

AGUINALDO PEREIRA DE NADAI

Efeitos toxicogenéticos e apoptóticos do N''-[(1E)-1-(4-metilphenyl) ethylidene]-N'''-[(phenylmethyl) amino] thioxomethyl]- 4-OH-BN-NCS, em camundongos Swiss.

Campo Grande – MS – 2015

AGUINALDO PEREIRA DE NADAI

**Efeitos Toxicogenéticos e apoptóticos do N''-[(1E)-1-(4-metilphenyl)ethylidene]-
N'''-[[(phenylmethyl)amino]thioxomethyl] - 4-OH-BN-NCS, em camundongos Swiss.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Saúde e Desenvolvimento na
Região Centro-Oeste da Universidade Federal
do Mato Grosso do Sul para a obtenção do
título de mestrado.**

Orientador: Prof. Doutor Guido Marks

Co-orientador: Prof. Doutor Rodrigo Juliano de
Oliveira

Campo Grande – MS – 2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Doutor. Guido Marks

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof. Doutor. João Ricardo F. Tognini.

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof. Doutor. Wilson de Barros Cantero

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

DEDICATÓRIA

A Deus por nos guiar, nos dar força e proteção todos os nossos dias.

A minha esposa Maria Inês por compartilhar uma grande história de amor ao longo de todos esses anos de convivência, pelo seu apoio e empenho em todos os momentos e pela dedicada e honrada mãe que desempenha um papel fundamental na educação dos nossos filhos.

Aos meus pais, Pedro e Anézia, pelo seu amor e dedicação na criação dos filhos, por terem se sacrificado para que eu e minha querida irmã Aureli estudássemos, e também nos passando, com os seus exemplos, determinação para enfrentar os desafios na nossa vida, e desempenhar o nosso trabalho sempre com dedicação e ética.

Aos meus filhos Gabriel e Carolina pelo amor incondicional, por ser motivo de força e inspiração para continuar a jornada diária de trabalho e pelos melhores momentos que são o nosso convívio.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Mato Grosso do Sul na pessoa da Reitora Prof^a Doutora Célia Maria da Silva Oliveira.

Ao programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, na pessoa da Sua Coordenadora Prof^a. Doutora Iandara Schettert Silva.

Ao Hospital Universitário da UFMS na pessoa do Diretor Geral Mestre Cláudio Luiz Wanderlei Saab

Ao Laboratório Cetrogen (Centro de estudos em células-tronco terapia celular e genética toxicológica), na pessoa da Coordenadora Clínica, Prof^a. Doutora Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli da Silva e do Coordenador Técnico Prof. Doutor Juliano Rodrigo de Oliveira

Ao meu orientador Prof. Doutor. Guido Marks pela sua amizade, incentivo, disponibilidade, colaboração e paciência na condução da minha pesquisa e pela sua incansável persistência na busca do conhecimento e ineditismo.

Ao Co-orientador Prof. Doutor. Rodrigo Juliano Oliveira, pelos seus conhecimentos e ensinamentos, objetividade e auxílio inestimável na condução deste trabalho.

Aos colaboradores, Camila Santos Suniga Tozatti, Antônio Brandão da Silva Neto, Cláudia Rodrigues Berno, João Renato Pesarini, Denis Pires de Lima, pela importante contribuição para realização deste trabalho.

Ao Prof. Doutor. Ricardo Dutra Aydos pela sua amizade, paciência, colaboração e orientação durante minha passagem pelo programa de Pós-graduação.

Prof. Doutor. Rondon Tosta Ramalho e a Mestre Ana Paula Maluf pelas suas orientações, colaboração e qualificação na realização dessa dissertação.

A técnica do CETROGEN Roseane sempre disposta a nos auxiliar, e a alunas do mestrado Sarah Alencar e Fabrícia Paniago, os meus sinceros agradecimentos pela amabilidade, gentileza e disponibilidade em nos auxiliar e dividir os seus conhecimentos.

.

Epígrafe

“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir”.

Steve Jobs

RESUMO

A classe de compostos denominada semicarbazona e tiosemicarbazonas possui uma vasta gama de propriedades biológicas e por isso é estudada em vários modelos experimentais em busca de propriedades farmacológicas. Uma das atividades biológicas mais relevantes dessa classe é a sua ação citotóxica e antitumoral. Frente ao exposto a presente pesquisa avaliou os efeitos toxicogenéticos e apoptóticos do carbonicdihydrazide, N"-[(1E)-1-(4-metilphenyl)ethylidene]-N"'-[[[(phenylmethyl)amino]thioxomethyl]- (4-OH-BN-NCS) em camundongos Swiss. Foram utilizados 25 animais, dividido em 5 grupos, sendo um grupo controle negativo com veículo, um grupo controle positivo com a ciclofosfamida, e três grupos 4-OH-BN-NCS, com as doses de 25, 50, e 100mg/kg. Os resultados indicaram que o composto é genotóxico, não é mutagênico e possui atividade apoptótica quando os animais foram tratados na dose de 100mg/Kg. Esses fatos permitem considerar que o composto testado, possui efetiva capacidade de causar danos genéticos e apoptose.

Palavras-chave: Tiosemicarbazona, apoptose, testes de mutagenicidade, ensaio cometa, ensaio do micronúcleo, câncer.

ABSTRACT

The class of compounds called semicarbazone and thiosemicarbazone has a wide range of biological properties and is therefore studied in various experimental models in search of pharmacological properties. One of the most relevant biological activities of this class is its cytotoxic and anti-tumor action. With this in mind this study evaluated the effects of genetic toxic and apoptotic carbonicdihydrazide, N "-[(1E)-1-(4-metilphenyl) ethylidene]-N"-[[[(phenylmethyl)amino] thioxomethyl]-(4-OH-BN-NCS) in Swiss mice. Twenty five animals were used and they were divided into five groups, where in one group was negative control with vehicle, one positive control group with cyclophosphamide, and three 4-OH-BN-NCS groups at doses of 25, 50 and 100mg/kg. The results indicated that the compound is genotoxic; it is not mutagenic and has apoptotic activity when animals were treated at a dose of 100mg/kg. These facts support the conclusion that the tested compound has effective capacity to cause genetic damage and apoptosis.

Keywords: Thiosemicarbazone, apoptosis, mutagenicity tests, comet assay, micronuclei assay, cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Danos toxicogenéticos – Valores médios $\pm$ erro padrão da média do tempo da cauda no ensaio do cometa.	28
Figura 2 – Valores médios $\pm$ erro padrão da média da frequência de células micronucleadas no ensaio de micronúcleo.	28
Figura 3 – Valores médios $\pm$ erro padrão da média da frequência de apoptose no fígado.	29
Figura 4 - Valores médios $\pm$ erro padrão da média frequência de apoptose nos rins.	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
CETROGEN	Centro de estudos em células-tronco terapia celular e genética toxicológica
cm	centímetro
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
FDA	Food and Drug Administration
g	grama
G1	primeira fase da interfase do ciclo celular
G2	terceira fase da interfase do ciclo celular
°C	grau célsius
LPM	Baixo ponto de fusão
M	Mol
mM	milimol
mA	mili-ampere
mg	miligrama
ml	mililitro
MN	Micronúcleo
nm	nanômetro
Nacl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
OCDE	Organização de cooperação para o desenvolvimento econômico
p.c.	peso corpóreo

ip	intra-peritonal
pH	potencial hidrogeniónico
4-OH-BN-NCS	N"-[(1E)-1-(4-metilphenyl)ethylidene]-N"'- [[(phenylmethyl)amino]thioxomethyl]
µL	microlitro
Kg	quilograma
RNA	Ácido ribonucleico
RNR	Ribonucleotídeo redutase
S	Fase de síntese da intérfase do ciclo celular
V	volt

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Tiossemicarbazonas	16
2.2 Ensaio biológicos	17
2.2.1 Ensaio do cometa	18
2.2.2. Ensaio do micronúcleo	18
2.2.3. Apoptose	19
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo Geral	22
3.2. Objetivo Específico	22
4.MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Agentes químicos	23
4.1.1. Ciclofosfamida	23
4.1.2. 4-OH-BN-NCS	23
4.2. Animais	23
4.3. Delineamento experimental	24
4.4. Ensaio biológicos	25
4.4.1. Avaliação toxicogenética	25
4.4.1.1. Ensaio do cometa em sangue periférico	25
4.4.1.2. Ensaio do micronúcleo em sangue periférico	25
4.4.2. Avaliação da atividade apoptótica	26
4.4.2.1. Ensaio da apoptose no fígado e rins	26
4.5. Análise estatística	26
5. RESULTADOS	27
5.1. Efeitos toxicogenéticos	27
5.2. Efeitos apoptóticos	29
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÃO	34
8. REFERÊNCIAS	35
9. ANEXOS	44

10. Protocolo do comitê de ética em pesquisa	46
11. CI 41/2013 de 05.09.2013.	47

1. INTRODUÇÃO

Os derivados da classe das semicarbazonas e tiosemicarbazonas tem demonstrado uma potente e seletiva atividade contra múltiplos tipos de câncer, dando suporte para avaliar os seus mecanismos moleculares de ação. Avanços significativos têm sido realizados para entender como esses agentes quelantes não somente modulam o metabolismo celular do ferro, mas também, as múltiplas vias de sinalização implicadas na progressão do tumor e de metástases¹.

