

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DO
COMPOSTO SINTÉTICO (E)-2-(((para-tolilimino)metil)fenol in vitro E in vivo

Autora: Suellen Rolon de Souza Silva
Orientadora: Dra. Susana Elisa Moreno
Co-orientador: Dr. Nelson Luís de Campos Domingues

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Novembro - 2018

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DO
COMPOSTO SINTÉTICO (E)-2-(((para-tolilimino)metil)fenol in vitro E in vivo**

Autora: Suellen Rolon de Souza Silva
Orientadora: Dra. Susana Elisa Moreno
Co-orientador: Dr. Nelson Luís de Campos Domingues

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia"

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Novembro - 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco - UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

S586d Silva, Suellen Rolon de Souza
Determinação das propriedades farmacológicas do composto
sintético (E)-2-((para-tolilimino)metil)fenol in
vitro e in vivo / Suellen Rolon de Souza Silva; orientadora
Susana Elisa Moreno; coorientador Nelson Luís de Campos
Domingues.-- 2018.
64 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Católica Dom
Bosco, Campo Grande, 2018

1. Biotecnologia. 2. Antitumoral. 3. Farmacologia.
4. Nocicepção. 5. Inflamação (Farmacologia). 6. Migração
de Neutrófilos. I.Moreno, Susana Elisa. II.Domingues,
Nelson Luís de Campos. III. Título.

CDD: 660.6



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Inspira o futuro

**Determinação das Propriedades Farmacológicas do Composto
(E) -2- (((paratolilimino)metil) fenol *in vitro* e *in vivo***

Autora: Suellen Rolon de Souza Silva

Orientadora: Profa. Dra. Susana Elisa Moreno

Coorientador: Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADA em 26 de novembro de 2018.

Profa. Dra. Susana Elisa Moreno - UCDB

Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues - UFGD

Profa. Dra. Luana Silva Soares - UCDB

Profa. Dra. Aline Regina Hellmann Carollo - UFMS

“A mente que se abre à uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente à Deus que me destes o dom da vida, à minha vó Nadir que na ausência da minha mãe Rosemeire (*in memorium*) teve força suficiente para nos dar educação e o pão de cada dia.

Dedico também à todos aqueles que colocaram obstáculos na minha vida, pois sem eles eu não saberia que seria capaz de chegar até aqui.

À todos meus companheiros desta jornada acadêmica que me ajudaram de alguma forma, seja uma palavra ou ajudando no experimento, desejo à todos vocês toda sorte e sucesso do mundo, pois são merecedores.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus pela oportunidade da vida.

À minha orientadora Prof. Dra. Susana Elisa Moreno, pela amizade, incentivo, oportunidade concedida e pela paciência.

À minha melhor amiga, companheira, mãe, pai e vó Nadir Pedroso, que foi a primeira à incentivar-me e apoiar nas dificuldades do dia-a-dia, obrigada pela educação que me destes.

Aos meus amigos de profissão Biomédicos que me incentivaram à continuar os estudos e os plantões trocados para que eu pudesse assistir as aulas.

Aos meus colegas e amigos professores da Unigran Capital que trocavam dias de serviço comigo para eu pudesse realizar meu experimento e sempre estavam me incentivando e apoiando.

Aos amigos do laboratório de Farmacologia: Danieli, Beatriz, Geraldo, Lídia, Mariana, Sarah, Robson, Georges, Aline, Kathyucia, Profa. Me. Letícia, pelos bons momentos de convivência e ajuda nas dificuldades.

À secretária Silvia pela atenção e colaboração.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

À minha família pelo apoio e incentivo durante todos os momentos.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Suellen Rolon de Souza Silva, filha de Dorival de Brito Silva e Rosemeire Rolon de Souza (*in memorium*), nasceu em Campo Grande – MS, no dia 01 de Setembro de 1986.

Concluiu a graduação em Biomedicina Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN) no ano de 2007, passando a atuar profissionalmente na área.

Em 2010, concluiu especialização em Citologia Clínica pela Sociedade Brasileira de Citologia Clínica – (SBCC) e em 2016 a especialização em Tomografia e Ressonância Magnética na Faculdade Unigran Capital, cursando na sequência diversos aprimoramentos profissionais na área. Possui experiência em análises clínicas, plantões e rotina hospitalar.

Desde 2016 é professora no curso de graduação de Biomedicina, atualmente é gestora da Pós em Microbiologia Avançada e Coordenadora de Estágio Supervisionado de Biomedicina.

No ano de 2017, ingressou como mestranda no programa de Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), pesquisando na área de Biotecnologia aplicada à saúde.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	ix
Lista de abreviaturas	x
Resumo	xi
Abstract	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO	1
1.2 NOCICEPÇÃO	04
1.3 CÂNCER	06
1.3.1 TRATAMENTO DO CÂNCER	08
1.3.2 Quimioterapia	08
1.3.2 MODELOS DE TUMORES EXPERIMENTAIS	11
1.3.2.1 Tumor de Ehrlich	11
1.4 BASES DE SCHIF	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 - OBJETIVO GERAL	16
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 COMPOSTO (e)-2-(((p-tolilimino)metil)fenol	17
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	17
3.3 ENSAIOS <i>in vitro</i>	17
3.3.1 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE	17
3.3.1.1 ATIVIDADE HEMOLITICA	17
3.3.1.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO BAÇO DE CAMUNDONGOS	18
3.3.1.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH (TAE)	19
3.3.1.4 VIABILIDADE CELULAR	19
3.3.1.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE PELO ENSAIO COLORIMÉTRICO COM SAL DE TETRAZOLIUM (MTT)	19

3.4 ENSAIOS <i>in vivo</i>	19
3.4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO PTMF	19
3.4.2 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS	20
3.4.3 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS	20
3.4.4 DOSAGEM DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)	21
3.4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NOCICEPTIVA DO PTMF	21
3.4.5.1 Teste de contorções abdominais induzida por ácido acético	21
3.4.5.2 Teste da Formalina	22
3.4.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO PTMF	22
3.4.6.1 Avaliação de micronúcleo do PTMF	22
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
7 ANEXOS	53

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 01: Eventos envolvidos no Processo Inflamatório agudo	02
Figura 02: Cascata do ácido araquidônico	03
Figura 03: Características moleculares para o desenvolvimento do câncer	07
Figura 04: (A) Camundongo Balb-C 14 dias após injeção de células do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE). (B) Células TAE, aumento de 1000X	13
Figura 05: Formação de base de Schiff a partir de aldeído ou cetona	14
Figura 06: Composto (<i>E</i>)-2-(((p-tolilimino)metil)fenol	17
Figura 07: Avaliação da atividade hemolítica do composto (<i>E</i>)-2-(((p-tolilimino)metil)fenol em eritrócitos murinos	25
Figura 08 Determinação da viabilidade de células do baço e TAE tratada ou não com o composto (<i>E</i>)-2-(((p-tolilimino)metil)fenol.	27
Figura 09 Determinação do numero de células totais de animais inoculados com TAE, tratados ou não com composto (<i>E</i>)-2-(((p-tolilimino)metil)fenol	29
Figura 10 Determinação da contagem diferencial das células (Leucócitos X TAE) da cavidade peritoneal dos camundongos inoculados com TAE, tratados ou não com composto (<i>E</i>)-2-(((p-tolilimino)metil)fenol.	30
Figura 11: Determinação da contagem diferencial das células da cavidade peritoneal dos camundongos inoculados com TAE, tratados ou não com (<i>E</i>)-2-(((p-tolilimino)metil)fenol	31

Figura 12: Avaliação do efeito do composto sintético (<i>E</i>)-2-(((<i>p</i> -tolilimino)metil)fenol sobre a migração de leucócitos para cavidade peritoneal de camundongos	32
Figura 13: Avaliação do efeito do composto sintético (<i>E</i>)-2-(((<i>p</i> -tolilimino)metil)fenol sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos.	33
Figura 14: Avaliação do efeito do composto sintético (<i>E</i>)-2-(((<i>p</i> -tolilimino)metil)fenol sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos pela dosagem da enzima MPO dos exudados do lavado peritoneal dos camundongos.	35
Figura 15: Avaliação do efeito antinociceptivo do composto sintético (<i>E</i>)-2-(((<i>p</i> -tolilimino)metil)fenol por meio do teste de contorções abdominais em camundongos.	36
Figura 16: Avaliação do efeito antinociceptivo do composto sintético (<i>E</i>)-2-(((<i>p</i> -tolilimino)metil)fenol por meio do teste de formalina em camundongos.	37
Figura 17: Determinação do número de micronúcleo em eritrócitos do sangue dos camundongos tratados ou não com composto (<i>E</i>)-2-(((<i>p</i> -tolilimino)metil)fenol.	38

LISTA DE ABREVIATURAS

UCDB - Universidade Católica Dom Bosco
PTMF - (E)-2-(((para-tolilimino)metil)fenol
a.C. – Antes de Cristo
COX - Ciclooxigenase
MTT - (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
WHO - World Health Organization
INCA - Instituto Nacional do Cancer
DNA - Ácido desoxirribonucleico
RNA - Ácido Ribonucleico
UFGD - Universidade Federal da Grande Dourados
µg - Micrograma
mL - Mililitro
g - Gramas
°C - Grau Celsius
µL - Microlitro
nm - Nanômetro
mg - Miligrama
Kg - Kilograma
RPM - Rotação por minuto
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute medium*
EDTA - Ácido Etilenodiaminotetra acético
CO₂ - Dióxido de Carbono
i.p. - intraperitonealmente
ANOVA - Teste de Análise de Variância
S/Trat. - Sem Tratamento
TNF-α - fator de necrose tumoral alfa
IL- Interleucina
IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor

TAE – Tumor ascítico de Ehrlich

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

MPO – Enzima mieloperoxidase

RESUMO

O processo inflamatório é uma complexa resposta biológica contra a lesão tecidual (por exemplo, estresse, irritantes e radiações) e infecções (microbianas e virais). A inflamação está associada ao processo de várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, diabetes, câncer, obesidade, asma, doenças autoimunes, aterosclerose e artrite reumatóide. Os fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais, mais utilizados no processo inflamatório, possuem inúmeros efeitos colaterais, tais como: irritação gástrica, ulceração, sangramento, insuficiência renal, insuficiência hepática, cefaléia, anemia hemolítica, exacerbação de asma, erupções cutâneas, angioedema e prurido; o que motiva a constante busca por novos compostos com poder anti-inflamatório. Nesse contexto, a modificação molecular é uma alternativa com grande perspectiva de sucesso, já que estudos que visam o planejamento e desenvolvimento de fármacos têm mostrado alta aplicabilidade nas mais diversas áreas de saúde. Os compostos constituídos pelas bases de Schiff, são potenciais candidatos, apresentando uma variada atividade biológica. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade farmacológica do composto sintético (*E*)-2-(((para-tolilimino)metil)fenol (PTMF) *in vitro* e *in vivo*. Para atingir o objetivo do trabalho foram utilizados os seguintes métodos: avaliação da atividade citotóxica pelo método de hemólise (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg / mL), viabilidade celular em células do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) e do baço de murinos *in vitro*, pelo método do MTT (100, 50 e 25 µg/mL) em 24 e 48 horas. A avaliação antitumoral *in vivo* do PTMF foi conduzida por 14 dias com animais tratados ou não com o composto. A atividade anti-inflamatória foi avaliada pelo método de migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos (100, 50 e 25 µg/animal). A atividade antinociceptiva foi avaliada pelo método de contorções abdominais em camundongos (100 µg/animal) e teste da formalina em camundongos (100 µg/animal), e a atividade genotóxica, pelo método de micronúcleo. O PTMF não apresentou atividade hemolítica em nenhuma das concentrações testadas. O PTMF foi capaz de reduzir, no tempo de 24 horas, a viabilidade das células do baço em 12,6%; na concentração de 100 µg/mL e 17% com as concentrações de 50 e 25 µg/mL. Após 24 horas de incubação o PTMF foi capaz de reduzir a viabilidade das células do TAE em 36%; na concentração de 100 µg/mL, 7% na concentração de 50 µg/mL e 16% na concentração de 25 µg/mL. Após 48 horas de incubação, nas concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL, foi observada uma redução da viabilidade das células do baço de 38%, 33% e 31% respectivamente e um efeito mais expressivo do composto diminuindo a viabilidade das células do TAE em 61,6% na concentração de 100 µg/mL; 57,3% na concentração de 50 µg/mL e 58,2% na concentração de 25 µg/mL. No ensaio antitumoral *in vivo* não foi observada diferença entre o número de células tumorais e leucócitos das cavidades peritoneais dos camundongos tratados ou não com PTMF; e na contagem diferencial dos leucócitos, o aumento de células tumorais não foi acompanhado pelo aumento do número de leucócitos. O PTMF foi capaz de inibir a migração de neutrófilos nas doses de 100, 50 e 25 µg/animal em 35%, 70% e 45%, respectivamente. O PTMF demonstrou uma atividade antinociceptora reduzindo o número de contorções abdominais na dose administrada (100 µg/animal) e no ensaio da formalina, o composto (100 µg/animal) foi capaz de reduzir as lambeduras dos animais na fase 2 do teste, semelhante ao controle de indometacina. No ensaio de genotoxicidade o composto não foi capaz de induzir micronúcleos em hemácias policromáticas. Novos ensaios serão realizados para elucidar os mecanismos de ação desempenhado pelo PTMF.

