grupos expostos a três diferentes doses do composto LQFM021 e grupo controle no teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias (n=5 por grupo).

	Controle	62,5 mg/kg/dia	125 mg/kg/dia	250 mg/kg/dia	Controle Satélite	250 mg/kg/dia Satélite
Glicose (mg/dL)	159,2 ± 25,3	165 ± 21,61	196,25 ± 45,60	147,4 ± 8,32	151,71 ± 44,23	132,67 ± 29,11
Ureia (mg/dL)	47,4 ± 6,1	43,13 ± 4,19	42,67 ± 2,69	48,4 ± 6,39	46,57 ± 3,41	50,4 ± 2,30
Creatinina (mg/dL)	0,54 ± 0,1	0,66 ± 0,11	0,62 ± 0,07	0,47 ± 0,08	0,55 ± 0,05	0,45 ± 0,07
AST (U/L)	81,25 ± 17,23	80 ± 21,19	80,5 ± 21,19	84,5 ± 18,23	81,33 ± 13,49	85 ± 16,47
ALT (U/L)	53,2 ± 4,35	52,25 ± 5,62	43,25 ± 8,43	47,8 ± 7,69	46,87 ± 9,23	50,80 ± 10,61
Amilase (U/L)	478 ± 62,4	513,1 ± 21,84	447,55 ± 58,99	526,95 ± 50,29	460,46 ± 108,20	467,85 ± 110,45
Albumina (g/dL)	2,41 ± 0,3	2,67 ± 0,42	2,65 ± 0,45	2,73 ± 0,45	2,59 ± 0,58	2,39 ± 0,70
Proteínas Totais (g/dL)	6,32 ± 0,9	6,35 ± 0,42	6,5 ± 0,67	6,55 ± 0,48	6,23 ± 0,65	5,54 ± 0,92

As dosagens bioquímicas foram realizadas em analisador automático Biosystems A-25. (p > 0,05).

Figura 23: Parâmetros bioquímicos dos grupos expostos a três diferentes doses do composto LQFM021 e grupo controle no teste de toxicidade oral subaguda de doses repetidas por 28 dias (n=5 por grupo): (a) Dosagem de glicose; (b) Dosagem de amilase pancreática; (c) e (d) Dosagem de marcadores de função renal: uréia e creatinina, respectivamente; (e) Dosagem de marcadores de função hepática: AST e ALT e (f) Dosagem de Albumina e Proteínas totais ($p > 0,05$).



4.5.7. Análise histopatológica

Atendendo ao protocolo de estudo de toxicidade, para esclarecer a atuação específica do composto LQFM021 sobre o sistema renal e hepático, os órgãos extraídos no momento da necropsia foram usados para confeccionar lâminas de cortes histológicos. No nosso trabalho, a análise histopatológica foi realizada de forma semi-quantitativa, contemplando o aparecimento de sinais de toxicidade no parênquima desses dois órgãos e utilizando o grupo controle como referencial.

4.5.7.1. Avaliação Renal

Ao analisar criteriosamente as lâminas de histologia dos rins dos animais expostos ao composto LQFM021, foi possível observar a presença de sinais de toxicidade nos grupos expostos às doses de 62,5 mg/kg/dia, 125 mg/kg/dia, 250 mg/kg/dia e 250 mg/kg/dia satélite, *a priori* não evidenciados nos parâmetros bioquímicos de função renal. Inicialmente, nos deparamos com um aparente quadro de dano glomerular, discreto processo de fibrose tecidual, perda de afinidade do parênquima à coloração eosina, além de focos de hemorragia e infiltração celular esparsos no tecido renal.

De forma pormenorizada, ao comparar os tecidos dos grupos expostos aos do grupo controle, o dano renal pôde ser notado por meio de uma variedade de modificações estruturais. Constatou-se aumento ou redução substancial do espaço de Bowman circundando glomérulos por vezes desfigurados e/ou atrofiados. Além disto, detectou-se espaços glomerulares vazios e estruturas amorfas no interior dos túbulos distais e proximais, as quais julgamos ser cristais, cilindros ou células necróticas em descamação. Foi possível verificar, ainda, perda de afinidade do corante eosina no parênquima renal, visível pela presença de coloração azulada em algumas áreas. De forma semi-quantitativa, as alterações evidenciaram a interferência do composto LQFM021 sobre o tecido renal de maneira dose-dependente e irreversível, uma vez que não houve mudanças no perfil histopatológico dos animais do grupo satélite. As alterações foram anotadas e os resultados estão expressos em cruces, de zero a quatro (Tabela 8). As cruces equivalem à presença dos eventos de forma gradual, utilizando o controle e o grupo

exposto à maior dose como parâmetros de comparação. Para melhor visualização, as Figuras 24, 25, 26, 27 e 28 ilustram todas essas alterações.

Tabela 8: Principais alterações encontradas na análise histopatológica dos rins dos animais expostos ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral aguda de doses repetidas por 28 dias (n=5 por grupo). Os resultados estão expressos em cruzes, de zero à quatro, que equivalem-se à ausência e presença dos eventos de forma gradual, utilizando o controle e os animais expostos à maior dose como parâmetro de comparação.

	62,5 mg/kg/dia	125 mg/kg/dia	250 mg/kg/dia	Controle	Controle Satélite	250 mg/kg/dia Satélite
Redução de espaço de Bowman	++	+++	++++	+	+	++++
Atrofia glomerular	++	++	+++	+	+	+++
Hemorragia	++	++	+++	+	+	++
Espaço Glomerular vazio	+	+	++	-	-	+
Perda de afinidade de corante eosina no parênquima renal	+	++	++	+	+	++
Material amorfo no interior dos túbulos	++	++	++	+	+	+++

Figura 24: Imagens dos cortes histológicos dos rins do grupo controle mostrando: a) parênquima renal e glomérulos normais (20x); b e c) glomérulos aparentemente saudáveis (40x) e d) glomérulo aparentemente saudável e seta apontando as hemácias, mostrando uma boa circulação no seu interior (100x). Coloração: hematoxilina – eosina.

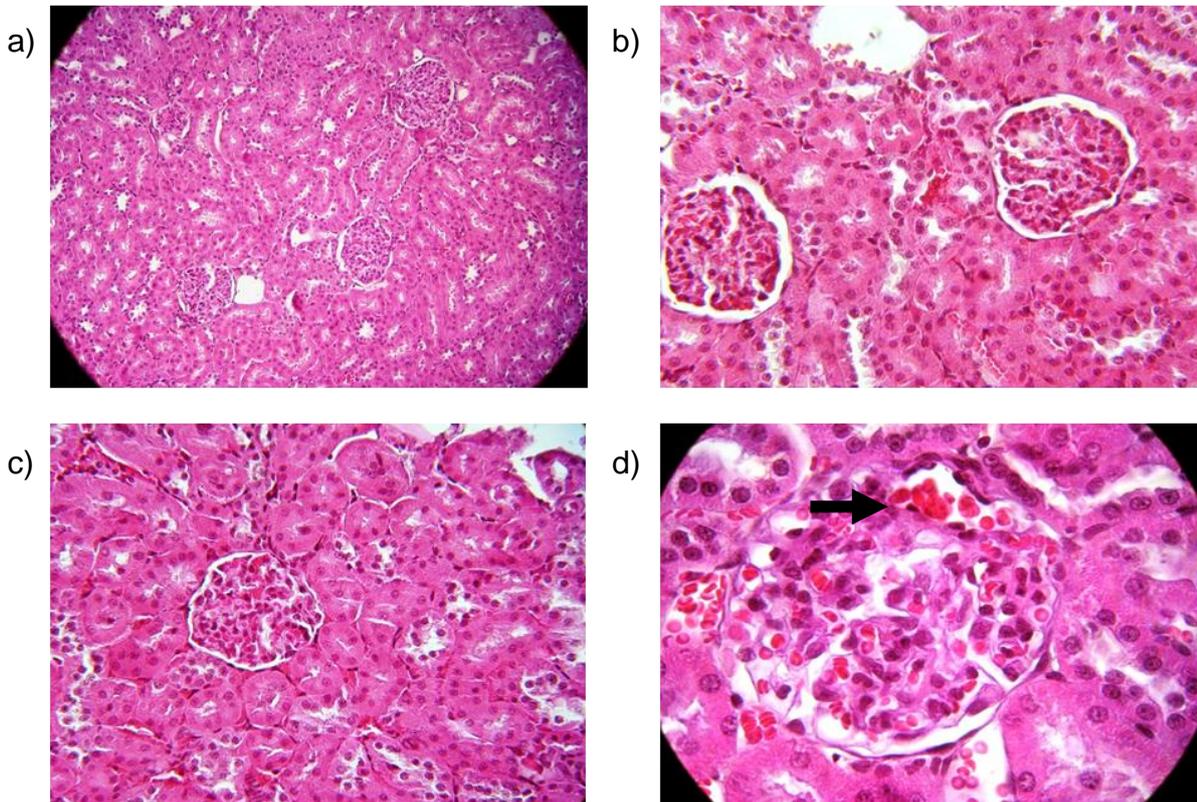


Figura 25: Imagens de corte histológico dos rins de ratas expostas ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral subaguda por 28 dias mostrando: (a) estruturas amorfas dentro de túbulos proximais (100x); (b) estruturas amorfas dentro dos túbulos distais (100x); (c) e (d) processo de edema do parênquima renal evidenciado pela presença de plasma (20x). Coloração: hematoxilina – eosina.

