

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

---

Emprego da citotoxicidade basal *in vitro* na redução do número de animais em ensaios de avaliação da toxicidade oral aguda: *a grandisina e seu metabólito majoritário como protótipos*

---

**Aluno: Marcelo de Sousa Vieira**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Marize Campos Valadares Bozinis**

**UFG**  
**2009**

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

---

Emprego da citotoxicidade basal *in vitro* na redução do número de animais em ensaios de avaliação da toxicidade aguda oral: *a grandisina e seu metabólito majoritário como protótipos*

---

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

**Aluno: Marcelo de Sousa Vieira**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Marize Campos Valadares Bozinis**

**Goiânia**  
**2009**

**BANCA EXAMINADORA DA  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluno: Marcelo de Sousa Vieira**

---

**Orientadora: Profa. Dra. Marize Campos Valadares Bozinis**

---

**Membros**

**1. Profa. Dra Marize Campos Valadares Bozinis**

**2. Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha**

**3. Profa. Dra Lee Chen Chen**

**Suplentes**

**4. Profa. Dra Eliana Martins Lima**

**5. Profa. Dra Kênnia Rocha Rezende**

**Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
da Universidade Federal de Goiás**

**Data: 14/04/2009**

*À minha mãe.*

*“Don’t make little plans. They have no magic to stir men’s blood and probably themselves will not be realized. Make big plans; aim high in hope and work, remembering that a noble, logical diagram once recorded will never die, but long after we are gone will be a living, asserting itself with evergrowing insistence.”*

***Daniel Hudson Burnham,  
Arquiteto e designer da exposição em homenagem  
a Cristóvão Colombo, Chicago 1893.***

# Agradecimentos

---

*À minha orientadora e amiga Profa. Dra. Marize Campos Valadares Bozinis por esses anos de ensinamentos que me fizeram crescer não apenas como profissional, mas também como pessoa. Pela admirável força e incentivo que nunca nos deixa desanimar.*

*Agradeço aos meus pais pelo apoio incondicional, por todo grandioso esforço em me auxiliar na minha formação profissional. Pelo orgulho que sentem a cada vitória, a cada passo que conseguimos dar.*

*Aos meus velhos amigos Rafael Vieira, Ekaterina Rivera e Márcio de Paula que sempre norteiam e inspiram minha carreira.*

*Um agradecimento especial à Ekaterina Rivera que teve papel fundamental na execução deste projeto. Como sempre me apóia, acredita e impulsiona minha carreira com seus preciosos ensinamentos e com a sua gratuita disposição em ajudar.*

*Ao Dr. William Stokes, diretor executivo ICCVAM, por abrir preciosas portas que foram fundamentais na execução deste projeto.*

*Ao Dr. Raymond Tice, diretor NICEATM, por sua disposição em me receber e compartilhar seus conhecimentos.*

*Ao Dr. Rodger Curren, presidente do IIVS, e toda sua equipe: Greg Moyer, Allison Hilberer, Amanda Ulrey, Erin Hill e Hans Raabe por me receberem de braços abertos em suas instalações.*

*À comissão científica do International Council for Laboratory Animal Science-ICLAS, aos laboratórios LabDiet e Charles River pelo incentivo e reconhecimento profissional.*

*À Polyana Benfica por todos os momentos que passamos, pelo apoio emocional e técnico.*

*Ao Centro de Produção de Anticorpos do Centro-Oeste - Cepraco, por disponibilizar sua estrutura física para a execução deste projeto.*

*Pelo importante apoio estatístico agradeço ao economista Victor Miranda e ao Dr. George Bozinis.*

*Ao Prof. Dr. Massuo Kato por fornecer o material objeto final de nosso estudo: grandisina.*

*Um agradecimento especial à Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade da São Paulo, São Paulo pela doação da linhagem celular utilizada neste trabalho.*

# Sumário

---

---

<b>TABELAS, FIGURAS, FLUXOGRAMAS E QUADROS .....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>14</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1. HISTÓRICO DA TOXICOLOGIA .....	16
1.2. TESTES TOXICOLÓGICOS: <i>IN VITRO X IN VIVO</i> .....	18
1.3. LIMITAÇÕES DOS TESTES <i>IN VITRO</i> .....	19
1.4. ALTERNATIVAS AO USO DE ANIMAIS .....	21
1.5. AGÊNCIAS REGULATÓRIAS.....	22
1.6. CORRELAÇÃO <i>IN VITRO X IN VIVO</i> .....	26
1.7. PESQUISA E DESENVOLVIMENTO .....	32
1.8. GRANDISINA .....	33
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
2.1. GERAL.....	35
2.2. ESPECÍFICOS .....	35
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>36</b>
3.1. SUBSTÂNCIAS-TESTE: ESCOLHA E PREPARO.....	36
3.2. GRANDISINA .....	39
3.3. PREPARO DAS AMOSTRAS TESTE: GRANDISINA E METABÓLITO.....	40
3.4. LINHAGEM DE FIBROBLASTOS DE CAMUNDONGO 3T3-A31 .....	41
3.5. EXPOSIÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS-TESTE ÀS CÉLULAS 3T3.....	45
3.6. TESTE DE CITOTOXICIDADE BASEADO NA CAPTAÇÃO DO CORANTE VERMELHO NEUTRO .....	46

---



<b>4. ARTIGO .....</b>	<b>50</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>
<b>6. ANEXO .....</b>	<b>57</b>

# Tabelas, Figuras, Fluxogramas e Quadros

---

Tabela 1	Classificação GHS ( <i>Globally Harmonized System</i> ). O Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos foi criado pela Organização das Nações Unidas (ONU) em 2003 para proporcionar maior segurança no manuseio, transporte e consumo de produtos químicos .....	36
Tabela 2	Lista das 35 substâncias indicadas para a realização da validação do protocolo. Fonte: ICCVAM, 2006b Test Method Evaluation Report.....	37
Tabela 3	Continuação da lista das 35 substâncias indicadas para a realização da validação do protocolo. Fonte: ICCVAM, 2006b Test Method Evaluation Report.....	38
Figura 1	Fontes: A) <a href="http://www.bidorbuy.co.za/item/18221516/Silent_Spring_Rachel_Carson.html">www.bidorbuy.co.za/item/18221516/Silent_Spring_Rachel_Carson.html</a> ; B) <a href="http://www.niehs.nih.gov/research/resources/bioethics/">www.niehs.nih.gov/research/resources/bioethics/</a> .....	17
Figura 2	Gráfico da correlação entre a IC <sub>50x</sub> e a DL <sub>50</sub> em roedores de 347 substâncias químicas. Fonte ICCVAM, 2001: <i>Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity</i> , 2001.....	27
Figura 3	Regressão obtida através das substâncias do RC com fibroblastos de camundongos (BALB/c 3T3) pelo método do vermelho neutro. O gráfico mostra a regressão do RC determinada pelas substâncias (linha em negrito) com um intervalo de $\pm \log 5$ (linhas mais finas) e os valores das doses iniciais de cada uma das substâncias (triângulos). Os novos valores obtidos pelos laboratórios são demonstrados pelos quadrados pretos e a nova linha de regressão linear encontrada é mostrada pela linha cinza descontínua. Fonte ICCVAM, 2001: <i>Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate in Vivo Starting Doses for Acute Toxicity</i> .....	31
Figura 4	Estrutura química da grandisina e 4-O-demetilgrandisina.....	40
Figura 5	Células da linhagem aderente Balb/c 3T3-A31 mostrando o crescimento em monocamada. Fotomicrografia em microscópio invertido 20 x com filtro.....	42

---

Figura 6	Esquema de plaquemento das células 3T3-A31 para realização do procedimento de citotoxicidade pelo método de captação do corante vermelho neutro.....	43
Figura 7	Esquema da placa de 96 poços demonstrando os poços brancos (VCb e C <sub>x</sub> b) sem células (ICCVAM, 2006b modificado).....	44
Figura 8	Esquema da placa de 96 poços demonstrando os poços controle (VC1 e VC2) e as 8 concentrações (C <sub>1-8</sub> ) em sextuplicata (ICCVAM, 2006b modificado).....	45
Figura 9	(A) Análise dos poços entre 2 e 3 horas após exposição ao corante para avaliação de viabilidade do teste (formação de cristais e homogeneidade). (B) Imagem em maior aumento mostrando a captação do corante vermelho neutro pelas células viáveis. As células translúcidas são as que sofreram danos pela exposição ao xenobiótico se tornando incapazes de absorver o corante (Cortesia Hans Raabe et al., IIVS-USA).....	47
Figura 10	Placa 96 poços após adição da solução de fixação do vermelho neutro e homogeneização mostrando a captação do corante vermelho neutro. Poços periféricos (linhas A e H; colunas 1 e 11) sem células. Os poços das colunas 2 e 11 são os controle em sextuplicata (12 repetições) não expostos à substância-teste; colunas 3 a 10 são os poços-testes com 8 concentrações sendo a coluna 3 a menor concentração da droga: maior viabilidade celular, maior captação do corante; coluna 10: maior concentração da droga, menor viabilidade celular, menor captação do vermelho do corante.....	48
Fluxograma 1	Procedimento para o teste de Toxicidade Oral Aguda OECD 423-Método de Classes partindo da dose de 300 mg/kg. Fonte: OECD 423 modificado.....	24
Fluxograma 2	Esquema para avaliar a continuidade de um teste de citotoxicidade in vitro para a determinação das doses iniciais no teste de toxicidade oral aguda. Fonte ICCVAM, 2001 modificado: <i>Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity</i> .....	30

# Símbolos, Siglas e Abreviaturas

---

C <sub>x</sub> b	Branco, sem a presença de células com a substância-teste
C <sub>1-8</sub>	Substâncias-teste nas concentrações: C <sub>1</sub> menor concentração, C <sub>8</sub> maior concentração.
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50% da população testada
EtOH	Etanol
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória para 50% da população testada
R <sup>2</sup>	Coefficiente de regressão linear
VCb	Branco Controle, sem a presença de células
VC1 e VC2	Controle negativo, células sem substância-teste
Balb/c 3T3-A31	Linhagem celular 3T3-A31 obtida de camundongos da linhagem Balb/c
BCOP	Bovine Corneal Opacity Permeability
BRD	Background Review Document
CAS	Chemical Abstracts Services
cels	Células
DMEM	Dullbecco's modified Eagle's medium
ECVAM	European Center for the Validation of Alternative Methods
FDCA-USA	Food, Drug and Cosmetic Act-United States
FRAME	Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments
GHS	Globally Harmonized System
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
ICE	Isolated Chicken Eye

ICH	International Conference on Harmonisation
<i>in house</i>	Experimentos realizados no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular-FARMATEC/Universidade Federal de Goiás
IU	Unidades Internacionais
IIVS	Institute for In Vitro Sciences
JaCVAM	Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods
NIHES	National Institute of Environmental Health Science
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
NTP	National Toxicology Program
NICEATM	NTP-Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods
NRU	Neutral red uptake
PBS	Phosphate-buffered saline
P.M.	Peso Molecular
RC	Registro de Citotoxicidade
REACH	Registration, Evaluation, Authorization and Restrictions of Chemicals
RTECS	Registry of Toxic Effects of Chemical Substances
SFB	Soro Fetal Bovino
TMER	Test Method Evaluation Report
Tripsina/EDTA	Solução de Tripsina e Ácido etileno-diaminotetarcético
VN	Corante Vermelho Neutro

# Resumo

---

A substituição ou redução do uso de animais em experimentos para a avaliação de toxicidade tem sido bastante encorajada e tem recebido grandes incentivos, inclusive financeiros, governamentais e institucionais. No entanto, a substituição completa da maioria dos testes mandatórios por agências reguladoras do setor ainda não é realidade, a exemplo, o teste de toxicidade oral aguda sistêmica. Neste contexto, se aplica a validação de testes *in vitro* para estimar dados *in vivo*. No presente trabalho, realizamos a validação *in house* do protocolo internacional e multilaboratorial recomendado pelo *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM): Utilização da Citotoxicidade In Vitro na Estimativa de Doses Iniciais para Testes de Toxicidade Oral Aguda Sistêmica*. Para tal, utilizamos o método de captação do corante vermelho neutro e a linhagem celular fibroblástica de camundongos BALB/c 3T3-A31. Dentre as substâncias recomendadas pelo ICCVAM para a validação do método foram investigadas 9 substâncias. A metabolização de produtos pelo organismo vivo é uma grande limitação dos testes *in vitro*. Utilizamos a grandisina, um tipo de ligana com grande potencial antitumoral e seu metabólito majoritário como substâncias modelos. Com utilização do metabólito conseguimos transpor esta barreira dos testes *in vitro*. Os resultados demonstraram que os dados obtidos estão em consonância com os dados da literatura sendo possível classificar ambas as substâncias na categoria GHS 4: grandisina e 4-O-demetilgrandisina: 617,72 mg/kg and 429,95 mg/kg, respectivamente.

Palavras-chaves: Correlação  $IC_{50}$  x  $DL_{50}$ ; Corante Vermelho Neutro; Balb/c 3T3-A31, Grandisina, Metabólito

---

# Abstract

---

The animal replacement in experiments has been very encouraged by government and other institutions. However, in drugs development the animal replacement is not yet a reality, like at oral acute systemic tests. The validation of *in vitro* protocols is necessary for data generation with reproducibility, repeatability and accuracy. In this study was validated at the Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular- Faculdade de Farmácia/Universidade Federal de Goiás the protocol already validated by three laboratories (two in the USA and one at United Kingdom) and coordinated by ICCVAM: *In Vitro Cytotoxicity Methods for Estimating Starting Doses for Acute Systemic Toxicity Tests*, using the neutral red uptake in BAL/c 3T3-A31 cell line. It was used the grandisine, a lignan, and its major metabolite taken by fungi biodegradation. Our research group has identified a potential anti-tumoral action of grandisine, data not yet published. After in house validation we estimated the LD<sub>50</sub> of grandisin and 4-*O*-demethylgrandisin: 617.72 mg/kg and 429.95 mg/kg, respectively. Both were classified under the GSH category 4.

**Key-words:** Correlation IC<sub>50</sub> x LD<sub>50</sub>; NRU assay; Balb/c 3T3-A31 cells, Grandisin, Metabolite

# 1. Introdução

---

## 1.1. Histórico da Toxicologia

A toxicologia cresceu como disciplina no século XX devido ao surgimento e produção de novos produtos químicos tais como medicamentos, agrotóxicos, munições (com a II Guerra Mundial) e fibras sintéticas. Os acidentes toxicológicos envolvendo o uso de medicamentos e exposições de trabalhadores em indústrias fizeram da toxicologia uma ciência imprescindível e despertou a sociedade para a necessidade de leis e exigências governamentais visando o estabelecimento de medidas de segurança, além de estimativas de risco para a utilização de produtos químicos (GALLO, 2001).