Palavras-Chave: Bases de Schiff; Inflamação, Nocicepção, Migração de Neutrófilos, Antitumoral.

ABSTRACT

The inflammatory process is a complex biological response against tissue damage (stress, irritants and radiations), infections (microbial and viral). Inflammation is associated with the onset of various diseases including cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases, diabetes, cancer, obesity, asthma, autoimmune diseases, atherosclerosis, and rheumatoid arthritis. The non-steroidal anti-inflammatory drug, most used in the inflammatory process, has numerous side effects such as: gastric irritation, ulceration, bleeding, renal failure, hepatic insufficiency, headache, haemolytic anemia, exacerbation of asthma, rash, angioedema and pruritus; which motivates the constant search for new compounds with anti-inflammatory power. In this context, molecular modification is an alternative with a great prospect of success, since studies that aim at the planning and development of drugs have shown high applicability in the most diverse areas of health. Schiff bases, is a powerful candidate, presenting a varied biological activity. The objective of this study was to evaluate the pharmacological activities of the synthetic compound (*E*)-2-(((para-tolilimino)metil)fenol (PTMF). In order to reach the objective of the work, the following methods were used: cytotoxic activity was evaluated by the hemolysis method (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and cell viability in Ehrlich Ascitic Tumor (EAT) cells and of the murine spleen in vitro by the MTT method (100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$). In vivo antitumor evaluation of PTMF was conducted for 14 days with animals treated or not with the PTMF. The anti-inflammatory activity was evaluated by the neutrophil migration method to the peritoneal cavity of mice (100, 50 e 25 $\mu\text{g/mice}$). The antinociceptive activity was evaluated by the abdominal contortion method in mice (100 $\mu\text{g} / \text{mice}$) and formalin test in mice (100 $\mu\text{g} / \text{mice}$). The genotoxic activity was evaluated by the micronucleus method. The PTMF did not show hemolytic activity at any of the concentrations tested. PTMF was able to reduce the viability of spleen cells in 12.6% in 24 hours; at the concentration of 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 17% at the concentrations of 50 and 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$. After 24 hours of incubation the PTMF was able to reduce the viability of the EAT cells by 36%; at a concentration of 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 7% at concentrations of 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 16% at a concentration of 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$. After 48 hours of incubation at concentrations of 100, 50 and 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$, a reduction in spleen cell viability of 38%, 33% and 31% respectively was observed, and a more expressive effect of the compound decreasing the viability of the cells of the spleen. EAT in 61.6% for concentration of 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$; 57.3% for 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 58.2% for 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$. In the in vivo antitumor assay no difference was observed between the number of tumor cells and leukocytes from the peritoneal wells of mice treated or not with PTMF; and in differential leukocyte counts, the increase in tumor cells was not accompanied by an increase in the number of leukocytes. PTMF was able to inhibit the migration of neutrophils at doses of 100, 50 and 25 $\mu\text{g} / \text{animal}$ in 35%, 70% and 45% respectively. The PTMF demonstrated an antinociceptive activity reducing the number of abdominal writhings at the administered dose (100 $\mu\text{g} / \text{mice}$) and in the formalin test the compound (100 $\mu\text{g} / \text{mice}$) was able to reduce the licking of the animals in phase 2 of the test, similar to the control of indomethacin. In the genotoxicity assay the compound was not able to induce micronuclei in polychromatic red cells. New trials will be conducted to elucidate the mechanisms of action performed by the PTMF.

Key words: Schiff's bases, Inflammation, Nociception, Neutrophil Migration, Antitumor.

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação foi caracterizada clinicamente em 30 a.C. pelo médico romano Aulus Cornélius Celsus por quatro sinais cardinais: calor, rubor, edema e dor. Cláudio Galeno acrescentou a perda da função do membro afetado, após algum tempo (Gilroy *et al.*, 2004). O processo inflamatório é caracterizado como uma reação microvascular induzida por um agente agressor aos tecidos e, consequentemente, movimentação de elementos intravasculares, como fluidos, células e moléculas para o espaço extravascular (Siqueira Junior e Dantas, 2000; Cranshaw e Griffiths, 2003). Todo elemento que possa estimular o organismo pode ser considerado como eventual agente etiológico da inflamação, dentre eles pode-se destacar agentes químicos, físicos e biológicos (Tracy, 2006).

O processo inflamatório objetiva identificar, neutralizar e eliminar o agente agressor, assim como induzir a reparação de células do epitélio (reepitelização), do parênquima (regeneração), do estroma (cicatrização) e de tecidos mortos (Hersh *et al.*, 1998; Cone, 2001).

A resposta inflamatória pode ser classificada em reação aguda e crônica. A reação aguda é caracterizada em diferentes fases, mediada por mecanismos diferentes. Na fase aguda, de duração variável, predominam fenômenos vasculares-exsudativos (vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar). A vasodilatação, o engurgitamento de capilares e arteríolas, promove um aumento do fluxo sanguíneo na área lesada e, este efeito, é responsável pelo rubor na área comprometida, podendo ocorrer a elevação da temperatura no local (Kunnumakkara *et al.*, 2018).

O aumento da permeabilidade vascular consiste na saída de um fluido rico em proteínas (exsudato) para o meio extravascular resultando em acúmulo deste, no local da lesão (edema) (Patterson e Lum, 2001; Amulic *et al.*, 2012). O edema tecidual comprime as terminações nervosas causando dor e os tecidos afetados perdem suas funções normais (Kunnumakkara *et al.*, 2018) (figura 1). Em decorrência do aumento da permeabilidade vascular, a velocidade da circulação diminui (estase sanguínea) contribuindo para a marginação dos leucócitos (Rosales, 2018).

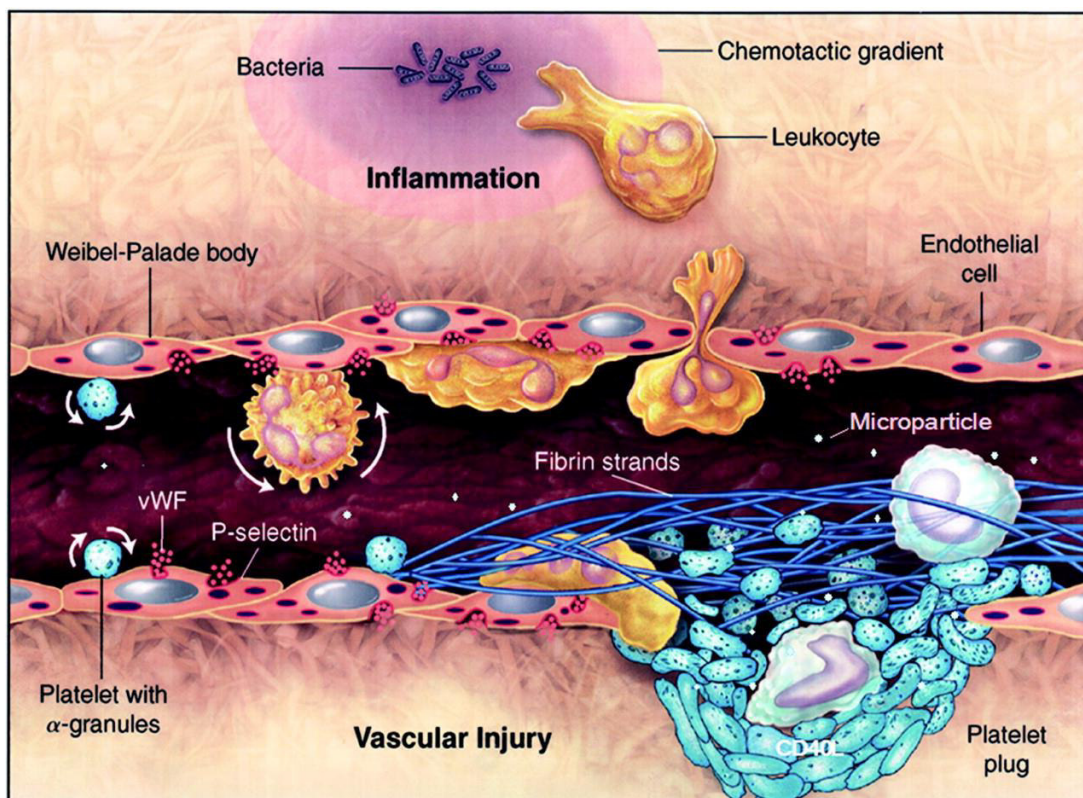


Figura 1: Eventos envolvidos no Processo Inflamatório agudo. Fonte: New Links Between Inflammation and Thrombosis, Volume: 25, Issue: 7, Pages: 1321-1324, DOI: (10.1161/01.ATV.0000166521.90532.44)

Posteriormente, ocorre uma fase subaguda, caracterizada por infiltração de leucócitos e de células fagocíticas para o sítio da lesão. No local da lesão, os neutrófilos e macrófagos reconhecem o agente agressor, englobam e fagocitam (Rodrigues *et al.*, 2002).

Uma variedade de mediadores químicos do sistema circulatório, das células inflamatórias e do tecido lesionado contribuem ativamente e ajustam a resposta inflamatória (Halliwell e Gutteridge, 2015). Os mediadores químicos liberados incluem aminas vasoativas, como histamina, serotonina, bradicinina e eicosanóides como os tromboxanos, leucotrienos e prostaglandinas). A histamina é liberada em pouca quantidade pelos basófilos para manter a resposta de fase aguda durante eventos de inflamação (Gilfillan e Metcalfe, 2011). A serotonina é produzida via descarboxilação do triptofano e é armazenada em grânulos (Platko, 2015).

A bradicinina é um nanopeptídeo formado a partir de proteínas precursoras do sistema calicreína-cinina (Baumann *et al.*, 2011). Dois ou mais receptores distintos estão presentes para as bradicininas e são denominados B1 e B2 (Raskin e Meyer, 2015).

O ácido araquidônico, que representa o principal componente dos fosfolípidios da membrana em todas as células, é um dos substratos mais importantes na síntese de mediadores biologicamente ativos da inflamação chamados eicosanóides (Mak *et al.*, 2013). Os eicosanóides incluem os produtos da 5-lipoxigenase (leucotrieno e ácido 5-hidroxi-eicosatetraenóico), ciclooxygenases (prostaglandinas e tromboxanos) e 12-lipoxigenase (ácido 12-hidroxi-eicosatetraenóico) (figura 2) (Piomelli, 2013).