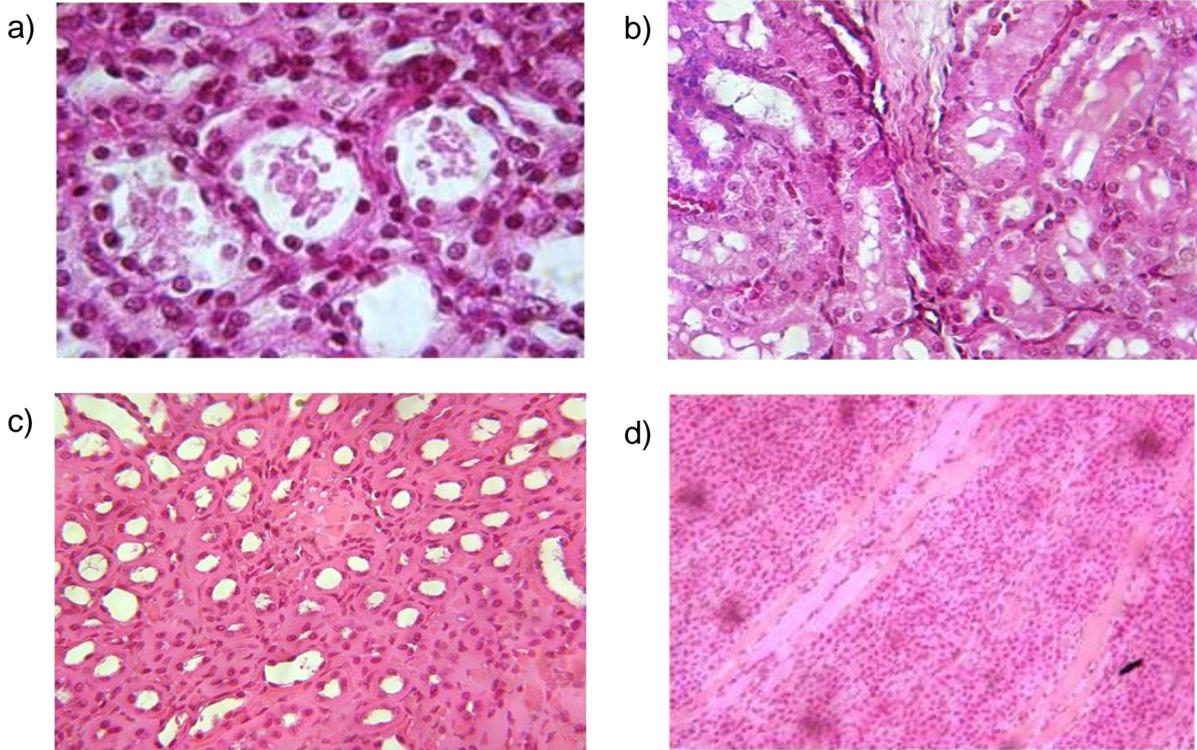


Figura 26: Imagens de corte histológico dos rins de ratas expostas ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral subaguda por 28 dias mostrando: (a) fibrose na artéria renal, hemorragia e alguns glomérulos desconstruídos (20x); (b) glomérulos disformes e aparente hipertrofia glomerular, reduzindo quase por completo o espaço de Bowman (40x); (c) glomérulos disformes, ausência de espaço de Bowman e aparente início de fibrose no tecido cortical (40x); (d) glomérulos disformes, ausência de espaço de Bowman em maior aumento (100x). Coloração: hematoxilina – eosina.

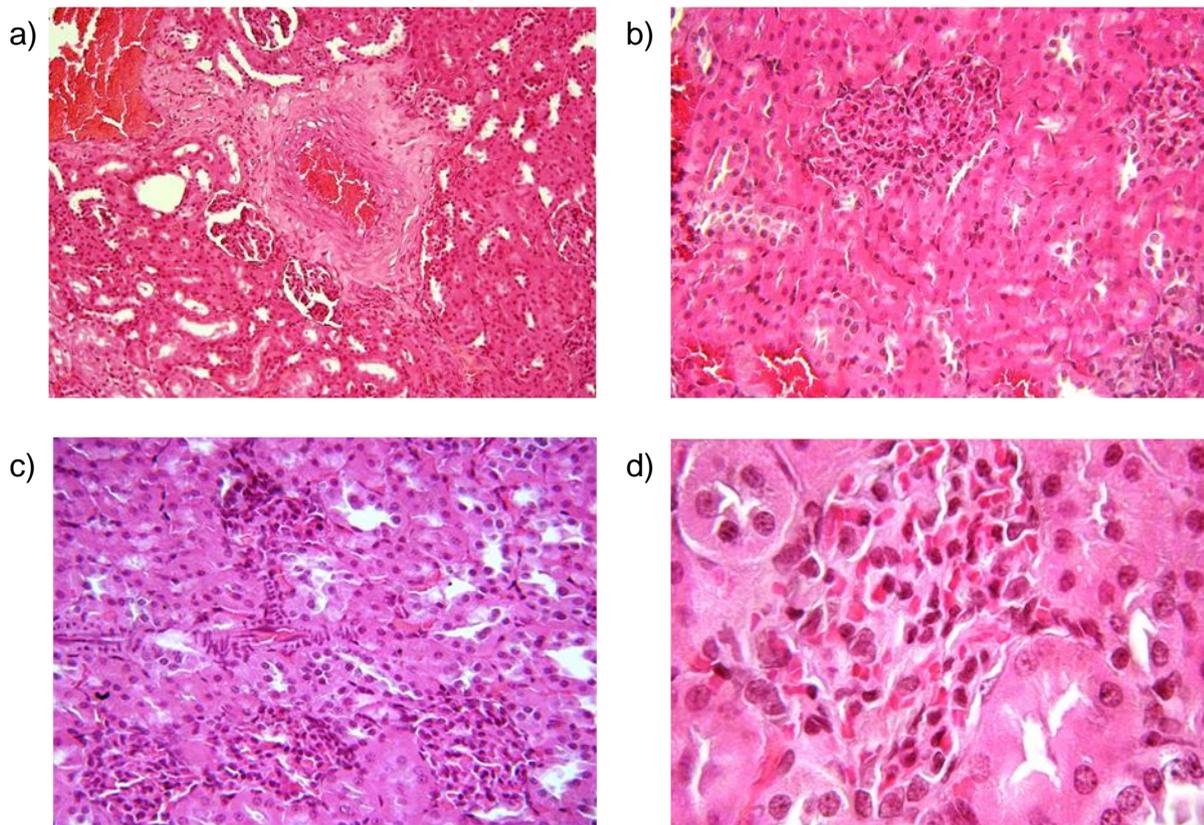


Figura 27: Imagens de corte histológico dos rins de ratas expostas ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral subaguda por 28 dias mostrando (a) focos hemorrágicos na camada cortical (10x); (b) rajadas de sangue indicando processo hemorrágico no parênquima renal (20x); (c) glomérulos desconstruídos, espaço de Bowman aumentado, atrofia glomerular e túbulos distais aumentados (20x); (d) espaços glomerulares vazios, glomérulos em desconstrução e um glomérulo isquêmico (20x). Coloração: hematoxilina – eosina.

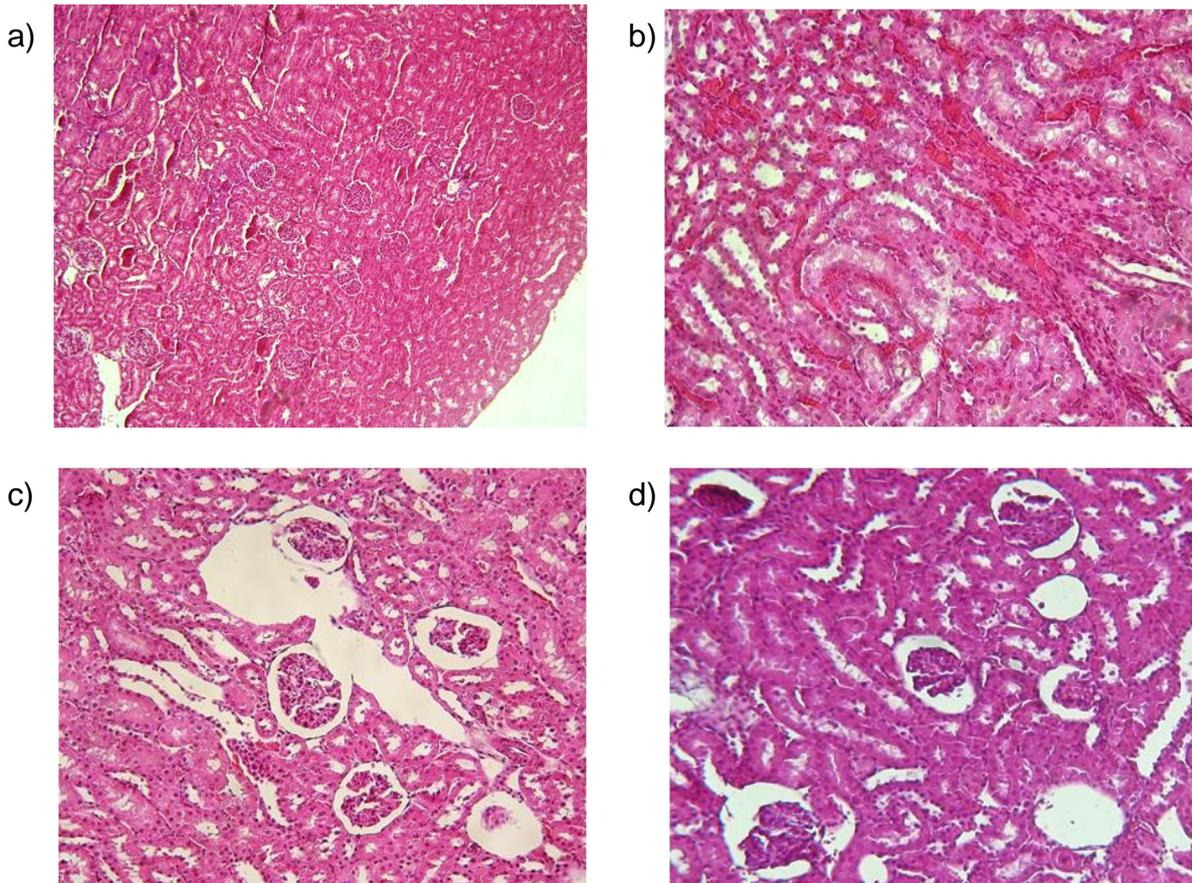
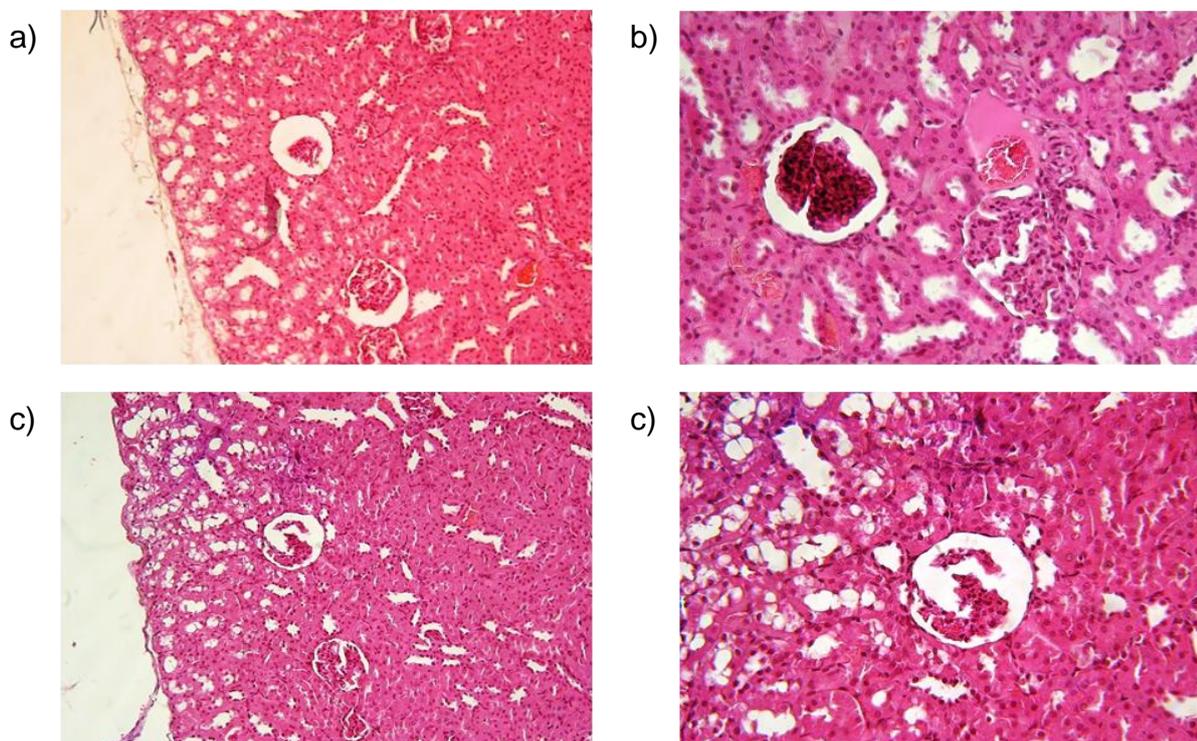