Nos Estados Unidos, a primeira lei que regulamentou o uso de medicamentos e aditivos químicos nos alimentos foi a chamada *Wiley bill*, 1906 (*Food and Drug Act*) (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007). Já em 1918 as grandes indústrias norte-americanas instituíram laboratórios de pesquisas toxicológicas para ajudar a entender os efeitos das substâncias na saúde dos trabalhadores e a segurança destes produtos. Para responder as perguntas acerca dos efeitos tóxicos de novas substâncias sobre o organismo vivo, iniciou-se a utilização da experimentação em animais (GALLO, 2001).

Outro marco na história da toxicologia regulatória ocorreu em 1937, com a tragédia da comercialização do então denominado “elixir”: um composto de sulfonamida solubilizada em etileno glicol, o qual resultou em pelo menos 73 vítimas fatais por falência renal aguda causada pela cristalização dos metabólitos do glicol (ácido oxálico e ácido glicólico) nos túbulos renais (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2007). A consequência desta tragédia foi a criação de uma agência que pudesse ser reguladora do setor químico/farmacêutico. Neste cenário, o congresso norte-americano aprovou a criação do *Food, Drug and Cosmetic Act* - FDCA, 1938 (GALLO, 2001). Em 1996, no Haiti, 86 crianças morreram por intoxicação por dietilenoglicol utilizado como veículo para o acetaminofeno (O'BRIEN, 1998).

Em 1962 Rachel Carson, pesquisadora do laboratório Johns Hopkins nos EUA, publica *Silent Spring* livro considerado um marco na toxicologia. Neste livro ela denuncia o uso abusivo



do dicloro-difenil-tricloro-etano (DDT) um agrotóxico persistente que colocou em risco algumas espécies de aves neste país (RONALD, 2002).



**Figura 1.** Fontes: A) [www.bidorbuy.co.za/item/18221516/Silent\\_Spring\\_Rachel\\_Carson.html](http://www.bidorbuy.co.za/item/18221516/Silent_Spring_Rachel_Carson.html); B) <http://www.niehs.nih.gov/research/resources/bioethics/>

Em 1970 é criada nos EUA, a *Environmental Protection Agency* (EPA), órgão governamental responsável pela monitoração do ar, solo e água e a regulamentação da emissão dos poluentes (EPA, 2008). A partir destes vários episódios surgiu a toxicologia regulatória e a exigência por parte das autoridades de uma triagem para a avaliação não apenas da eficácia, no caso de medicamentos, mas principalmente dos riscos que essas novas substâncias causavam no ser humano.

Mais recente, após vasta utilização do Vioxx<sup>®</sup> pela população foram descobertos seus efeitos colaterais: risco de ataque cardíaco ou mesmo de acidente vascular cerebral. Este medicamento foi desenvolvido para o tratamento de artrite sem afetar o aparelho digestivo, como ocorre com algumas outras drogas.

Neste contexto destacamos a importância do desenvolvimento de técnicas capazes de detectar os efeitos adversos nos estágios iniciais da pesquisa e desenvolvimento e a aplicação de testes *in vitro* na determinação não apenas da eficácia, mas principalmente da segurança de novas substâncias antes que sejam lançadas no mercado.

## 1.2. Testes Toxicológicos: *in vitro* x *in vivo*

No processo de pesquisa e desenvolvimento de novas drogas e principalmente na toxicologia experimental são seguidos passos hierárquicos para a determinação da segurança de substâncias, sendo os testes *in vitro* o primeiro passo, excluindo nesta etapa compostos muito tóxicos. Após esta triagem são realizados os testes pré-clínicos (testes em animais) e só quando temos dados satisfatórios quanto à segurança das substâncias é que são realizados os testes clínicos (SPIELMANN et al., 2008).

Testes de toxicidade oral aguda são mandatórios antes da fase I de testes clínicos, gerando importantes informações a respeito da caracterização do potencial tóxico visando a seleção de substâncias para a determinação de doses seguras e, primeira evidência da ação de compostos em órgãos alvo (UKELIS et al., 2008).

A citotoxicidade basal deve ser considerada como prioridade antes de qualquer teste *in vivo* (EISENBRAND et al, 2002). Os testes *in vitro* entram nessa cadeia como uma ferramenta importante para a diminuição do número de animais utilizados e para diminuir a dor e o sofrimento que estes testes causam, uma vez que substâncias muito tóxicas são eliminadas antes de serem testadas *in vivo*.

Além disso, a comparação entre a toxicidade *in vitro* e a *in vivo* com modelos animais, assim como a comparação entre a *in vitro*/animal e *in vitro*/humano tem mostrado correlação positiva para a estimativa de risco para o ser humano (POOL-ZOBEL et al., 1994).

A avaliação do potencial risco de novas substâncias ou mesmo de novas formulações é feita em animais, e para tanto existem protocolos específicos para cada tipo de avaliação que definem a espécie animal que melhor responde ao objetivo esperado, via de administração, tempo de exposição e avaliação do início e duração dos sinais e sintomas. Modelos animais produzem bons dados na determinação da toxicidade humana em torno de 70-80% (UKELIS et al., 2008).

De acordo com a legislação dos países quem compõem o ICH (*Conference on International Harmonisation*, órgão que regulamenta protocolos de testes com fármacos - EU, EUA e Japão) um programa padrão de estudos pré-clínicos deve ser estabelecido antes de qualquer teste em humanos. Estes testes são realizados para a avaliação dos efeitos em órgãos

alvo, a relação dose-resposta e a reversão dos efeitos tóxicos. Assim uma dose segura pode ser estimada para os testes em humanos na fase I dos testes clínicos (UKELIS et al., 2008).

Os testes pré-clínicos obrigatórios se dividem em testes de toxicidade aguda e toxicidade crônica. A toxicidade aguda é o primeiro passo na triagem destas substâncias. É nesta etapa que são definidas as doses (DL<sub>50</sub> - dose letal para 50% da população testada) de segurança em organismos vivos. Entre os testes de toxicidade aguda temos os testes de toxicidade oral, testes inalatórios, cutâneos, corrosão/irritação dérmica, corrosão/irritação ocular, sensibilização dérmica dentre outros. Só após a determinação das doses que causam efeitos agudos é que são realizados os testes crônicos, ou seja, testes de teratogênese, testes reprodutivos, de carcinogênese e testes que determinam as menores e maiores doses que não causam nenhum efeito adverso no organismo animal.

### **1.3. Limitações dos testes *in vitro***

A grande limitação dos testes *in vitro* é a metabolização dos compostos originais que ocorre nos organismos vivos (COECKE et al., 2006). A transposição desta limitação torna os testes *in vitro* mais confiáveis na determinação do perfil toxicológico no processo de busca de novos compostos. O conhecimento da ação dos metabólitos no início dos testes toxicológicos é considerado um passo fundamental para a determinação do perfil farmacológico e toxicológico de novos xenobióticos (ZUCCO, et al., 2004). Quanto mais cedo for a descoberta da ação dos metabólitos no organismo vivo maiores são as chances de sucesso de um novo medicamento.

Os metabólitos podem ser mais tóxicos que o próprio composto, testes *in vitro* complementares devem ser realizados para caracterizar o perfil de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (BOTHAM, 2002). Ainda não existem testes *in vitro* que substituam os sistemas biológicos como um todo.

Uma alternativa é a pesquisa dos metabólitos obtidos por processos de biotransformação por fungos, por exemplo.

### 1.3.1. Animais e 3 R's

Descartes dizia que os animais não sentiam dor uma vez que não possuíam consciência e, por séculos os animais serviram de modelo de estudos sem a utilização de analgésicos ou anestésicos (BAUMANS, 2006). Somente em 1846, com a descoberta dos efeitos anestésicos do éter se iniciou o desenvolvimento de técnicas voltadas para amenizar a dor e o desconforto dos animais utilizados em pesquisa (JUNIOR, 2006).

Já na primeira metade do século XIX Marshall Hall, fisiologista britânico, propôs a não realização de procedimentos repetidos e a utilização de animais inferiores na escala filogenética (MANUEL, 1987).

Nos anos 50 com a publicação do livro *The Principles of Humane Experimental Technique* por Russel and Burch (1959) se iniciou a preocupação em diminuir o número de animais em testes quando lançaram o princípio dos 3 R's: *Reduction, Refinement e Replacement*. Os 3R's preconizavam a redução no número de animais, o refinamento nos ensaios com animais, sendo este o princípio mais importante na execução de um experimento, que é a informação coletada com qualidade e em quantidade de um mesmo ensaio e, a substituição dos animais sempre que houver possibilidade (alternativas) para tal, sem prejuízo da qualidade das informações obtidas. Atualmente os 3R's são considerados como o "padrão" mínimo para a prática de uma pesquisa de qualidade em ensaios que utilizem animais de experimentação.

No dia 1º de Junho de 2007 entrou em vigor na União Européia uma resolução do parlamento europeu onde foi criado o REACH - *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*. Este é um programa com evidentes efeitos no comércio mundial, uma vez que nenhuma nova substância terá permissão para entrar na União Européia antes de ter o seu grau de risco determinado. O programa incentiva o uso de métodos alternativos e o uso destes métodos deve gerar redução no número de animais em experimentos de 8 a 13 milhões (REACH, 2008).

No processo atual de desenvolvimento de novos medicamentos e na nova regulação européia (REACH) o estabelecimento de métodos *in vitro* para a substituição dos testes de toxicidade oral aguda *in vivo* é um ponto crucial em testes futuros tanto para a pesquisa de base como para os testes regulatórios (UKELIS, 2008).

## 1.4. Alternativas ao uso de animais

Há muito se discute alternativas para os testes realizados *in vivo* no intuito de diminuir o número e/ou minimizar o sofrimento dos animais utilizados nas pesquisas científicas. A substituição por completo ainda não é possível, no entanto métodos que reduzam o uso dos animais têm sido validados e aplicados como no caso da toxicidade oral aguda (STITZEL et al., 2002).

### 1.4.1 Testes *in vitro*, *in silico* e *ex vivo*

Os métodos *in vitro* geralmente utilizam linhagens celulares. Hoje há uma tendência em classificar o grau de risco e a toxicidade das substâncias baseando-se em sua estrutura química, são os testes *in silico* que utilizam modelos computadorizados, como o “Quantitative structure-activity relationships” (QSAR) e o “Quantitative structure-activity-activity relationship” (QSAAR). O QSAR é um modelo matemático computadorizado que relaciona a atividade biológica dos compostos teoricamente ou experimentalmente calculada através de suas estruturas químicas. Este é um programa fácil de ser aplicado, rápido, eficiente e de baixo custo (LESSIGIARSKA et al., 2006). O QSAR pode ser usado para estimar doses iniciais para testes *in vivo*. No entanto, ainda não há nenhum programa que faça uma estimativa com exatidão para os testes de toxicidade oral aguda (STITZEL et al., 2002). O QSAAR leva em consideração tanto informações biológicas quanto descrições estruturais, enquanto QSAR usa somente a estrutura química das substâncias para predefinir a toxicidade das mesmas (LESSIGIARSKA et al., 2006).

Experimentos *ex vivo* utilizam órgãos ou tecidos de animais (GUBBELS-VAN HAL et al., 2005). Temos como exemplos de experimentos *ex vivo* dois testes aceitos em 2008 nos Estados Unidos para fins regulatórios: *Bovine Corneal Opacity and Permeability* (BCOP) e *Isolated Chicken Eye* (ICE) que utilizam respectivamente olhos de bovinos e aves obtidos de abatedouros para a avaliação de irritação/corrosão ocular substituindo o antigo e discutido teste de Draize onde eram utilizados coelhos.

Ainda hoje, o objetivo da toxicologia é o de avaliar o risco de uma substância química quando em contato com o organismo vivo. Dentre as áreas da Toxicologia, a de medicamentos é,

atualmente, alvo de grandes discussões. Para avaliação dos parâmetros de segurança, testes pré-clínicos (*in vitro* e *in vivo* – com ou sem uso de animais) e clínicos (seres humanos) devem ser realizados. Testes de toxicidade sistêmica aguda é a avaliação dos efeitos tóxicos não específicos em dose única de uma substância e com subsequente observação por 21 dias. Por meio deste teste que é definida ou aproximada a DL<sub>50</sub>. A DL<sub>50</sub> é vastamente utilizada pelas autoridades governamentais na classificação de substâncias químicas em categorias de risco ao homem: fornecendo dados para que se tenham quantidades limites de exposição, indicando melhores condições de transporte, armazenamento e manuseio diminuindo assim os riscos de exposição tanto do homem quanto do ambiente.

### **1.5. Agências Regulatórias**

Dentre as Agências Reguladoras Internacionais que definem protocolos para os testes de avaliação de toxicidade, destaca-se a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Co-operation and Development* - OECD), com 30 países membros está sediada em Paris, França, e foi criada em 1961 (OECD, 2007). A OECD desenvolve protocolos - *Guidelines* para a realização de testes toxicológicos com finalidade regulatória, os quais são seguidos mundialmente.

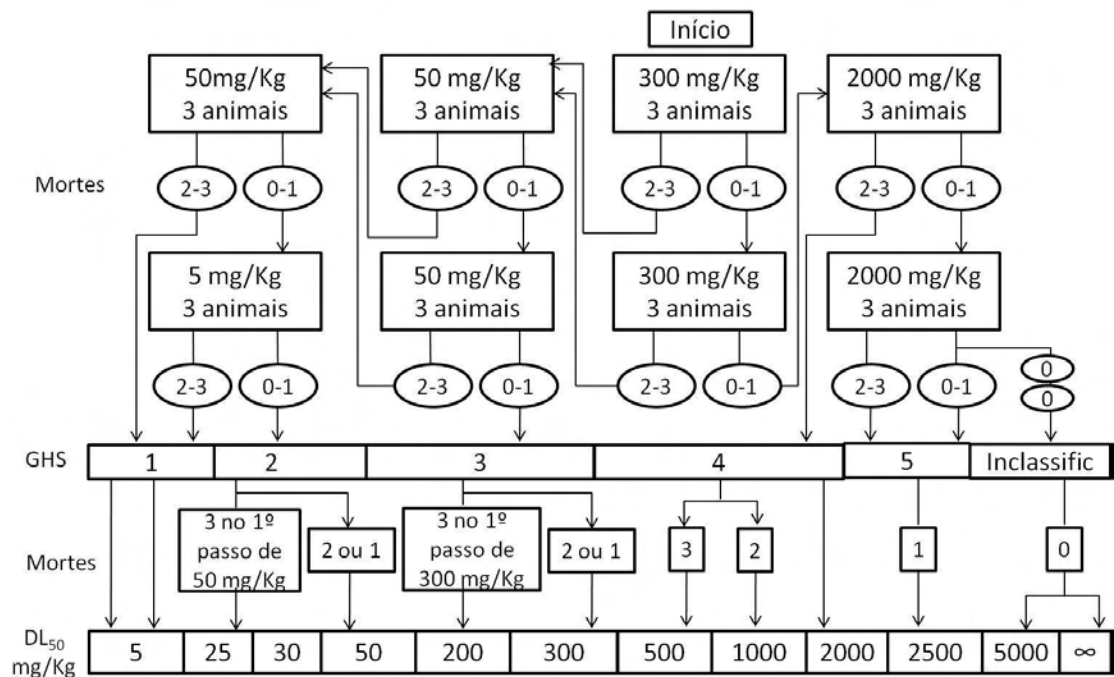
Historicamente, a morte era o objetivo dos testes de toxicidade oral aguda (OECD 401, 1981). Entretanto, informações importantes podem e devem ser coletados (ICCVAM, 2001) através do exame clínico (início, fim e duração dos sintomas), exames macroscópicos e microscópicos de órgãos e tecidos verificando a toxicidade específica de substâncias sobre órgãos alvo ou sobre sistemas (WORTH e BALLS, 2002a).