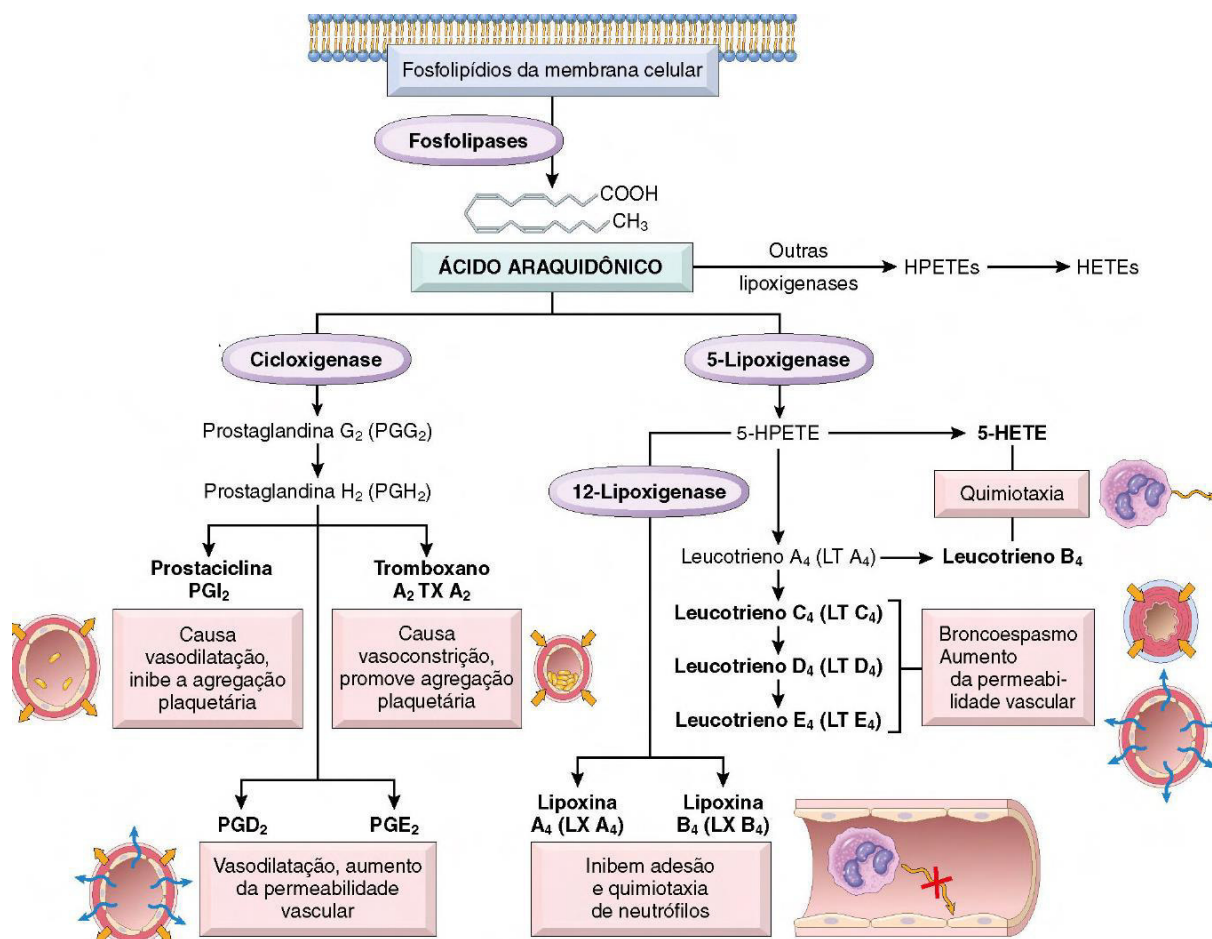


Figura 2 Cascata do ácido araquidônico.

Fonte: (Kumar *et al.*, 2013)

A ciclooxygenase (COX) é uma enzima envolvida na síntese de eicosanóides, incluindo prostaglandinas pró-inflamatórias potentes e metabolismo do ácido araquidônico, que existe em pelo menos duas isoformas: COX -1 e COX -2 (Bailey, 2013). A COX-1 é produzida constitutivamente na maioria dos tipos de células de mamíferos e plaquetas. Também é secretado no endotélio vascular, estômago, epitélio uterino e rim. Por outro lado, a COX -1 (não apenas a COX-2) tem um papel

patológico no corpo do animal, e também pode ser estimulada no local da inflamação (Zhong *et al.*, 2012).

As prostaglandinas (prostaglandina E2 e prostaglandina b) estão envolvidas no processo inflamatório, aumentando a permeabilidade vascular e fortalecendo o resultado de outros mediadores inflamatórios como serotonina e histamina, contribuindo para a vermelhidão, aumento do fluxo sanguíneo, e exsudação do plasma na área da inflamação aguda que leva ao edema. Estas prostaglandinas produzem hiperalgesia, afetando as fibras C aferentes. Além disso, a prostaglandina E2 age sobre os neurônios na rede termorreguladora do hipotálamo, causando aumento na temperatura corporal (Newton e Roberts, 2016).

As prostaglandinas também desempenham função importante na patogênese de vários tipos de câncer, como mama, fígado e pulmão, com superexpressão de COX -2 e superprodução de prostaglandina (Jordan, 2008).

Além de muitas células estromais, fibroblastos e células endoteliais, cada citocina pode ser liberada de muitos tipos de células (Seta e Bachschmid, 2012). As citocinas têm efeitos importantes na atividade de muitas células. No entanto, são de particular importância devido à regulação do sistema imunológico (Guo *et al.*, 2013).

A produção de citocinas induz a liberação de resposta de fase aguda. Interleucina (IL) -1 β , IL-8, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e IL-12 são as citocinas incluídas na resposta da fase aguda do processo inflamatório (Rubin e Reisner, 2009). Nesse caso, essa resposta é limitada à área onde ocorre dano tecidual. Isso levará a um aumento na densidade de citocinas derivadas de macrófagos no plasma (Opriessnig *et al.*, 2011).

Os mediadores inflamatórios também induzem a ativação ou a sensibilização de neurônios sensoriais, o que pode resultar em dor, alodínia ou hiperalgesia (Collins *et al.*, 1999).

1.2 NOCICEPÇÃO

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) definiu dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão”; ainda, a dor é a conscientização de um desconforto agudo ou crônico que ocorrem em vários níveis de gravidade resultante de uma lesão, doença ou estresse emocional, como é

evidenciado por mudanças biológicas e comportamentais. A dor é um dos sinais clássicos do processo inflamatório e decorre da sensibilização dos nociceptores (Lorenz e Casey, 2005).

A dor é um complexo mecanismo neurológico de percepção de estímulos potencialmente nocivos capazes de produzir alterações na homeostase do organismo animal. Além dos mecanismos neurológicos, há o estresse gerado pela dor que atrapalha e retarda a recuperação do organismo, portanto, seu controle é um dos tratamentos mais importante para o paciente clínico e muitas vezes é a única opção para pacientes oncológicos (terapia paliativa) (Leite Pereira *et al.*, 2011).

A dor inflamatória aguda é caracterizada por hipernocicepção devido à sensibilização de neurônios nociceptivos sensoriais primários, referida também como hiperalgesia ou alodinia (Millan, 1999). Após injúria tecidual, mediadores específicos são liberados e agem em receptores metabotrópicos na membrana neuronal, disparando a ativação dos segundos mensageiros. As aminas simpáticas e os eicosanóides são os mais importantes mediadores primários responsáveis pela hipernocicepção mecânica em ratos (Khasar *et al.*, 1999).

Na última década, foi demonstrado que o estímulo inflamatório não estimula diretamente a liberação de mediadores hipernociceptivos primários, mas que sua liberação é precedida de uma cascata de citocinas. Experimentos já realizados em ratos sugerem que, há uma cascata de liberação de citocinas que constitui uma ligação entre a injúria e a liberação de mediadores hipernociceptivos primários. Ratores que receberam carragenina tiveram hipernocicepção mecânica induzida através de uma cascata de citocinas, liberadas por células locais ou migratórias, iniciadas pela liberação de bradicinina (Ferreira, 1993).

Células dendríticas, macrófagos, linfócitos e mastócitos são componentes teciduais que, após o reconhecimento do estímulo inflamatório, liberam uma cascata de citocinas, as quais exercem função essencial no desenvolvimento da dor inflamatória, bem como em outros eventos inflamatórios. As primeiras citocinas descritas como participantes no desenvolvimento da dor inflamatória e/ou neuropática foram a IL-1 β , TNF- α , IL-6, e as quimiocinas IL-8, CINC-1 e quimiocina derivada de queratinócitos (KC). Recentemente, foi demonstrado que IL-18 e IL-12 também induzem hipernocicepção (Verri Jr *et al.*, 2006).

Inflamação e dor são eventos intimamente relacionados ao câncer. Em 1863, Rudolf Virchow propôs pela primeira vez a função da inflamação no câncer, depois de observar a presença de leucócitos no tecido neoplásico (Balkwill e Mantovani, 2001). Uma vez que a observação inicial de Virchow sugeriu que a inflamação e o câncer estão ligados, evidência empírica sublinhou inflamação tanto como a causa como consequência de câncer (Kundu e Surh, 2008; Grivennikov *et al.*, 2010). O meio inflamatório promove um microambiente celular que favorece a expansão das alterações genômicas e o início da carcinogênese (Mantovani, 2009). Enquanto a inflamação aguda é predominantemente considerada um processo autolimitante e um importante componente do sistema imunológico com significado terapêutico, a resolução inadequada ou incompleta das respostas inflamatórias frequentemente leva a várias doenças crônicas, incluindo o câncer (Aggarwal *et al.*, 2009; Grivennikov e Karin, 2010). De fato, numerosos estudos epidemiológicos e clínicos indicaram que a inflamação crônica não resolvida promove e exacerba a malignidade de um tumor (Demaria *et al.*, 2010).

1.3 CÂNCER

O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo e representou 8,8 milhões de mortes em 2015. O câncer de pulmão, próstata, colorretal, estomacal e hepático são os tipos mais comuns de câncer nos homens, enquanto os cânceres mamários, colorretais, pulmonares, cervix e estomacais são o mais comum entre as mulheres (WHO,2018).

A palavra câncer vem do grego *karkínos*, que quer dizer caranguejo, e foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates; 460 e 377 a.C. O fato de ter sido detectado em múmias egípcias comprova que ele já comprometia o homem há mais de 3 mil anos antes de Cristo (INCA,2012).

É uma doença caracterizada pelo crescimento e multiplicação descontrolados de células com a capacidade de invadir diversos tecidos. Envolve várias etapas que modificam células saudáveis em células cancerígenas, evoluindo para hiperproliferação com capacidade angiogênicas, potencial invasivo e metástases. Atualmente, é um importante problema de saúde pública em todo o mundo, já que é uma das principais causas de mortalidade e morbidade nos países ocidentais e a segunda

maior causa de morte nos países do terceiro mundo, gerando uma carga social significativa (Ferlay *et al.*, 2015; Rolim *et al.*, 2017).

É uma doença complexa que envolve fatores moleculares, celulares e teciduais (Carrassa e Damia, 2011). Para que a doença se desenvolva, várias alterações são necessárias, entre elas: perda da sinalização da proliferação celular; insensibilidade a sinais supressores de crescimento; habilidade de invasão e metástase; resistência celular; indução da angiogênese; potencial replicativo ilimitado; instabilidade genômica e mutação; inflamação; e mais recentemente: o papel do sistema imune na progressão do tumor; e a reprogramação da energia celular (Figura 3) (Hanahan e Weinberg, 2011).



Figura 3. Características moleculares para o desenvolvimento do câncer. Fonte: Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011.

A carcinogênese envolve três fases sendo elas: iniciação, promoção e progressão tumoral (Pitot, 1993). No desenvolvimento tumoral a primeira fase é o processo de iniciação, podendo ser desencadeado por agentes biológicos, físicos ou químicos, e fatores genéticos. Após a primeira fase o câncer se torna irreversível, devido a mutação ser passada para células filhas, evoluindo assim para a segunda

fase do desenvolvimento tumoral. No processo de promoção pode haver ação de promotores (específicos ou inespecíficos) que podem levar à proliferação das células mutantes. Nessa fase, o tumor ainda não se encontra em estado de malignidade, mas para que alcance a segunda fase de progressão tumoral, vai depender do efeito dos promotores na expansão clonal das células iniciadas, que podem levar à segunda fase de progressão tumoral (Klaunig *et al.*, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011; Liu *et al.*, 2015). A terceira fase de progressão do tumor tem várias modificações e caracteriza-se pela malignidade das células, juntamente a proliferação e angiogênese (Ziyad e Iruela-Arispe, 2011).