Estudos sugerem que o câncer pode ser induzido por eventos genotóxicos e/ou mutagênicos sendo reconhecida uma correlação entre eles. Diversos ensaios biológicos podem ser realizados para prever a interação de carcinógenos químicos com o DNA e suas repercussões na saúde^{2,3,4}, bem como podem ser direcionados para inferir ação quimioterápica de compostos visto que o aumento de lesões no DNA, seguido do aumento da taxa apoptose podem ser uma boa estratégia e mecanismo de ação de um composto com potencial quimioterápico^{5,6,7,8}.

Como o câncer é uma importante questão de saúde pública na atualidade a busca de novos compostos com capacidade de prevenir^{9,10} ou tratar^{11,5,7}, essa doença se tornam cada vez mais importante. Diversos medicamentos anticâncer estão disponíveis no mercado¹². No entanto, a eficiência e a seletividades desses medicamentos ainda não são as ideais^{13,14}. Assim, na corrida pela busca de drogas mais eficientes, mais seletivas, e, portanto, com menos efeitos tóxicos, a área de síntese orgânica tem ganhado cada vez mais atenção^{15,16}, e a estratégia de planejamento de análogos a partir de grupos funcionais descritos pode ser uma boa opção.

Uma das classes de compostos funcionais que se destacam atualmente com atividade anticâncer são as semicarbazonas e as tiosemicarbazonas. Essas podem agir como compostos anticâncer principalmente porque tem a capacidade de interagir com o DNA e ou inibir a sua síntese. Além disso, são capazes de agir como inibidores enzimáticos, principalmente pela complexação de metais endógenos ou por meio de reações redox, sendo ainda capazes de mimetizar a ação de outras enzimas^{17,18}.

Além da atividade antitumoral^{19,20} também estão descritas para as semicarbazonas e tiosemicarbazonas as atividades citotóxica^{18,21,22,23,24,25}, antifúngica^{26, 24}, antiparasitária²⁷ e anticonvulsivante^{28,29}.

Estudos atuais tem demonstrado forte interesse na vasta gama de atividades biológicas e no largo espectro de ação dos compostos tiosemicarbazonas, principalmente quanto aos seus efeitos antitumorais³⁰. Diante disso, este experimento se valeu de ensaios biológicos de genotoxicidade, mutagenicidade e apoptose, para descrever os efeitos genotóxicos, mutagênicos e apoptóticos do carbonic dihydrazide, N"-[(1E)-1-(4-metilphenyl) ethylidene]-N'''-[[[(phenylmethyl) amino] thioxomethyl] - (4-OH-BN-NCS), em camundongos Swiss.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Tiossemicarbazonas

Apesar de recentes avanços, o tratamento do câncer permanece ainda não padronizado devido à multiplicidade de tipos de tumor e a sua consequente resistência terapêutica. O ferro é um elemento característico para uma grande variedade de processos metabólicos, incluindo a síntese de DNA e a transdução de energia. Devido à alta capacidade proliferativa a célula cancerígena possui uma demanda metabólica por ferro maior que a célula normal. Deste modo o metabolismo do ferro representa um fator importante para o câncer, que pode ser alvo de ligantes que se vinculam e sequestram o ferro intracelular. De fato os novos agentes quelantes como as tiossemicarbazonas atuam com dupla ação, como se ligar ao ferro intracelular e na produção de reação de oxirredução, demonstrando seletividade e potência tanto *in vivo* quanto *in vitro* em vários tipos de tumores³¹.

Esses compostos possuem ampla versatilidade farmacológica e através de suas especificidades estruturais, podem desempenhar diversas atividades específicas. De modo geral pode-se dizer que tiossemicarbazonas agem, como inibidores de enzimas, através da complexação de metais endógenos, agem através de oxirredução ou através inibição da síntese de DNA, possivelmente pelo bloqueio da enzima ribonucleotídeo difosfato redutase (RNR). Além disso, alguns complexos metálicos desses ligantes apresentam a habilidade de mimetizar a ação de certas enzimas¹⁶.

Além do considerável interesse científico dos compostos tiossemicarbazonas, devido as suas importantes propriedades químicas e biológicas, tais como antitumoral³², antibacteriana³³, antiviral³⁴, antiprotozoária³⁵, citotóxica³⁶, dentre outras. A que vem sendo alvo de amplos estudos é sem dúvida a sua atividade anticâncer¹⁶.

A enzima ribonucleotídeo difosfato redutase (RNR) vem sendo relacionada como um alvo promissor na terapia do câncer^{37,38}. Esta enzima existe em todas as células vivas e apresenta função catalizadora na síntese dos desoxiribonucleotídeos, necessários para síntese do DNA^{39,40}. Portanto os Inibidores desta enzima são extremamente efetivos em bloquear a síntese do DNA, por conta dos baixos níveis de dextrriboncleotídeos^{41,42}.

A gentamicina e a hidroxiuréia são os únicos inibidores desta enzima aprovados pela “Food and Drug Administration (FDA)”, sendo que a hidroxiuréia atua na subunidade R2 da enzima⁴³. A hidroxiuréia, entretanto, é pouco efetiva uma vez que possui pouca afinidade pela RNR e um tempo de meia-vida mais curto no plasma⁴⁴.

Dentre outras substâncias conhecidas por também apresentarem atividade inibitória sobre esta enzima a RNR, estão as tiossemicarbazonas, essas substâncias são 1000 vezes mais potentes que a hidroxiuréia para inibir a ribonucleotídeo difosfato redutase em células da leucemia L-1210⁴⁴. Além disso as moléculas de tiossemicarbazidas apresentam facilidade de síntese devido ao baixo custo dos reagentes de partida e facilidade de manipulação⁴⁵.

A oxirredução do sítio catalítico do ferro no complexo tiossemicarbazona é fundamental para a sua atividade anticâncer, resultando em dano oxidativo e inibição do ribonucleotídeo redutase RNR. Testes *in vivo* mostram que algumas tiossemicarbazonas mostram potencial no tratamento do câncer tanto quantos as drogas quimioterápicas⁴⁶.

2.2. Ensaios Biológicos

Câncer é uma das principais causa de mortalidade humana em todo o mundo⁴⁷. A maioria dos tecidos cancerígenos mostra um complexo número de aberrações cromossômicas^{48,49}. A indução e acúmulo de dano genético pode causar instabilidade genômica e isto é conhecido como um passo crucial para o desenvolvimento do câncer⁵⁰.

Os carcinógenos industriais e outros agentes com potencial genotóxico podem causar a alteração da expressão gênica, ocasionando o crescimento de células anormais e o desarranjo da função normal das células. Estes fenômenos portanto, podem resultar em instabilidade genômica e possível desenvolvimento da carcinogênese⁴⁶.

A avaliação do risco de câncer e dano genético pode ser determinada pelos ensaios de genotoxicidade; incluindo o ensaio do cometa e ensaio do micronúcleo.

Estes ensaios são testes aprovados oficialmente pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), como guidelines, para avaliação de genotoxicidade⁵³.

Deste modo a combinação de ambos os testes *in vivo*, o ensaio do cometa e ensaio do micronúcleo tem sido aplicados com sucesso para avaliação do potencial de genotoxicidade e

mutagenicidade e a possível relação com a carcinogênese. Podendo deste modo serem aplicados em estudos para detecção de potenciais carcinógenos, com consequente prevenção do câncer e desenvolvimento de substâncias visando o seu tratamento⁵¹.

2.2.1. Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa possui uma série de vantagens, por ser um teste rápido, de alta sensibilidade e com flexibilidade de mensurar a capacidade de quebra do filamento do DNA no nível celular⁵².

Foi inicialmente estabelecido por Ostling e Johanson em 1984, tendo sido largamente utilizado para estudar a quebra da cadeia do DNA a nível celular, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O ensaio do cometa é, portanto um biomarcador para detectar suscetibilidade genética e danos do DNA relacionado com a carcinogênese⁵³.

O princípio do ensaio do cometa é realizado pela detecção das quebras de cadeia do DNA que são identificadas como se fossem iguais a cauda de um cometa, formado pelos fragmentos do DNA nas células. Após a lise e a ação de eletroforese, as cargas negativas dos fragmentos de DNA migram para fora da célula em direção ao ânodo, após preparo em lamínas e colocadas em cuba de eletroforese e aparecem na forma de um cometa, sendo visualizadas posteriormente em microscopia de fluorescência⁵⁴.

2.2.2. Ensaio do Micronúcleo

O ensaio do micronúcleo (MN) é um teste para identificação de produtos químicos, que provocam genotoxicidade e mutagenicidade, o qual detecta um fragmento de DNA, ocorrido durante a divisão celular, localizados no citoplasma, envolto em uma pequena membrana nuclear. O testes MN positivos suportam fortes evidências de mutagenicidade sistêmica e resultados negativos suportam a conclusão que não houve mutagenicidade⁵⁵.

Os micronúcleos são formados por pequenos corpos contendo fragmentos cromossômicos, a célula micronucleada. Uma célula que sofreu dano estrutural cromossômico na interfase pode resultar na formação de um fragmento cromatídico, sem centrômero (acêntrico), durante a mitose, a reconstrução da membrana nuclear ao redor do fragmento cromatídico produz um micronúcleo (MN), o qual pode ser identificado na célula filha⁵⁶.

O ensaio do micronúcleo exhibe alta confiabilidade, rapidez de execução e largo espectro de determinação do nível de dano cromossômico (rastreamento da instabilidade cromossômica)⁵⁷.