A partir de 1987, a OECD iniciou o refinamento do teste de toxicidade oral aguda DL<sub>50</sub> (OECD 401, 1981) dando origem a três novos testes: Dose Fixa (OECD, DF 420, 1992), Método de Classe (OECD 423, ATC, 1996) e *Up and Down* (OECD, UD 425, 1998). Estes testes foram preconizados pensando no bem-estar dos animais com o objetivo de diminuir a dor e o desconforto (BOTHAM, 2002), uma vez que testes de toxicidade aguda são considerados de alto nível de estresse (BAUMANS, 2006). Desde 17 de dezembro de 2002 o teste OECD 401 foi banido e experimentos realizados por esse método, a partir desta data, não são mais aceitos

(STITZEL et al., 2002), reduzindo bastante o número de animais utilizados nos testes de toxicidade oral aguda, que inicialmente chegou ao número de 100 animais por teste e por substância.

Dentre os protocolos aceitos preconizados pela OECD para a avaliação da Toxicidade Oral Aguda, destaca-se o OECD 423 - Método de Classes, o qual tem como meta estabelecer a faixa que será encontrada a  $DL_{50}$  (SCHLEDE et al., 2005). Este teste é iniciado por doses pré-definidas com base em dados da literatura ou dados preliminares obtidos nos próprios laboratórios de pesquisa. Estas doses devem ser próximas a 5, 50, 300 ou 2000 mg/kg de peso do animal. Quando justificável pode-se utilizar a dose limite de 5000 mg/kg de peso do animal. Tal teste é realizado em “etapas” e, a escolha correta da dose inicial, impactará de forma determinante no número de animais que serão utilizados no teste para o estabelecimento da classe ou faixa tóxica. O teste é iniciado com três animais.

Quando se desconhece a suposta dose inicial, o teste pode iniciar-se com qualquer uma das 4 doses supracitadas. Em caso de algum indicativo de toxicidade, a exemplo a dose de 300 mg/kg, inicia-se o teste com esta dose onde, durante a exposição, se ocorrer morte de nenhum ou 1 (0 ou 1) animal, deve-se repetir a dose de 300 mg/kg se, novamente morrer 0 ou 1 animal segue-se para a dose maior de 2000 mg/kg. Se houver morte de 2 ou 3 animais o teste é finalizado e a dose de 2000 mg/kg é determinada para este xenobiótico. Desta forma, obtém-se a faixa ou classe onde pode ser definida a  $DL_{50}$  para a substância teste. O Fluxograma 1 ilustra as etapas do método de classes iniciando com a dose de 300 mg/kg de peso vivo do animal (OECD ATC 423, 1996).



**Fluxograma 1:** Procedimento para o teste de Toxicidade Oral Aguda OECD 423-Método de Classes partindo da dose de 300 mg/kg. Fonte: Adaptado do OECD 423.

Quando não houver qualquer dado sobre a substância-teste corre-se o risco de utilizar desnecessariamente um maior número de animais enquanto que os testes *in vitro* são capazes de fornecer informações para que possamos iniciar os testes com animais com a dose o mais próxima possível da real.

Citotoxicidade foi definida por Ekwall (1983) como efeitos adversos resultado da interferência em estruturas e/ou processos essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou funções celulares.

Embora os protocolos com animais sejam aceitos pela comunidade científica, muitas são as tentativas de se encontrar métodos alternativos para o refinamento ou mesmo a substituição destes. A citotoxicidade basal *in vitro* é um grande exemplo de alternativa para os passos iniciais nos testes de toxicidade.

Podemos definir métodos alternativos como qualquer metodologia que substitua, refine ou mesmo diminua o uso de animais em testes (UKELIS et al., 2008). Os protocolos OECD 420,



423 e 425 apesar de usar animais são considerados testes alternativos uma vez que reduz o número de animais que o seu antecessor, o OECD 401.

No contexto dos avanços na busca de métodos alternativos, em 1986 foi instituída na Comunidade Econômica Européia, uma lei que determinava que: “*Experimentos em animais não devem ser conduzidos se houver outro método científico que dê resultados satisfatórios*” (LILIENBLUM et al., 2008). A partir desta mesma lei que determina o desenvolvimento de métodos alternativos o seu artigo 23 determina a criação de uma agência européia destinada a desenvolver métodos alternativos aos testes com animais (PURCHASE,1997). E em 1991 foi criado o ECVAM (*European Center for the Validation of Alternative Methods*) hoje um dos mais importantes centros de validação e pesquisa acerca de métodos alternativos no mundo (ECVAM, 2007).

Nos Estados Unidos a *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) foi criada em 1997 ligada ao National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) e em 1998 foi estabelecido o *National Toxicology Program* (NTP) *Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods* (NICEATM).

Ambas as agências, européia e norte-americana, têm como objetivo coordenar projetos de validação de métodos alternativos ao uso de animais em testes além de servir como um ponto de convergência de pesquisas e banco de dados, o NICEATM e ICCVAM são voltados à validação de testes toxicológicos, já ECVAM desenvolve alternativas para outros tipos de testes, além dos toxicológicos. No Japão existe o *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods* - JaCVAM. E na Alemanha foi criado em 1989 o ZEBET sigla em alemão que significa Centro para Documentação e Avaliação de Alternativas para Experimentos com Animais. Atualmente no Brasil há propostas para a criação do BraCVAM, *Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods*.

A aplicação de testes *in vitro* para a determinação da toxicidade oral aguda vem sendo validados e aceitos pelas agências regulatórias e apesar de haver uma clara limitação em reproduzir os sistemas biológicos eles são confiáveis na determinação da toxicidade aguda, o que não ocorre com a toxicidade crônica ou de doses repetidas como mostram os estudos de (UKELIS, 2008). Por esse motivo é feita uma bateria de testes alternativos em diferentes áreas

tais como, toxicidade local, fototoxicidade, genotoxicidade e testes farmacológicos para que se alcance dados confiáveis quanto a toxicidade de novas substâncias (UKELIS, 2008).

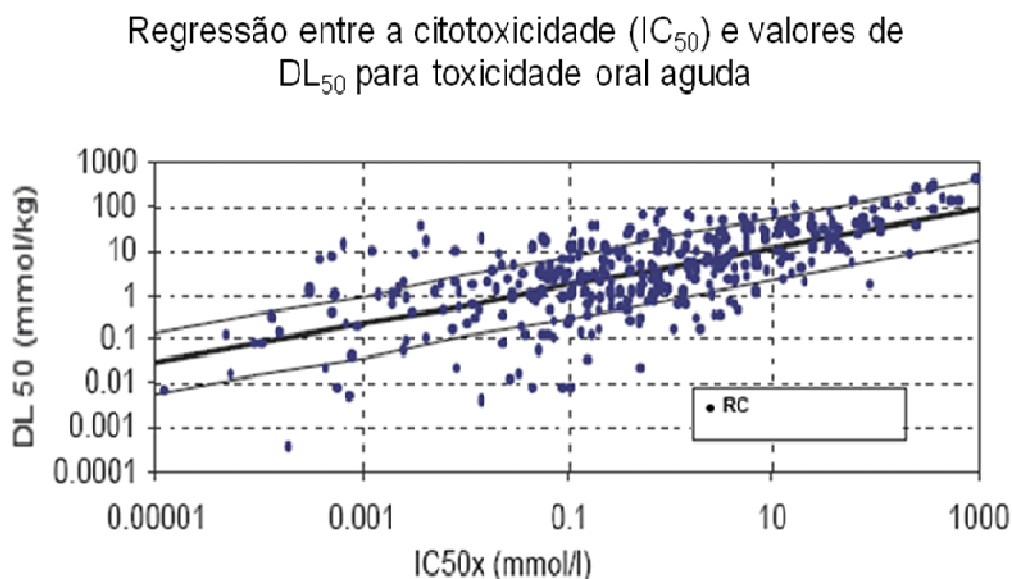
Há cerca de duas décadas testes de mutagenicidade *in vitro* foram adotados como o primeiro método alternativo na toxicologia (LIEBSCH e SPIELMANN, 2002). O uso de métodos *in vitro* pode economizar material e diminuir a duração dos testes *in vivo* (STITZEL et al., 2002), uma vez que, quando escolhemos uma dose próxima da real necessitamos de um menor número de passos/etapas para se chegar à dose correta e conseqüentemente reduzimos no número de animais em cada teste. A correlação entre a citotoxicidade basal *in vitro* e a estimativa da DL<sub>50</sub> surgiu da comparação de dados de testes de toxicidade aguda com resultados de testes de citotoxicidade basal (ICCVAM, 2001). Ao contrário do que se imaginava e do que pesquisas indicavam até meados dos anos 80, a cultura de células era pouco utilizada como uma ferramenta na toxicologia (ZUCCO et al., 2004). Experimentos *in vitro* são realizados com o objetivo de definir um perfil toxicológico mais compreensivo de novas substâncias (EISENBRAND et al., 2002)

## **1.6. Correlação *In Vitro* x *In Vivo***

Phillips et al. (1990) e Garle et al. (1994) demonstraram que há fortes correlações entre os testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo* (STOKES et al., 2003). Segundo EISENBRAND et al. (2002), a citotoxicidade basal deveria ser o primeiro passo na avaliação do potencial risco toxicológico *in vivo*, uma vez que podemos estimar a toxicidade de substâncias observando *in vitro* os danos que a mesma causa nas funções celulares, sem a necessidade de utilizar animais.

Halle coletou dados de 20 anos de literatura e publicou em 1998 o Registro de Citotoxicidade (RC), o qual contém 1912 valores de IC<sub>50</sub> (concentração letal para 50% das células testadas) de 347 substâncias, as quais foram correlacionadas com as doses de DL<sub>50</sub> oral em ratos e DL<sub>50</sub> intraperitoneal em camundongos (WORTH e BALLS, 2002). Os dados foram coletados do NOISH (*National Institute for Occupational Safety and Health*) do Registro dos efeitos tóxicos de substâncias químicas (RTECS). O estudo do RC trouxe uma enorme contribuição para o conhecimento da correlação entre a toxicidade *in vitro* e a faixa da

mortalidade ( $DL_{50}$ ) *in vivo* (HALLE, 2003). A Figura 1 mostra a correlação positiva entre os valores de  $IC_{50}$  de 347 substâncias (pontos azuis) com o valor correspondente da dose inicial da  $DL_{50}$  em roedores. O RC é um método baseado na comparação da média dos valores da  $IC_{50}$  com os valores de  $DL_{50}$  usando análise de regressão linear (HALLE, 2003).



**Figura 2.** Gráfico da correlação entre a  $IC_{50}$  e a  $DL_{50}$  em roedores de 347 substâncias químicas.  
**Fonte:** ICCVAM, 2001 *Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity*.

Neste estudo, a dose inicial *in vivo* foi estimada pela seguinte equação obtida da regressão linear do RC das 347 substâncias estudadas:

$$\log(DL_{50}) = 0,435 \times \log(IC_{50}) + 0,625 \quad (1)$$

A margem de erro estabelecida foi de  $\pm \log 5$ .

O resultado desta equação é expresso em mols (mmol/kg). Este valor deve ser convertido para medidas de peso (mg/kg) multiplicando-se pelo peso molecular da substância antes de se fazer o cálculo da  $DL_{50}$  (ICCVAM, 2001). No caso de misturas como extratos vegetais, este cálculo ainda não está totalmente estabelecido. Para a validação laboratorial deste estudo, a linha

de regressão resultante deve ser comparada com a linha de regressão do RC original obtido da literatura. Se a nova reta for paralela e cair na margem limite de  $\pm \log 5$  então os parâmetros do RC podem ser usados para predizer as doses iniciais para os testes de toxicidade oral aguda, como demonstra o fluxograma 2.

A ICCVAM em 2000 recomendou a adoção imediata do uso de dados coletados *in vitro* para determinar doses iniciais para todos os testes de toxicidade aguda, no entanto, ainda hoje esta recomendação pouco tem sido seguida pelos laboratórios brasileiros que realizam ensaios de toxicidade oral aguda.