Figura 28: Imagens de corte histológico dos rins de ratas expostas ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral subaguda por 28 dias mostrando: (a) espaço de Bowman aumentado (10x); (b) glomérulo atrofiado e extravasamento de plasma arteriolar (40x); (c) aspecto “bolhoso” dos túbulos distais e proximais na camada cortical do rim e glomérulo desconstruído (10x); (d) Imagem anterior em maior aumento (40x). Coloração: hematoxilina – eosina.



4.5.7.2. Avaliação Hepática

Assim como a análise do tecido renal, a observação das lâminas de histologia do fígado dos grupos expostos ao composto em estudo indicou sinais de toxicidade anteriormente não evidenciados pelas dosagens bioquímicas. Todavia, os eventos de hepatotoxicidade se figuraram de forma mais branda. Utilizando o critério de comparação com o grupo controle, os grupos expostos à doses 62,5 mg/kg/dia, 125 mg/kg/dia, 250 mg/kg/dia e 250 mg/kg/dia satélite do composto LQFM021 apresentaram pequenos e isolados focos de infiltração e desarranjo parcial da arquitetura do parênquima hepático que ora sinalizava a presença de um edema, ora denunciava episódios de hemorragias exúguas. Os resultados da análise semi-quantitativa estão expressos em cruces, de zero a quatro (Tabela 9), utilizando o controle e o grupo exposto à maior dose como parâmetros de comparação. De

forma mais elaborada, as Figuras 29, 30 e 31 expõem as disparidades entre o parênquima hepático aparentemente saudável do grupo controle e os dos demais grupos.

Tabela 9: Principais alterações encontradas na análise histopatológica do fígado dos animais expostos ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral aguda de doses repetidas por 28 dias (n=5 por grupo). Os resultados estão expressos em cruces, de zero à quatro, que equivalem-se à ausência e presença dos eventos de forma gradual, utilizando o controle e os animais expostos à maior dose como parâmetros de comparação.

	62,5 mg/kg/dia	125 mg/kg/dia	250 mg/kg/dia	Controle	Controle Satélite	250 mg/kg/dia Satélite
Focos hemorrágicos	+	+++	++++	+	+	+++
Desarranjo do parênquima	++	++	+++	-	-	++
Infiltrado celular	++	++	++	+	+	+

Figura 29: Imagens de cortes histológicos de fígado de ratas do grupo controle no teste de toxicidade oral subaguda por 28 dias mostrando parênquima hepático aparentemente saudável: figura a: 10x e figura b: 20x. Coloração: hematoxilina – eosina.

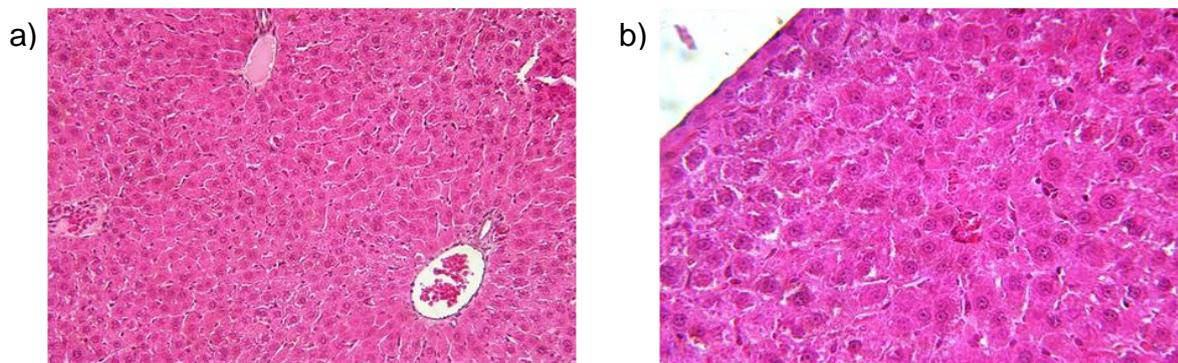


Figura 30: Imagens de corte histológicos do fígado de ratas expostas ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral subaguda por 28 dias mostrando: (a) e (b) focos hemorrágicos e desconstrução parcial do parênquima hepático (20x); (c) desarranjo parcial da arquitetura do parênquima hepático (40x) e (d) hepatócitos de tamanho aumentado e desarranjo intracelular que sinalizam a presença de edema (40x). Coloração: hematoxilina – eosina.

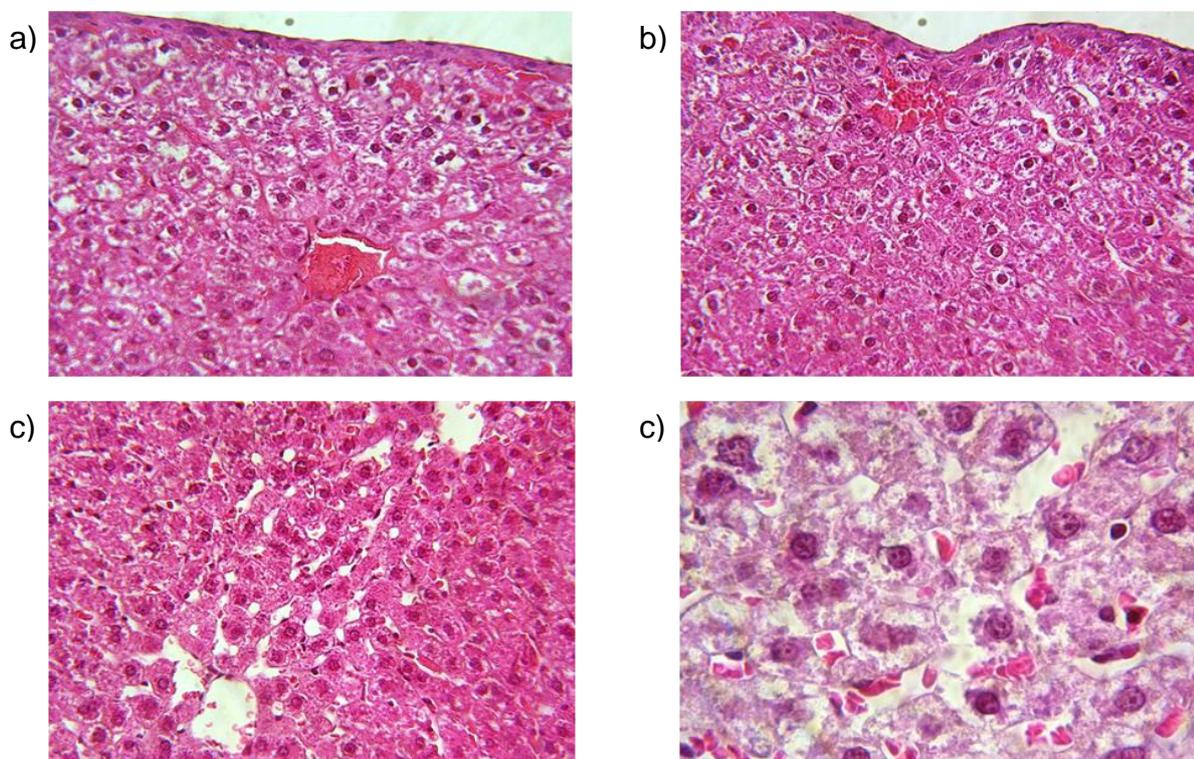
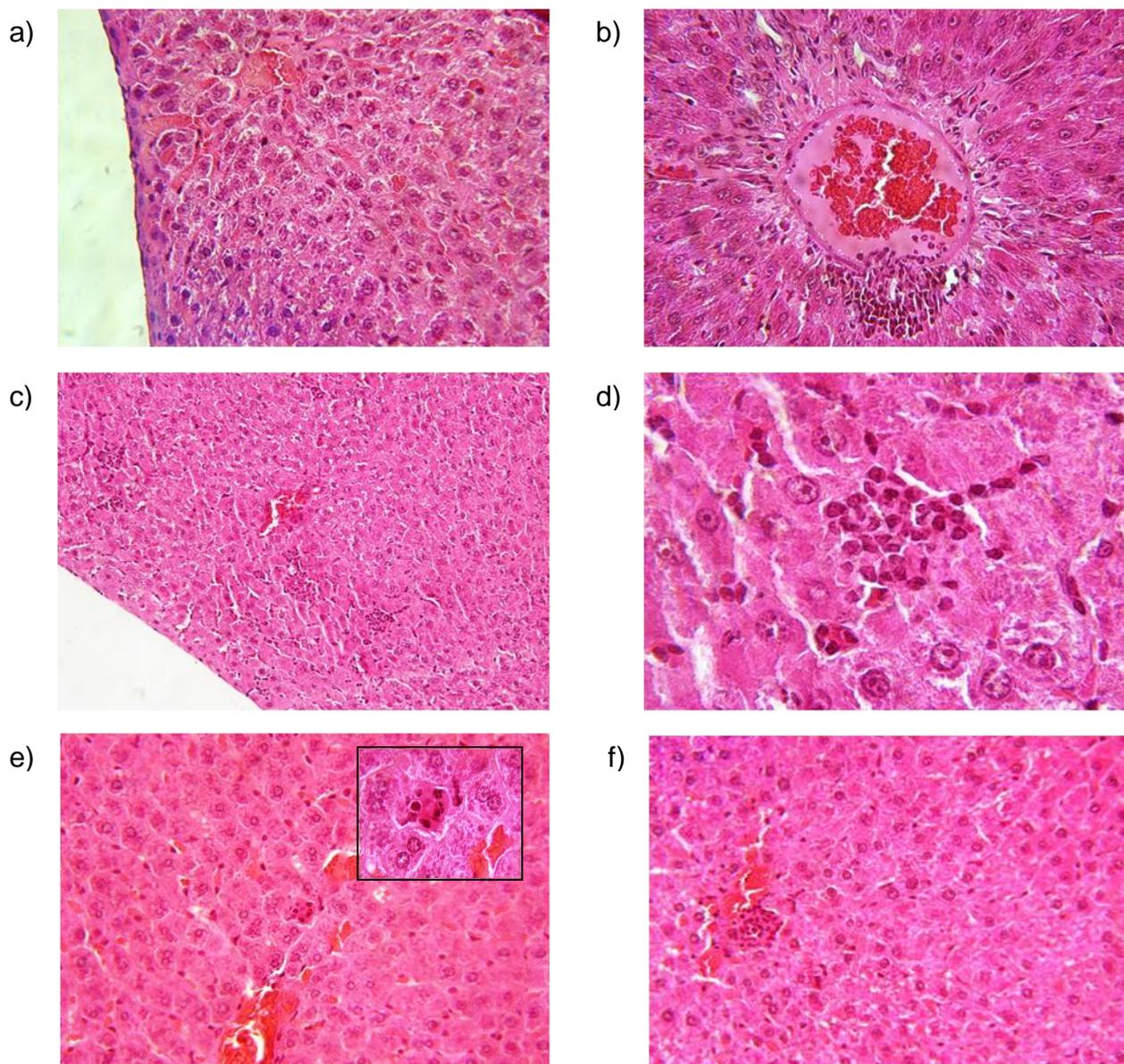