É um teste rápido e possui facilidade de análise dos dados, utilizando amostras de sangue periférico, com esfregaços em lâminas e após fixação e coloração com alaranjado de acridina é feita a análise por meio de microscopia de fluorescência⁵⁸.

2.2.3. Apoptose

A apoptose celular, ou morte celular programada é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas⁵⁹. Em 1965, foi proposto o termo “morte celular programada” para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental⁵⁷. Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo de morte celular⁵⁸.

A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos⁶⁰.

A apoptose tem características marcantes e coordenadas, é um fenômeno bastante rápido onde ocorre retração da célula com perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, ruptura da membrana das mitocôndrias, condensação da cromatina, desintegração, prolongamento e ruptura da membrana celular, originando estruturas que englobam o conteúdo celular, formando corpos apoptóticos. Estes corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar processo inflamatório⁶¹.

A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular, levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer⁶².

Evidências indicam que uma falha no mecanismo de apoptose pode desencadear o câncer ou doenças autoimunes. Sob muitas condições de estresse, como nas lesões pré-cancerígenas, a ativação dos checkpoints (pontos de checagem) no ciclo celular, para remover

danos do DNA, através da via de ativação da apoptose, pode bloquear a evolução da carcinogênese^{63,64}.

Defeitos na morte celular programada (apoptose), desempenha um importante papel no desenvolvimento dos tumores, permitindo que as células neoplásicas sobrevivam além da sua vida útil, dando tempo para acumulação de alterações genéticas que desregulam a proliferação celular, promovendo a angiogênese e progressão do tumor⁶⁵.

Defeitos nos mecanismos de reparo do DNA, leva a célula ao suicídio programado (apoptose) como um mecanismo de defesa, para erradicação de instabilidade genética celular, portando a falha neste mecanismo de defesa, permite a sobrevivência de células geneticamente instáveis, fornecendo oportunidades para o desenvolvimento do câncer⁶⁶.

A apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência, que requer a interação de inúmeros fatores moleculares e bioquímicos⁶⁷. Os mecanismos moleculares são regulados através da expressão de proteínas anti-apoptóticas como o Bcl-2 e pró apoptóticas como Bax. Estímulos como o dano do DNA, levam ao aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas induzindo, portanto a apoptose⁶⁸.

O início da cascata da via intrínseca da apoptose é ativada por estresse intracelular ou extracelular, como a privação de fatores de crescimento, danos do DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Estes sinais são codificados em respostas, e esses insultos convergem principalmente para a mitocôndria. Esta organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial com a liberação da proteína Bax (pro-apoptótica) a associação/inibição da Bcl-2 (anti-apoptótica), induzindo a liberação da APAF-1(fator de ativação de protease associada a apoptose), que em associação com o citocromo c, ativa a caspase 9 e caspase 3, induzindo dessa maneira a apoptose⁶⁹.

Na via extrínseca a combinação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana, da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF), é capaz de ativar a cascata das caspases⁷⁰.

Existem fortes evidências da participação da proteína p53 na supressão do desenvolvimento do câncer. Esta proteína participa na regulação do ponto de checagem de G1 no ciclo celular, que tem fundamental importância na manutenção da integridade do genoma,

pois permite a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas através do processo de apoptose⁷¹.

Danos no DNA promovem a super-expressão e consequente ativação da p53, resultando em parada do ciclo celular em G1 e iniciando o reparo do DNA. Depois de realizado o reparo, a p 53 aumenta a transcrição da proteína a mdm-2 que age como inibidora da p53. A proteína mdm-2 se associa então a p53, revertendo o bloqueio do ciclo celular e promovendo o avanço para a fase S⁷².

Portanto quando os danos do DNA não são passíveis de reparo, ocorre a ativação da apoptose⁷³. Mutações no gene p53 resultam em um descontrole do ponto de checagem G1 do ciclo celular, possibilitando que células danificadas progridam para fase S do ciclo celular, sem reparar as lesões, ou entrar em apoptose⁷⁴.

Evidencias demonstram que a resistência das células a apoptose desempenha um papel central no desenvolvimento e progressão de alguns tipos de câncer⁷⁵.

O sucesso de cada estratégia terapêutica, na atuação das drogas anti-neoplásicas contra as células cancerígenas, está na capacidade destas drogas interferirem nas vias de sinalização da apoptose, objetivando inibir a super-expressão de proteínas anti-apoptótica ou estimulando a expressão das proteínas pró-apoptóticas⁷⁶.

Dando continuidade a linha de pesquisa em carcinogênese e câncer experimental no Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, testamos um composto derivado da tiossemicarbazona: o N"-[(1E)-1-(4-metilphenyl) ethylidene]-N"'-[[[(phenylmethyl) amino] thioxomethyl] - 4-OH-BN-NCS, desenvolvido no instituto de química da UFMS e testado por meio de ensaios biológicos, com relação à toxicogenética e a indução de apoptose, no Laboratório do centro de estudos em célula-tronco, terapia celular e genética toxicológica (CETROGEN), NHU/UFMS.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Estudar com uso de ensaios biológicos os efeitos do composto 4-OH-BN-NCS derivado da tiossemicarbazona, em modelo experimental.

3.2. ESPECÍFICO

Estudar com uso de ensaios biológicos, (ensaio do cometa, ensaio do micronúcleo e ensaio da apoptose) os efeitos genotóxicos, mutagênicos e apoptóticos do composto 4-OH-BN-NCS derivado da tiossemicarbazona, em modelo experimental de camundongos swiss.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Agentes Químicos

4.1.1. Ciclofosfamida:

Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico Ciclofosfamida (Ítaca Laboratórios - Fosfaseron®, REG. M.S. No. 1.2603.0056.002-1; Batch 063020, Brasil), um agente alquilante de ação indireta, para a indução de danos no DNA. O mesmo foi preparado em solução salina 0,9% (NaCl 0,9%), pH 7,4 e administrado na dose de 100mg/Kg de peso corpóreo (p.c.), por via intraperitoneal (i.p.) em dose única (Oliveira et al., 2015).

4.1.2. 4-OH-BN-NCS

O composto-teste carbonic dihydrazide, N"-[(1E)-1-(4-metilphenyl) ethylidene]-N"'-[[[(phenylmethyl) amino] thioxomethyl]-denominado como 4-OH-BN-NCS foi sintetizado por CSS Tozatti, sob orientação de DP Lima, em sua tese de doutorado e como a síntese envolve processo de patente a mesma não será descrita nesse estudo.

O 4-OH-BN-NCS foi diluído em álcool e, em seguida, em solução salina 0,9% sendo a proporção final de etanol igual 1%. Após foi administrado aos animais nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg (p.c., i.p.). Essas doses foram determinadas em experimentos pilotos (dados não apresentados).

4.2. Animais

Para a realização dos experimentos utilizou-se 25 camundongos machos da linhagem Swiss (*Mus musculus*), provenientes da Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO). Os animais foram mantidos em caixas de polietileno recobertas por cepilho e alimentados com ração comercial (Nuvital®) e água filtrada *ad libitum*. Em ambiente controlado, foram mantidos sob condições padronizadas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa ($55 \pm 10\%$) e luminosidade (fotoperíodo de doze horas; 12 horas de claro: 12 horas de escuro) em rack ventilado ALESCO®. O experimento foi conduzido segundo as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais e com aprovação do Comitê de Ética no Uso dos Animais da UFMS (Protocolo # 399/2012).

4.3. Delineamento Experimental

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n=5 animais/grupo), os quais foram submetidos aos seguintes tratamentos:

Grupo 1- Controle: os animais receberam uma administração de solução salina 0,9% (veículo da ciclofosfamida) e outra solução salina 0,9% acrescida de etanol 1% (veículo do 4-OH-BN-NCS), ambas na proporção de 0,1 mL/10g (p.c., i.p.).

Grupo 2- Ciclofosfamida: os animais receberam a administração de ciclofosfamida na dose de 100 mg/Kg (p.c., i.p.) e outra de solução salina 0,9% a 1% de etanol (veículo do 4-OH-BN-NCS, óleo de milho, *ip*) na proporção de 0,1 mL/10g (p.c., i.p.).

Grupos 3 -25 + 4-OH-BN-NCS: os animais receberam solução salina 0,9% (veículo da ciclofosfamida) na proporção de 0,1 mL/10g (p.c., i.p.) e outra de 4-OH-BN-NCS na dose de 25 mg/Kg (p.c., i.p.).

Grupo 4 - 50 + 4-OH-BN-NCS: os animais receberam solução salina 0,9% (veículo da ciclofosfamida) na proporção de 0,1 mL/10g (p.c., i.p.) e outra de 4-OH-BN-NCS na dose de 50 mg/Kg (p.c., i.p.).

Grupo 5 - 100 + 4-OH-BN-NCS: os animais receberam solução salina 0,9% (veículo da ciclofosfamida) na proporção de 0,1 mL/10g (p.c., i.p.) e outra de 4-OH-BN-NCS na dose de 100 mg/Kg (p.c., i.p.).

Vinte e quatro horas (T1) após a administração dos compostos coletou-se duas amostras de 20µL de sangue periférico para realização dos ensaios de micronúcleo e cometa. Após 48 e 72 horas, T2 e T3, respectivamente, coletou-se 20µL de sangue periférico para a realização do ensaio do micronúcleo. Logo após a última coleta de sangue, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical para a coleta de fígado e rins para os ensaios de apoptose.