1.3.1 TRATAMENTO DO CÂNCER

As abordagens terapêuticas contra o câncer podem incluir a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia ou ainda a associação desses recursos. O tipo de tratamento adotado dependerá do estadiamento clínico e do tipo histológico do tumor, sendo o mais comum a quimioterapia.

1.3.2 Quimioterapia

A quimioterapia é o método que utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos, no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é chamada de quimioterapia antineoplásica (Apetoh *et al.*, 2007).

O primeiro quimioterápico antineoplásico foi desenvolvido a partir do gás mostarda, usado nas duas Guerras Mundiais como arma química. Após a exposição de soldados a este agente, observou-se que eles desenvolveram hipoplasia medular e linfóide, o que levou ao seu uso no tratamento dos linfomas malignos. A partir da publicação, em 1946, dos estudos clínicos feitos com o gás mostarda e das observações sobre os efeitos do ácido fólico em crianças com leucemias, verificou-se avanço crescente da quimioterapia antineoplásica. Atualmente, quimioterápicos mais ativos e menos tóxicos encontram-se disponíveis para uso na prática clínica. Os avanços verificados nas últimas décadas, na área da quimioterapia antineoplásica, têm facilitado consideravelmente a aplicação de outros tipos de tratamento de câncer e permitido maior número de curas (Clements *et al.*, 2002).

Os agentes utilizados no tratamento do câncer afetam tanto as células normais como as neoplásicas, porém eles acarretam maior dano às células malignas

do que às dos tecidos normais, devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos dessas duas populações celulares. Os citotóxicos não são letais às células neoplásicas de modo seletivo. As diferenças existentes entre o crescimento das células malignas e os das células normais e as pequenas diferenças bioquímicas verificadas entre elas provavelmente se combinam para produzir seus efeitos específicos (Love, 1994).

O DNA, material genético de todas as células, age como modelador na produção de formas específicas de RNA transportador, RNA ribossômico e RNA mensageiro e, deste modo, determina qual enzima será sintetizada pela célula. As enzimas são responsáveis pela maioria das funções celulares, e a interferência nesses processos irá afetar a função e a proliferação tanto das células normais como das neoplásicas. A maioria das drogas utilizadas na quimioterapia antineoplásica interfere de algum modo nesse mecanismo celular, e a melhor compreensão do ciclo celular normal levou à definição clara dos mecanismos de ação da maioria das drogas. A partir dessa definição, as drogas podem ser classificadas conforme a sua atuação sobre o ciclo celular em (Love, 1994; Rang *et al.*, 2015):

- a) Ciclo-inespecíficos - Aqueles que atuam nas células que estão ou não no ciclo proliferativo, como, por exemplo, a mostarda nitrogenada;
- b) Ciclo-específicos - Os quimioterápicos que atuam somente nas células que se encontram em proliferação, como é o caso da ciclofosfamida;
- c) Fase-específicos - Aqueles que atuam em determinadas fases do ciclo celular, como, por exemplo, o metotrexato (fase S), o etoposído (fase G2) e a vincristina (fase M).

A quimioterapia pode ser feita com a aplicação de um ou mais quimioterápicos. O uso de drogas isoladas (monoquimioterapia) mostrou-se ineficaz em induzir respostas completas ou parciais significativas, na maioria dos tumores, sendo atualmente de uso muito restrito (BRASIL, 2007).

A poliquimioterapia é de eficácia comprovada e tem como objetivos atingir populações celulares em diferentes fases do ciclo celular, utilizar a ação sinérgica das drogas, diminuir o desenvolvimento de resistência às drogas e promover maior resposta por dose administrada.

Os quimioterápicos não atuam exclusivamente sobre as células tumorais. As estruturas normais que se renovam constantemente, como a medula óssea, os pêlos

e a mucosa do tubo digestivo, são também atingidas pela ação dos quimioterápicos. No entanto, como as células normais apresentam um tempo de recuperação previsível, ao contrário das células anaplásicas, é possível que a quimioterapia seja aplicada repetidamente, desde que observado o intervalo de tempo necessário para a recuperação da medula óssea e da mucosa do tubo digestivo. Por esse motivo, a quimioterapia é aplicada em ciclos periódicos. Os efeitos terapêuticos e tóxicos dos quimioterápicos dependem do tempo de exposição e da concentração plasmática da droga. A toxicidade é variável para os diversos tecidos e depende da droga utilizada. Nem todos os quimioterápicos ocasionam efeitos indesejáveis, tais como mielo-depressão, alopecia e alterações gastrintestinais (náuseas, vômitos e diarreia) (Love, 1994; Rang *et al.*, 2015).

A cada dia, medicamentos novos são postos à disposição dos oncologistas visando à redução da toxicidade dos quimioterápicos à manutenção da quimioterapia (fatores de crescimento hematopoiético e antieméticos, por exemplo), e a intensificação dos quimioterápicos (ácido folínico, por exemplo). O transplante de medula óssea também tem permitido superar o problema da toxicidade hematológica da quimioterapia como fator limitante do tratamento, a par de constituir-se ele próprio em um método terapêutico de doenças hematológicas. É preciso salientar, porém, que a maioria desses medicamentos e métodos tem se mostrado inacessível à maioria dos pacientes, mais por seus custos do que por sua disponibilidade (comercial, institucional ou de doadores de órgãos); além do que eles também se acompanham de efeitos tardios ainda não totalmente conhecidos nem bem controlados (Gotwals *et al.*, 2017).

Segundo Gotwals *et al.*, 2017; a maior falha da quimioterapia antineoplásica é devida à resistência às drogas. Essa resistência ocorre ou porque as populações celulares desenvolvem nova codificação genética (mutação) ou porque são estimuladas a desenvolver tipos celulares resistentes ao ser expostas às drogas, o que lhes permite enveredar por vias metabólicas alternativas, através da síntese de novas enzimas. É também observada resistência nos casos em que o tratamento é descontinuado, quando a população tumoral é ainda sensível às drogas, em que a quimioterapia é aplicada a intervalos irregulares e em que doses inadequadas são administradas. A partir dos anos setenta, tem se detectado, em laboratório, um tipo de resistência cruzada apresentada por linhagens celulares, entre quimioterápicos diversos, cuja característica comum é serem derivados de produtos naturais. Esse

tipo de fenômeno passou a ser denominado "resistência a múltiplas drogas" e está relacionado à diminuição da concentração intracelular do quimioterápico e a presença de uma glicoproteína, ligada à membrana plasmática, a glicoproteína 170-P (Gotwals *et al.*, 2017). Desse modo, é possível reverter o mecanismo de resistência a partir do uso de compostos que inativem a glicoproteína 170-P.

É importante enfatizar a vantagem de iniciar-se a quimioterapia quando a população tumoral é pequena, a fração de crescimento é grande e a probabilidade de resistência por parte das células com potencial mutagênico é mínima. Essas são as condições ideais para se proceder à quimioterapia adjuvante (E Silva *et al.*, 2017).

1.3.2 MODELOS DE TUMORES EXPERIMENTAIS

Os avanços na ciência têm contribuído para a melhoria no diagnóstico, pesquisa e nas estratégias terapêuticas dos tumores. O desenvolvimento de modelos experimentais de tumores, muito tem contribuído para o estudo de seu desenvolvimento, mecanismos envolvidos nas metástases e no teste de substância com ação antineoplásica. Na área da oncologia, diversos modelos experimentais são propostos buscando atender a esses objetivos. De modo geral, quer para os estudos básicos de biologia tumoral, quer para a investigação de novas modalidades terapêuticas (cirúrgica, medicamentosa, radioterápica) dispõem-se hoje de uma variedade de tumores experimentais já catalogados. Dentre eles alguns exemplos são os tumores ascítico e sólido de Ehrlich (Arcangeli *et al.*, 1983), melanoma (B16 e F10) (Altmann *et al.*, 1985), tumor hepático experimental (VX-2) (Hossne, 2002), tumor de cólon (MC38, MC32a e CT 26) (Hörig *et al.*, 2001).

Os tumores experimentais podem ser mantidos em laboratório, por meio de cultura de células (tumor de Walker, melanoma, cólon), de transplantes em hospedeiros susceptíveis (tumor de Ehrlich) e/ou induzidos por substâncias químicas (tumor de tireóide) (Kavarana *et al.*, 1999).

1.3.2.1 Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich foi primeiramente descrito por Paul Ehrlich em 1906. É uma neoplasia de camundongos, transplantável constituída de células de origem epitelial, um adenocarcinoma de mama (Ehrlich e Apolant, 1906). O tumor de Erlich

desenvolve-se em cavidades serosas como a abdominal e pleural, bem como em músculos; não se observa, porém, crescimento em vísceras parenquimatosas, como fígado. As formas ascítica ou sólida de seu crescimento ocorre conforme o local de sua inoculação (WAINSTEIN, 1999). Quando inoculado na cavidade abdominal, as células tumorais crescem na sua forma ascítica desenvolvendo uma carcinomatose peritoneal. Essa forma tem como característica o grande acúmulo de fluídos no abdômen (ascite) e uma baixa resposta inflamatória, com pequena infiltração de macrófagos e um influxo tardio de células polimorfonucleares para a cavidade (a partir de sexto dia após a inoculação) (Hossne, 2002).

O tumor de Ehrlich sólido pode ser descrito morfológicamente com células com alto grau de atipias (anaplasia), caracterizadas por nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo - citoplasma maior que a das células normais. O estroma é constituído por fibras colágenas e delicados capilares (Ehrlich e Apolant, 1905; Ozaslan *et al.*, 2011).

O carcinoma de Ehrlich pode ser caracterizado como um tumor indiferenciado, que pode ter alta capacidade de transplante sem regressão, rápida proliferação podendo chegar a 100% de malignidade e pode apresentar uma característica similar aos tumores humanos sensíveis a quimioterapia (Kaleoğlu e İşli, 1977).

O tumor de Ehrlich possui capacidade de crescimento em quase todas as linhagens de camundongos, provavelmente porque durante o processo de transformação maligna suas células perderam os antígenos de histocompatibilidade H-2 (Carry *et al.*, 1979).

Devido a sua baixa imunidade, esta neoplasia apresenta crescimento bastante agressivo, com proliferação celular acelerada e invasão de tecidos adjacentes. A virulência do tumor de Ehrlich não é alterada pela linhagem do camundongo utilizada, porém cada linhagem apresenta uma reação imunológica específica à presença do tumor, fato que altera a sobrevivência de acordo com a linhagem utilizada (Kodama e Kodama, 1975). O tumor de Ehrlich é um bom modelo para estudos envolvendo citologia, por crescer na forma ascítica, como mostra na figura 4A, o que permite a obtenção de células tumorais isoladas, o que pode-se ver conforme a figura 4B (Hossne, 2002).