Antes de começar um teste de citotoxicidade para estimar as doses iniciais em animais, deve-se realizar a validação do método por meio de uma correlação quantitativa entre o teste *in vitro* e o *in vivo* testando um pequeno número de substâncias aplicando o RC, através da fórmula de regressão. Estabelecendo a concentração capaz de matar 50% das células em teste (IC<sub>50</sub>) é possível comparar quantitativamente a resposta de uma substância química em diferentes sistemas ou mesmo diferentes substâncias em sistemas individuais (EISENBRAND E. et al., 2002)

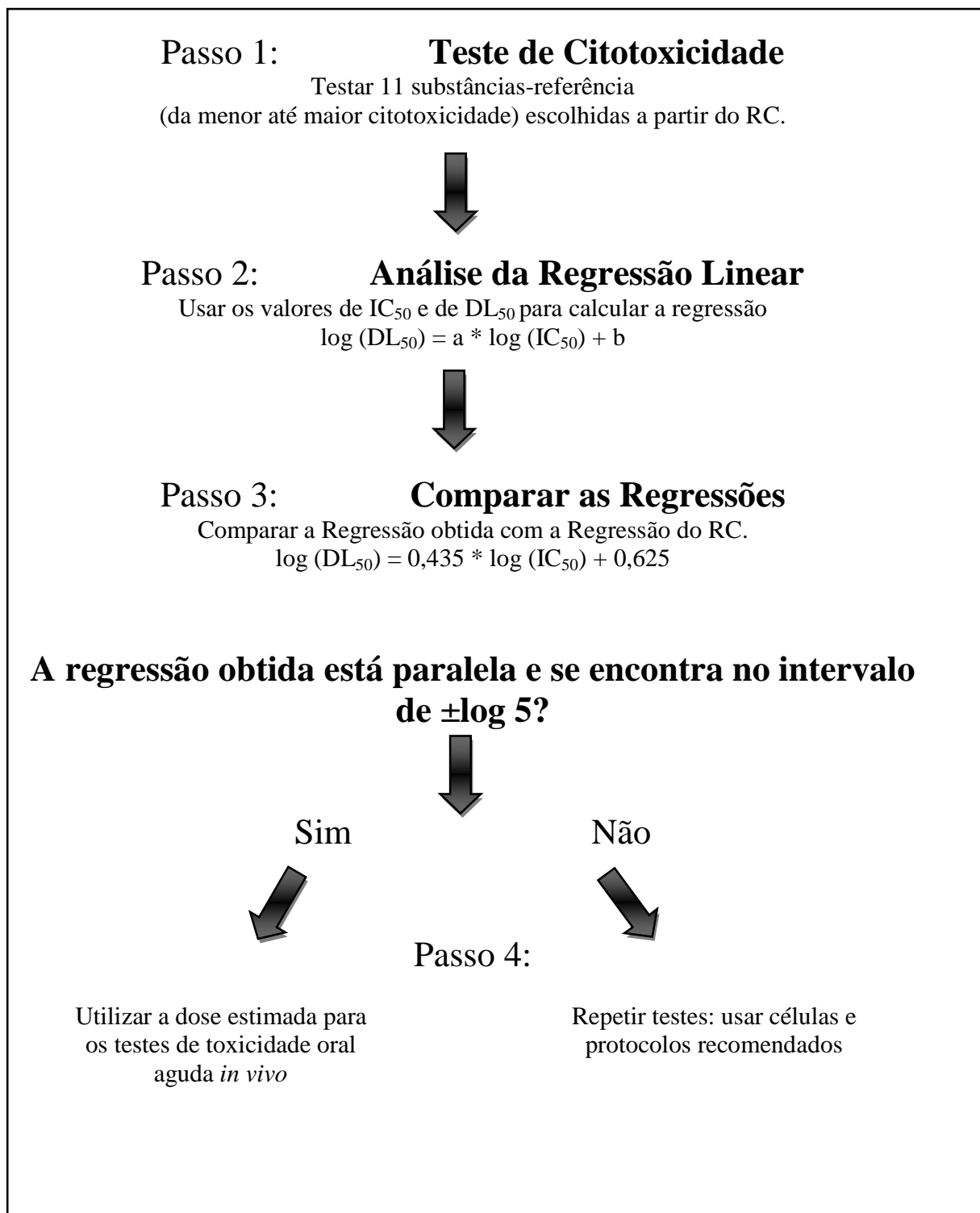
O ECVAM propôs a realização do teste de citotoxicidade basal usando a linhagem celular Balb/c 3T3 e o método de incorporação do vermelho neutro (NRU) para o estabelecimento do RC de novas moléculas. Outra abordagem seria o teste de toxicidade com células específicas, metabolizadoras, com o intuito de investigar a biotransformação (WORTH e BALLS, 2002).

Embora o uso de ensaios *in vitro* para determinar qual a dose inicial dos testes *in vivo* exista há mais de 20 anos (ICCVAM, 2001), ainda é um procedimento inovador e importante na redução do número de animais utilizados, tendo em vista que a correta escolha da dose inicial é o que determina o número de animais em cada teste (ICCVAM, 2001).

Em novembro de 2006 foi publicado o resultado de 2 anos e meio de trabalho de validação de um protocolo que utiliza dados *in vitro* na determinação das doses iniciais para testes *in vivo*: o *ICCVAM TEST METHOD EVALUATION REPORT: In Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests* (ICCVAM, 2006b) sendo esta diretriz aceita e utilizada internacionalmente de forma eficaz como um guia para a determinação das doses iniciais de toxicidade em animais. Este foi um processo de validação internacional e multilaboratorial. Multilaboratorial por ser composta por três laboratórios: o *Institute for In Vitro Sciences – IIVS, USA*; o *Fund for the Replacement of Animals in Medical*

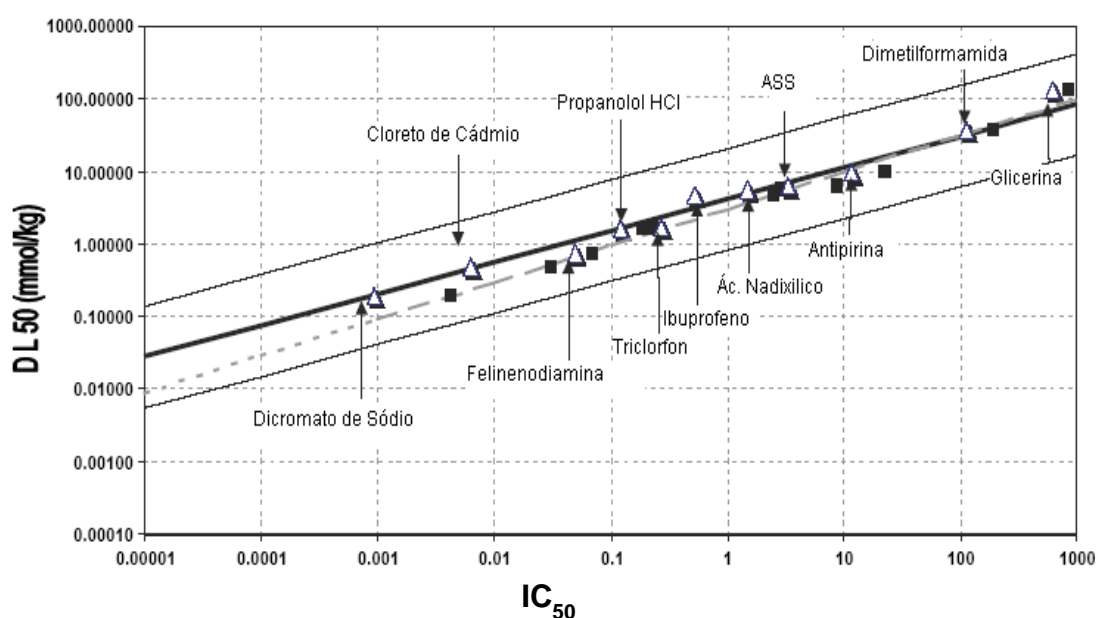
*Experiments* – FRAME da University of Nottingham, Reino Unido e o U.S. Army Edgewood Chemical Biological Center (ECBC); e internacional por receber ajuda científica e financeira de instituições internacionais como o ECVAM - Europa. O IIVS - USA foi o laboratório responsável em conduzir e definir os protocolos da validação.

Baseado nos trabalhos de Spielmann et al. (1999) ficou estabelecido uma seqüência de passos ilustrados no fluxograma 2, para a determinação dos valores obtidos em um teste de citotoxicidade podem ser usados como determinantes das doses iniciais nos testes de toxicidade oral aguda (ICCVAM, 2001).



**Fluxograma 2:** Esquema para avaliar a continuidade de um teste de citotoxicidade *in vitro* para a determinação das doses iniciais no teste de toxicidade oral aguda. Fonte ICCVAM, 2001 modificado: *Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity*.

Para comparar a regressão obtida da substância-teste com o RC foram selecionadas substâncias (denominadas substância de referência) a partir do RC que Halle (1998) desenvolveu (ICCVAM, 2001). As substâncias de referência foram testadas em três laboratórios diferentes IIVS-USA, FRAME-Reino Unido e ECBC-USA com células fibroblásticas de camundongos da linhagem BALB/c 3T3, (Figura 2) pelo método de captação do corante vermelho neutro para atestar a eficácia do método. Os resultados são apresentados abaixo em forma de gráfico comparando o resultado do RC com o teste realizado pelos três laboratórios.



**Figura 3.** Regressão obtida através das substâncias do RC com fibroblastos de camundongos (BALB/c 3T3) pelo método de captação do corante vermelho neutro. O gráfico mostra a regressão do RC determinada pelas substâncias (linha em negrito) com um intervalo de  $\pm \log 5$  (linhas mais finas) e os valores das doses iniciais de cada uma das substâncias (triângulos). Os novos valores obtidos pelos laboratórios são demonstrados pelos quadrados pretos e a nova linha de regressão linear encontrada é mostrada pela linha cinza tracejada. Fonte ICCVAM, 2001: *Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate in Vivo Starting Doses for Acute Toxicity*.

Nesta validação a nova regressão obtida para a linhagem BALB/c 3T3 pelo método do vermelho neutro foi:

$$\log (DL_{50}) = 0,506 \times \log (IC_{50x}) + 0,475 \quad , \quad [R^2=0,9848] \quad (2)$$

Esta regressão foi então comparada com a equação de regressão linear do RC da literatura [ $\log (DL_{50}) = 0,435 \times \log (IC_{50x}) + 0,625$ ], demonstrando que existe pareamento entre as equações e, assim, a reprodutibilidade do teste.

### 1.7. Pesquisa e Desenvolvimento

Para José Gomes Temporão, Ministro da Saúde e Carlos Grabois Gadelha, vice-presidente de Produção e Inovação da Fundação Oswaldo Cruz.

O mercado farmacêutico brasileiro movimenta R\$ 22 bilhões gerando 300 mil empregos diretos e 1,6 milhões de empregos indiretos. Há, porém, enorme fragilidade econômica e tecnológica. As indústrias perderam competitividade internacional ao longo da década de 90. O déficit acumulado cresceu de US\$ 700 milhões ao ano, no final dos anos 80, para US\$ 4 bilhões, sendo 60% concentrados na área farmacêutica. Um país desenvolvido requer base produtiva forte para atender a inclusão social e atenuar as desigualdades. O Brasil apresenta grande possibilidade de superação dessa vulnerabilidade. Nossa base produtiva, ciência, recursos humanos qualificados e sistema de saúde universal conferem ao Estado elevado poder de compra de bens industriais, com financiamento de longo prazo pelo BNDES. Fatores singulares na realidade latino-americana (TEMPORÃO e GADELHA, 2007).

Neste contexto, fármacos e medicamentos inovadores, produtos biotecnológicos e cosméticos que visem suprir a necessidade nacional e ampliar a competitividade nacional e internacional obrigatoriamente terão de serem avaliados e/ou reavaliados quanto o seu potencial tóxico para que possam ser utilizados com segurança pela população, cumprindo assim o seu papel social.

Testes de toxicidade oral aguda, usualmente realizados em animais, são o primeiro passo para identificar e caracterizar os danos que um novo composto pode ou não causar ao ser humano. Embora o uso de ensaios *in vitro* para determinar qual a dose inicial dos testes *in vivo* exista há mais de 50 anos (ICCVAM, 2001), ainda é um procedimento inovador e importante na



redução do número de animais utilizados, tendo em vista que a correta escolha da dose inicial é o que determina o número de animais em cada teste (ICCVAM, 2001).

Em outubro de 2000, as agências *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM), *National Toxicology Program* (NTP) e *Interagency Center for Evaluation of Alternative Toxicological Methods* (NICEATM), realizaram um *workshop* com a finalidade de reavaliar e desenvolver normas sobre os métodos *in vitro* disponíveis para a determinação da Toxicidade Sistêmica Aguda. Deste encontro resultou o *Guidance Document on Using 'In Vitro' Data to Estimate 'In Vivo' Starting Doses for Acute Toxicity* (ICCVAM, 2001).

Diante do exposto, fica evidente a importância da adoção da metodologia de testes de citotoxicidade basal para a determinação das doses iniciais em animais para os testes de toxicidade oral aguda nas etapas iniciais da descoberta de um novo candidato a fármaco.

## **1.8. Grandisina**

A grandisina pertence ao grupo das neolignananas, que são dímeros oxidativos de alil álcool e fenóis (NIHEI et al., 2004). As neolignananas são encontradas predominantemente em arbustos e se acumulam nos troncos como resposta a ferimentos mecânicos ou ao ataque de microrganismos, exibem propriedades contra insetos, como o efeito antialimentar induzido pela piperona, isolada de *Piper futokadsura* Siebold (Piperaceae).

O uso extensivo de lignanas na medicina tradicional faz das mesmas uma importante família para estudo do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com base em modificações na estrutura de cada composto. Atualmente as lignanas são alvos de diferentes linhas de pesquisa, como a que estuda a inibição da transcriptase reversa e da atividade anti-HIV (EICH et al., 1996; LEE, et al., 1997; LIU, et al., 1997; HARA et al., 1997 *apud* GORDALIZA, et al. 2004), da atividade antifúngica (ZACCHINO et al., 1997), da atividade anti-reumática, da atividade anti-psoríase e anti-malária (LERNDAL e SVENSSON, 2000) anti-leishmania, mas o que mais desperta o interesse científico, é o estudo da citotoxicidade e da atividade anti-viral dessas lignanas (AYRES e LOIKE, 1990).

Dentre as lignanas com atividade antitumoral podemos relatar a ação do composto elenosídeo, uma arilnaftaleno lignana, estruturalmente relacionada a prostalidinas, justicidinas e derivados da podofilotoxina, extraído de *Justicia hyssopifolia* L., que demonstrou citotoxicidade contra leucemia, câncer pulmonar de células pequenas, melanoma, câncer de colon, de ovário e renal (NAVARRO et al., 2001). Entretanto, a lignana que se destaca quanto à atividade antitumoral é a podofilotoxina, que por apresentar níveis inaceitáveis de citotoxicidade, não é utilizada na terapia antineoplásica. Diante disso, extensivas modificações na sua estrutura têm sido feitas com o objetivo de se encontrar agentes antitumorais mais potentes e menos tóxicos (DESBÈNE e RENAULT, 2002). Dentre seus derivados semi-sintéticos, etoposídeo e tenoposídeo, são utilizados no tratamento de tumores testiculares, câncer pulmonar de células pequenas e como um dos componentes do tratamento pluriterapêutico no combate a leucemia linfoblástica aguda da infância, linfoma e sarcoma de Kaposi (AYRES e LOIKE, 1990; DESBÈNE e RENAULT, 2002; GORDALIZA et al., 2004). Porém várias limitações como, mielosupressão, desenvolvimento de resistência à droga e citotoxicidade as células normais ainda existem. O efeito anti-proliferativo do 4DPG foi bem maior que do etoposídeo (QI et al., 2005). Estudos preliminares *in house* com camundongos mostraram que a grandisina aumenta a sobrevida de animais com tumor ascítico de Ehrlich e em um modelo de indução de danos a DNA esta substância apresentou um efeito quimioprotetor contra danos cromossômicos (dados ainda não publicados).

Diante dos interesses no desenvolvimento de um novo fármaco a partir da grandisina, bem como da importância de refinamento nos testes de toxicidade oral aguda, neste trabalho padronizamos a citotoxicidade basal como ferramenta para estimar doses iniciais nos estudos *in vivo*. Para tal utilizamos a grandisina e seu metabólito majoritário como protótipos.