4.4. Ensaios Biológicos

4.4.1. Avaliação toxicogenética

4.4.1.1. Ensaio do Cometa em Sangue Periférico

Realizou-se o ensaio do cometa seguindo as descrições de Singh⁷⁷ com as modificações de Navarro⁴. Primeiramente homogeneizou-se 20µL de sangue periférico e 120µL de agarose de baixo ponto de fusão (LPM) (0,5%). Em seguida, essa solução foi depositada em lâminas previamente cobertas com agarose normal (5%). Recobriu-se o material biológico com lamínula de vidro. Posteriormente, as lâminas foram resfriadas a 4°C por 20 minutos. Após esse período, removeram-se as lamínulas para que as lâminas fossem imersas em solução de lise (89,0ml de estoque de lise - 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10,0mM Tris, pH 10,0 corrigido com NaOH sólido; 1,0mL de Triton X-100 e 10,0mL de DMSO) por uma hora, à uma temperatura de 4°C, protegida da luz. Em seguida, as lâminas foram levadas a cuba de eletroforese com tampão de PH>13,0 (300,0mM NaOH e 1mM EDTA, preparado a partir de uma solução estoque de 10N NaOH e 200mM EDTA 200,0, com pH corrigido para 10,0 por um período de 20 minutos a 4°C para desnaturação do DNA). Seguiu-se a eletroforese à 25V e 300,0mA (1,25V/cm) por 20 minutos. Em seguida, neutralizaram-se as lâminas com tampão pH 7,5 (0,4M Tris-HCl), durante 3 ciclos de 5 minutos cada, secas ao ar livre e fixadas álcool etílico absoluto por 10 minutos. O material foi corado posteriormente (100,0µL de brometo de etídio - 20×10^{-3} mg/mL) e analisado em microscópio de epifluorescência (Motic®, Molel BA410FL) em aumento de 400x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Para a análise dos dados, capturou-se, aleatoriamente, 10 imagens/lâmina (animal), com a utilização do programa de fotodocumentação em Câmera *Motican 2.0*. Posteriormente, as imagens foram analisadas pelo software *ImageJ* (version 1.48; Java 1.6.0_65 [32-bit]) e *OpenComet* (version 1.3) O resultado foi expresso em *Tail moment* (TM), que analisa a relação entre o tamanho da cauda, vezes a porcentagem de fragmentos de DNA na cauda.

4.4.1.2. Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico

O ensaio do micronúcleo em sangue periférico foi realizado segundo Hayashi⁷⁸ com modificação de Oliveira⁷⁹. Um total de 20µL de sangue periférico foi colocado sobre uma lâmina previamente recoberta por 20µL de Alaranjado de Acridina (1,0 mg/mL), sendo uma

lamínula depositada, em seguida, sobre o material biológico. A lâmina permaneceu em *freezer* (-20°C) por um período mínimo de duas semanas. Realizou-se a análise em microscópio de epifluorescência (Motic®, Molel BA410FL), em aumento de 400x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro barreira 520nm. Contou-se 2.000eritrócitos/animal.

4.4.2. Avaliação da Atividade Apoptótica

4.4.2.1 Ensaio de Apoptose no Fígado e Rins

Após a eutanásia e consequente coleta de baço e rim dos animais, os órgãos foram macerados separadamente em solução salina 0,9%. Coletou-se 100µL da solução e fez-se o esfregaço em lâmina de vidro. As lâminas foram secas ao ar livre em temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram fixadas em *Carnoy* por 5 minutos e submetidas a uma bateria de concentrações decrescentes de etanol (95%, 75%, 50% e 25%) seguida de lavagem com Tampão *McIlvaine* por 5 minutos, coloração de Alaranjado de Acridina (0,01%, 5 minutos) e nova lavagem em tampão. A identificação de células em apoptose se deu por meio da análise de padrões de fragmentação do DNA, segundo Navarro⁴. Contou-se 100 células por animal.

4.5. Análise Estatística

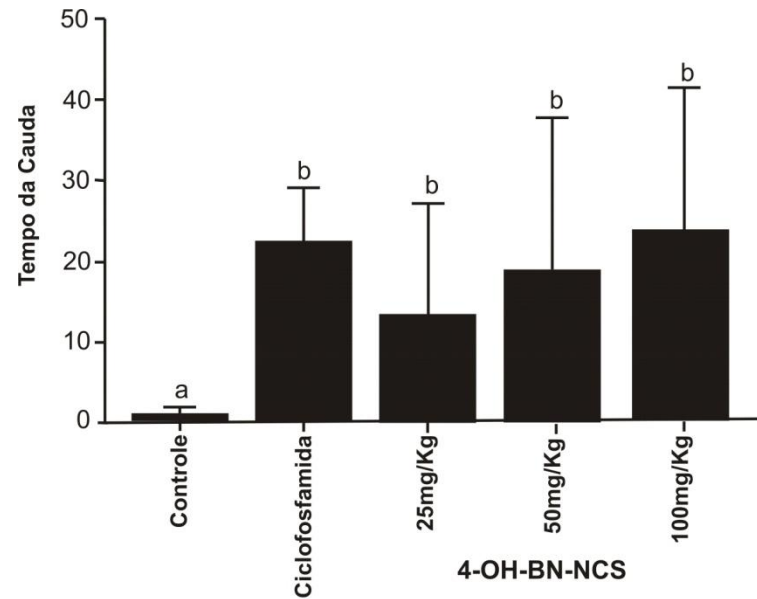
Os valores apresentados foram expressos em média $\pm$ EPM (erro padrão da média) e os dados foram analisados por ANOVA/Tukey por meio do software *GraphPadPrism* (Version3. 02; *Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA*). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Efeitos Toxicogenéticos

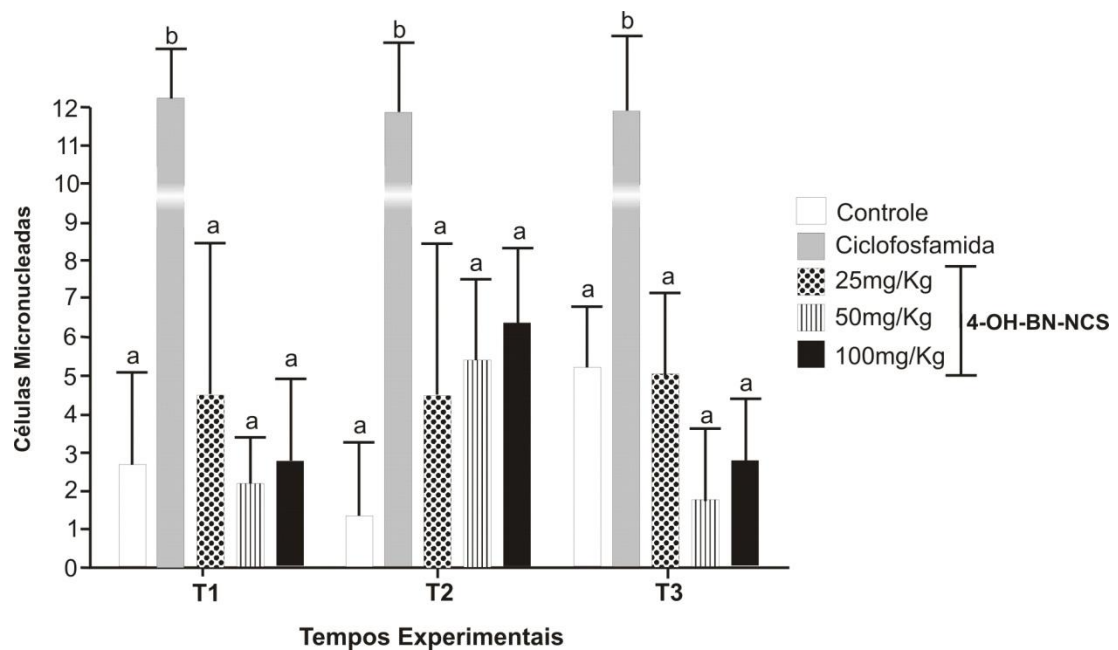
O ensaio do cometa demonstrou que o 4-OH-BN-NCS aumentou a frequência de danos genotóxicos quando comparados ao controle. Na avaliação de 24 horas TM encontrados foram (Média±EPM) de: $0,58 \pm 0,59$ e $22,87 \pm 3,33$, para o controle e ciclofosfamida respectivamente e (Media±EPM) de: $14,19 \pm 8,16$, $18,55 \pm 10,77$ e $23,81 \pm 9,78$ para as doses de 25mg/Kg, 50mg/Kg e 100mg/Kg de 4-OH-BN-NCS respectivamente. Observando-se que ocorreu significância estatística em relação ao controle na frequência de danos genotóxicos $p < 0,001$, nas 3 doses testadas do 4- OH-BN-NCS. (Tabela 9.1.1.1 no anexo e Figura 1).