Figura 31: Imagens de corte histológicos do fígado de ratas expostas ao composto LQFM021 no teste de toxicidade oral subaguda por 28 dias mostrando: (a) focos hemorrágicos (20x); (b) infiltrado celular na borda da veia hepática (20x); (c) focos de infiltrados celulares e hemorragia (10x); (d) foco de infiltrado celular da lâmina c (100x); (e) presença de neutrófilo no interior de um hepatócito (40x) e aumento para melhor visualização (100x) e (f) infiltrado celular às margens de um foco hemorrágico (40x). Coloração: hematoxilina – eosina.



Pela análise semi-quantitativa, foi possível identificar uma leve redução da intensidade e frequência dos focos de hemorragia e desarranjo parenquimal no grupo satélite tratado com a maior dose (250 mg/kg/dia). Neste âmbito, foi possível sugerir uma correlação entre os dados gerados da observação do tecido e a massa

relativa do fígado dos animais do grupo de exposição de 250 mg/kg/dia e aparente reversão do quadro no grupo satélite de mesma dose, corroborados pela observação de focos de edema hepático encontrados na histologia.

Como considerações gerais, acrescenta-se que nenhum animal veio a óbito durante o experimento, porém, três animais foram sacrificados em momentos e situações diferentes, pois apresentaram um quadro de infecção na pele, com foco purulento em alguma região isolada do corpo. Esses animais pertenciam a grupos de tratamento e controle e ocorreram em momentos diferentes, dessa forma, entende-se que a lesão não se relacionava com a exposição ao composto LQFM021, e que a eutanásia viria diminuir o sofrimento animal e reduzir as chances de contaminação, se caso o processo infeccioso se mostrasse transmissível.

4.6. MICRONÚCLEO (OECD 474)

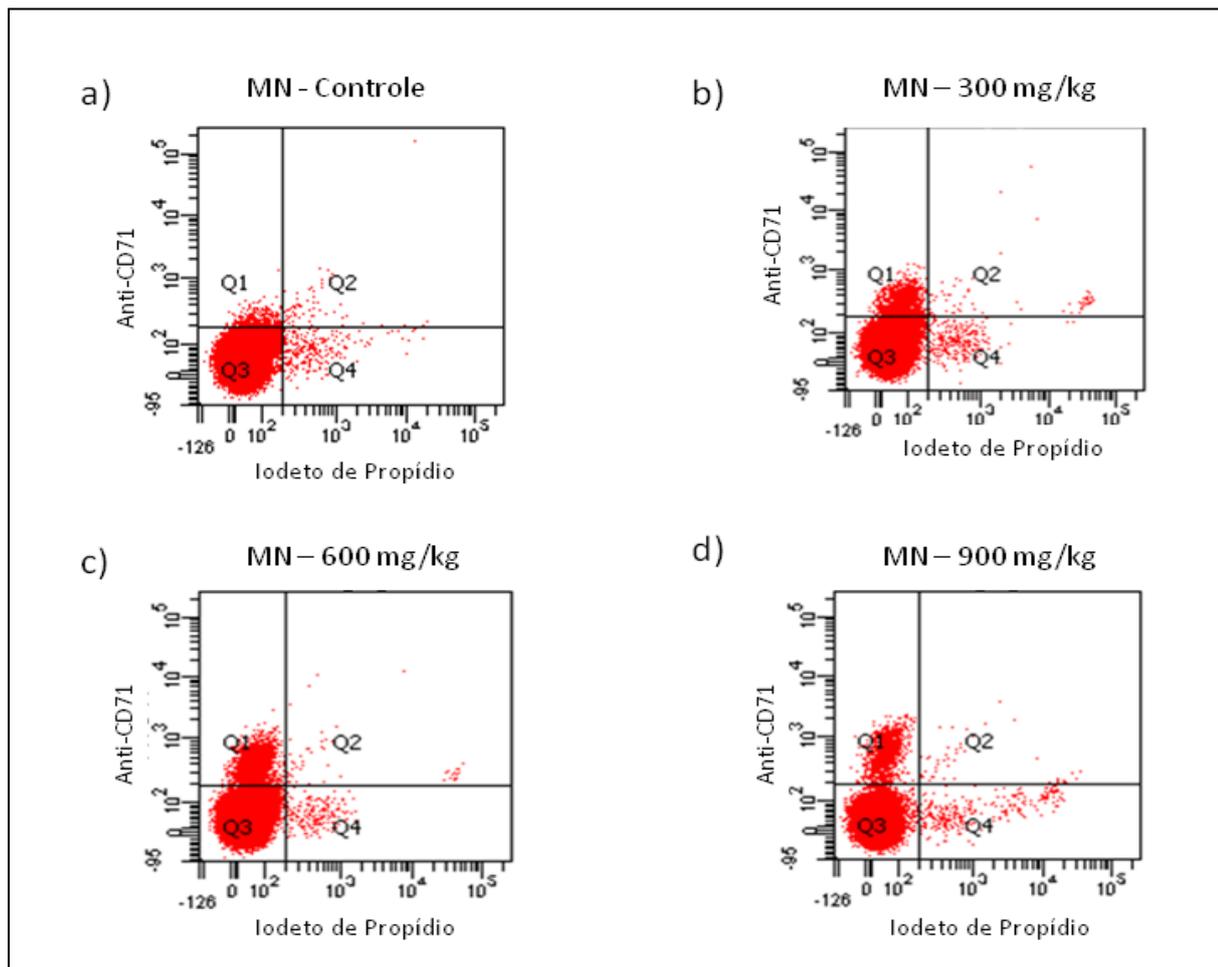
Em continuidade aos estudos de toxicidade, foi analisado o potencial mutagênico do composto LQFM021 em três diferentes doses (300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg) após 48 horas de exposição por meio do teste de micronúcleo em reticulócitos do sangue periférico de camundongos por citometria de fluxo. A análise foi realizada por meio dos parâmetros de dupla marcação em 100.000 eventos: Anti CD71-FITC marcando reticulócitos e IP marcando DNA. Como os eritrócitos maduros e reticulócitos não apresentam DNA no seu interior, a ocorrência de eventos positivos marcados com IP assinala a presença de micronúcleo. A frequência de reticulócitos (Q1), reticulócitos micronucleados (Q2), eritrócitos maduros (Q3) e eritrócitos maduros micronucleados (Q4) é mostrada na Tabela 10 e a ocorrência dos eventos é ilustrada na Figura 32.

Tabela 10: Frequência de reticulócitos (Q1), reticulócitos micronucleados (Q2), eritrócitos maduros (Q3) e eritrócitos maduros micronucleados (Q4) em sangue periférico de camundongos expostos a três diferentes doses (300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg) do composto LQFM021 por 48 horas (n=3 por grupo). Parâmetros avaliados por citometria de fluxo de dupla marcação (CD71 x IP).

	Controle Negativo	300 mg/kg	600 mg/kg	900 mg/kg
Q1	0,3 ± 0,02	* 1,4 ± 0,00	* 2 ± 0,14	* 1,2 ± 0,1
Q2	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,05 ± 0,07	0,05 ± 0,07
Q3	99,4 ± 0,9	98,2 ± 0,9	97,75 ± 0,7	98,45 ± 0,7
Q4	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,03	0,2 ± 0,02	0,3 ± 0,02

A frequência de MN-RET foi avaliada em 100.000 eventos (* p< 0,05).

Figura 32: Fluorescência de dupla marcação com anti-CD71-FITC e iodeto de propídio (IP) de eritrócitos de sangue periférico de camundongos após 48 horas de exposição a três diferentes doses do composto LQFM021 (300 mg/mL, 600 mg/mL e 900 mg/mL) (n=3 por grupo) por citometria de fluxo evidenciando as populações de reticulócitos (Q1), reticulócitos micronucleados (Q2), eritrócitos maduros (Q3) e eritrócitos maduros micronucleados (Q4). Análise da ocorrência dos eventos a partir dos parâmetros de área x fluorescência em 100.000 eventos. Não foram observadas diferenças no resultado deste experimento quando comparamos o sexo dos animais.



Ao analisar a Figura 32, é possível identificar uma população mais robusta de eritrócitos com marcação para CD71, indicativo de reticulócitos (Q1) nos grupos expostos às três distintas doses quando comparadas ao grupo controle, porém não foi evidenciado aumento no número de micronúcleos nestas células, assinalado neste teste pela dupla marcação de CD71 x conteúdo de DNA (Q2). Sobretudo, os dados adquiridos nas análises de citometria de fluxo apontam que o composto LQFM021 não apresenta potencial mutagênico nas doses de 300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg no período de 48 horas. Entretanto, o aumento no número de

reticulócitos nos animais expostos evidencia a assertiva interferência deste composto no processo de eritropoiese destes animais.

Não foram observadas diferenças no resultado deste experimento quando comparamos o sexo dos animais.

5. DISCUSSÃO

Compostos pirazolínicos, ou pirazóis, são substâncias de origem sintética que possuem em sua estrutura um anel pirazolínico, um heterociclo de cinco membros com dois átomos de nitrogênio adjacentes e três de carbono (HASSAN, 2011). Vários derivados pirazóis têm demonstrado atividade em diferentes classes farmacológicas, das quais destacam-se: anti-inflamatória (ELQUERO et al., 2002; SZABO et al., 2008), antibacteriana e antifúngica (TANITAME et al., 2004; TANITAME et al., 2005), hipoglicêmica (KAMAURA et al., 2009; DUGI et al., 2009), anti-hiperlipidêmica (MOMOSE et al., 2001), anti-angiogênica (ABADI et al., 2003) e antitumoral (BALBIA et al., 2011).