## 2. Objetivos

---

### 2.1. Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicabilidade do teste de toxicidade *in vitro* no processo de descoberta de novas substâncias, para tanto foram utilizados dois protótipos a fármacos antitumorais, a grandisina e seu metabólito majoritário (4-O-demetilgrandisina).

### 2.2. Específicos

- Estimar a faixa provável de se obter a  $DL_{50}$  (dose letal para 50% dos animais tratados) da grandisina

- Estimar a faixa provável de se obter a  $DL_{50}$  do metabólito majoritário da grandisina (4-O-demetilgrandisina), obtido processo biotecnológico por meio de bioconversão por fungos filamentosos.

## 3. Metodologia

### 3.1. Substâncias-teste: escolha e preparo

As substâncias-teste utilizadas na implementação do estudo *in house* foram adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA; Steinheim, Germany) escolhidas dentre as 35 substâncias recomendadas pela ICCVAM (ICCVAM, 2006b). Na seleção das substâncias levou-se em consideração a classificação das mesmas no GHS (*Global Harmonized System*) Tabela 1 que classifica as substâncias quanto a toxicidade. As substâncias testadas são substâncias conhecidas e com a toxicidade determinada. Seus limites de segurança e risco já estão estabelecidos. A importância de se ter substâncias já estabelecidas é por possibilitar a comparação com o registro de citotoxicidade. Foram selecionadas 9 substâncias para a validação *in house*: propranolol HCl (3506-09-0); oxalato de sódio (62-76-0), sulfato de atropina (5908-99-6), acetaminofeno (203-90-2); ácido acetil salicílico (50-78-2), ácido tricloroacético (76-03-9); dimetilformamida (68-12-2); cloreto de potássio (7447-40-7); e glicerina (56-81-5).

Todas as amostras foram solubilizadas em meio de cultura DMEM e filtradas em microfiltros com membrana PES (com poro de 0,22 µm) para garantir a esterilidade do material.

ICCVAM em seu *Test Method Evaluation Report - TMER* (ICCVAM, 2006b) lista 35 substâncias das 72 testadas para a realização da validação do protocolo pelos laboratórios interessados. Tabelas 2 e 3.

**Tabela 1** - Classificação GHS (*Global Harmonized System*). O Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) foi criado pela Organização das Nações Unidas (ONU) em 2003 para proporcionar maior segurança no manuseio, transporte e consumo de produtos químicos.

Categoria GHS	1	2	3	4	5	6 ou inclassificado
DL <sub>50</sub> em mg/kg de peso vivo do animal	DL <sub>50</sub> ≤ 5	5 < DL <sub>50</sub> ≤ 50	50 < DL <sub>50</sub> ≤ 300	300 < DL <sub>50</sub> ≤ 2000	2000 < DL <sub>50</sub> ≤ 5000	DL <sub>50</sub> > 5000

**Tabela 2** - Lista das 35 substâncias indicadas para a realização da validação do protocolo. Fonte: Test Method Evaluation Report, (ICCVAM, 2006b).

Reference Substance	CASRN	Rodent Oral LD <sub>50</sub> <sup>1</sup>		3T3 IC <sub>50</sub> <sup>2</sup>		NHK IC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	
		mg/kg	mmole/kg	µg/mL	mM	µg/mL	mM
<b>LD<sub>50</sub> ≤ 5 mg/kg</b>							
Mercury II chloride	7487-94-7	1	0.0037	4.122	0.0152	5.796	0.0213
Triethylenemelamine	51-18-3	1	0.0049	0.2722	0.0013	1.853	0.0091
Cycloheximide	66-81-9	2	0.0071	0.1874	0.0007	0.0734	0.0003
Busulfan	55-98-1	2	0.0081	77.68	0.3154	260.1	1.056
Phenylthiourea	103-85-5	3	0.0197	78.98	0.5189	336.3	2.210
<b>5 &lt; LD<sub>50</sub> ≤ 50 mg/kg</b>							
Dichlorvos	62-73-7	17	0.0769	17.74	0.0803	10.69	0.0484
Digoxin	20830-75-5	18	0.0230	445.5	0.5705	0.0010	0.000001
Sodium arsenite	7784-46-5	41	0.3156	0.7587	0.0058	0.4766	0.0037
Triphenyltin hydroxide	76-87-9	44	0.1199	0.0172	0.00005	0.0101	0.00003
Sodium dichromate dihydrate	7789-12-0	50	0.1908	0.5867	0.0020	0.7117	0.0024
<b>50 &lt; LD<sub>50</sub> ≤ 300 mg/kg</b>							
Hexachlorophene	70-30-4	61	0.1499	4.195	0.0103	0.0289	0.00007
Cadmium II chloride	10108-64-2	88	0.4801	0.5177	0.00280	1.797	0.0098
Sodium oxalate	62-76-0	155	1.160	37.14	0.2772	339.4	2.533
Sodium fluoride	7681-49-4	180	4.290	78.02	1.858	48.90	1.164
Diquat dibromide monohydrate	6385-62-2	231	0.6714	8.040	0.0222	4.333	0.0120
<b>300 &lt; LD<sub>50</sub> ≤ 2000 mg/kg</b>							
Amitriptyline HCl	549-18-8	361	1.150	7.054	0.0225	8.959	0.0286
Propranolol HCl	3506-09-0	470	1.589	14.11	0.0477	36.20	0.1224
Atropine sulfate monohydrate	5908-99-6	639	0.9204	76.03	0.1094	81.83	0.1178
Acetylsalicylic acid	50-78-2	1000	5.549	676.4	3.754	605.5	3.360
Carbamazepine	298-46-4	1957	8.282	103.2	0.4367	83.24	0.3523

**Tabela 3** - Continuação da lista das 35 substâncias indicadas para a realização da validação do protocolo. Fonte: Test Method Evaluation Report (ICCVAM, 2006b).

Reference Substance	CASRN	Rodent Oral LD <sub>50</sub> <sup>1</sup>		3T3 IC <sub>50</sub> <sup>2</sup>		NHK IC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	
		mg/kg	mmole/kg	µg/mL	mM	µg/mL	mM
<b>2000 &lt; LD<sub>50</sub> ≤ 5000 mg/kg</b>							
Acetaminophen	103-90-2	2404	15.90	47.66	0.3152	518.0	3.426
Potassium chloride	7447-40-7	2602	34.90	3555	47.68	2237	30.01
Chloramphenicol	56-75-7	3393	10.50	130.2	0.4029	345.0	1.068
Lactic acid	50-21-5	3730	41.41	3044	33.79	1304	14.48
Trichloroacetic acid	76-03-9	4999	30.59	901.8	5.519	413.3	2.529
<b>LD<sub>50</sub> &gt; 5000 mg/kg</b>							
Ethylene glycol	107-21-1	8567	138.0	24435	393.6	42097	678.1
Gibberellic acid	77-06-5	6305	18.20	7810	22.55	2856	8.246
Sodium hypochlorite	7681-52-9	10328 <sup>3</sup>	138.7 <sup>3</sup>	1040	13.97	1502	20.18
Dibutyl phthalate	84-74-2	11998	43.11	43.37	0.1558	28.69	0.1031
Glycerol	56-81-5	12691	137.8	24345	264.4	24730	268.5
<b>Secondary Subset</b>							
<b>Precipitating Substances<sup>4</sup></b>							
<b>LD<sub>50</sub> ≤ 5 mg/kg</b>							
Arsenic trioxide	1327-53-3	20	0.1000	2.072	0.0105	6.840	0.0346
Parathion	56-38-2	2	0.0069	37.42	0.1285	30.26	0.1039
<b>Volatile Substances<sup>5</sup></b>							
<b>300 &lt; LD<sub>50</sub> ≤ 2000 mg/kg</b>							
Phenol	108-95-2	414	4.400	66.32	0.7047	75.03	0.7972
<b>LD<sub>50</sub> &gt; 5000 mg/kg</b>							
Ethanol	64-17-5	14008	304.15	6523	141.6	10018	217.5
2-Propanol	67-63-0	5843	97.21	3489	58.04	5364	89.24

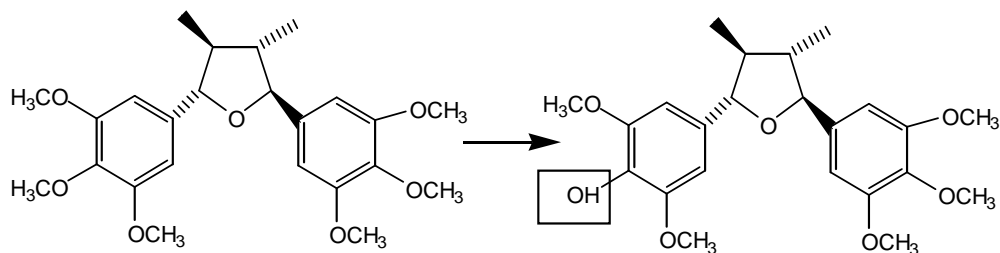
## 3.2. Grandisina

A grandisina foi isolada de extratos das folhas da espécie *Piper solmsianum* descrita pela primeira vez por Martins et al., (2000).

### 3.2.1. Obtenção e Extração do Metabólito (4-O-demetilgrandisina)

Para avaliar a capacidade em metabolizar a grandisina foi realizada uma triagem com cinco cepas de fungos filamentosos da ordem Mucorales pertencentes ao LaBioCon (M6, M8, M16, M18 e M20). Em paralelo nosso grupo realizou uma pesquisa dos possíveis metabólitos formados após a administração oral da solução de grandisina em camundongos. Foi observado que todas as cepas estudadas foram capazes de bioconverter a grandisina no período de 24 a 96 h, mantendo temperatura constante de 27°C e rotação de 200 rpm, em quantidade variável de metabólitos, sendo que a cepa LaBioCon M8 foi capaz de produzir um metabólito com perfil cromatográfico semelhante ao observado nas análises do soro dos camundongos nos intervalos de 30', 60', 180', 360' e 540' após a administração da solução. No processo de metabolização, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a grandisina perdeu uma metila no carbono 4 (Fig.: 3) dando origem a seu metabólito majoritário (4-O-demetilgrandinina). Os métodos de análise utilizados para o monitoramento da formação de metabólitos foram CLAE e CCD para ambas as análises.

*Cunninghamella echinulata* (ATCC 9244) foi cultivada por 70 h em dez Erlenmeyers com 100mL de meio de cultura (ASHA e VIDYAVATHI, 2009). Grandisina (50 mg) foi solubilizada em etanol (1 mL) e foi incubada em temperatura de 27°C em agitador orbital (200 rpm) durante 72 h. Após período de incubação a mistura e a massa resultante foram filtrados com acetona resultando em um óleo marron viscoso (300mg). O metabólito (pó branco) foi obtido pela cristalização em acetona : ciclohexano.



**Figura 4.** Estrutura química da grandisina e 4-O-demetilgrandisina.

### 3.3. Preparo das amostras teste: grandisina e metabólito

A grandisina e o seu metabólito majoritário são os objetos do nosso estudo final. A grandisina (P.M.: 432,214) foi cedida pelo Prof. Dr. Massuo Kato do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O metabólito da grandisina (P.M.: 418,214) foi obtido por processo biotecnológico por bioconversão por fungos no Laboratório de Bioconversão da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás coordenado pela Profa. Dra. Valéria Oliveira.

A grandisina é uma substância insolúvel em água. Foram realizados testes de solubilidade com as mais diversas substâncias compatíveis com o nosso sistema-teste (células), mas nenhum foi satisfatório, uma vez que sempre havia formação de precipitado quando era adicionado veículo aquoso. A solução encontrada para a exposição da grandisina e seu metabólito às células foi o preparo de uma emulsão. Para o preparo da emulsão, a grandisina e seu metabólito foram solubilizados individualmente em clorofórmio, adicionou-se um tenso ativo biológico (fosfatidilcolina) e óleo de girassol. Depois de homogeneizada esta mistura foi levada para evaporação do clorofórmio em nitrogênio líquido. Após a eliminação do clorofórmio, a emulsão foi formada adicionando água ultra-pura sob agitação mecânica. Em seguida, a emulsão passou por um processo de diminuição das gotículas de óleo em equipamento de ultrassom Ti-probe por 15 minutos. A diminuição das gotículas de óleo se faz necessária uma vez que as mesmas em seu tamanho original são maiores que 0,22  $\mu\text{m}$  e impedem o processo de microfiltração para garantir a esterilidade das amostras. O veículo da grandisina e metabólito (emulsão) foram testados em cultura para garantir a inocuidade perante as células.

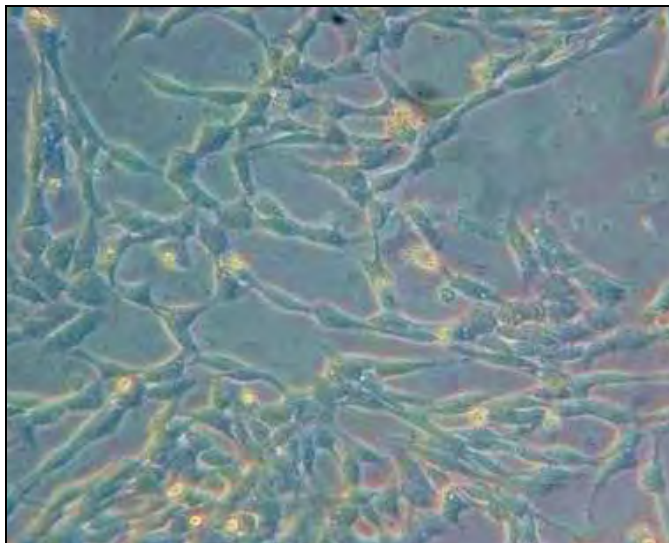


A grandisina e o metabólito foram preparados individualmente na forma de emulsão e as células foram expostas em 8 concentrações: 2,31  $\mu\text{mol/mL}$ ; 1,16  $\mu\text{mol/mL}$ ; 0,58  $\mu\text{mol/mL}$ ; 0,29  $\mu\text{mol/mL}$ ; 0,14  $\mu\text{mol/mL}$ ; 0,07  $\mu\text{mol/mL}$ ; 0,04  $\mu\text{mol/mL}$ ; 0,002  $\mu\text{mol/mL}$ . Os testes foram realizados em sextuplicata (seis repetições de cada concentração) e foram realizados dois experimentos simultâneos (mesmo dia) totalizando doze repetições de cada das 8 concentrações.