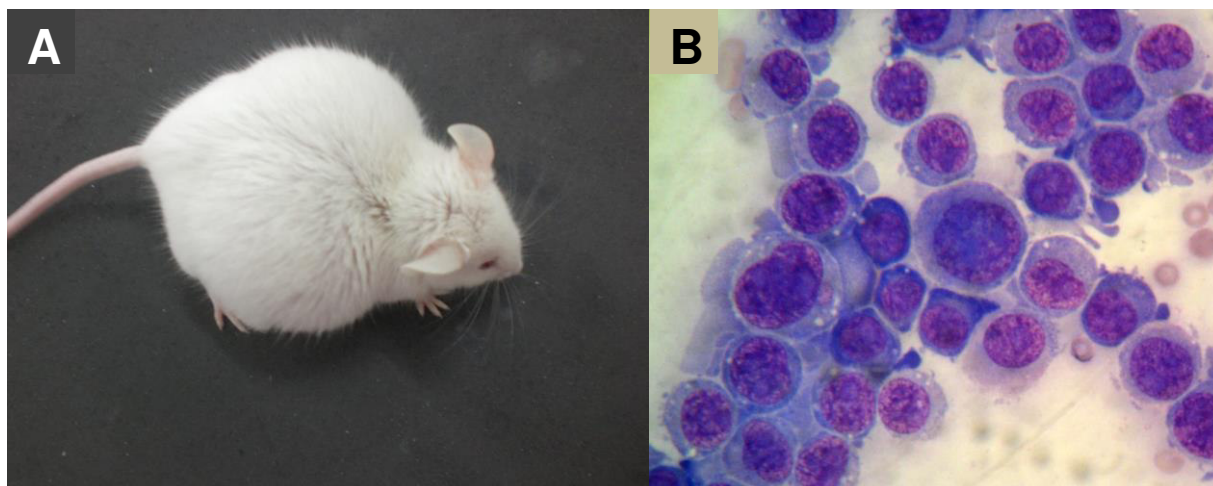


Figura 4: (A) Camundongo Balb-C 14 dias após injeção de células do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE). (B) Células TAE, aumento de 1000X. Fonte: Autor

A descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é um processo complexo, e de alto custo, embasado principalmente em inovações científicas e tecnológicas. A química medicinal, de reconhecido papel central no processo de produção e desenvolvimento de fármacos, caracteriza-se por seu relevante caráter multidisciplinar, abrangendo diversas especialidades, tais como química orgânica, bioquímica, farmacologia, informática, biologia molecular e estrutural, entre outras. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (da sigla inglesa IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*), a química medicinal envolve a invenção, a descoberta, o planejamento, a identificação, a preparação e a interpretação do mecanismo de ação molecular de compostos biologicamente ativos. Além da descoberta de moléculas bioativas, a química medicinal também incorpora os estudos do metabolismo e das relações entre a estrutura química e atividade (Wermuth, 2011). As bases de Schiff representam um importante grupo de compostos na química orgânica, pois são materiais de partida na síntese de produtos industriais onde as ligações carbono-nitrogênio estão presentes sendo um importante composto a ser estudado (Garza-Ortiz *et al.*, 2008).

1.4 BASES DE SCHIFF

Bases de Schiff são compostos provenientes da condensação de aminas primárias com composto carbonílicos primeiramente sintetizadas por Hugo Schiff (Tofazzal *et al.*, 2001). As bases de Schiff possuem grupos imina ($C=N$) com um

grupo R diferente de hidrogênio ligado ao nitrogênio, com fórmula mínima $R_2C=NR'$. Representam uma classe importante de ligantes em química de coordenação e apresentam aplicação em diferentes campos (Tofazzal *et al.*, 2001; Shaker *et al.*, 2009). As bases de Schiff possuem alta afinidade por íons de metais de transição e seus complexos podem apresentar diferentes geometrias (Omar *et al.*, 2006), com variadas propriedades biológicas tais como potencial antitumoral e antimicrobiana (Hickey *et al.*, 2011).

Estes compostos são sintetizados a partir de uma amina aromática e um composto carbonílico (por exemplo, aldeídos, cetonas) (Figura 05) através de uma adição nucleofílica, o que leva à formação de um hemimalinal, e a consequente desidratação para gerar uma imina. A reação do éter 4,4'-diaminodifenílico com *o*-vanilina pode ser considerada uma reação típica (Faridbod *et al.*, 2007)



Figura 05: Formação de base de Schiff a partir de aldeído ou cetona

A aplicação de aldeídos leva à formação de iminas do tipo $R_1HC=NR_2$. Isto é, enquanto o resultado da mesma reação com cetonas são de $R_1R_2C=NR_3$ aminas do tipo (reação de cetonas ocorre mais lentamente do que a de aldeídos). O mecanismo geral de formação de bases de Schiff é de acordo com a reação em várias etapas.

Uma imina (base de Schiff), como a formada a partir de *o*-vanilina, forma complexos com íons metálicos via átomos doadores de N e O. Os efeitos estéreos e eletrônicos em torno do núcleo de metal podem ser afinados por meio da seleção apropriada de substituintes de elétrons ou de doação de elétrons nas bases de Schiff. Esses átomos de N e O induzem dois efeitos eletrônicos opostos: o oxigênio fenolado é considerado um doador resistente, que estabiliza os estados de oxidação mais elevados, enquanto o nitrogênio imino é um doador mais flexível e estabiliza os estados de oxidação mais baixos do íon metálico (Gupta *et al.*, 2006).

As bases de Schiff são consideradas “ligandos privilegiados” que são ativos e bem projetados. Esses ligantes foram extensivamente estudados em química de coordenação, e são encontrados para ser estável sob uma variedade de condições oxidativas e redutoras (Singh *et al.*, 2007). Bases de Schiff são realmente capazes de estabilizar muitos metais diferentes em vários estados de oxidação, controlando o desempenho de metais em uma grande variedade de transformações catalíticas úteis (Cozzi, 2004).

Complexos metálicos de transição destes compostos têm sido utilizados na catálise de diversos processos, como transferência de oxigênio e átomos, epoxidação enantiosseletiva e aziridação, mediando reações redox orgânicas e como mediadores em outros processos de oxidação. No entanto, muito pouco se sabe sobre seus complexos equilíbrios de formação na solução e também sobre o uso de *salens* e seus complexos como portadores nos eletrodos íon-seletivos (Shamsipur *et al.*, 2001).

As bases de Schiff têm potencial para serem utilizadas em diferentes áreas como eletroquímica, bio-inorgânica, catálise, desativadores metálicos, processos de separação e química ambiental e estão se tornando cada vez mais importantes nas indústrias farmacêutica (Gupta *et al.*, 2006). Podem apresentar uma ampla faixa de aplicações farmacológicas (Beraldo e Gambino, 2004); dentre elas, pode-se destacar atividades como agentes antitumorais, antivirais, antibacterianos, antimaláricos, antituberculose, fungicidas, antiparasitários e anticonvulsivantes (West, 1993; Beraldo e Gambino, 2004) sendo um importante composto a ser estudado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinação das propriedades farmacológicas do composto sintético (e)-2-(((para-tolilimino)metil)fenol (PTMF) *in vitro* e *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar toxicidade do PTMF por meio de ensaio de hemólise;
- Avaliar o efeito do PTMF sobre a viabilidade das células do baço de camundongos e sobre células do TAE por meio do ensaio de MTT ;
- Avaliar o perfil do infiltrado leucocitário no líquido ascítico de camundongos inoculados com as células do TAE e tratados com PTMF;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do PTMF por meio do modelo de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do PTMF por meio de dosagem da enzima mieloperoxidase no lavado peritoneal dos animais desafiados com carragenina;
- Avaliar o efeito anti-nociceptivo do PTMF por meio do ensaio de contorções abdominais e teste da formalina em camundongos;
- Avaliar o efeito do PTMF sobre a frequência de micronúcleos em eritrócitos do sangue de animais tratados com PTMF.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMPOSTO (e)-2-(((p-tolilimino)metil)fenol

O PTMF utilizado nos experimentos, foi sintetizado e gentilmente cedido pelo professor Dr. Nelson Luís de Campos Domingues da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) (Figura 06).

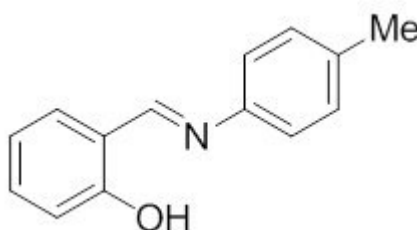


Figura 06: Composto (E)-2-(((p-tolilimino)metil)fenol - PTMF

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para os experimentos foram utilizados camundongos swiss, machos e fêmeas, com 22-24g, de 6 a 8 semanas de idade; provenientes do biotério da Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande/MS. Os camundongos foram acondicionados em sala climatizada sob temperatura constante de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo de claro-escuro de 12 h, com água e ração “*ad libitum*”. O projeto foi previamente enviado ao Comitê de Ética da Universidade Católica Dom Bosco e aprovado com número de protocolo 031/2017.

3.3 ENSAIOS *in vitro*

3.3.1 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

3.3.1.1 ATIVIDADE HEMOLITICA

O ensaio para determinar a atividade hemolítica foi realizado de acordo com (Park *et al.*, 2004) com pequenas modificações. Os eritrócitos foram coletados a partir de camundongos Swiss, lavados com solução salina a 0,9% e centrifugados a 1200rpm; 4°C ; 2 min. Para o experimento, foi utilizado sangue a 8%, distribuído em placa de 96 poços, adicionando diferentes concentrações do PTMF (100, 50, 25,

12,5 e 6,25 µg/mL). O controle recebeu Triton X-100 (Vetec) (5µL diluído em 95µL de água Mili-Q) e Salina 0,9%. Todos os grupos foram realizados em triplicata. A leitura foi realizada a 550nm em leitor de microplacas.

3.3.1.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO BAÇO DE CAMUNDONGOS

As células utilizadas para avaliar a citotoxicidade do PTMF foram retiradas a partir do baço de camundongos. Um animal foi eutanasiado por aprofundamento anestésico (Cetamina 150mg/Kg/ Xilazina 20mg/Kg), retirado o baço, lavado em álcool 70% e emergido em meio de cultura RPMI 1640. O baço foi macerado em falcon 15mL, centrifugados a 1200rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi descartado, adicionado tampão de lise de hemácias (EDTA; NaHCO₃; NH₄Cl); após 2 minutos foi adicionado 5mL de meio RPMI para parar a reação de lise e centrifugado a 1300 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *precipitado celular* ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI completo. Posteriormente foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer (diluição de 1:20 em líquido de Turk).

3.3.1.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH (TAE)

As células do TAE foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Patologia da UNESP de Botucatu e estocadas em freezer -80°C na concentração de 2×10^5 /ml. Para os ensaios, as células foram descongeladas, centrifugadas por 5 minutos a 2000rpm, e o sobrenadante desprezado. As células foram ressuspensionadas em meio de cultura RPMI 1640. A partir dessa suspensão celular, foram injetados 200µl de células TAE intraperitonealmente em dois camundongos a cada sete dias, para obtenção de células para os estudos de atividade citotóxica. Após cinco dias da injeção das células do TAE, o crescimento tumoral tornou-se evidente devido à expansão abdominal do animal. Para condução dos ensaios, *in vitro* e *in vivo*, as células foram obtidas a partir do lavado peritoneal, após as células foram lavadas por duas vezes em meio de cultura RPMI 1640 e centrifugadas por 5 minutos a

2000rpm em temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer (diluição de 1:20 em líquido de Turk).

3.3.1.4 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do azul de Tripán (Evans e Starling, 1913). Resumidamente, 20 μ l de uma suspensão de células/ml (células do baço) foram colocados em 20 μ l de azul de Tripán (1:1) e avaliado sua viabilidade. Foi realizada a contagem de 100 células e diferenciadas em viável ou inviável. As células foram consideradas adequadas ao experimento, *in vitro* se apresentasse, no mínimo, 90% de viabilidade.

3.3.1.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE PELO ENSAIO COLORIMÉTRICO COM SAL DE TETRAZOLIUM (MTT)

A citotoxicidade também foi determinada por meio do ensaio colorimétrico do MTT, (Takeuchi M, 1991; Sieuwerts *et al.*, 1995). A citotoxicidade foi avaliada pela análise baseada na redução do sal 3-[(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) solúvel em água para um formazan insolúvel de cor roxa, produto das desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente ativas (vivas). Para o ensaio, uma suspensão de células, contendo 2×10^5 células/mL (TAE ou células do baço) foram colocados em placa de 96 poços e incubadas com meio RPMI contendo 100, 50 e 25 μ g/mL do composto (E)-2-((p-tolilimino)metil)fenol, perfazendo um volume final de 200 μ l e mantidas em estufa de CO₂ 5%, a 37°C. A viabilidade celular foi avaliada após 24 e 48h da incubação. Em seguida, foi aspirado todo o meio e adicionados 10 μ l da solução de MTT, em todas as cavidades da placa, e incubada por 4 h, com abrigo da luz. Após o período de incubação, foi adicionado a solução solubilizadora para solubilizar os cristais de formazan. Posteriormente, as placas foram agitadas, levemente, a temperatura ambiente, por 5-10 min, para que todo o formazan seja solubilizado e realizada a leitura a 570nm em leitor tipo ELISA (SpectraMax). As porcentagens de viabilidade celular foram calculadas em relação aos controles celulares não tratados.