Já para ensaio do micronúcleo a análise estatística demonstrou que o 4-OH-BN-NCS não foi mutagênico em nenhuma das doses testadas quando comparados ao controle ($p > 0,05$). Em 24 horas foram contadas (média±EPM) de: $2,6 \pm 1,2$, $81 \pm 1,8$, $4,6 \pm 1,7$, $2,2 \pm 0,5$ e $2,8 \pm 1,0$, células micronucleadas para o controle, Ciclofosfamida, 25mg/Kg, 50mg/Kg e 100mg/Kg (de 4-OH-BN-NCS) respectivamente. Em 48 horas foram contadas (média±EPM) de: $1,4 \pm 0,9$, $61,2 \pm 4,4$, $4,8 \pm 1,6$, $5,6 \pm 0,9$ e $6,2 \pm 1,1$, células micronucleadas para o controle, Ciclofosfamida, 25mg/Kg, 50mg/Kg e 100mg/Kg (de 4-OH-BN-NCS) respectivamente. Enquanto que em 72 horas foram contadas (média±EPM) de: $5,2 \pm 0,7$, $60 \pm 4,8$, $5,0 \pm 0,8$, $2,0 \pm 0,8$ e $2,8 \pm 0,6$ células micronucleadas para o controle, Ciclofosfamida, 25mg/Kg, 50mg/Kg e 100mg/Kg (de 4-OH-BN-NCS) respectivamente. (Tabela 9.1.2 no anexo e (Figura 2).



Grupos Experimentais

Figura 1 – Danos toxicogênicos – Valores médios ± erro padrão da média do tempo da cauda no ensaio do cometa. Teste Estatístico: ANOVA/Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.



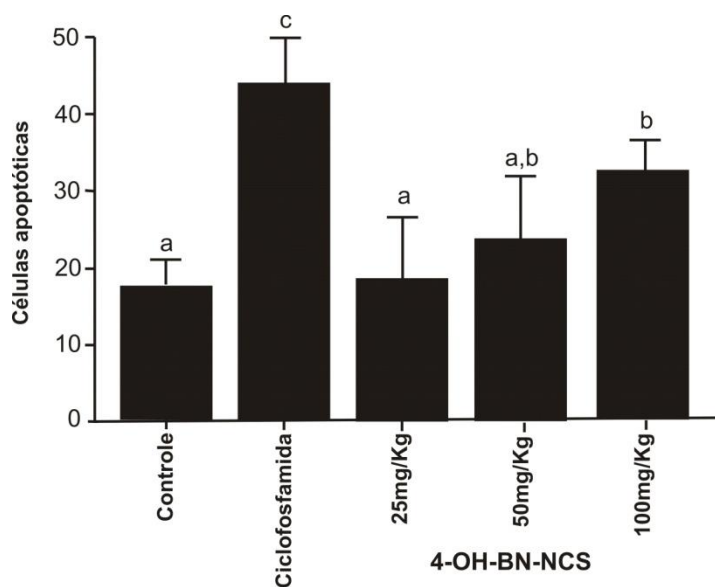
Tempos Experimentais

Figura 2 – Valores médios ± erro padrão da média da frequência de células micronucleadas no ensaio de micronúcleo. Teste Estatístico: ANOVA/Tukey ($P > 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

5.2. Efeitos Apoptóticos

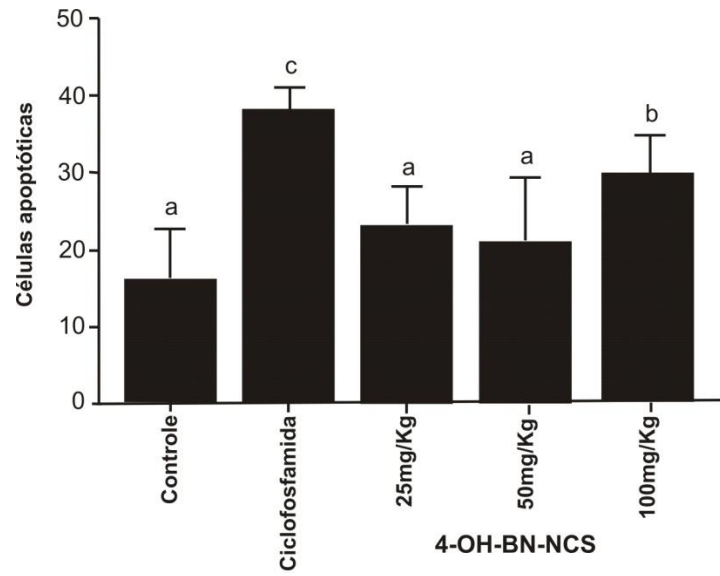
Os resultados para o ensaio de apoptose para o fígado foram de (Media±EPM) 18,2±1,9, 43,2±2,4, 19,6±2,9, 23,0±2,5 e 30,4±1,9 para o controle, Ciclofosfamida, 25mg/Kg, 50mg/Kg e 100mg/Kg (de 4-OH-BN-NCS) respectivamente. Enquanto para os rins foram de (Média±EMP) 17±2,7, 38,2±0,9, 22,0±2,1, 20,4±2,9 e 28,8±1,0 para o controle, Ciclofosfamida, 25mg/Kg, 50mg/Kg e 100mg/Kg (de 4-OH-BN-NCS) respectivamente.

Ocorreu diferença estatística, em relação ao controle, na frequência dos eventos apoptóticos tanto no fígado ($p < 0,05$) quando nos rins ($p < 0,01$) quando os animais foram tratado com 4-OH-BN-NCS na dose de 100mg/kg. (Tabelas 9.1.3 e 9.1.4 no anexo e figuras 3 e 4).



Grupos Experimentais

Figura 3 – Valores médios ± erro padrão da média da frequência de apoptose no fígado. ANOVA/Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.



Grupos Experimentais
Figura 4 - Valores médios $\pm$ erro padrão da média da frequência de apoptose nos rins. Teste Estatístico: ANOVA/Tukey ($p < 0,01$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

6. DISCUSSÃO

A síntese de DNA é um processo complexo e coordenado com diferentes pontos de checagem visto que uma adequada replicação garante a transmissão das características hereditária de uma célula para outra ou de uma geração para outra⁸⁰. Esse procedimento depende de uma maquinaria celular e de diversas enzimas que precisam trabalhar com grande precisão e fidelidade^{81,82}. Dentre as diferentes enzimas que atuam nesse procedimento destaca-se a ribonucleotídeo difosfato redutase que tem como função catalisar a redução do ribonucleotídeo para desoxirribonucleotídeo, a partir de seus nucleotídeos correspondentes, pela redução de sua posição C2', e não por síntese de novo a partir de precursores contendo desoxirribose⁸³.

Logo, compostos que são capazes de interferir nesse processo podem ser importantes fontes de prospecção para novos compostos anticâncer^{84,85,86}. Dentre os compostos que possuem essa capacidade destacam-se as semicarbazonas e as tiosemicarbazonas^{87,88,89}, sendo um representante dessa classe, o 4-OH-BN-NCS, um composto de síntese inédito, objeto de estudo desse grupo e que foi testado inicialmente quanto aos seus efeitos genotóxicos, mutagênicos e apoptóticos na intenção de estudar suas possíveis propriedades quimioterápicas o que demonstra o pioneirismo desse estudo.

O ensaio do cometa demonstrou que todas as doses testadas foram genotóxicas e existe uma correlação dose resposta, ou seja, à medida que a dose aumenta há também o aumento das lesões genômicas. Vale salientar ainda que apesar de não existir diferenças estatisticamente significativas entre as doses testadas e o controle positivo, a maior dose apresentou nível de lesões próximo ao da ciclofosfamida, que é um quimioterápico comercial, que causa a morte de células tumorais aumentando os níveis de dano no DNA e, posteriormente, causando apoptose⁹⁰. Logo essa correspondência pode ser um bom indicativo de ação quimioterápica.

Segundo a literatura, a hidroxiuréia, é um medicamento utilizado na terapia contra o câncer e tem ação similar à apresentada pelas semicarbazonas e tiosemicarbazonas em geral^{91,92}. O mecanismo de ação da hidroxiuréia envolve a inibição da síntese de DNA, porém, tem pouca interferência na síntese de RNA e de proteínas^{90,93,94}. Apesar de possuir vários sítios de ação, esse medicamento inibe a incorporação da timina no material genético e, portanto, prejudica diretamente a síntese de DNA^{93,95,96}. Mas também é fator limitante para a síntese de

DNA a falta de desoxirribonucleotídeos que pode ocorrer uma vez que esse medicamento destrói o radical tirosil que forma o centro catalítico da ribonucleotídeo difosfato redutase⁹⁷. Devido às características apresentadas, a hidroxiuréia apresenta-se como um inibidor da fase-S e, provavelmente, cause bloqueio do ciclo celular no checkpoint G1-S e também no final de G2^{93,98,99}. Assim, pode ocorrer tanto uma redução do número de células que iniciam a fase de síntese do DNA bem como da frequência daquelas que conseguem finalizar a mesma, o que promove estacionamento de células tanto em S como em G2.

As afirmativas acima corroboram os dados encontrados nesse estudo para o 4-OH-BN-NCS, ou seja, a avaliação do ensaio do micronúcleo indicou que o composto não é mutagênico, diferentemente da ciclofosfamida (composto utilizado como controle positivo) que aumenta de forma significativa na frequência de mutações, e esse fato pode ter ocorrido pelo bloqueio do ciclo celular. Assim, as lesões genotóxicas não se fixarão no DNA uma vez que elas só poderão ser observadas como mutações (micronúcleos) uma divisão após a ocorrência do dano genético¹⁰⁰.

Uma avaliação mais minuciosa das 3 diferentes doses testadas indica que no primeiro momento de análise, 24 horas após a administração do 4-OH-BN-NCS, a menor dose foi a que apresentou maior frequência de danos seguida pela maior dose e sendo a menor frequência de micronúcleos observada na dose intermediária. No segundo momento de análise, 48 horas, observou-se uma correlação dose resposta, ou seja, à medida que ocorreu o aumento da dose houve um aumento da frequência de danos.