### **3.4. Linhagem de fibroblastos de camundongo 3T3-A31**

Para a implantação do protocolo no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular foi utilizada a linhagem de fibroblastos de camundongos Balb/c 3T3-A31 recomendada pela ICCVAM (ICCVAM, 2001; 2006b). A linhagem foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade da São Paulo, São Paulo. Esta é uma linhagem aderente (Fig.: 4) extensamente utilizada em testes toxicológicos e foi desenvolvida em 1963 por George Todaro e Howard Green pesquisadores do departamento de patologia da New York University School of Medicine - New York e recebeu o nome BALB/c 3T3 por ter sido obtida de camundongos da linhagem BALB/c e 3T3 imortalizada por sucessivas transferências durante 3 dias na concentração de  $3 \times 10^5$  (**3**:- 3 dias; **T**:- transfer; **3**:-  $3 \times 10^5$  densidade celular) (TODARO e HOWARD, 1963). Esta foi a linhagem utilizada na validação oficial e é indicada pela ICCVAM (ICCVAM, 2006b).

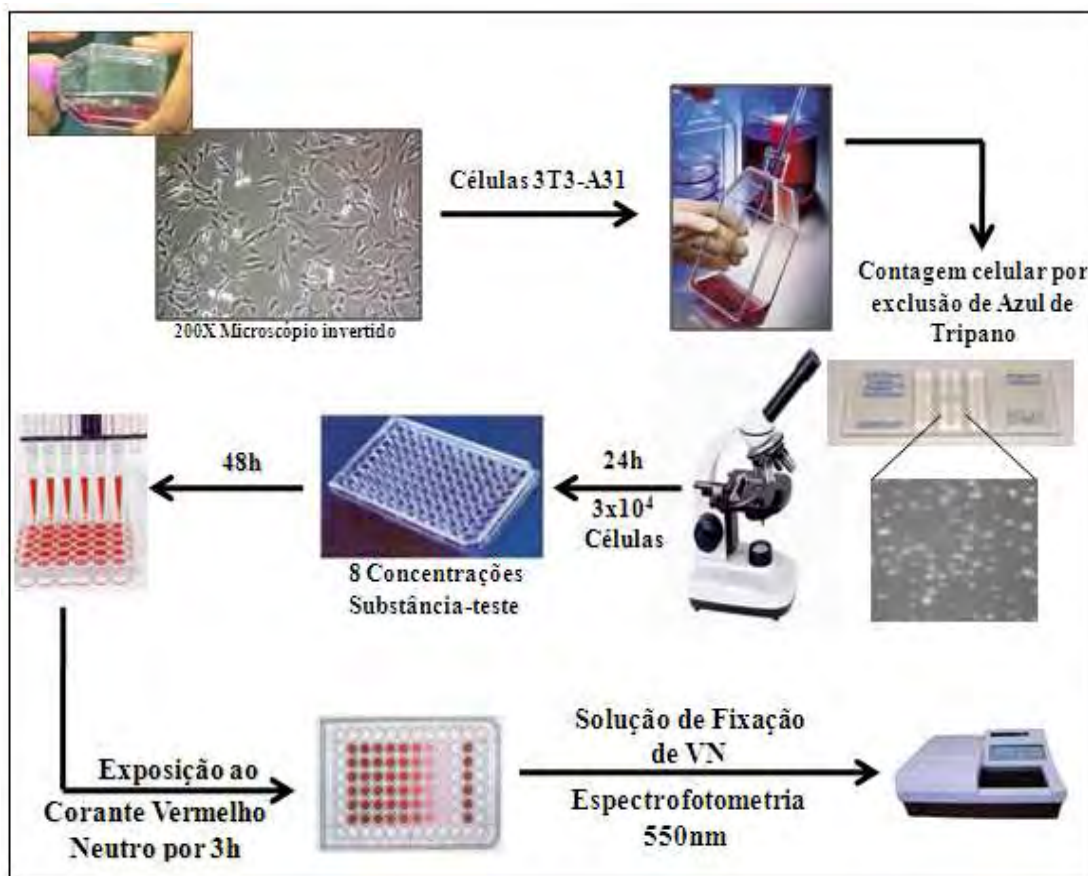
As células foram cultivadas em monocamada (Fig.: 4) em garrafas com meio de cultura Dullbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 100 IU/ml penicilina, 100  $\mu\text{g/ml}$  estreptomicina e 2 mM glutamina. Antes do início do experimento as células foram examinadas em microscópio invertido e qualquer alteração na morfologia ou adesão foi registrada.



**Figura 5.** Células da linhagem aderente Balb/c 3T3-A31 mostrando o crescimento em monocamada. Fotomicrografia em microscópio invertido 200x com filtro. LFTC.

A remoção das células das garrafas de cultura foi feita por desagregação química (tripsinização) com confluência entre 50 e 80%. O meio foi retirado e as células foram lavadas com 15 mL de PBS (phosphate buffered saline) para a remoção do SFB para a atuação da solução de tripsina/EDTA diluídos em PBS (0,0025%:0,02%, respectivamente), uma vez que o SFB inativa a ação desta solução. A solução de lavagem foi descartada e então foram adicionados 3 mL da solução de tripsina/EDTA por aproximadamente 30 segundos para a desagregação das células da garrafa de cultura. O excesso de tripsina/EDTA foi descartado e a garrafa foi cuidadosamente agitada para a total desagregação das células.

Após a desagregação química das células foi adicionado 1 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB para a inativação da tripsina/EDTA e para obtenção de uma solução homogênea de células foi realizada desagregação mecânica com pipetadora automática antes da contagem. Uma amostra de 20 $\mu$ L foi retirada para a contagem visual em câmara de newbauer pela técnica de exclusão pelo corante azul de tripano verificando assim a viabilidade (Fig.: 5).



**Figura 6.** Esquema de plaquetagem das células 3T3-A31 para realização do procedimento de citotoxicidade pelo método de captação do corante vermelho neutro.

No dia anterior ao início do teste o meio das células era substituído por um meio novo. O início do teste se dava com a desagregação das células pela técnica de tripsinização descrita no parágrafo anterior. Uma suspensão de células na concentração de  $3 \times 10^4$  cels/mL de DMEM suplementado com 10% SBF era preparada e 100  $\mu$ L desta suspensão eram dispensados em cada poço da placa de 96 poços, com exceção dos poços periféricos que recebiam os mesmos 100  $\mu$ L, mas apenas DMEM suplementado 10% SBF, sem células. Nesta técnica os poços periféricos não são utilizados para exposição às substâncias uma vez que os mesmos sofrem perda de líquido. Os mesmos poços servem como uma fonte extra de umidade aos poços com o sistema-teste (células) além de servirem como branco ao final do teste. VCb são poços brancos: apenas meio de cultura

suplementado com SFB 10% (WORKSHOP ON PRACTICAL METHODS IN *IN VITRO* TOXICOLOGY, 2007). Os poços C<sub>x</sub>b são poços brancos com meio de cultura suplementada com SFB 10% e a substância-teste (Figura 6).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	VCb	VCb	C <sub>1</sub> b	C <sub>2</sub> b	C <sub>3</sub> b	C <sub>4</sub> b	C <sub>5</sub> b	C <sub>6</sub> b	C <sub>7</sub> b	C <sub>8</sub> b	VCb	VCb
B	VCb											VCb
C	VCb											VCb
D	VCb											VCb
E	VCb											VCb
F	VCb											VCb
G	VCb											VCb
H	VCb	VCb	C <sub>1</sub> b	C <sub>2</sub> b	C <sub>3</sub> b	C <sub>4</sub> b	C <sub>5</sub> b	C <sub>6</sub> b	C <sub>7</sub> b	C <sub>8</sub> b	VCb	VCb

**Figura 7.** Esquema da placa de 96 poços demonstrando os poços brancos (VCb e C<sub>x</sub>b) sem células (ICCVAM, 2006b modificado).

O sistema-teste permaneceu na placa por 24h ± 2 em estufa de cultura celular em ambiente controlado: 37°C ±1; 90% ±10 de umidade; 5,0%±1.0 CO<sub>2</sub>/ar, esse período de incubação de 24h tem o objetivo de assegurar a recuperação das propriedades basais das células, sua aderência e atingir a fase de crescimento exponencial chegando a menos de 50% de confluência no poço quando expostas às substâncias. Cada poço foi examinado em microscópio invertido para a identificação de qualquer erro no experimento em relação ao número de células e na confluência.

### 3.5. Exposição das substâncias-teste às células 3T3

As amostras das substâncias-teste foram diluídas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sem soro fetal bovino. Os compostos foram testados em oito concentrações (C1-C8) em diluições seriadas. As soluções foram preparadas no dia anterior da exposição às células.

Após 24 h  $\pm$  2 o meio de cultura foi retirado por inversão da placa em ambiente estéril (fluxo laminar) o que restava de meio nas placas foi gentilmente retirado batendo a placa contra papel toalha estéril garantindo mínimo dano à monocamada de células formada na placa. Imediatamente eram adicionados 50  $\mu$ L de DMEM pré-aquecido em banho-maria a 37°C em todos os poços, incluindo os brancos. Eram então adicionados 50  $\mu$ L da solução das substâncias-teste previamente preparadas no dia anterior nas 8 concentrações com exceção do controle e do branco os quais recebiam mais 50  $\mu$ L de DMEM suplementado com 10% SFB, de forma que o volume de 100  $\mu$ L em cada poço era mantido. O teste foi feito em sextuplicata (seis valores individuais) para cada concentração, sendo o controle negativo (VC1 e VC2) duplicado, tendo doze valores individuais (Figura 7).

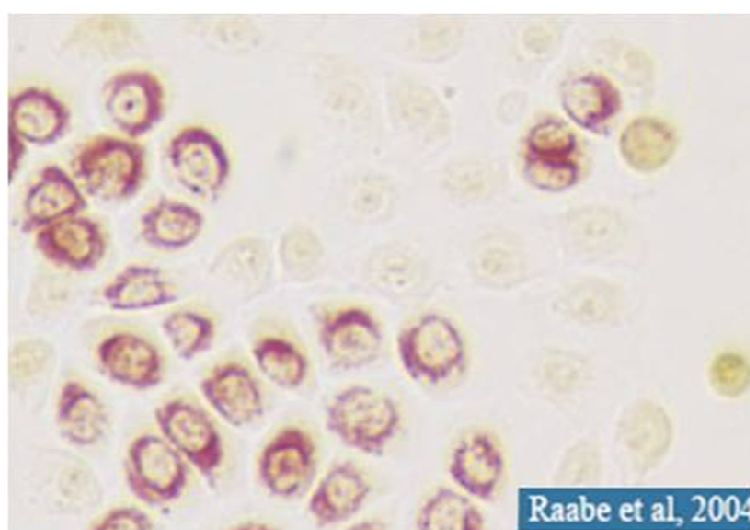
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		VC1	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	VC2	
C		VC1	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	VC2	
D		VC1	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	VC2	
E		VC1	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	VC2	
F		VC1	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	VC2	
G		VC1	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	VC2	
H												

**Figura 8.** Esquema da placa de 96 poços demonstrando os poços controle (VC1 e VC2) e as 8 concentrações (C<sub>1-8</sub>) em sextuplicata (ICCVAM, 2006b modificado).

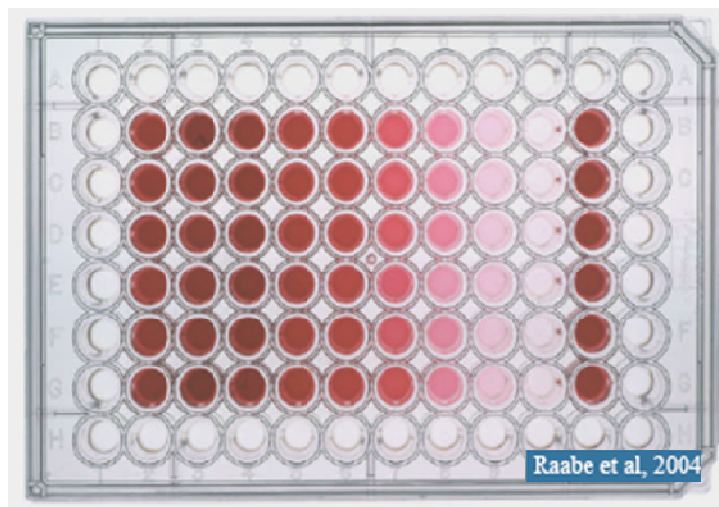
A exposição da substância-teste às células foi feita sempre da menor concentração (C1) para a maior (C8). As células já expostas às substâncias foram incubadas por 48 h  $\pm$ 0,5 em ambiente controlado em estufa de cultura celular: 37°C  $\pm$ 1; 90% $\pm$ 10 umidade; 5,0% $\pm$ 1,0 CO<sub>2</sub>/ar. Após 46 h de exposição às substâncias-teste as células foram examinadas em microscópio invertido para a avaliação da morfologia celular e viabilidade do teste. Comparando a placa como um todo: controle e as 8 concentrações.

### **3.6. Teste de citotoxicidade baseado na captação do corante vermelho neutro**

O teste de captação do corante vermelho neutro é um procedimento de avaliação da sobrevivência e viabilidade celular (Fig.: 8 B) e foi realizado de acordo com o protocolo Borenfreund e Puerner (1984) modificado pelo NICEATM durante a validação do experimento (ICCVAM, 2001; 2006b). Os fibroblastos de camundongos Balb/c 3T3 foram semeados em uma densidade de  $3 \times 10^4$  cels/mL de DMEM suplementado com 10% SFB em placas de 96 poços. Após 24 h, as mesmas foram expostas às oito concentrações das substâncias-teste diluídas em DMEM em sextuplicata (seis repetições por concentração) por 48 h. Sendo o grupo controle exposto apenas ao DMEM 10% SFB. As soluções foram removidas por inversão da placa após 48 h de exposição e as células foram lavadas com 250  $\mu$ l de PBS/poço e então as células foram expostas a 250  $\mu$ l em uma concentração de 25  $\mu$ g/ml de meio vermelho neutro em todos os poços, incluindo brancos e incubados por 3 h  $\pm$ 0,1 em estufa de cultura celular com ambiente controlado: 37°C  $\pm$ 1, 90%  $\pm$ 10 umidade, 5%  $\pm$ 1 CO<sub>2</sub>/ar. O meio vermelho neutro foi preparado no dia da exposição a partir de uma solução de vermelho neutro concentrada. Após 2h da exposição era feita uma monitoração para avaliar a formação de cristais e a viabilidade do teste (Fig.: 8 A). Após 3h de exposição ao corante vermelho neutro o meio foi removido dos poços por inversão e cuidadosamente as células foram lavadas com 250  $\mu$ l de PBS pré-aquecido. O PBS foi então removido por inversão da placa e adicionado 100  $\mu$ l de solução de fixação do vermelho neutro (1% ácido acético: 50% EtOH : 49% H<sub>2</sub>O deionizada) em todos os poços incluindo os brancos. As placas passaram por agitação mecânica por no mínimo 20 minutos em equipamento apropriado para a obtenção de uma solução homogênea para ser analisada por espectrofotometria em comprimento de onda de 550 nm (Fig.:9).