3.4 ENSAIOS *in vivo*

3.4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO PTMF

Inicialmente os camundongos foram inoculados intraperitonealmente (*i.p.*) com 1×10^3 células TAE. Após 24 horas da implantação do tumor, o tratamento dos animais foi iniciado com o PTMF (25, 50 e 100µg/animal *i.p.*) ou salina (0.2ml *i.p.*) e mantido por 14 dias, com intervalo de 24 horas entre as administrações. Após 14 dias da inoculação das células TAE, os animais foram eutanasiados e as células peritoneais analisadas em relação entre o número de células tumorais e leucócitos emigrados. Todos os animais foram pesados diariamente para avaliação do crescimento tumoral, determinado pelo ganho de peso dos animais tratados ou não com PTMF.

3.4.2 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS

Os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia (Cetamina 150mg/Kg/ Xilazina 20mg/Kg) para avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos camundongos. A cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de PBS/ EDTA. A partir do exsudato foi feita a contagem total e diferencial das células presentes. A contagem total foi realizada em câmara de Neubauer e expressa como número de células $\times 10^6$ /ml. A contagem diferencial foi realizada em lâminas do esfregaço de células do exsudato, devidamente coradas (panótico rápido), e foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000 vezes), sendo contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se quatro tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mononucleares. A quantidade de cada tipo celular presente na cavidade peritoneal foi calculada pela porcentagem dessas células contadas nos esfregaços e pela quantidade de células totais obtida na contagem total. Os resultados foram expressos como número de célula $\times 10^6$ / ml.

3.4.3 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS

Após 6 horas da administração do estímulo inflamatório, os grupos de animais pré-tratados ou não com PTMF foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia (Cetamina 150mg/Kg/ Xilazina 20mg/Kg) para avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos camundongos. A cavidade peritoneal foi lavada com 3 ml de PBS/EDTA (5%) e, a partir do exsudato foram feitas as contagens total e diferencial das células presentes. A contagem total foi realizada em câmara de Neubauer e expressa como nº de células x 10⁶/ml. Uma alíquota do lavado peritoneal foi armazenada em tampão II de enzima mieloperoxidase para posterior dosagem da enzima MPO. A contagem diferencial foi realizada em lâminas do esfregaço de células do exsudato, devidamente coradas (panótico rápido), e foram examinadas em microscópio óptico por meio da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000 vezes), sendo contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se quatro tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mononucleares. A quantidade de cada tipo celular presente na cavidade peritoneal foi calculada pela percentagem dessas células contadas nos esfregaços e pela quantidade de células totais obtida na contagem total. Os resultados foram expressos como nº de neutrófilos x 10⁶/ mL.

3.4.4 DOSAGEM DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)

Para confirmar os resultados obtidos no ensaio de migração de neutrófilos, a atividade da enzima MPO dos neutrófilos foi mensurada (Alves-Filho *et al.*, 2006). A lavagem peritoneal dos animais tratados com salina, carragenina ou PTMF nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/animal; foi submetida à mensuração de MPO. Para isto, uma solução usando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM) foi adicionada a 25 µL da suspensão de lavagem peritoneal de cada grupo animal, e a mudança na absorbância a 450 nm foi medida. Primeiro, os resultados foram relatados como o número total de neutrófilos, comparando a absorbância de neutrófilos peritoneais de camundongos processados da mesma maneira. Para este fim, a migração de neutrófilos foi induzida no peritônio de camundongos por injeção de carragenina (500 µg/animal). Uma curva padrão relacionando o número de neutrófilos (> 95% de pureza) e absorbância foi obtida processando neutrófilos purificados e testando a atividade da MPO. Os resultados foram expressos como o número de neutrófilos/mL.

3.4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NOCICEPTIVA DO PTMF

3.4.5.1 Teste de contorções abdominais induzida por ácido acético

Consiste em um teste de método bem sensível com aplicação de estímulo nociceptivo por via intraperitoneal (Koster R, 1959). Os animais foram pré-tratados ou não com PTMF (100 µg/animal) e após 15 minutos do pré-tratamento (s.c.) foi injetado como estímulo nocivo 100 µL de ácido acético 0,8% por via intraperitoneal. Os controles receberam Indometacina 5mg/Kg. A avaliação das contorções abdominais iniciou-se após 5 minutos da administração do ácido acético, totalizando 30 minutos de observação.

3.4.5.2 Teste da Formalina

O teste da formalina avalia a atividade analgésica de acordo com o número de lambidas/ou mordidas na pata. Os camundongos Swiss (n=5) foram pré-tratados ou não com PTMF (100 µg/animal), 15 minutos antes do estímulo com Formalina 2,5% (30µL s.p.). Os controles receberam Indometacina 5mg/Kg. Os animais foram avaliados em duas fases: 1ª fase nos primeiros 5 minutos, fazendo uma pausa de 10 minutos e a 2ª fase os 15 minutos restante observando o número de lambidas e/ou mordidas na pata injetada (HUNSKAAR e HOLE 1987).

3.4.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO PTMF

3.4.6.1 Avaliação de micronúcleo do PTMF

O teste de micronúcleos foi realizado em três grupos de animais (n=5/grupo) os quais foram tratados com: salina+DMSO (controle negativo); colchicina 5mg/Kg (controle positivo); 100µg/animal do PTMF. Os animais receberam o tratamento (*i.p.*) e após 24 horas foi colhido sangue periférico da calda produzindo duas lâminas de esfregaços. As lâminas foram fixadas e coradas com May Grunwald e Giemsa 10%. Foram contadas dois mil eritrócitos por lâmina, diferenciando em normocromáticos; com ou sem micronúcleos e policromáticos; com ou sem micronúcleos. As lâminas foram analisadas em aumento de 1.000 X com óleo de imersão em microscópio ótico. Os dados foram expressos como frequência de micronúcleos por 2.000 células.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para comparar as diferenças entre as análises. Em todos os casos, comparações individuais foram realizadas por meio do pós-teste de Bonferroni (comparações múltiplas). Foi utilizado o programa *GraphPad Prim 5*. Os resultados foram expressos como média \pm EPM e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bases de Schiff representam um importante grupo de compostos na química orgânica, pois são materiais de partida na síntese de produtos industriais com a presença de ligações carbono-nitrogênio (Garza-Ortiz *et al.*, 2008). Em particular, esta ligação N-C está envolvida em várias funções biológicas, permitindo que as bases de Schiff se comportem, por exemplo, como agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios e/ou antitumorais (Parvez *et al.*, 2012).

As bases de Schiff são uma classe notável de compostos com amplo potencial farmacológico, tais como: ação anti-úlcero-gênica (Hajrezaie *et al.*, 2012), antibacteriana, antifúngica (Saeednia, 2010; Datta e Ramya, 2012), anti-diabético (Vančo *et al.*, 2008), antitumoral (Adsule *et al.*, 2006; Da Silveira *et al.*, 2008), antiproliferativa (Illán-Cabeza *et al.*, 2008; Sujarania *et al.*, 2012) e atividades anti-inflamatórias (Sondhi *et al.*, 2006; Bawa e Kumar, 2009).

Apesar da importância desses compostos na química medicinal, a maioria dos estudos envolvendo as bases de Schiff está focada no potencial antibacteriano e antifúngico, demonstrando que ainda há um vasto campo de estudo para a elucidação das atividades farmacológicas desses compostos.

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades farmacológicas do PTMF, para tanto, inicialmente foi avaliado sua toxicidade em eritrócitos murinos. A Figura 7 demonstra que o PTMF não apresentou atividade hemolítica em nenhuma das concentrações testadas quando comparada ao controle positivo (Triton-X 100).

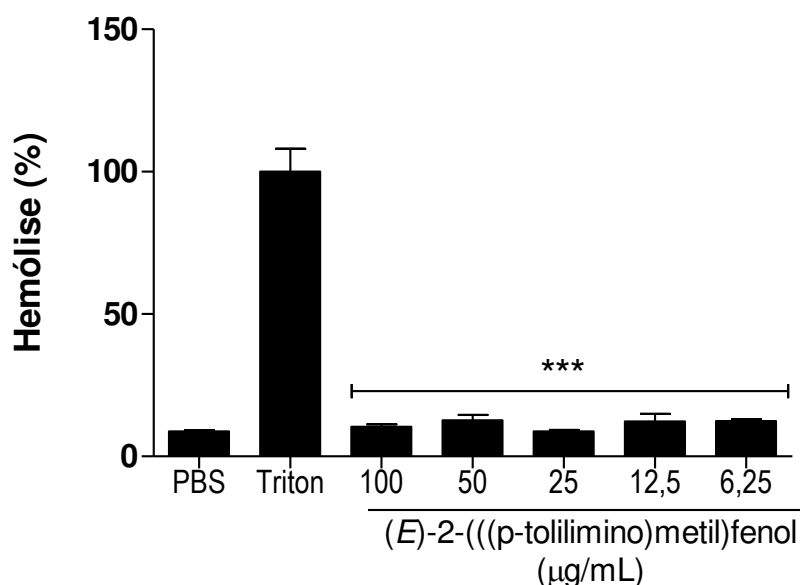


Figura 07: **Avaliação da atividade hemolítica do composto (E)-2-((p-tolilimino)metil)fenol em eritrócitos murinos.** Em uma placa de 96 poços, 50µL do composto (E)-2-((p-tolilimino)metil)fenol foram adicionados em diferentes concentrações (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL). O controle negativo foi PBS (100 mL) e o controle positivo foi Triton X-100. A análise foi realizada em espectrometria na absorvância de 550nm. Os resultados são expressos como porcentagem de hemólise (média ± DPM) *** p <0,05 quando comparados aos grupos controle positivo Triton X-100.

Visando avaliar a atividade citotóxica do PTMF, células do TAE e do baço (Figura 8) foram incubadas por 24 horas (Figura 8 A) e 48 horas (Figura 8 B) com diferentes concentrações do PTMF (100, 50 e 25 µg/mL) e realizado ensaio de MTT. O PTMF reduziu no tempo de 24 horas, a viabilidade das células do baço em 12,6%; na concentração de 100µg/mL e 17% com as concentrações de 50 e 25 µg/mL quando comparado ao controle não tratado de células do baço (Figura 8A).

Após 24 horas de incubação o PTMF reduziu a viabilidade das células do TAE em 36%; na concentração de 100µg/mL, 7% na concentração de 50 µg/mL e 16% na concentração de 25 µg/mL quando comparado ao controle não tratado de células do TAE (Figura 8A). Com esses dados pode-se observar que o PTMF apresentou uma ação citotóxica maior na concentração de 100µg/mL nas células do TAE (Figura 8A).

Após 48 horas, observa-se que a diminuição da viabilidade celular se apresentou mais evidente para as células do baço bem como células do TAE (Figura 8B). Nas concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL, foi observada uma redução da viabilidade das células do baço de 38%, 33% e 31% respectivamente quando

comparado ao controle de células do baço sem tratamento, sugerindo uma ação tempo dependente do PTMF (Figura 8B).

Após 48h, foi observado um efeito mais expressivo do PTMF, diminuindo a viabilidade das células do TAE em 61,6% para concentração de 100 µg/mL; 57,3% para concentração de 50 µg/mL e 58,2% para concentração de 25 µg/mL (Figura 8B). Esses dados sugerem que o PTMF possui uma ação citotóxica para células do TAE, tempo dependente.

Comparando os resultados de células do baço e TAE, após 48h de incubação, foi possível observar que o efeito do PTMF se apresentou mais acentuado em células do TAE.