Apesar da ausência de significância estatística, em nível biológico, esses resultados permitem importantes considerações a cerca do processo de dano genético e morte celular. Assim, é necessário chamar a atenção para o leitor, o fato de que a mesma curva dose resposta observada para o ensaio do cometa em 24h foi reproduzida pelo ensaio do micronúcleo em 48 horas. Levando em consideração que o dano genético só pode ser observado como mutação após um ciclo celular, os danos demonstram concordância. O fato de os danos genotóxicos apresentarem diferença estatisticamente significativa, mas os mutagênicos não podem ser explicados pelo bloqueio do ciclo celular tanto em G1/S quanto no final de G2 que impediria a fixação da mutação. Mas que possivelmente teria que encaminhar a célula para apoptose caso esse dano não seja passível de reparo⁹⁸.

Supondo que a ausência de desoxirribonucleotídeos não possa ser suprida, porque a enzima ribonucleotídeo difosfato redutase não esteja atuante, a progressão esperada é que as células com danos no DNA ou bloqueadas nos checkpoints G1/S e G2/M sofram apoptose¹⁰¹. Esse fato pode ser confirmado pelo ensaio de apoptose, no fígado, que demonstrou a mesma curva dose resposta observada para o ensaio do cometa em 24h e para o ensaio do micronúcleo em 48 horas. Assim, como esses eventos são sequenciais a ocorrência de apoptose em 72 horas reforça a hipótese apresentada.

O ensaio de apoptose nos rins não demonstrou esse mesmo perfil. Talvez isso possa ter ocorrido porque o fígado é o principal metabolizador de xenobióticos bem como de drogas como os quimioterápicos¹⁰² e os rins sejam um passo mais tardio da excreção seja dos xenobióticos/medicamentos ou de seus metabólitos. No entanto tanto no fígado quanto nos rins a dose que efetivamente causou apoptose foi a dose de 100mg/kg, que também evidenciou o maior efeito genotóxico. Portanto, os dados são concordantes visto que os danos genotóxicos levam as células à morte celular por apoptose¹⁰³.

Frente ao exposto, considera-se que o 4-OH-BN-NCS possui efetiva capacidade de causar danos genéticos e apoptose em *camundongos swiss*, fatos que podem ser requeridos para o desenvolvimento de novos medicamentos na terapia anticâncer, o que sugere prospecção em ação quimioterápica.

7. CONCLUSÃO

Evidenciou-se que o composto 4-OH-BN-NCS derivado da tiossemicarbazona, apresentou aumento significativo dos efeitos genotóxicos em todas as doses analisadas e aumento significativo dos efeitos apoptóticos na dose de 100 mg/kg, enquanto o efeito mutagênico não apresentou diferença significativa em nenhuma das doses testadas, em modelo experimental de camundongos swiss.

8. REFERÊNCIAS

-
- 1 Lui GY, Kovacevic Z, Richardson V, Merlot AM, Kalinowski DS, Richardson DR. Targeting cancer by binding iron: Dissecting cellular signaling pathways. *Oncotarget* 2015 Aug 7; 6(22):18748-79.
 - 2 Ames BN. Carcinogens are mutagens: their detection and classification. *Environ Health Perspect.* 1973 Dec; 6:115-8.
 - 3 Vogel EW, Blijleven WG, Kortselius MJ, Zijlstra JA. A search for some common characteristics of the effects of chemical mutagens in *Drosophila*. *Mut Res.* 1982 Feb 22; 92(1-2):69-87.
 - 4 Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, James D. DNA damage and repair and their role in carcinogenesis. In: Freeman WH. *Molecular Cell Biology*, 4th edition. New York, 2000.
 - 5 Navarro SD, Beatriz A, Meza A, Pesarini JR, Gomes Rda S, Karaziack CB, Cunha-Laura AL, Monreal AC, Romão W, Lacerda Júnior V, Mauro Mde O, Oliveira RJ. A new synthetic resorcinolic lipid3-heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H-isobenzofuran-1-one: evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *Eur J Med Chem.* 2014 Mar 21;75:132-42.
 - 6 Zhao P, Chen L, Li LH, Wei ZF, Tong B, Jia YG, Kong LY, Xia YF, Dai Y. SC-III3, a novel scopoletin derivative, induces cytotoxicity in hepatocellular cancer cells through oxidative DNA damage and ataxia telangiectasia-mutated nuclear protein kinase activation. *BMC Cancer.* 2014 Dec 19;14:987
 - 7 Oliveira RJ, Navarro SD, de Lima DP, Meza A, Pesarini JR, da Silva Gomes R, Karaziack CB, de Oliveira Mauro M, Cunha-Laura AL, Monreal AC, Romão W, Júnior VL, Beatriz A. A novel cytosporone 3-Heptyl-4, 6-dihydroxy-3H-isobenzofuran-1-one: synthesis; toxicological, apoptotic and immunomodulatory properties; and potentiation of mutagenic damage. *BMC Cancer.* 2015 Jul 31; 15:561.
 - 8 Chang LC, Yu YL, Liu CY, Cheng YY, Chou RH, Hsieh MT, Lin HY, Hung HY, Huang LJ, Wu YC, Kuo SC. The newly synthesized 2-arylnaphthyridin-4-one, CSC-3436, induces apoptosis of non-small cell lung cancer cells by inhibiting tubulin dynamics and activating CDK1. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015 Jun;75(6):1303-15.
 - 9 Yu TW, Xu M, Dashwood RH. Anti-mutagenic activity of spearmint. *Environ Mol Mutagen* 2004; 44(5):387-93.

-
- 10 Kim HR, Park CG, Jung JY. Acacetin (5, 7-dihydroxy-4'-methoxyflavone) exhibits in vitro and in vivo anticancer activity through the suppression of NF- κ B/Akt signaling in prostate cancer cells. *Int J Mol Med*. 2014 Feb; 33(2):317-24.
 - 11 Woo SR, Ham Y, Kang W, Yang H, Kim S, Jin J, Joo KM, Nam DH. KML001, a telomere-targeting drug, sensitizes glioblastoma cells to temozolomide chemotherapy and radiotherapy through DNA damage and apoptosis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:747415.
 - 12 Nussbaumer S, Bonnabry P, Veuthey JL, Fleury-Souverain S. Analysis of anticancer drugs: a review. *Talanta*. 2011 Oct 15; 85(5):2265-89.
 - 13 Atkins JH, Gershell LJ. Selective anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Jul; 1(7):491-2.
 - 14 Chari RV. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. *Acc Chem Res*. 2008 Jan; 41(1):98-107.
 - 15 Schreiber SL. Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science*. 2000 Mar 17; 287(5460):1964-9.
 - 16 A. Organic synthesis: the art and science of replicating the molecules of living nature and creating others like them in the laboratory. *Proc. Math Phys Eng Sci*. 2014 Mar 8; 470(2163):20130690.
 - 17 Beraldo H, Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas Amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Quim. Nova*. 2004 27, 3 : 461-471
 - 18 Greenbaum DC, Mackey Z, Hansell E, Doyle P, Gut J, Caffrey CR, Lehrman J, Rosenthal PJ, McKerrow JH, Chibale K. Synthesis and structure-activity relationships of parasitocidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. *J Med Chem*. 2004 Jun 3; 47(12):3212-9.
 - 19 Jafri L, Ansari FL, Jamil M, Kalsoom S, Qureishi S, Mirza B. Microwave-assisted synthesis and bioevaluation of some semicarbazones. *Chem Biol Drug Des*. 2012 Jun; 79(6):950-9.
 - 20 Hussein MA, Guan TS, Haque RA, KhadeerAhamed MB, Abdul Majid AM. Mononuclear dioxomolybdenum(VI) thiosemicarbazonato complexes: Synthesis, characterization, structural illustration, in vitro DNA binding, cleavage, and antitumor properties. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2014 Oct 22; 136PC:1335-1348.