Ao avaliar o potencial terapêutico de um novo candidato a fármaco, é indispensável assegurar o equilíbrio entre eficácia frente ao alvo farmacológico do composto *versus* a sua capacidade de induzir efeitos tóxicos (PHRMA, 2010). Atualmente, recomenda-se o uso de ensaios *in vitro* preliminares durante a triagem de novos compostos na tentativa de refinar o estudo e reduzir o número de animais nos testes pré-clínicos mandatórios pelas Agências Reguladoras, além de aperfeiçoar o tempo e os custos relacionados a este processo (SCHERLIEß, 2011).

Balbia et al. (2011) encontraram derivados pirazolínicos com atividade antiproliferativa e pró-apoptótica em células HL60. Diante desse dado, neste trabalho, a primeira etapa de estudo foi a investigação do potencial citotóxico dos derivados pirazolínicos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 frente à células leucêmicas, HL60 e K562. Os resultados demonstraram que todos os compostos investigados não apresentaram valores de IC₅₀ dentro do considerado indicativo de atividade antitumoral promissora. Segundo Whitebread et al. (2005) e Bugelski et al. (2000), os compostos são considerados potentes citotóxicos quando apresentam IC₅₀ inferiores a 10 µM. Em paralelo à investigação da atividade citotóxica frente células leucêmicas, a citotoxicidade dos compostos também foi avaliada sobre células de metabolismo basal (3T3) e os valores de IC₅₀ encontrados sugerem um perfil de baixa toxicidade para todos os

compostos, conforme proposto por Michaelides (2010), que afirma que compostos que detêm o anel pirazolínico apresentam baixa toxicidade, sendo possível, portanto, estabelecer condições seguras de uso. O composto LQFM011 ($IC_{50} = 70,8 \mu\text{g/mL}$) apresentou o maior valor de IC_{50} , se mostrando menos citotóxico dentre os demais, enquanto que o composto LQFM22 apresentou a maior citotoxicidade ($38,7 \mu\text{g/mL}$). Como proposto pelo ICCVAM (2006), esses valores foram utilizados para a estimativa da DL_{50} e para direcionar a escolha da dose inicial nos testes de toxicidade oral aguda (OECD, 2001). Os ensaios de citotoxicidade indicaram a dose de 2000 mg/kg para o teste *in vivo*.

Na avaliação da toxicidade oral aguda, os compostos LQFM020, LQFM023 e LQFM024 foram classificados dentro da categoria 5 ($>2000 \text{ mg/kg}$) pelo sistema GHS e o composto LQFM021, apesar de ter ocorrido apenas um óbito durante o experimento, foi classificado na categoria 4 (entre 300 e 2000 mg/kg) por apresentar sinais intensos de toxicidade, conforme orientação do protocolo OECD 423. O grupo de animais expostos a dose única de 2000 mg/kg do composto LQFM021 apresentou paresia nos membros posteriores embora tenha sido preservada a resposta positiva aos estímulos dolorosos. Estudos de Martins (2012) sobre o mecanismo de ação do composto LQFM021 evidenciaram associação do relaxamento vascular às vias de AMPc e GMPc e esta propriedade pode estar relacionada com a paresia observada nos animais. Por se tratar de compostos inéditos, ainda não há dados de toxicidade aguda na literatura. Ao compararmos os resultados de toxicidade oral aguda dos compostos em estudo com os fármacos que atuam pela modulação de AMPc os quais foram modelos da síntese de todos os compostos teste, verificamos que a milrinona se enquadra na classe 3, com DL_{50} em ratos de 91 mg/kg e o cilostazol se enquadra na categoria 5, com DL_{50} em ratos $>5000 \text{ mg/kg}$.

Por apresentar propriedade relaxante vascular e possível inibidor de PDE3 (MARTINS, 2012), o composto LQFM021 foi escolhido para maior investigação do perfil de toxicidade. Realizou-se o estudo da toxicidade subaguda em três doses diferentes (62,5 mg/kg/dia; 125 mg/kg/dia; 250 mg/kg/dia) por 28 dias. Os animais expostos às três doses nos primeiros 30 minutos mostraram hipoatividade e letargia.

Considerando a hipotensão secundária ao relaxamento vascular na maioria dos fármacos inotrópicos (BOCCHI, et al., 2009; SAAB et al., 2002), esses sinais podem estar associados a este fato. Curiosamente, a intensidade da letargia e hipoatividade relatadas foi maior no grupo exposto à menor dose (62,5 mg/kg/dia), sem apresentar uma relação dose-resposta clássica. A fração efetiva da dose administrada aos animais, bem como a fração eliminada do composto, não foram avaliadas neste estudo, porém, a intensidade superior dos sinais de letargia e hipoatividade apresentadas pelo grupo de exposição de 62,5 mg/kg/dia podem estar associadas com a maior dose efetiva dos estudos de relaxamento vascular realizados por Martins (2012), que demonstrou efeito relaxante dose-dependente em artérias isoladas.

Também foi possível identificar discreta redução na medida de “força para agarrar” durante a triagem hipocrática em todos os grupos tratados, o que pode estar relacionados com a letargia anteriormente citada, embora não se possa excluir a possibilidade desses dados estarem associados à intensa paresia posterior encontrada no teste de toxicidade oral aguda. No mais, os resultados não demonstraram interferência do composto LQFM021 sobre os outros parâmetros comportamentais analisados (massa dos animais e consumo de ração x produção de fezes).

Os animais expostos às doses de 62,5 mg/kg/dia; 125 mg/kg/dia; 250 mg/kg/dia e 250 mg/kg/dia satélite, em contraposição ao grupo controle, não apresentaram alterações nos parâmetros hematológicos de série vermelha e plaquetária no tempo em que foram expostos. Porém, quando foi analisada a série branca dos grupos de animais expostos, notou-se que houve diferenças estatísticas ($p < 0,05$) no número total de leucócitos entre os grupos tratados e o grupo controle, entretanto, essa diferença se deu de forma dose independente. De acordo com Xue et al. (2012), as alterações estatisticamente significantes, quando ocorrem de forma independente da dose, não devem ser relacionadas à substância de exposição. No presente trabalho, soma-se ainda a ausência de alterações na relação de células mononucleadas (monócitos e linfócitos) e polinucleadas (neutrófilos segmentados e eosinófilos) entre os grupos.

Sob o mesmo parâmetro de comparação, os valores de glicose, amilase, ureia, creatinina, aminotransferases (AST e ALT), albumina e proteínas totais não sofreram alterações, remetendo que o composto LQFM021 não interfere nessas funções metabólicas em nenhuma das doses de exposição.

Os estudos macroscópicos dos órgãos (coração, pulmão, fígado, rins, estômago e baço) não apresentaram alterações. No entanto, quando se analisou a massa relativa dos órgãos isoladamente dos animais expostos em paralelo ao grupo controle, foi averiguado um aumento discreto do fígado no grupo exposto a dose de 250mg/kg/dia. Sabe-se que o fígado é o órgão responsável por metabolizar a grande maioria dos fármacos (MÜNCHEN, 2010; SLADEN, 2012; SURIWINATA; THUNG, 2011) e em situações de injúria provocadas pela exposição a compostos químicos, pode ocorrer um quadro de hipertrofia/hiperplasia celular em virtude da sobrecarga nos hepatócitos. Isso acontece, basicamente, porque a atividade celular e a capacidade de adaptação dessas células são promovidas com volume aumentado do fígado (FAUSTO, 2000). No entanto, no grupo satélite exposto à mesma dose, ao final dos 14 dias de exposição, o fígado apresentou redução da sua massa relativa quando comparada ao controle. Carvalho et al. (2011) observaram esta mesma situação quando analisaram o pulmão de camundongos expostos a ácidos anacárdicos de caju, em um estudo de toxicidade subaguda. Segundo os autores, a redução proporcional do órgão pode estar efetivamente relacionada com ganho de massa corporal total que os animais apresentaram após o período complementar de observação (14 dias). Além disso, o aumento da massa relativa do fígado encontrado nos animais expostos à maior dose e subsequente redução quando a administração foi interrompida, pode sugerir um quadro de reversibilidade, o que é corroborado pelos achados histológicos hepático relatados neste trabalho.

Por serem órgãos de excreção e metabolismo de praticamente todas as substâncias que adentram o organismo, os rins e o fígado são constantemente alvos dos efeitos tóxicos de fármacos e seus metabólitos (SLADEN, 2012; MÜNCHEN, 2010). Em virtude disso, é fundamental avaliar o comportamento desses órgãos em investigações de toxicidade nos estudos pré-clínicos. A análise histológica tem se mostrado uma ferramenta importante no diagnóstico precoce de injúrias renais e hepáticas, fornecendo informações sobre danos teciduais preliminares aos

marcadores funcionais séricos (FUCHS; HEWITT, 2011; PFALLER; GSTRAUNTHALER, 1998; PRIETO et al., 2006). Para esclarecer a atuação específica do composto LQFM021 sobre o sistema renal e hepático, foi realizada uma análise histopatológica semi-quantitativa, a qual permitiu detectar o aparecimento de sinais de toxicidade no parênquima desses dois órgãos, utilizando o grupo controle como referencial. A análise histopatológica evidenciou sinais leves de toxicidade renal nos grupos expostos a todas as doses do estudo, *a priori* não evidenciados nos parâmetros bioquímicos. Detectou-se um aparente quadro de dano glomerular, presença de focos de hemorragia e infiltração celular esparsos no parênquima renal. De forma pormenorizada, o dano renal pôde ser apontado por uma variedade de modificações estruturais facilmente identificáveis. Foi possível observar aumento ou redução substancial do espaço de Bowman circundando glomérulos por vezes desfigurados e/ou atrofiados. Além disto, foi evidenciada a presença espaços glomerulares vazios, perda da afinidade do corante eosina em diversas áreas do parênquima renal e estruturas amorfas no interior dos túbulos distais e proximais, as quais julgamos ser cristais, cilindros ou células necróticas em descamação. Foi possível, ainda, verificar células com fragmentação nuclear e edema tecidual pela presença de plasma no parênquima. Essas alterações suscitam que o composto LQFM021 acarreta injúria renal de forma dose-dependente nas condições de exposição dos animais.