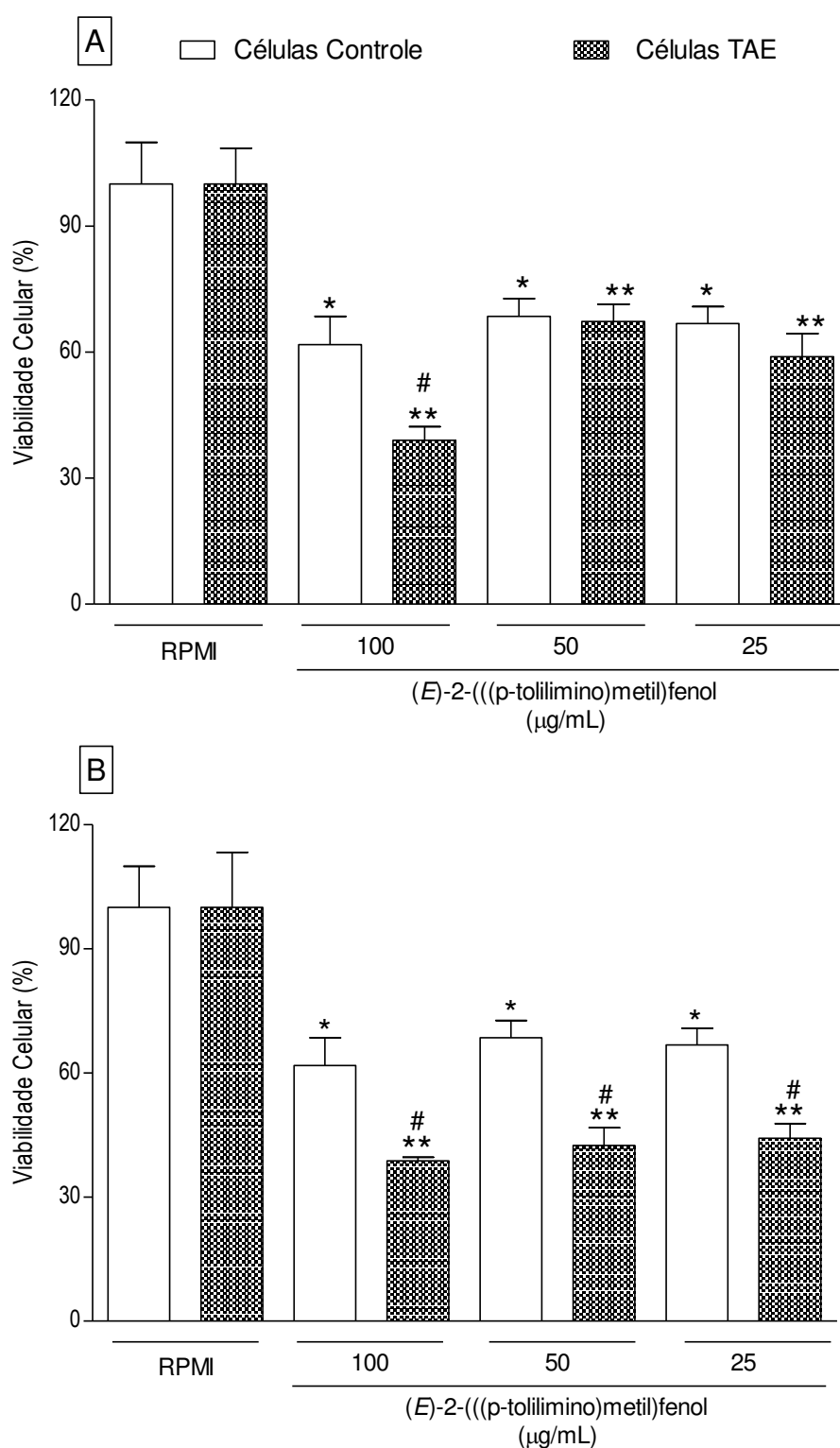


Figura 08. Determinação da viabilidade de células do baço e TAE tratada ou não com o PTMF. 1×10^5 de células foram incubados com diferentes concentrações (100, 50 e $25 \mu\text{g/mL}$) do PTMF por 24h (A) e 48h (B). Após esses período, a viabilidade foi determinada pelo MTT. Os resultados estão expressos como porcentagem de células viáveis (média \pm DPM). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle não tratado (ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

Dongfang et al (2008), avaliando o efeito antitumoral de cinco complexos de bases de Schiff demonstraram que estes foram capazes de inibir o crescimento de células de leucemia mielóide humanas (K562) de modo dose dependente e que a regressão do tumor estava associada à indução de apoptose induzida pelos compostos de interesse.

Recentemente, Shabbir et al, (2017) sintetizaram dois compostos (N-(2-oxidophenyl) salicylideneiminatotriphenylphosphinenickel(II)(Ni(L1)PPh₃) e N-(2-sulfidophenyl)salicylideneiminatotriphenylphosphine nickel(II)(Ni(L2)PPh₃) os quais apresentaram um potente efeito antitumoral. Os compostos apresentaram inibição de proliferação tumoral de aproximadamente 70% na concentração de 100µg/mL, se apresentando mais eficaz que PTMF.

Análise in vivo.....

Objetivando avaliar o efeito do PTMF sobre a proliferação das células do TAE, camundongos foram tratados com PTMF (25, 50 e 100µg/animal *i.p*) por 14 dias. No 14º dia, do início do tratamento, foi conduzida a contagem total das células da cavidade peritoneal (Figura 09), bem como a relação entre o número de células tumorais e leucócitos (Figura 10).

Na Figura 09 está representado o número de células totais da cavidade peritoneal de animais inoculados com TAE, tratados ou não com o PTMF. Ao comparar o grupo salina com o grupo TAE sem tratamento, observamos um aumento de mais de 100% no número de células, confirmando o sucesso do modelo, visto que uma das características de células tumorais é a proliferação acelerada. Entretanto, diferente do observado nos ensaios in vitro, os resultados demonstram que o PTMF, nas doses de 25, 50, 100µg/animal não foi capaz de inibir a proliferação das células TAE quando comparado ao grupo sem tratamento.

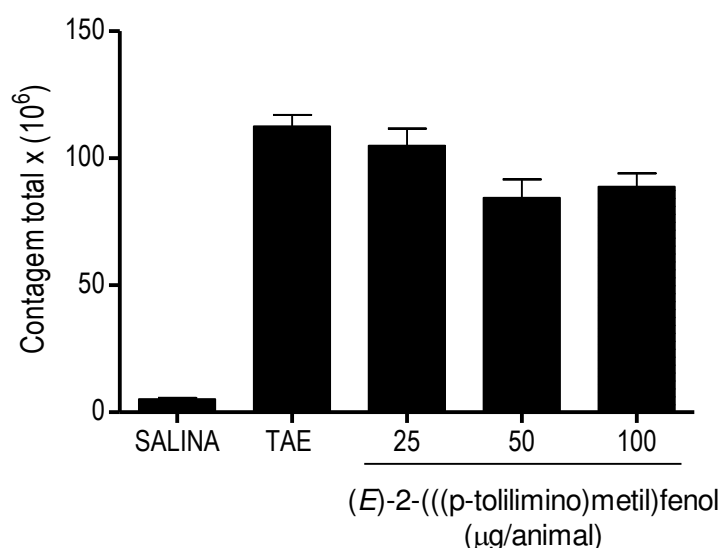


Figura 09: Determinação do número de células totais de animais inoculados com TAE, tratados ou não com PTMF. Após 14 dias do início do tratamento, foi conduzida a contagem total das células da cavidade peritoneal em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos em 10⁶ /ml * $p < 0,05$ quando comparada ao grupo controle não tratado (ANOVA seguida do teste Bonferroni).

Com intuito de determinar os tipos células encontrados na cavidade peritoneal dos camundongos inoculados com TAE, tratados ou não com o PTMF foi realizada a contagem diferencial para identificação entre a relação do número de leucócitos e células TAE. Na Figura 10 está representada a relação entre o número de leucócitos e células TAE da cavidade peritoneal de camundongos. Os resultados demonstram que o aumento na proliferação das células tumorais não foi acompanhado pelo aumento no número de leucócitos peritoneais nos animais não-tratados com o PTMF. Os animais do grupo salina, os quais não receberam células TAE, estão representados na figura 10, apenas com os leucócitos.

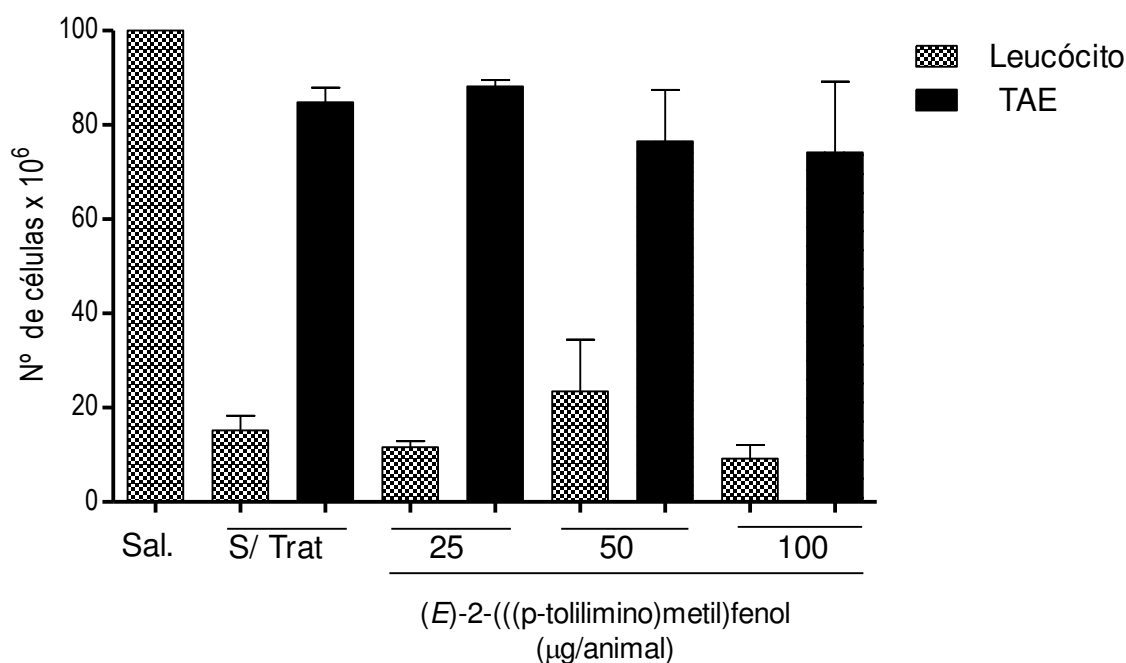


Figura 10: Determinação da contagem diferencial das células (Leucócitos X TAE) da cavidade peritoneal dos camundongos inoculados com TAE, tratados ou não com PTMF. Na contagem diferencial foram identificados os leucócitos totais e as células TAE. As lâminas foram submetidas à coloração com panótico rápido e avaliadas 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em 10⁶ /ml * $p < 0,05$ quando comparada ao grupo controle não tratado (ANOVA seguida do teste Bonferroni).

Com o objetivo de investigar quais leucócitos estavam presentes no lavado peritoneal foi realizada a contagem diferencial identificando quatro tipos celulares (eosinófilos, basófilos, neutrófilos e monócitos) (Figura 11, A,B). Foram identificados apenas dois tipos de leucócitos; neutrófilos (Figura 11, A) e monócitos (figura 11, B). Os resultados demonstram que o PTMF aumentou o número de neutrófilos na concentração de 100µg/animal; quando comparado ao grupo com TAE sem tratamento (Figura 11, A). A figura 11B demonstra o número de monócitos presentes no lavado peritoneal dos camundongos, tratados ou não com PTMF (25, 50, 100µg/animal). Pode-se observar aumento no número de monócitos no grupo tratado com 100µg/animal do PTMF quando comparado com o grupo com TAE sem tratamento.