**Figura 9.** Imagem em maior aumento mostrando a captação do corante vermelho neutro pelas células viáveis. As células translúcidas são as que sofreram danos pela exposição ao xenobiótico se tornando incapazes de absorver o corante (Cortesia Raabe et al., IIVS-USA).



**Figura 10.** Placa 96 poços após adição da solução de fixação do vermelho neutro e homogeneização mostrando a captação do corante vermelho neutro. Poços periféricos (linhas A e H; colunas 1 e 11) sem células. Os poços das colunas 2 e 11 são os controle em sextuplicata (12 repetições) não expostos à substância-teste; colunas 3 a 10 são os poços-testes com 8 concentrações sendo a coluna 3 a menor concentração da droga: maior viabilidade celular, maior captação do corante; coluna 10: maior concentração da droga, menor viabilidade celular, menor captação do vermelho do corante. (Cortesia Raabe et al., IIVS-USA).

A viabilidade celular foi medida a partir do controle e os brancos foram usados como referência para descontar o desvio de luz do material da placa e da solução de fixação, ficando assim a análise apenas do corante captado pelas células viáveis.

A técnica do corante vermelho neutro é baseada na habilidade das células viáveis de incorporar e se ligar ao corante. 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. Alterações na membrana plasmática e/ou na membrana dos lisossomos por ação de xenobióticos resultam na diminuição da captação e ligação do vermelho neutro aos sítios aniônicos lisossomais. Sendo assim possível a distinção entre células viáveis e não viáveis.



### 3.7. Análise Estatística

#### 3.7.1. Análise de Regressão Linear

A análise de regressão linear é um método estatístico que compara duas variáveis que possuem correlação entre si. A partir de uma variável é possível prever o valor da segunda com melhor acurácia do que pela simples sorte (Equação 1). Uma vez que os termos “regressão” e “estimativa” são sinônimos chamamos a linha resultante dos dados como linha de regressão (HALLE, 2003). Partindo deste pressuposto a proposta do método de RC é que a partir de valores de IC<sub>50</sub> consigamos encontrar valores de DL<sub>50</sub> (Equações 3 e 4).

A equação de regressão linear segue a estrutura abaixo:

$$y = a + b * x \quad (3)$$

A equação de regressão linear do RC utiliza a IC<sub>50</sub> como a variável conhecida para encontrar a desejada DL<sub>50</sub>.

$$\log DL_{50} = a + b * \log de IC_{50} \quad (4)$$

A média geométrica dos valores de IC<sub>50</sub> é a mais apropriada para o cálculo da média IC<sub>50</sub> e para tanto os valores precisam ser transformados em logaritmos (HALLE, 2003). As linhas de regressão linear devem ser no mínimo paralelas para mostrar que há uma correlação positiva entre os valores do RC e dos valores encontrados (HALLE, 2003).

Tanto para a análise da viabilidade celular quanto para a correlação entre IC<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub> foi utilizado o *Microsoft Office Excell 2007*<sup>®</sup>.

## **4. ARTIGO**

---



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ASHA, S., VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* – A microbial model for drug metabolism studies – A review. *Biotechnology Advances* vol. 27, p. 6–29, 2009.

AYRES, D.C.; LOIKE, J.D. *Lignans Chemical Biological and Clinical Properties*. Cambridge University Press, Cambridge, 1990.

BAUMANS, V. International Course on Laboratory Animals, FELASA Cat. C, Salvador-BA, Brasil, jun. 2006.

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

BORENFREUND, E., PUERNER, J., A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/ NR-90). **Journal of Tissue Culture Methods**. v. 9, p. 7–9, 1984.

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

DESBÈNE, S.; RENAULT, S. Anti-Cancer Agents. **Curr. Med. Chem.** n. 2, p. 71-90, 2002.

EISENBRAND G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, 40, 193-236, 2002.

EKWALL, B. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. **Annals of the New York Academy of Science** 407, 64–77. 1983.

EPA. About EPA. Disponível em: <<http://www.epa.gov/epahome/aboutepa>>. Acesso em 18 Nov. 2008.

EUROPEAN CENTRE FOR THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS-ECVAM. About ECVAM. Disponível em <<http://ecvam.jrc.it/>>. Acesso em 25 de set. 2007.

GALLO, M.A. History and Scope of Toxicology. In: KLAASSEN, C.D. *Casarett Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 6<sup>th</sup> edition, New York, Pergamon Press, 2001, chapter 1.

GORDALIZA, M.P.A., GARCÍA, J.M., CORRAL, M., CASTRO M.A., GÓMEZ-ZURITA, M.A. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. **Toxicol.** n. 44, p. 441-459, 2004.

GUBBELS-VAN HAL, W.M.L.G.; BLAAUBOER, B.J.; BARENTESEN, H.M.; HOITINK, M.A.; MEERTS, I.A.T.M.; HOEVEN, J.C.M. An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** n.42, p.284-295, 2005.

HALLE, W. The Registry of Cytotoxicity Testing in Cell Cultures to Predict Acute Toxicity (LD50) and to Reduce Testing in Animals. **ATLA** n.31, p.89-198, 2003.

ICCVAM. *Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity*. NIH Publication No. 01-4500. Research Triangle Park, NC: National Institute for Environmental Health Sciences, 2001. Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/> Acesso em 15 abr. 2006.

ICCVAM. Background Review Document (BRD): *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<sup>a</sup>. Disponível em: <<http://iccvam.niehs.nih.gov/> Acesso 20 jan. 2007>.

ICCVAM. 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<sup>b</sup>. Disponível em: <<http://iccvam.niehs.nih.gov/>>. Acesso 20 jan. 2007>.

JUNIOR, A.R. O primeiro a utilizar anestesia em cirurgia não foi um dentista. Foi o médico Crawford Williamson Long. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. Campinas, v. 56, n. 3, p. 304-324, mai-jun, 2006.

KINSNER-OVASKAINEN, A., RZEPKA, R., RUDOWSKI, R., COECKE, S., COLE, T., PRIETO, P. Acutoxbase, an innovative database for in vitro acute toxicity studies. **Toxicology In Vitro**. 23, 476-485, 2009.

LERNDAL, T.; SVENSSON, B. A clinical study of CPH 82 vs. methotrexate in early rheumatoid arthritis. **Rheumatology**. n. 39, p. 316-320, 2000.

LESSIGIARSKA, I. et al. Quantitative structure-activity-activity and quantitative structure-activity investigations of human and rodent toxicity. **Chemosphere**, n.65, p.1878-1887, 2006.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology. **Toxicology Letters**, n.127, p.127-134, 2002.

LILIENBLUM, W. DEKANT, W. FOTH, H. GEBEL, T. HENGSTLER, J.G. KAHL, R. KRAMER, P.-J. SCHWEINFURTH, H. WOLLIN, K.-M. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). **Arch Toxicol**. 82:211-236, 2008.

MANUEL, D. Marshall Hall: Vivisection and the development of experimental physiology. In **Vivisection in historical perspective**. Rupke. London: Croom Helm, 1770–1857. 1987.

MARTINS, R.C.C; LATORRE, L.R.; SARTORELLI, P.; KATO, M.J. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, n.55, p.843-846, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Toxicity Testing In the 21<sup>st</sup> Century: A vision and a Strategy*. The National Academies Press, Washington, DC, 2007.

NATIONAL TOXICOLOGICAL PROGRAM (NTP). *Test method protocol for the BALB/c 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Test*. Research Triangle Park, NC, 2003.

NAVARRO, E.; ALONSO, S.J.; ALONSO, P.J.; TRUJILLO, J.; JORGE, E.; PEREZ, C. Pharmacological Effects of Elenoside, an Arylnaphthalene Lignan. **Biol. Pharm. Bull.** n.24(3), p. 245-258, 2001.

NIHEI, K.-I. et al. Synthesis of trypanocidal tetrahydrofuran lignans. **ARKIVOC**, v.1, p.112-126, 2004.

O'BRIEN, K,L. et al. Epidemic of pediatric deaths from acute renal failure caused by diethylene glycol poisoning. **JAMA**. 279(15), p.1175-1180, 1998.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *About OECD*. Disponível em: <<http://www.oecd.org/pages/>>, acesso em outubro de 2007.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 401. Acute Oral Toxicity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 1987.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 420. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure-DF. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method-ATC. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 425. Acute Oral Toxicity-Modified Up and Down Procedure-UDP. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

POOLI-ZOBEL, B.L., et al. Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 24, 23–45, 1994.

POPIOLKIEWICZ, J.; POLKWSKI, K.; SKIERSKI, J.S.; MAZUREK, A.P. In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-geistein glycosides. **Cancer Letters**. n.229, p. 67-75, 2005.

PURCHASE, I.F.H. Prospects for Reduction and Replacement Alternatives in Regulatory Toxicology. **Toxicology In Vitro**. 11, 313-319, 1997.

QI, Y.; LIAO, F.; ZHAO, C.; LIN, Y.; ZUO, M. Cytotoxicity, apoptosis induction, and mitotic arrest by a novel podophyllotoxin glucoside, 4DPG, in tumor cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, n. 26 (8), p.1000-1008, 2005.

Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances (REACH). Disponível em <<http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach>>. Acesso em: out. 2008.

RONALD, B. Silent Spring at 40: Rachel Carson's classic is not aging well. **Reason Magazine**. 2002. Disponível em: <<http://www.reason.com/news/show/34823.html>> Acesso em 15 nov. 2008.

SCHLEDE, E.; GENSCHOW, E.; SPIELMANN, H.; STROPP, G.; KAYSER, D. Oral acute toxic class method: A successful alternative to the oral LD<sub>50</sub> test. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. n.42, p.15-23, 2005.

SPIELMANN, H.; GRUNE, B.; LIEBSCH, M.; SEILER, A.; VOGEL, R. Successful validation of in vitro methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for Alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). **Experimental and Toxicologic Pathology**. 60, 225-233, 2008.

SPIELMANN, H. et al. 13<sup>th</sup> Meeting of the Scientific Group on Methodologies for the Safety Evaluation of Chemicals (SGOMSEC): Alternative Testing Methodologies for Organ Toxicity. **Environmental Health Perspectives**. v. 106 Suppl:2. p. 427-439, 1998.

SPIELMANN, H.; LIEBSCH, M. Validation Successes: Chemicals. **ATLA**. n.30, Supp. 2, p.33-40, 2002.

STITZEL, K.A.; SPIELMANN, H.; GRIFFIN, G. The International Symposium on Regulatory Testing and Animal Welfare: Recommendations on Best Scientific Practices for Acute Systemic Toxicity Testing. **ILAR Journal**. v.43, p.108-111, 2002.

STOKES, W. et al. Validation Study to Evaluate the Usefulness of Two Cytotoxicity Methods for Estimating Acute Systemic Toxicity. **In Vitro Cytotoxicity Validation Study Design**. dez, 2003.

TEMPORÃO, J.G; GADELHA, C.G. A saúde em novo modelo de desenvolvimento. **Folha de São Paulo**, Brasil, 27/05/2007. Disponível em:

< <http://www.globoonliners.com.br/icox.php>>. Acesso em: 15 out. 2007.

TODARO, G.J.; HOWARD, G.M.D. Quatitative Studies of the Growth of Mouse Embryo Cells in Culture and their Development into Established Lines. **The Journal of Cell Biology**, Volume 17, 1963.

UKELIS, U.; KRAMER, P-J.; OLEJNICZAK, K.; MUELLER, S.O. Replacement of in vivo acute oral toxicity studies by in vitro cytotoxicity methods: Opportunities, limits and regulatory status. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 51, 108–118, 2008.

WORKSHOP ON PRACTICAL METHODS IN *IN VITRO* TOXICOLOGY, 3. Institute for In Vitro Sciences, Inc. Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos, 2007.

WORTH, A.; BALLS, M. Alternative (Non-animal) Methods for Chemical Testing: Current Status and Future Prospects. Chapter 4: Acute Lethal Toxicity. **ATLA** 30, Supp. 1, p.27-33, 2002a.

ZACCHINO, S. et al. In vitro evaluation of antifungal properties of 8.O.4'-neolignans. **Journal Natural Products**. v.60, n 7. p. 659-562, 1997.

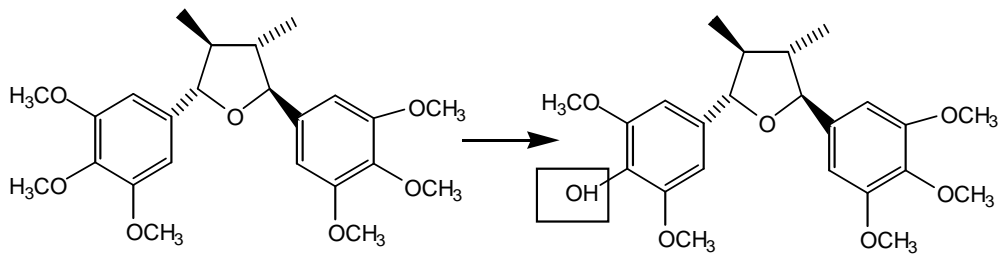
ZUCCO, F.; ANGELIS I. DE; TESTAI, E.; STAMMAT, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in Vitro**. 18, 153-163. 2004