Os mecanismos pelos quais o composto LQFM021 ou os metabólitos associados ao composto interferiram no tecido renal não foi objeto de investigação neste trabalho. No entanto, sabe-se que os mecanismos de indução de efeitos tóxicos pela exposição a compostos químicos podem envolver interações complexas, multi-celulares, de órgãos múltiplos e/ou multi-sistemas. Além disso, muitos eventos tóxicos ocorrem por interferência de mecanismos bioquímicos e fisiológicos homeostáticos (PRIETO et. al., 2006). Fármacos e/ou drogas e seus metabólitos concentram-se no líquido tubular renal à medida que a água é reabsorvida pelo néfron, de modo que os túbulos renais são expostos a concentrações maiores que nos demais tecidos, ficando, desta forma, mais suscetíveis aos efeitos destas substâncias (CORELLI, 2010).

A discordância entre os marcadores séricos de função renal (ureia e creatinina) e os achados histopatológicos observada no nosso estudo é frequentemente relatada na literatura. Fuchs e Hewitt (2011) comentam, em sua revisão, o pobre valor diagnóstico dos níveis de ureia e creatinina sanguíneos e justificam que, por serem marcadores tardios de comprometimento renal, frequentemente geram resultados falso-negativos, indicando dessa forma, a observação histopatológica como “padrão ouro” na investigação de efeitos tóxicos de novos compostos. Segundo informa Prieto et al. (2006) em seu relatório dos *workshops* organizados pelo ECVAM em 2003, isto ocorre porque os glomérulos não comprometidos acabam se sobrecarregando para manter a filtração glomerular prejudicada durante a exposição a substâncias tóxicas. Estes autores explicam que em situações de injúrias, as células epiteliais renais, hepáticas e pulmonares têm a excepcional habilidade de regeneração e conseguem manter uma reserva substancial da função destes órgãos, mesmo em condições de dano celular abundante. Pfaller e Gstraunthaler (1998) ressaltam que a redução da funcionalidade dos rins ocorre somente após a perda de aproximadamente dois terços da biomassa renal.

No presente estudo, a redução substancial do espaço de Bowman e a evidência de glomérulos condensados e desarranjados podem sugerir hipertrofia das células mesangiais após exposição tóxica. Oliveira et al. (2011) assimilam essas alterações ao aumento da filtração glomerular pelas células mesangiais na intenção de manter a taxa de filtração renal. Esses autores ainda explicam os eventos de perda de afinidade do corante eosina no parênquima renal, igualmente evidenciada neste trabalho, como sendo uma deposição local de material amorfo com características básicas, uma vez que a eosina apresenta características de afinidade por compostos ácidos. Por outro lado, no trabalho de Lindeblad et al. (2010), a perda de afinidade do corante eosina foi associada à basofilização do citoplasma e a mecanismos de regeneração tecidual. Os demais achados histopatológicos evidenciados neste trabalho reafirmam a presença de efeitos tóxicos provocados pelo composto LQFM021 e/ou seus metabólitos sobre o sistema renal.

É pertinente assinalar que os danos estruturais apontados na análise histopatológica dos rins não apresentaram características de reversibilidade nos 14

dias subsequentes à interrupção da exposição à LQFM021, uma vez que os mesmos achados também foram detectados no grupo satélite, não sendo possível excluir a possibilidade de dano renal permanente.

Assim como a análise do tecido renal, a leitura das lâminas de histologia do fígado dos grupos expostos ao composto em estudo indicou sinais de toxicidade anteriormente não evidenciados pelas dosagens bioquímicas. Todavia, os eventos de hepatotoxicidade se figuraram de forma mais branda. Em contraste ao grupo controle, os grupos expostos a todas as doses do composto LQFM021 apresentaram pequenos e isolados focos de infiltração e desarranjo parcial da arquitetura do parênquima hepático que ora sinalizava a presença de um edema, ora denunciava episódios de hemorragias exíguas. Resultados parecidos foram encontrados por Xue et al. (2012) quando avaliação a toxicidade subaguda de carotenoides extraídos da casca de citrinos. Notavelmente, alguns focos hemorrágicos e episódios de desarranjo celular permaneceram evidentes após a interrupção da exposição do composto LQFM021 aos animais do grupo satélite. No entanto, foram avistados de forma mais amena pré-anunciando aparente reversibilidade destes sinais. Em conformidade com o relatório de Prieto et al. (2006) anteriormente citado, a não alteração das aminotransferases durante avaliação bioquímica corrobora a funcionalidade íntegra dos hepatócitos embora tenha havido dano tecidual.

Cabe aqui destacar que durante a avaliação dos efeitos nocivos de um fármaco, não é rara a ocorrência de anormalidades discretas da função hepática, porém o mecanismo da lesão é incerto e nem sempre é necessário suspender o uso de um fármaco quando surgem alterações discretas, porém, a ocorrência de hepatopatia irreversível (p. ex. cirrose), em consequência a um tratamento prolongado, exige cautela (RANG et al, 2005). Sabe-se que no processo de metabolização de um fármaco, a lesão celular habitualmente é causada por substâncias reativas (metabólitos) embora alguns fármacos possam provocá-la diretamente. Os metabólitos tóxicos podem formar ligações covalentes com moléculas-alvo, ou alterar a molécula-alvo por meio de ligações não covalentes. Por vezes, alguns metabólitos possuem ambos os efeitos (CORELLI, 2010).

Adicionalmente, não foram observadas alterações toxicológicas específicas na análise tecidual primária dos demais órgãos estudados neste trabalho.

Em continuidade aos estudos de segurança pré-clínica do composto LQFM021, foi analisado o seu potencial mutagênico em três diferentes doses (300 mg/kg, 600 mg/kg e 900 mg/kg) após 48 horas da exposição, pelo teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongos pela metodologia de citometria de fluxo com dupla marcação (anti-CD71 e IP). Nesta análise, encontrou-se uma população bem mais robusta de reticulócitos nos grupos expostos às três distintas doses, de forma, aparentemente, não dependente da dose quando comparadas ao grupo controle, porém, não foi evidenciado aumento no conteúdo de DNA nestas células em nenhum grupo de exposição. Os dados adquiridos nas análises de citometria de fluxo apontam, sobretudo, que o composto LQFM021 não apresenta potencial mutagênico nas doses de 300, 600 e 900 mg/kg no período de 48 horas. No entanto, evidenciam uma interferência deste composto sobre o processo de eritropoiese dos animais, o que pode sugerir efeito citotóxico sobre a medula óssea e, por conseguinte, a necessidade de maior produção das células de série vermelha.

O aumento da população de reticulócitos na circulação periférica é reflexo da atividade eritropoética da medula óssea e normalmente ocorre em resposta a níveis elevados de eritropoetina em animais com função ósseo-medular ativa (FERNANDEZ e GRINDEM, 2000; JAIN, 1993a; RILEY et al., 2001). Visto que a eritropoetina é um fator de crescimento hematopoético produzido nos rins, situações de déficit da concentração de oxigênio renal estimulam a sua produção, potencializando a diferenciação dos progenitores eritróides e estimulando a divisão celular em todos os estágios de desenvolvimento dos eritrócitos. Adicionalmente, a eritropoetina estimula o aumento da síntese de hemoglobina e a liberação antecipada de reticulócitos jovens para a circulação periférica (RILEY et al., 2001; JAIN, 1993 b). Sob essa perspectiva, no presente trabalho, o aumento do número de reticulócitos apresentado nos grupos expostos ao composto LQFM021 pode ser decorrente de uma possível redução nos níveis de oxigênio provocado pela exposição aguda. Uma vez evidenciada a ocorrência de dano renal após exposição relativamente prolongada no teste de toxicidade subaguda frente a doses inferiores às utilizadas no teste do micronúcleo, não se pode excluir a possibilidade de

acometimento renal frente às elevadas doses a que os animais foram expostos apesar do tempo reduzido deste teste. Em contrapartida, os parâmetros hematológicos analisados ao fim do teste de 28 dias não apontaram qualquer alteração específica à série vermelha. Este fato é compreendido uma vez que os reticulócitos aparecem na circulação periférica 48 horas após perda sanguínea ocasional e retornam ao normal 9 a 13 dias subsequentes (FERNANDEZ e GRINDEM, 2000; WITT et al. 2008), evidenciando, particularmente, a ocorrência de um evento recente. Além disso, a ausência de número aumentado de reticulócitos nos parâmetros hematológicos do teste de toxicidade subaguda pode estar relacionada à capacidade regenerativa adquirida pelos animais, além é claro, da eficácia esplênica em retirar grande parte dos eritrócitos imaturos da corrente periférica que os ratos apresentam, o que não ocorre em camundongos (SCHLEGEL e MACGREGOR, 1984) . Além disso, torna-se inviável comparar as metodologias empregadas nas duas avaliações, tendo em vista a superior sensibilidade atribuída à técnica de citometria de fluxo (DERTINGER et al., 1997).

Em conclusão, neste estudo foi demonstrado que os compostos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 não apresentam potencial citotóxico frente células leucêmicas que justifique a continuidade da sua investigação antitumoral. Os compostos em estudo foram classificadas para o teste de toxicidade oral aguda como classe 4 ou 5 do GHS. Observou-se que, nas condições de estudo aqui realizadas, o composto LQFM021 apresenta potencial nefrotóxico e hepatotóxico de baixa intensidade e não apresenta potencial mutagênico. Considerando os efeitos adversos provocados pelos fármacos já estabelecidos na terapêutica das diversas desordens que acometem o organismo humano, sobretudo os cardiovasculares, é possível inferir que, de acordo com os resultados encontrados neste trabalho e a pertinente necessidade de agregar fármacos mais eficientes e seguros à conduta de tratamento da atualidade, o composto LQFM021 apresenta um baixo perfil de toxicidade e os estudos de continuidade devem ser encorajados.

6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados permite interpretar que:

- Os compostos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 não apresentaram atividade citotóxica satisfatória nas linhagens celulares HL60, desestimulando a continuidade dos estudos de atividade antitumoral.
- Os compostos LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 não apresentaram atividade citotóxica satisfatória na linhagem celular K562, o que corrobora os resultados do item acima.
- Os compostos LQFM011, LQFM012, LQFM020, LQFM021, LQFM022, LQFM023 e LQFM024 apresentaram um perfil de baixa toxicidade nos estudos com células de metabolismo basal (3T3) e os valores de DL₅₀ estimados para início dos estudos de toxicidade oral aguda reduziram o número de animais do teste.
- Os compostos LQFM020, LQFM023 e LQFM024 foram classificados na categoria 5 (>2000 mg/kg) do sistema GHS de classificação de risco e o composto LQFM021 foi classificado na categoria 4 (300 – 2000 mg/kg).
- O composto LQFM021 não interferiu nos parâmetros de metabolismo, hematológico e bioquímico dos animais expostos em nenhuma das doses de exposição. Porém, apresentou baixo potencial nefrotóxico e hepatotóxico nas condições de estudo.
- O composto LQFM021 não apresentou potencial mutagênico.

7. REFERÊNCIAS

ALLEY, M. C. *et al.* Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. **Cancer Res**, v. 48, p. 589–601, 1988.