-
- 21 Lee WY, Lee PP, Yan YK, Lau M. Cytotoxic copper(II) salicylaldehydesemicarbazone complexes: mode of action and proteomic analysis. *Metallomics*. 2010 Oct; 2(10):694-705.
- 22 Lessa JA, Mendes IC, da Silva PR, Soares MA, dos Santos RG, Speziali NL, Romeiro NC, Barreiro EJ, Beraldo H. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxic activity in nanomolar doses against malignant gliomas. *Eur J Med Chem*. 2010 Dec; 45(12):5671-7.
- 23 Gan C, Cui J, Su S, Lin Q, Jia L, Fan L, Huang Y. Synthesis and antiproliferative activity of some steroidal thiosemicarbazones, semicarbazones and hydrozones. *Steroids*. 2014 Sep; 87:99-107. .
- 24 Wong WY, Loh SW, Ng WL, Tan MC, Yeo KS, Looi CY, Maah MJ, Ea CK. A cell-based screening system for anti-influenza A virus agents. *Sci Rep*. 2015 Mar 2;5: 8672.
- 25 Pahontu E, Julea F, Rosu T, Purcarea V, Chumakov Y, Petrenco P, Gulea A. Antibacterial, antifungal and in vitro antileukaemia activity of metal complexes with thiosemicarbazones. *J Cell Mol Med*. 2015 Apr;19(4):865-78.
- 26 Alomar K, Gaumet V, Allain M, Bouet G, Landreau A. Synthesis, crystal structure, characterisation, and antifungal activity of 3-thiophene aldehyde semicarbazone (3STCH), 2,3-thiophene dicarboxaldehydebis (semicarbazone) (2,3BSTCH₂) and their nickel (II) complexes. *J Inorg Biochem*. 2012 Oct;115:36-43.
- 27 Soares RO, Echevarria A, Bellieny MS, Pinho RT, de Leo RM, Seguin WS, Machado GM, Canto-Cavaleiro MM, Leon LL. Evaluation of thiosemicarbazones and semicarbazones as potential agents anti-Trypanosomacruzi. *Exp Parasitol*. 2011 Dec; 129(4):381-7.
- 28 Caliş U, Septioğlu E, Aytemir MD. Synthesis and anticonvulsant evaluation of some novel (thio) semicarbazone derivatives of arylalkylimidazole. *Arzneimittelforschung*. 2011; 61(6):327-34.
- 29 Deshmukh R, Thakur AS, Jha AK, Kumar PS. Anticonvulsant and Neurotoxicity of Some Novel 1-([1,3,4]thiadiazino[6,5-b]indol-3-yl) Semicarbazides. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2015 Jun 22.
- 30 Tare AY, Farid AB, Shabane EG, Ola AE, Gaber MAE. In vitro and in vivo antitumor activity of some synthesized 4-(2-pyridyl)-3-Thiosemicarbazides derivatives. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* 2011 Feb; 3(2):37-46
- 31 Lane DJ, Mills TM, Shafie NH, Merlot AM, Saleh Moussa R, Kalinowski DS, Kovacevic Z, Richardson DR. Expanding horizons in iron chelation and the treatment of cancer: role of iron in the regulation of ER stress and the epithelial-mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Apr; 1845(2):166-81.

-
- 32 Feun L, Modiano M, Lee K, Mao J, Marini A, Savaraj N, Plezia P, Almassian B, Colacino E, Fischer J, MacDonald S. Phase I and pharmacokinetic study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) using a single intravenous dose schedule. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002 Sep; 50(3):223-9.
- 33 Kasuga NC, Sekino K, Ishikawa M, Honda A, Yokoyama M, Nakano S, Shimada N, Koumo C, Nomiya K. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc(II) complexes with four thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands. *J Inorg Biochem.* 2003 Aug 1; 96(2-3):298-310.
- 34 Teitz Y, Ronen D, Vansover A, Stematsky T, Riggs JL. Inhibition of human immunodeficiency virus by N-methylisatin-beta 4':4'-diethylthiosemicarbazone and N-allylisatin-beta-4':4'-diallythiosemicarbazone. *Antiviral Res.* 1994 Aug; 24(4):305-14.
- 35 Bharti N, Husain K, Gonzalez Garza MT, Cruz-Vega DE, Castro-Garza J, Mata-Cardenas BD, Naqvi F, Azam A. Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2002 Dec 2;12(23):3475-8.
- 36 Karali N. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new 5-nitroindole-2,3-dione derivatives. *Eur J Med Chem.* 2002 Nov;37(11):909-18.
- 37 Louie AY, Meade TJ. Metal complexes as enzyme inhibitors. *Chem Rev.* 1999 Sep 8; 99(9):2711-34.
- 38 Cory JG. Ribonucleotide reductase as a chemotherapeutic target. *Adv Enzyme Regul.* 1988; 27:437-55.
- 39 Finch RA, Liu M, Grill SP, Rose WC, Loomis R, Vasquez KM, Cheng Y, Sartorelli AC. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde- thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. *Biochem Pharmacol.* 2000 Apr 15;59(8):983-91.
- 40 Gokhale N, Jain S, Yadav M. Design and virtual screening towards synthesis of novel substituted thiosemicarbazones as ribonucleotide reductase (RNR) inhibitors with improved cellular trafficking and anticancer activity. *Curr Top Med Chem.* 2015;15(1):37-42.
- 41 Finch RA, Liu MC, Cory AH, Cory JG, Sartorelli AC. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone; 3-AP): an inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity. *Adv Enzyme Regul.* 1999;39:3-12.
- 42 Moorthy NS, Cerqueira NM, Ramos MJ, Fernandes PA. Development of ribonucleotide reductase inhibitors: a review on structure activity relationships. *Mini Rev Med Chem.* 2013 Nov;13(13):1862-72.

-
- 43 Li J, Luo X, Wang Q, Zheng LM, King I, Doyle TW, Chen SH. Synthesis and biological evaluation of a water soluble phosphate prodrug of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP). *Bioorg Med Chem Lett*. 1998 Nov 17;8(22):3159-64.
- 44 Wang Y, Liu MC, Lin TS, Sartorelli AC. Synthesis and antitumor activity of 3- and 5-hydroxy-4-methylpyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones. *J Med Chem*. 1992 Oct 2;35(20):3667-71.
- 45 Rômulo P. Tenório e Alexandre J. S. Góes, José G. de Lima, Antônio R. de Faria, Antônio J. Alves e Thiago M. de Aquino, *Quim. Nova*, 2005 Vol. 28, No. 6, 1030-1037.
- 46 Kalinowski DS, Quach P, Richardson DR. Thiosemicarbazones: the new wave in cancer treatment. *Future Med Chem*. 2009 Sep;1(6):1143-51.
- 47 Pratheepa Sivasankari N, Kaur S, Reddy KS, Vivekanandam S. Micronucleus Index: an early diagnosis in oral carcinoma. *J Anat Soc India* 2008;57:8-13.
- 48 Keen-Kim D, Nooraie F, Rao PN. Cytogenetic biomarkers for human cancer. *Front Biosci* 2008;13:5928-49.
- 49 Miyamae Y, Yamamoto M, Sasaki YF, Kobayashi H, Igarashi-Soga M, Shimoi K, et al. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutat Res* 1998;418: 131-40.
- 50 Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009 Apr 9; 458(7239):719-24.
- 51 Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death--I. cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *J Insect Physiol*. 1965 Feb; 11:123-33.
- 52 Morte celular por apoptose(programmed cell death) *Rev. Bras. Cancerologia* 2007; 53(3): 335-343
- 53 Zhang H, Buchholz TA, Hancock D, Spitz MR, Wu X. Gamma-radiation-induced single cell DNA damage as a measure of susceptibility to lung cancer: a preliminary report. *Int J Oncol*. 2000 Aug;17(2):399-404.
- 54 Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*. 1995 Feb;339(1):37-59.
- 55 Kang SH, Kwon JY, Lee JK, Seo YR. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. *J Cancer Prev*. 2013 Dec;18(4):277-88.
- 56 Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1084-104.

-
- 57 Hovhannisyan GG. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Mol Cytogenet.* 2010 Sep15;3:17.
- 58 Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 2012, OECD.
- 59 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.
- 60 Ranganath RM, Nagashree NR. Role of programmed cell death in development. *Int Rev Cytol.* 2001;202:159-242.
- 61 Morte celular por apoptose (programmed cell death) *Rev. Bras. Cancerologia* 2007; 53(3): 335-343
- 62 Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805): 810-6.
- 63 Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science.* 2008 Mar 7;319(5868):1352-5.
- 64 Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Mar;11(3):220-8.
- 65 Reed JC, Jurgensmeier JM, Matsuyama S. Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Aug 10;1366(1-2):127-37.
- 66 Ionov Y, Yamamoto H, Krajewski S, Reed JC, Perucho M. Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 26;97(20): 10872-7.
- 67 Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000 Feb;45(3):528-37.
- 68 Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Mar 1;1644(2-3):83-94.
- 69 Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2000 Sep;10(9):369-77.

-
- 70 Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:269-90.
- 71 Lemoine NR, Hall PA. Growth factors and oncogenes in pancreatic cancer. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1990 Dec;4(4):815-32.
- 72 Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 2000 Jul 15;60(14):3689-95.
- 73 Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 2005 May-Jun;55(3):178-94.
- 74 Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Stark GR. The p53 network. *J Biol Chem.* 1998 Jan 2;273(1):1-4.
- 75 King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:601-17.
- 76 Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int.* 2014 Jun 12.
- 77 Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988 Mar;175 (1):184-91.
- 78 Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res.* 1990 Dec;245 (4):245-9.
- 79 Oliveira RJ, Mantovani MS, Pesarini JR, Mauro MO, da Silva AF, Souza TR, Ribeiro LR. 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development in vivo. *Genet Mol Res.* 2015 Feb 2;14 (1):834-49.
- 80 Noguchi, E. The DNA Replication Checkpoint and Preserving Genomic Integrity During DNA Synthesis. *Nature Education*, v.3, p.46, 2010
- 81 Heller RC, Marians KJ. Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Dec;7 (12):932-43.
- 82 Lambert S, Froget B, Carr AM. Arrested replication fork processing: interplay between checkpoints and recombination. *DNA Repair (Amst).* 2007 Jul 1;6 (7):1042-61.