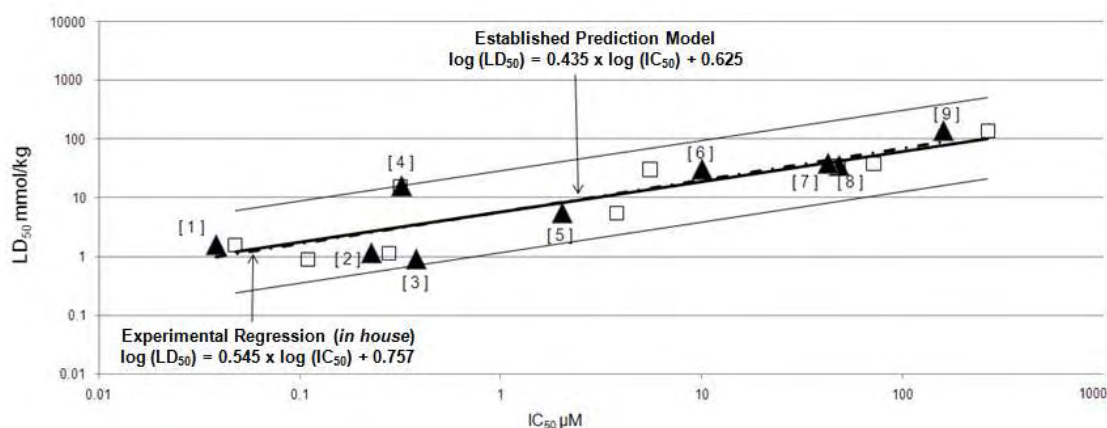
# 6.ANEXO

---

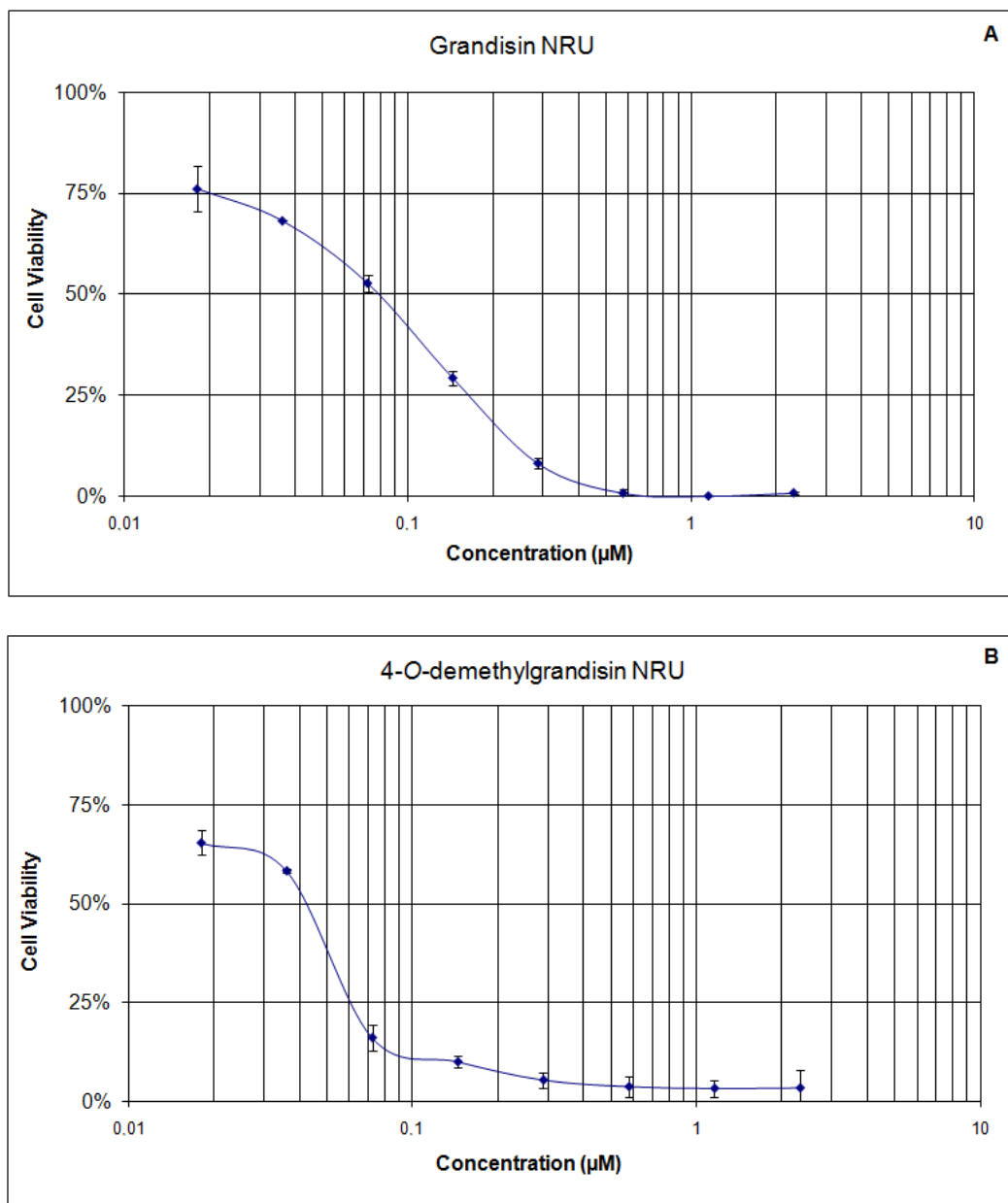
## 6.1. Figuras do artigo



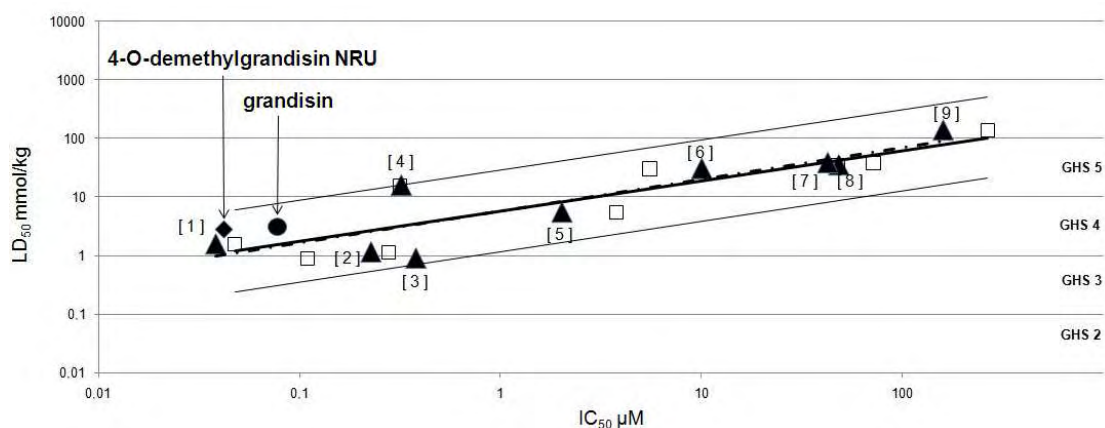
**Fig. 1.** Grandisin and its major metabolite, 4-O-demethylgrandisin.



**Fig. 2.** Plot of  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) values for reference chemicals: [1] propranolol HCl; [2] sodium oxalate; [3] atropine sulfate monohydrate; [4] acetaminophen; [5] acetylsalicylic acid; [6] trichloroacetic acid; [7] dimethylformamide; [8]; potassium chloride [9] glycerol obtained in 3T3 NRU assay *versus* acute rat oral  $LD_{50}$  values (mmol/kg) compared with the prediction model for acute rodent toxicity based in registry of cytotoxicity. The  $IC_{50}$  were obtained in 3T3 NRU assay *versus* acute rat oral  $LD_{50}$  values (mmol/kg) compared with the prediction model for acute rodent toxicity based in registry of cytotoxicity. Balb/c 3T3-A31 cells were exposed to test materials for 48 h. 3T3 NRU assay was used for determination of cell viability. This figure shows the literature-based prediction regression (black bold line)  $\pm$  log 5 interval (black thin lines) and the nine reference chemicals (squares). The new  $IC_{50}/LD_{50}$  points obtained with the 3T3 NRU assay are shown (black triangles) with the new linear regression curve determined from these data (dashed line).



**Fig. 3.** Balb/c 3T3-A31 NRU cytotoxicity assay after 48 h exposure with (A) grandisin and (B) 4-*O*-demethylgrandisin. Both compounds presented cell viability (%) within 12 repetition  $\pm$  SD using 8 concentrations (2.31  $\mu$ M; 1.16  $\mu$ M; 0.58  $\mu$ M; 0.29  $\mu$ M; 0.14  $\mu$ M; 0.07  $\mu$ M; 0.04  $\mu$ M; 0.02  $\mu$ M) after the validation process with nine compounds from registry of cytotoxicity. The  $IC_{50}$  found for the candidates to new drugs were: (A)  $IC_{50}$ = 0.078  $\mu$ M and (B)  $IC_{50}$ = 0.043  $\mu$ M.



**Fig. 4.** Plot of  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) values for reference chemicals: [1] propranolol HCl; [2] sodium oxalate; [3] atropine sulfate monohydrate; [4] acetaminophen; [5] acetylsalicylic acid; [6] trichloroacetic acid; [7] dimethylformamide; [8]; potassium chloride [9] glycerol in comparison with  $LD_{50}$  values of grandisin and 4-O-demethylgrandisin estimated from equation obtained in *in house* validation. The  $IC_{50}$  were obtained in 3T3 NRU assay *versus* acute rat oral  $LD_{50}$  values (mmol/kg) compared with the prediction model for acute rodent toxicity based in registry of cytotoxicity. Balb/c 3T3-A31 cells were exposed to test materials for 48 h. 3T3 NRU assay was used for determination of cell viability. This figure shows the literature-based prediction regression (black bold line)  $\pm$  log 5 interval (black thin lines) and the nine reference chemicals (squares). The new  $IC_{50}/LD_{50}$  points obtained with the 3T3 NRU assay are shown (black triangles) with the new linear regression curve determined from these data (dashed line).

## 6.2. Normas para publicação no periódico *Experimental and Toxicologic Pathology*



## **Experimental and Toxicologic Pathology**

### **Official Journal of the European Society of Toxicologic Pathology ESTP**

**ISSN:** 0940-2993

**Founded:** 1967 by Franz Bolck

**Language:** English

Statistics

**Impact Factor:** 1.431

### **General Information**

The international multidisciplinary journal *Experimental and Toxicologic Pathology* is devoted to the publication of studies covering the whole range of experimental research on disease processes and toxicology including cell biological investigations. Its aim is to support progress in the interdisciplinary cooperation of researchers working in pathobiology, toxicology, and cell biology independent of the methods applied. During the past decades increasing attention has been paid to the importance of toxic influence in the pathogenesis of human and animal diseases. This is why *Experimental and Toxicologic Pathology* meets the urgent need for an interdisciplinary journal felt by a wide variety of experts in medicine and biology, including pathologists, toxicologists, biologists, physicians, veterinary surgeons, pharmacists, and pharmacologists working in academic, industrial or clinical institutions. *Experimental and Toxicologic Pathology* publishes original articles, short communications and reviews.

### **1 Copyright**

Submission of a manuscript implies that the submitted work has not been published before (except as part of a thesis or lecture note or report, or in the form of an abstract); that it is not under consideration for publication elsewhere; that its publication has been approved by all co-authors as well as by the authorities at the institute where the work has been carried out; that written permission of copyright holders is obtained by the authors for material used from other copyrighted sources; that, if and when the manuscript is accepted for publication, the authors

hand over the transferable copyrights of the accepted manuscript to the publisher; and that the manuscript or parts thereof will thus not be published elsewhere in any language without the consent of the copyright holder. Copyrights include, without spatial or timely limitation, the mechanical, electronic and visual reproduction and distribution; electronic storage and retrieval; and all other forms of electronic publication or any other types of publication including all subsidiary rights. If material from other copyrighted works is included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. For more information about authors' rights please see <http://www.elsevier.com/authorsrights>

## **2 Submission of manuscripts**

All manuscripts should be submitted online to <http://ees.elsevier.com/etp>

**The submitted manuscript should fulfill the following requirements:**

### **2.1 General**

Manuscripts should be prepared in the style of the journal and written in concise and grammatically correct US English. Authors should seek assistance if they are not writing in their native language. Incomprehensible papers and those not conforming to the style of the journal will be returned to the authors for revision. Manuscripts should be typewritten double-spaced throughout, with 2.5 cm margins on all sides. All pages should be numbered, including the title page. Manuscripts should not exceed 30 typewritten pages for original articles and 6 typewritten pages for short communications (incl. tables and figure legends). The editors reserve to themselves the right of condensing any paper submitted.

The hardcopy (in duplicate) and the accordant electronic file (on CD-ROM or on floppy disc 1.4 MB) of the latest manuscript version should be sent to the Editorial Office. Text, including italics and bold character formatting, should be provided in Microsoft Word format. The use of SI-units is required. For manuscripts describing studies with experimental animals, the authors must state in a cover letter that all procedures have been performed in accordance with national or local animal welfare legislation. The procedures employed for animal care and handling must be described in "Materials and methods".

### **2.2 Requirements for text**

Manuscripts should be arranged as follows:

Title page, Abstract ending with Keywords, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References, Tables, Figures and Figure legends.



The **Title page** must include the title of paper, names of all authors (first names in full and surnames) and their professional addresses. For the corresponding author a full postal address, phone and fax numbers and an e-mail address is necessary.

The **Abstract** should be limited to 250 words and should summarize the aim of the paper, the results and the principal conclusions. It should be followed by five to ten meaningful **keywords**.

The list of **References** should be arranged in alphabetical order by first author. Use the citation style as shown in the following examples:

Journals:

Kinlen LJ. Epidemiological evidence for an infective basis in childhood leukaemia. *Br J Cancer* 1995;71:1–5.

Books:

Howard CV, Reed MG. Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 1998.

Chapter in an edited book:

Tomatis L. Overview of perinatal and multigeneration carcinogenesis. In: Napalkov NP, Rice JM, Tomatis L, editors. Perinatal and multigeneration carcinogenesis, vol. 96. IARC Science Publications; 1989. pp 1–15.

The authors are responsible for the correctness of the cited literature.

In the text, references should appear as follows:

one author: "...(Kinlen, 1995)",

two authors: "...(Savitz and Chen, 1990)",

more than two authors: "...(Dubrova et al., 1998)".

**Tables** must be numbered sequentially (Arabic numerals), referenced in the text and need a heading.

Tables must be submitted as Microsoft Word files (Tiff or other graphic files are not acceptable).

### **2.3 Requirements for figures**

**Figures** must be numbered sequentially (Arabic numerals) and referenced in the text. **Legends** should be provided on a separate page.

Figures can be provided as hardcopies or (preferably) in electronic format.

All **hardcopy figures** should be clearly numbered with pencil on the back side. They must be provided in camera-ready form, preferably as glossy photographic prints with high contrast, clean computergenerated charts, or sharp photocopies. Original line drawings are acceptable, but poor photocopies are not.

Figures provided as **electronic files** should be saved in TIFF or EPS format (final resolution 300 dpi for halftone images, 1000 dpi for black/white line drawings). Figures should **not** be embedded in the manuscript text. For further information on the preparation of electronic artwork, please see

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Illustrations (after reduction) must be within the limits of the standard printed page (177mm X 224mm; column width: 84.3 mm). The acceptable number of illustrations is an equivalent of 2–3 standard pages. The size of lettering and numerals has to be appropriate to that of the figure, taking into account the necessary reduction in size. The legends for photomicrographs must state the staining method and magnification.

**Color figures:** If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the web (e.g., Science Direct and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced on color in the printed version. Color figures can be printed only if the costs are covered by the author (€550.00 for first color page €350.00 for every following color page). Authors who agreed to pay the production costs for figures to be published in color will automatically receive 50 additional free offprints.

### **3 Proofs and offprints**

A PDF for correction will be sent to the corresponding author. An Acrobat Reader is needed to view and print your article. Together with the PDF you will get a link for downloading the program for free.

Please, note the deadline for corrections: two working days. In exceptional cases you can receive the proofs by fax or mail.

30 offprints of each paper will be provided free of charge. Additional offprints may be purchased. Until publication of the print edition, corrected proofs will be available online ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)) and can be cited with their DOI.