AROSON, J.K. (Ed.). The International Encyclopedia of Adverse Drugs Reactions and Interactions. **Meyler's Side Effects of Drugs Encyclopedia**. 15 ed, p. 2346-2347, 2005.

BALBIA, A. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Novel Pyrazole Derivatives with Anticancer Activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 5293-5309, 2011.

BALCELLS, J. Fármacos Inotrópicos y Vasoactivos . **Avances en Terapéutica** , Barcelona, v. 3, p. 244-247, 2005.

BALLS, M. Replacement of Animal Procedures: Alternatives in Research. **Education and Testing. Laboratory Animals**, v. 28, p. 193-211. 1994.

BEAVO, J.A; CONTI, M.; HEASLIP, R.J. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Mol. Pharmacol**, v. 46, p. 399-405, 1994.

BENBOW, J.W. *et al.* Predicting Safety Toleration of Pharmaceutical Chemical Leads: Cytotoxicity Correlations to Exploratory Toxicity Studies. **Toxicology Letters**, v. 197, p. 175–182. 2010.

BENDER A. T, BEAVO J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacol Rev.**, v. 58, p. 488–520, 2006.

BERRIDGE, M.V., HERST, P.M., TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnol. Annu. Rev.**, v. 11, p. 127–152, 2005.

BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and Toxicodynamic Modelling and its Role in Toxicological Research and Risk Assessment. **Alternatives to laboratory animals**. v. 31 n. 3, p. 277-281. 2003.

BOCCHI, E.A. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.93 (1 supl.1), p. 1-71, 2009.

BOTHAM, P. A. Acute Systemic Toxicity. **Supplement ILAR Journal**, v. 43, p. 27-30, 2002.

BOWEN, D. E. et al. Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test. **Mutation Research**, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos**, 2010. Disponível em: < www.anvisa.gov.br>. Acesso em 21 jul 2012.

BUGELSKI, P.J. et al. A Strategy for Primary High Throughput Cytotoxicity Screening in Pharmaceutical Toxicology. **Pharm. Res**, v. 17, p. 1265–1272. 2000.

CARVALHO, A.L.N. et al. Acute, Subacute Toxicity and Mutagenic Effects of Anacardic Acids from Cashew. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 730 – 36, 2011.

COECKE, S. et al. Toxicokinetics and Metabolism. **Alternatives to laboratory animals**, p. 147-175. 2005.

COECKE S, et al. Metabolism: a bottlenecking *in vitro* toxicological test development. The report and recommendations of ECVAM workshop 54. **Alternatives to Laboratory Animals**, V. 34, p. 49–84, 2006.

CONTI M, NEMOZ G, SETTE C, VICINI E. Recent progress in understanding the hormonal regulation of phosphodiesterases. **Endocr. Rev**, v. 16, p. 370-89, 1995.

COOPER, G.M. **A Célula**, 2º ed., Artmed_ Editora LTDA, Porto Alegre, 712, 2001

CORELLI, R. L. Potencial tóxico e terapêutico dos medicamentos de venda livre. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 10ª ed., 2010.

COTE, R.H. Characteristics of photoreceptor PDE (PDE6): similarities and differences to PDE5. **Int J Impot Res**, v.16, p. 28 – 33, 2004.

DAL-PIAZ, V; GIOVANNONI, M.P. Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to rolipram, as promising agents for the treatment of asthma and other pathologies. **Eur J Med Chem**, v. 35, p. 463–480, 2000.

DETINGER, S. D. et al. Flow Cytometric analysis of Micronucleated Reticulocytes in Mouse Bone Marrow. **Mutation Research**, v. 390, p. 257-262, 1997.

DETINGER, S.D. et al. Three-color labeling method for flow cytometric measurement of cytogenetic damage in rodent and human blood, **Environ. Mol. Mutagen**, v. 44, p. 427-435, 2004.

EC, 2011. Chemicals. CLP/GHS – **Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures**. Available at: <http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/classification/index_en.htm>. Acessado em: Jul, 2012.

EKWALL, B. Overview of the final MEIC results: II. The *in vitro/in vivo* evaluation, including the selection of a practical battery of cell tests for prediction of acute lethal blood concentrations in humans. **Toxicology in Vitro**. v. 13, p. 665–673. 1999.

ELGUERO, J. et al.(Eds.). **Targets in Heterocyclic Systems**. Società Chimica Italiana, Roma, 6ª ed, p. 52-98, 2002.

EVANS, D.B. Overview of cardiovascular physiologic and pharmacologic aspects of selective phosphodiesterase peak III inhibitors. **Am J Cardiol**, p. 9A–11A, 1989.

EVANS, S.M. et al. Development of a High Throughput *in Vitro* Toxicity Screen Predictive of High Acute *in vivo* Toxic Potential. **Toxicol. In Vitro**, v. 15, p. 579–584. 2001.

EYKEN, E. B. B. D.V.; MORAES, C.L. Prevalência de Fatores de Risco para Doenças Cardiovasculares entre Homens de uma População Urbana do Sudeste do Brasil. **Cad. Saúde Pública**,v. 25(1), p. 111-123, Rio de Janeiro, 2009.

FAUSTO, N. Liver Regeneration. **Journal of Hepatology**, v. 32, p. 19-31, 2000.

FELDMAN, A.M. Classification of Positive Inotropics Agents. **J Am Coll Cardiol**, v. 22, p.1233-1237, 1993.

FERNANDEZ, F.B.; GRINDEM, C.B. Reticulocyte response. In: FELDMAN, B.F. et al. (Eds.). **Schalm's Veterinary Hematology**, 5ª Ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 110-116, 2000.

FIEDLER, R.D.; WEINERB, S. K.; SCHULERA, M. Evaluation of a Modified CD71 MicroFlow® Method for the Flow Cytometric Analysis of Micronuclei in Rat Bone Marrow Erythrocytes. **Mutation Research**, v. 703, p. 122–129, 2010.

FLECKNELL, P. Laboratory Animal Anesthesia. **New York: Academic Press**, 1996.

FRAJBLAT, M. et al. Bem Estar em Animais de Laboratório. In: Rogerio CHRISTOFOLETTI, R; BECK, A. A. H. (Org.). **Ética, Ciência e Desenvolvimento**. Itajaí: Editora da Universidade do Vale do Itajaí, p. 117-128, 2006.

FUCHS, T. C.; HEWITT, P. Biomarkers for Drug-Induced Renal Damage and Nephrotoxicity – An Overview for Applied Toxicology. **The AAPS Journal**, Vol 13 (4), p. 615-31, 2011.

GAZIANO, M.J. Screening for Coronary Heart Disease and its Risk Factors. In: BRAUNWALD, E.; GOLDMAN, L. (Ed.). **Primary Cardiology**. Saunders Philadelphia, 2007, p. 261–9.

GIACHINI, F. R.; LIMA, V. V. ; CARNEIRO, F. S.; TOSTES, R. C. Decreased cGMP Level Contributes to Increased Contraction in Arteries From Hypertensive Rats Role of Phosphodiesterase 1. **Hipertens**, 2011.

GOLDIM, J.R. A Avaliação Ética da Investigação Científica de Novas Drogas : A Importância Da Caracterização Adequada das Fases da Pesquisa . **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, 2007.

GOODWIN, R. et al. Targeted agents: How to select the winners in preclinical and early clinical studies? **European Journal of Cancer**, v. 48, p. 170 – 78, 2012.

HARRISON, S.A.; CHANG, M.L.; BEAVO, J.A. Differential Inhibition of Cardiac Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Isoenzymes by Cardiotonic Drugs. **Circulation**, 73:109-116, 1986.

HEDDLE, J. et al. A. Reflections on the Development of Micronucleus Assays. **Mutagenesis**, v. 26 (1), p. 3–10, 2011.

HORVATH, S. Cytotoxicity of Drugs and Diverse Chemical Agents to Cell Cultures. *Toxicology*, v. 16, p. 59 -66. 1980.

ICCVAM - INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. **Report of the International Workshop on *In Vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity**. NIH Publication No. 01-4499. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, 2001

ICCVAM - INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. **Test Method Protocol for BALB/c 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay Phase III**. The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, 2003.

ICCVAM - INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. Test method evaluation report (TMER): *in vitro* cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity tests. NIH publication No.07-4519. Research triangle park, NC: National institute for environmental health sciences, 2006.

ICH. Guidance for Industry. Good Clinical Practice: Consolidated Guidance. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. 1996.

JAIN NC. Erythrocyte physiology and changes in disease. In: **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger; p. 133–58, 1993 (a).

JAIN, N.C. Hematopoiesis. In: **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger; p. 72–81, 1993 (b).

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. 1ª Edição, Santos, São Paulo, p. 123, 1983.

KAYANI, A.M. et al. The Mosaic of CVD Risk Factors – A Study on 10,000 Pakistani Cardiac Patients. **CVD Prevention and Control**, v. 6, p. 1-7, 2010.

KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, p. 711–715. 2004

KRAMER, J.A.; SAGARTZ, J.E.; MORRIS, D.L. The Application of Discovery Toxicology and Pathology Towards the Design of Safer Pharmaceutical Lead Candidates. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 6, p. 636–649. 2007.

KRISHNA, G.; Hayashi, M. *In Vivo* Rodent Micronucleus Assay: Protocol, Conduct and Data Interpretation. **Mutation Research**, v. 455, p. 155 – 166, 2000.

LAMONTE, M.J. Epidemiology of Cardiovascular Disease. In: DURSTINE J.L.; MOORE, G.E.; LAMONTE, M.J.; FRANKLIN, B.A. (Ed.). **Pollock's Textbook of Cardiovascular Disease and Rehabilitation**. Human kinetics, USA, p. 9–16, 2008.

LEHTONEN, L.A.; ANTILA, S.; PENTIKAINEN, P.J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intravenous Inotropic Agents. **Clin Pharmacokinet**, 43(3): 187-203, 2004.

LEIST, M.; JÄÄTTELÄ, M. Four Deaths and a Funeral: From Caspases to Alternative Mechanisms. **Nature Rev**, v. 2, p. 1-10. 2001.

LINDEBLAD, M. et al. Assessment of oral toxicity and safety of pentamethylchromanol (PMCoI), a potential chemopreventative agent, in rats and dogs. **Toxicology**, v. 273, p. 19-28, 2010.

KIMURA, Y.; TANI, T.; KANBE, T.; WATANABE, K. Effect of Cilostazol on Platelet Aggregation and Experimental Thrombosis. **Arzneimittelforschung**, 35: p. 1144-9, 1985.

MACGREGOR, J.T. et al. The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. **Fund. Appl. Toxicol**, v.14, p. 513 – 22, 1990.

MALONE M. H.; ROBICHAUD, R.C. **A Hippocratic screen for pure or crude drug materials**. *Lloydia*, v. 25, p. 320-332, 1962.