-
- 83 Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB. Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem Sci.* 1992 Mar;17 (3):119-23.
- 84 Matsumoto M, Rey DA, Cory JG. Effects of cytosine arabinoside and hydroxyurea on the synthesis of deoxyribonucleotides and DNA replication in L1210 cells. *Adv Enzyme Regul.* 1990;30:47-59.
- 85 Pereira S, Fernandes PA, Ramos MJ. Mechanism for ribonucleotide reductase inactivation by the anticancer drug gemcitabine. *J Comput Chem.* 2004 Jul30;25 (10):1286-94.
- 86 Meli M, Tolomeo M, Grifantini M, Mai A, Cappellacci L, Petrelli R, Rotili D, Ferro A, Saiko P, Szekeres T, Dusonchet L. Histone deacetylase inhibition modulates deoxyribonucleotide pools and enhances the antitumor effects of the ribonucleotide reductase inhibitor 3'-C-methyladenosine in leukaemia cells. *Int J Oncol.* 2011 May;38(5):1427-36.
- 87 Cory JG, Cory AH, Rappa G, Lorico A, Liu MC, Lin TS, Sartorelli AC. Inhibitors of ribonucleotide reductase. Comparative effects of amino- and hydroxy-substituted pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones. *Biochem Pharmacol.* 1994 Jul 19;48 (2):335-44.
- 88 Li J, Zheng LM, King I, Doyle TW, Chen SH. Syntheses and antitumor activities of potent inhibitors of ribonucleotide reductase: 3-amino-4-methylpyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone (3-AMP), 3-amino-pyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone (3-AP) and its water-soluble prodrugs. *Curr Med Chem.* 2001 Feb;8 (2):121-33.
- 89 Moorthy NS, Cerqueira NM, Ramos MJ, Fernandes PA. Development of ribonucleotide reductase inhibitors: a review on structure activity relationships. *Mini Rev Med Chem.* 2013 Nov;13 (13):1862-72.
- 90 Hall AG, Tilby MJ. Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies. *Blood Rev.* 1992 Sep;6 (3):163-73.
- 91 Finch RA, Liu M, Grill SP, Rose WC, Loomis R, Vasquez KM, Cheng Y, Sartorelli AC. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. *Biochem Pharmacol.* 2000 Apr 15;59(8):983-91.
- 92 Madaan K, Kaushik D, Verma T. Hydroxyurea: a key player in cancer chemotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012 Jan;12(1):19-29.
- 93 Kihlman BA, Eriksson T, Odmark G. Effects of Hydroxyurea on chromosomes, cell division and nucleic acid synthesis in *Vicia faba*. *Hereditas.* 1966 v.55, p.386-397,.

94 Alvino GM, Collingwood D, Murphy JM, Delrow J, Brewer BJ, Raghuraman MK. Replication in hydroxyurea: it's a matter of time. *Mol Cell Biol*. 2007 Sep; 27 (18):6396-406.

95 Maaloe O, Hanawalt PC. Thymine deficiency and the normal DNA replication cycle. I. *J Mol Biol*. 1961 Apr;3: 144-55..

96 Kuong KJ, Kuzminov A. Cyanide, peroxide and nitric oxide formation in solutions of hydroxyurea causes cellular toxicity and may contribute to its therapeutic potency. *J Mol Biol*. 2009 Jul 31; 390 (5):845-62.

97 Gräslund A, Sahlin M, Sjöberg BM. The tyrosyl free radical in ribonucleotide reductase. *Environ Health Perspect*. 1985 Dec; 64:139-49.

98 de Lima PD, Cardoso PC, Khayat AS, Bahia Mde O, Burbano RR. Evaluation of the mutagenic activity of hydroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: an in vitro study. *Genet Mol Res*. 2003 Sep 30; 2 (3):328-33.

99 Koç A, Wheeler LJ, Mathews CK, Merrill GF. Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J Biol Chem*. 2004 Jan 2; 279(1):223-30.

100 Pagès V, Fuchs RP. How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene*. 2002 Dec 16;21 (58):8957-66.

101 Fleisig H, Wong J. Measuring cell cycle progression kinetics with metabolic labeling and flow cytometry. *J Vis Exp*. 2012 May 22;(63):e4045.

102 Lin JH, Lu AY. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol Rev*. 1997 Dec;49 (4):403-49.

103 Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol*. 2008; 414:13-21.

9. ANEXO

9.1 Tabelas

9.1.1 – Tabela 1. Resultados do tempo de cauda do Ensaio do Cometa.

	Controle	Ciclofosfamida 100mg/kg	25mg/kg	4-OH-BN-CSN 50mg/kg	100mg/kg
Média	0,58	22,87	14,19	18,55	23,81
SD	1,33	7,44	18,25	24,08	21,87
EPM	0,59	3,33	8,16	10,77	9,78
SD/2	0,66	3,72	9,13	12,04	10,93

Valores, médios, desvio padrão e erro médio padrão do tempo de cauda do cometa, medido pelo programa OpenComet.

9.1.2 Tabela 2. Resultado do número de células micronucleadas do ensaio do micronúcleo

	24 horas					48 horas					72 horas				
	Control	4OH-BN-NCS				Control	4OH-BN-NCS				Control	4OH-BN-NCS			
	Ciclofosfamida	25mg/kg	50mg/kg	100mg/kg	Controle	Ciclofosfamida	25mg/kg	50mg/kg	100mg/kg	Controle	Ciclofosfamida	25mg/kg	50mg/kg	100mg/kg	Controle
	3	87	0	2	4	4	59	5	6	8	4	62	5	5	2
	0	82	8	2	2	0	72	10	7	2	7	51	5	2	1
	7	78	6	4	1	3	63	4	2	6	4	75	7	1	3
	1	81	1	1	1	0	66	0	6	7	7	48	6	0	4
	2	77	8	2	6	0	46	5	7	8	4	64	2	2	4
Médias	2,6	81	4,6	2,2	2,8	1,4	61,2	4,8	5,6	6,2	5,2	60	5	2	2,8
SD	2,7	3,9	3,8	1,1	2,2	1,9	9,7	3,6	2,1	2,5	1,6	10,8	1,9	1,9	1,3
EPM	1,2	1,8	1,7	0,5	1,0	0,9	4,4	1,6	0,9	1,1	0,7	4,8	0,8	0,8	0,6

Números de micronúcleos, médias, desvio padrão e erro médio padrão.

9.1.3 Tabela 3. Resultado do número de células com apoptose no fígado

	Controle	Ciclofosfamida	4-OH-BN-NCS		
			25mg/kg	50mg/kg	100mg/kg
	17	37	28	23	32
	13	51	14	14	28
	16	43	13	27	25
	24	40	19	23	31
	21	45	24	28	36
Médias	18,2	43,2	19,6	23,0	30,4
SD	4,3	5,3	6,4	5,5	4,2
EPM	1,9	2,4	2,9	2,5	1,9

Números absolutos, médias e desvio padrão e erro médio.padrão.

9.1.4 Tabela 4. Resultado do número de células com apoptose nos rins

	Controle	Ciclofosfamida	4-OH-BN-NCS		
			25mg/kg	50mg/kg	100mg/kg
	26	38	26	24	30
	15	36	26	18	29
	15	39	24	24	29
	19	37	16	26	25
	10	41	18	10	31
Médias	17,0	38,2	22,0	20,4	28,8
SD	6,0	1,9	4,7	6,5	2,3
EPM	2,7	0,9	2,1	2,9	1,0

Números absolutos, médias, desvio padrão e erro médio padrão.

10. Protocolo do comite de ética em pesquisa 399/2012



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

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

Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA

Campo Grande, 23 de março de 2012.

2ª. via emitida em 06/10/2015

Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação- PROPP
Cidade Universitária, s/n | Caixa Postal 549
Fone: 67 3345.7186 E-mail: gab.propp@ufms.br
CEP 79070-900 | Campo Grande | MS

11. CI 41/2013 de 05.09.2013



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais



CI 086/2013 – CEUA

De: Dra. Maria Araújo Teixeira
Coordenação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS

Para: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira Oliveira

Data: 14.10.2013

Prezada Senhor:

Informamos para os devidos fins que a solicitação de autorização para ampliação/extensão de projetos anteriormente aprovados para o desenvolvimento de novo experimento (CI 41/2013- de 05.09.2013) dos Protocolos CEUA nº 399/2011, processo nº 23104.000615/2012-15 e protocolo nº 523/2013, processo nº 23104.005057/2013-65 do pesquisador Rodrigo Juliano Oliveira, referente aos projetos de pesquisa “Avaliação da atividade (anti)mutagênica, imunomodulatória, apoptótica e histopatológica dos lipídios resorcinólicos AMS-35AA, AMS-35BB e AMS-49 *in vivo*” e Avaliação da atividade bioquímica e hematológica dos lipídios resorcinólicos AMS-49, AMS-35AA e AMS-35BB, respectivamente, foram encaminhados à CEUA/UFMS e, após análise sob os preceitos éticos e legais vigentes, autoriza as ampliações/extensões acima solicitadas, após constatação de que trata-se de um mesmo assunto, com a mesma metodologia. Mudando somente os lipídios resorcinólicos a serem avaliados (AMS37, Cardanol, – óleos sintetizados a partir da *Acrocomia aculeata* -, RJ07, RJ14, DRF-2 e enol-lactona). Passando os protocolos CEUA/UFMS 399/2012 e 523/2013 a serem acrescidos, respectivamente, de 480 camundongos *Swiss* machos, com peso médio de 30 gramas. E a utilização destes animais terá início em janeiro de 2014 e a finalização do projeto de pesquisa será em novembro de 2015.

Sendo o que se apresenta para o momento, apresentamos a Vossa Senhoria nossas atenciosas saudações.

Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFMS

Comissão de Ética no Uso de Animais
Cidade Universitária – Caixa Postal 549
Fone: (67) 3345-7187; ceua@propp.ufms.br
70070-900 – Campo Grande - MS