MANSUR, A. P; FAVARATO D. Mortality due to Cardiovascular Diseases in Brazil and in the Metropolitan Region of São Paulo: A 2011 Update. **Arq Bras Cardiol**, Sao Paulo. 2012.

MARTINS, D. R. **Avaliação do Relaxamento Vascular Induzido por um Novo Derivado Pirazólico Protótipo a Fármaco (LQFM021), Possível Inibidor de Fosfodiesterase.** (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, 2012

MARTINS, L.M. et al. Activation of Multiple Interleukin-1beta Converting Enzyme Homologues in Cytosol and Nuclei of HL-60 Cells During Etoposide-induced Apoptosis. **J Biol Chem**, v. 272, p. 7421-7430, 1997.

MICHAELIDES, M. R. **Kinase inhibitors with improved cyp safety profile.** 2010. Patent Number: 2010065825

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immun. Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.

MROSS K, MARZ W. Clinical Trials: Prerequisite of Evidence-Based Oncology: Reality, Perspectives and a New Tool Recruited-The Internet. **Onkologie**, p. 24-34. 2001.

MUGHAL, A. et al. Simultaneous use of erythropoietin and prior bleeding enhances the sensitivity of the peripheral blood micronucleus assay. **Mutagenesis**, v. 26 (2), p. 331–338, 2011.

MUKHERJEE, D.; YADAV JS. Update on Peripheral Vascular Diseases: From Smoking Cessation to Stenting. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 68, p. 723-33. 2001.

MÜNCHEN, F.B.H. (Ed.). **Adverse Drug Reactions.** Handbook of Experimental Pharmacology, v. 196, 2010.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. M.; METSAVAHT, L. Pharmacology of Vasoactive Drugs. **Acta Fisiatr**, v. 17, p. 22 – 27. 2010.

MUSIALEK, P. et al. Role of cGMP-inhibited phosphodiesterase and sarcoplasmic calcium in mediating the increase in basal heart rate with nitric oxide donors. **J Mol Cell Cardiol**, p. 1831–1840, 2000.

NIEMINEN, et al. Guías de Práctica Clínica sobre el diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia cardíaca aguda. Versión resumida. **Rev Esp Cardiol.**, v. 58, p. 389 – 429, 2005.

OLIVEIRA, R. B. et al. Renal Toxicity Caused by Oral Use of Medicinal Plants: The Yacon example. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 434-441, 2011.

ONU - **Globally harmonized system of classification and labeling of chemicals – GHS**. Third revised edition. NewYork and Geneva, 2009. Disponível em: <http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html/S>. Acesso em: 30 jul 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. Preventing Chronic Diseases: a Vital Investment. WHO global report. **Geneva World Health Organization**, p. 48. 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. **World Health Statistics**. Brasil, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/en/index.html>. Acesso em 20 jul 2012.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline for the Testing of Chemicals, OECD 407. **Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 1995.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline for the Testing of Chemicals, OECD 474. **Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**. Organization for Economic Cooperation and Development. Paris, 1997.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline for the Testing of Chemicals, OECD 423. **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

PAIVA, F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Fundação Oswaldo Cruz, Salvador. 2005.

PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER G. Nephrotoxicity testing *in vitro* – what we know and what we need to know. **Environ Health Perspect**, v. 106, p. 559 – 69, 1998.

PHRMA. Pharma 2020: The Vision – Which Path Will You Take?. **Pharmaceuticals and Life Sciences**, 2010.

PHRMA. 2011 Report: For heart disease and stroke. Biopharmaceutical Research Companies Are Developing Nearly 300 Medicines for Cardiovascular Disease. **Medicines in development**, 2011.

PHRMA. 2012 Report: New Drug Approvals in 2011. Biopharmaceutical Research Companies Receive Approval for 35 New Treatments in 2011. **Medicines in development**, 2012.

PRIETO, P. et al. The Assessment of Repeated Dose Toxicity *in Vitro*: A Proposed Approach. the Report and Recommendations of Ecvam Workshop 56. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 34, n. 3, p.315-41. 2006.

PURCHASE, I. F. et al. Workshop Overview: Scientific and Regulatory Challenges for the Reduction, Refinement, and Replacement of Animals in Toxicity Testing. **Toxicological Sciences**. v. 43, n. 2, p. 86-101. 1998.

RANG et al. Eliminação e farmacocinética das substâncias. **Farmacologia**, 5ª Ed, p. 121-130, 2005.

REGENSTEINER, J. G. et al. Effect of Cilostazol on Treadmill Walking, Community-Based Walking Ability, and Health-Related Quality of Life in Patients with Intermittent Claudication Due to Peripheral Arterial Disease: Meta-Analysis of Six Randomized Controlled Trials. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 50, p.1939-46, 2002.

REGENSTEINER, J. G.; HIATT, W. R. Current Medical Therapies for Patients with Peripheral Arterial Disease: A Critical Review. **Excerpta Medica**, Inc, v. 112, p. 49-57. 2002.

RILEY, R.S. et al. A. Reticulocytes and Reticulocyte Enumeration. **J Clin Lab Anal**, v. 15, p. 267-94, 2001.

RISS, T.; MORAVEC, R. Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, And Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays. **Assay Drug Dev Technol**, v. 2, p. 51-62. 2004.

ROSA, M.P.; BARONI, G.V.; PORTAL, V.L. Cilostazol, um Inibidor da Fosfodiesterase III: Perspectivas Futuras na Aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**, Porto Alegre, v. 87, p. 222-226, 2006.

ROTHFUS, A. et al. Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: Combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. **Mutation Research**, 2011.

RUSSEL, W., BURCH, R. The Principles of Humane Experimentation Technique. **Methuen**, London, 1959.

SAAB, G. et al. Acute Renal Failure Secondary to Milrinone in a Patient With Cardiac Amyloidosis. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 40 (2), 2002.

SANTOS, et al. Agentes inotrópicos e cronotrópicos positivos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ed. FAEF, 2008.

SCHECHTMAN, L. M. Implementation of the 3Rs (Refinement, Reduction, and Replacement): Validation and Regulatory Acceptance Considerations for Alternative Toxicological Test Methods. **ILAR Journal**, v. 43, p. S85-S94. 2002.

SCHERLIEß, R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity *in vitro* on respiratory epithelial cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, p. 98–105, 2011.

SCHLEGEL, R.; MACGREGOR, J. T. The Persistence of Micronucleated Erythrocytes in the Peripheral Circulation of Normal and Splenectomized Fischer 344 Rats: Implications for Cytogenetic Screening. **Mutat. Res**, v. 127, p. 169 – 174, 1984.

SCHRIER, R. W. (Ed.) **Diseases of the Kidney and Urinary Tract**. 7^a Ed. v. 3, 2001.

SERKE, S.; HUHN, D. Identification of CD71 transferrin receptor. expressing erythrocytes by multiparameter-flow-cytometry_MP-FCM.: correlation to the quantitation of reticulocytes as determined by conventional microscopy and by MP-FCM using a RNA-staining dye. **Br. J. Haematol.**, v. 81, p. 432–439, 1992.

SHIPLEY, J.B. et al. Milrinone: Basic and Clinical Pharmacology and Acute and Chronic Management. **Am J Med Sci**, 311:286-291, 1996

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Publishing Group**, p. 813-23, 2006.

SLADEN, R. N, Acute kidney injury: We've got the diagnosis, now what?. **Canadian Anesthesiologists' Society**, 2012

SORKIN, E. M.; MARKHAM, A. Cilostazol. **Drugs Aging**, v. 14, p. 63-71. 1999.

SOUNESS J.E. et. Al. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors. **Immunopharmacology**, p. 127–162, 2000.

SPIELMANN, H. et al. Determination of The Starting Dose for Acute Oral Toxicity (LD50) Testing in the Up And Down Procedure (UDP) from Cytotoxicity Data. **Alternatives to Laboratory Animals**. v. 27, p. 957-966.1999.

STEFANINI, E. et al. Epidemiologia das Doenças Cardiovasculares . **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 16, n. 1, jan/fev/mar. 2006.

SURIAWINATA, A. A.; THUNG, S. N. **Liver Pathology: An Atlas and Concise Guide**. Ed. Demos Medical.NY, 2011.

SZABO, G. et al. New Celecoxib Derivatives as Anti-inflammatory Agents. **J. Med. Chem.** 51, p 142-7, 2008.

TANITAME, A. et al. Synthesis and Antibacterial Activity of Novel and Potent DNA Gyrase Inhibitors with Azole Ring. **Bioorg. Med. Chem.** 12, p. 5515-5524, 2004.

TANITAME, A. et al. Synthesis and Antibacterial Activity of a Novel Series of DNA Gyrase Inhibitors: 5-[(E)-2-arylviny]pyrazoles. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 15, p. 4299-4303, 2005.

THACKRAY, S. et al. Clinical Trials Update: OPTIME-CHF, PRAISE-2, ALL-HAT. **European Journal of Heart Failure** 2, p. 209-212, 2000.

TOROUS, D.K. et al. Interlaboratory validation of a CD71-based flow cytometric method (Microflow) for the scoring of micronucleated reticulocytes in mouse peripheral blood. **Environ. Mol. Mutagen**, v. 45, p. 44-55, 2005.

VALADARES, M. C. Avaliação de Toxicidade Aguda : Estratégias Após a “Era Do Teste DI50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. Synadenium umbellatum : citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos . **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** , Goiânia, v. 43, n. 4, out./dez., 2007.

XIA M. et al. Compound Cytotoxicity Profiling Using Quantitative High-throughput Screening. **Environ Health Perspect**, v. 116, p. 284-91, 2008.

XUE, F. et al. Subacute toxicity assessment of carotenoids extracted from citrus peel (Nanfengmiju, Citrus reticulata Blanco) in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 62, p. 16-22, 2012.

ZHOU, X. et al. Superiority of combination of thiazide with angiotensin-converting enzyme inhibitor or AT1-receptor blocker over thiazide alone on renoprotection in L-NAME/SHR. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 289, p. F871-F879, 2005.

WANG, P. et al. Characterisation of cavernosum type 5 phosphodiesterases. **Life Science**, 1977–1987, 2001.

WITT, K. L. et al. Comparison of Flow Cytometry and Microscopy-based Methods for Measuring Micronucleated Reticulocyte Frequencies in Rodents Treated with Nongenotoxic and Genotoxic Chemicals. **Mutation Research**, v. 649, p. 101 – 113, 2008.

WHITEBREAD, S.; HAMON, J.; BOJANIC, D.; URBAN, L. *In vitro* safety pharmacology profiling: an essential tool for successful drug development. **DDT**, v. 10 (21), 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. The World Health Report 2004, 2004. Disponível em <<http://www.who.int/whr/2004/en/>>. Acesso em 17 jul 2012.