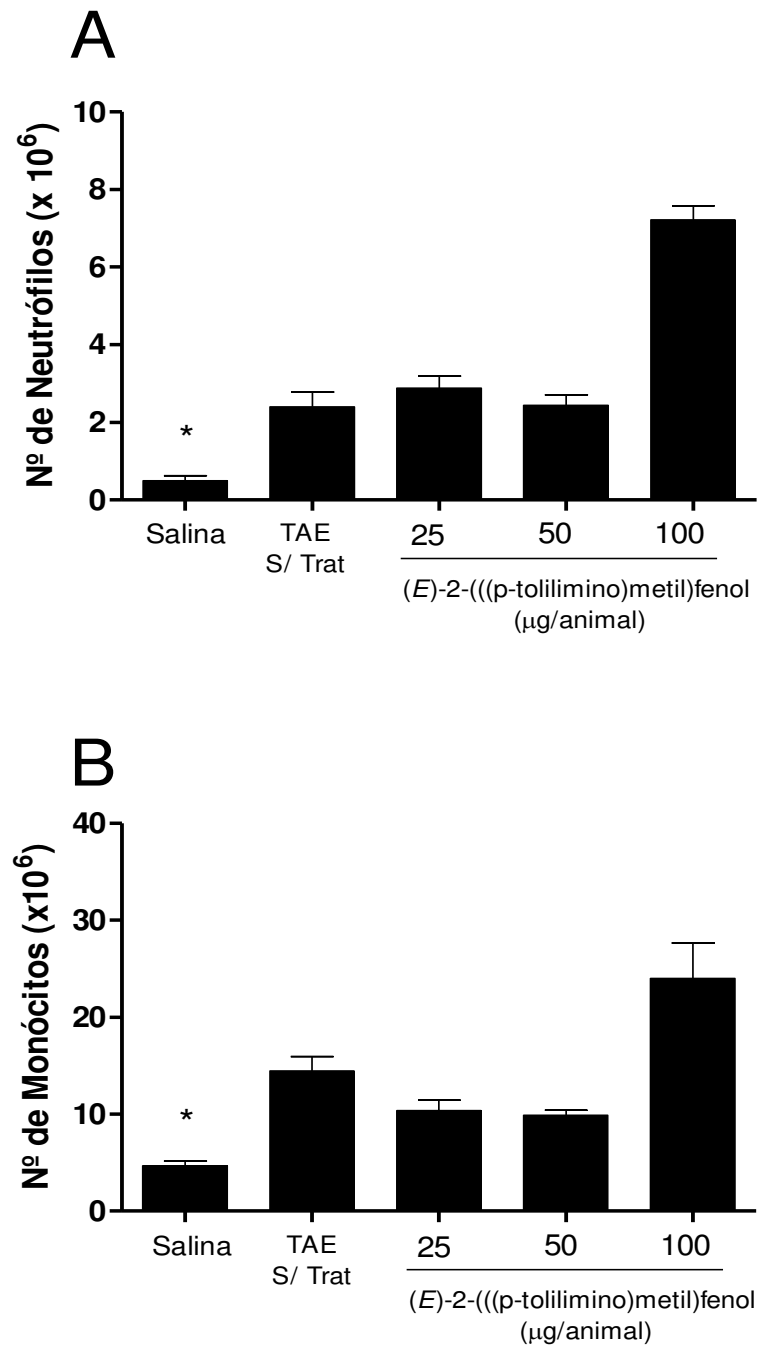


Figura 11: Determinação da contagem diferencial das células da cavidade peritoneal dos camundongos inoculados com TAE, tratados ou não com PTMF. Na contagem diferencial foram identificados quatro tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos basófilos e mononucleares. As lâminas foram submetidas à coloração com panótico rápido e avaliadas 100 células por lâmina. Em **A** estão demonstrados neutrófilos e **B** estão demonstrado monócitos. Os resultados foram expressos em 10^6 /ml. * $p < 0,05$ quando comparada ao grupo controle não tratado (ANOVA seguida do teste Bonferroni).

Um método eficaz utilizado na busca de novas substâncias com potencial anti-inflamatório é o modelo de peritonite induzida por agentes flogísticos com as carragenina. As carrageninas são polissacarídeos sulfatados provenientes de algas marinhas consideradas potentes aditivos alimentares. Além disso, são utilizadas no modelo de migração de leucócitos para cavidades peritoneais de camundongos para investigação da fisiopatologia da inflamação aguda para triagem de substâncias com potencial anti-inflamatório (Winter *et al.*, 1962; Di Rosa, 1972; Vinegar *et al.*, 1982; Bhattacharyya *et al.*, 2008).

Com intuito de determinar a atividade anti-inflamatória do PTMF, foi realizado o ensaio de migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos. Na contagem de leucócitos totais, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com PTMF nas concentrações 100, 50 e 25 μ g quando comparado ao grupo controle (carragenina) (Figura 12).

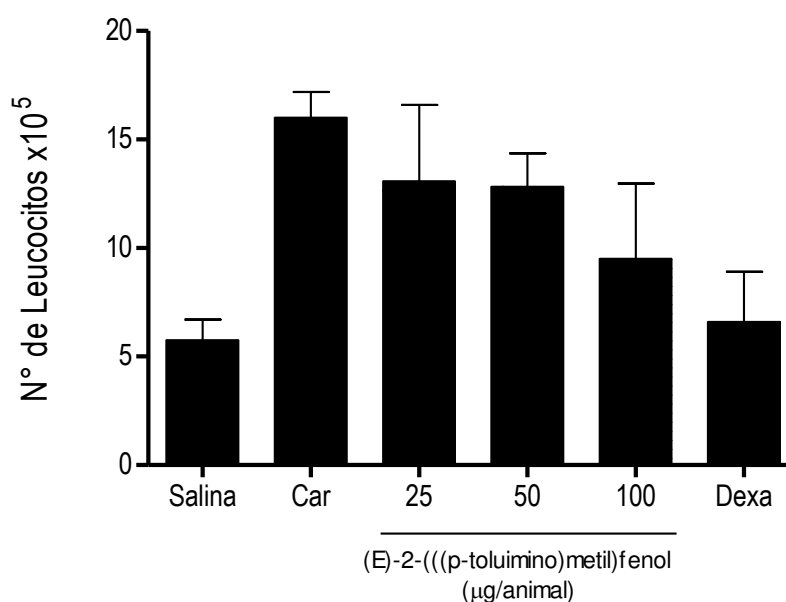


Figura 12. Avaliação do efeito do PTMF sobre a migração de leucócitos totais para cavidade peritoneal de camundongos. O efeito anti-inflamatório do PTMF foi avaliado em camundongos Swiss (n=6) submetidos ao pré-tratamento com diferentes doses do composto (25, 50 e 100 μ g/ animal/s.c.) 15 minutos antes do estímulo inflamatório (carragenina 1mg/animal *i.p.*). Os controles negativos receberam salina 0,9% (200 μ L *i.p.*). Após 6 horas os animais foram eutanasiados e realizada a contagem total das células. Os resultados estão expressos em número de leucócitos X 10⁵ (media \pm EPM) Foi utilizado o programa Graphpad prism 5.

Quando avaliou-se a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, o composto inibiu a migração de neutrófilos nas doses de 25 (45%) , 50 (70%) e 100 μ g (35%) quando comparada com o grupo que recebeu apenas carragenina, sem tratamento (Figura 13).

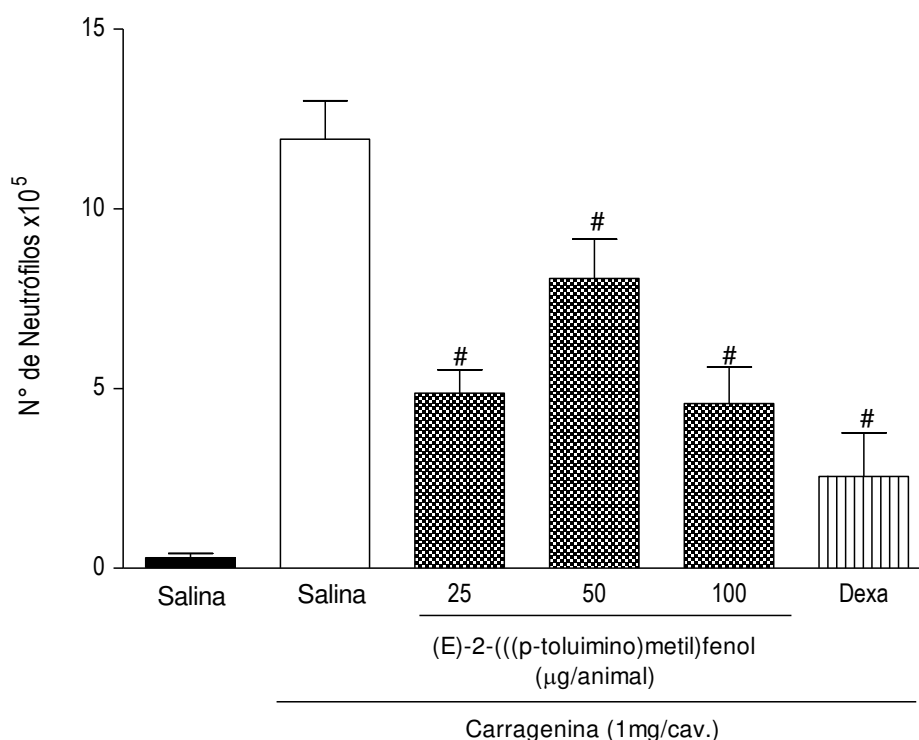


Figura 13. Avaliação do efeito do PTMF sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos. O efeito anti-inflamatório do PTMF foi avaliado em camundongos Swiss (n=6) submetidos ao pré-tratamento com diferentes doses do PTMF (25, 50 e 100 μ g/ animal/s.c.) 15 minutos antes do estímulo inflamatório (carragenina 1mg/animal *i.p.*). Os controles negativos receberam salina 0,9% (200 μ L *i.p.*). Após 6 horas os animais foram eutanasiados e realizada a contagem diferencial das células. Os resultados estão expressos em número de neutrófilos X 10⁵ (media \pm EPM) e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle não tratado (ANOVA seguido do teste de *Bonferroni*).

Os neutrófilos respondem a múltiplos sinais no organismo podendo produzir várias citocinas e outros fatores inflamatórios que influenciam e regulam a inflamação e também o sistema imunológico (Nauseef e Borregaard, 2014; Scapini e Cassatella, 2014). Atualmente, reconhece-se que os neutrófilos são células

complexas transcricionalmente ativas (Ericson *et al.*, 2014) que produzem citocinas (Tecchio e Cassatella, 2016), modulam as atividades das células vizinhas e contribuem para a resolução da inflamação (Greenlee-Wacker, 2016).

Por outro lado, Glennon-Alty *et al.*, 2018 demonstraram que os neutrófilos liberaram níveis mais elevados de ROS em doenças auto-imunes, e os danos oxidativos derivados dos neutrófilos são mediados ao tecido hospedeiro (primários e secundários) contribuindo assim para a evolução da doença (Glennon-Alty *et al.*, 2018).

Tagreed e Omar em 2007 desenharam e sintetizaram dois compostos de bases de Schiff derivados de salicilideno e avaliaram o potencial anti-inflamatório por meio do ensaio de edema de pata. Um dos compostos apresentou efeito semelhante ao da indometacina, na concentração de 100mg/Kg. Os autores atribuem o resultado promissor do composto aos constituintes da sulfonamida no anel aromático contribuindo para a dupla ligação secundária da azometina (Omar, 2017).

Nos microambientes inflamatórios, os neutrófilos ativados podem produzir intermediários reativos de oxigênio ou desgranular liberando enzimas líticas tais como proteases (por exemplo, elastase, gelatinase, etc.), ou mieloperoxidase (MPO) (Papayannopoulos *et al.*, 2010). A MPO é uma enzima imunologicamente ativa que catalisa a oxidação e cloração de macromoléculas utilizando o peróxido de hidrogênio como substrato para formar adutos de ácido hipocloroso (Hazen, Hsu, Duffin, *et al.*, 1996; Hazen, Hsu, Mueller, *et al.*, 1996; Eiserich *et al.*, 1998; Nauseef, 2007), sendo um indicativo de presença de neutrófilos.

Objetivando confirmar os dados encontrados na migração de neutrófilos, foi realizada a dosagem da enzima MPO dos lavados peritoniais dos animais. Os dados da dosagem da enzima MPO não apresentaram diferença significativa entre os grupos tratados com PTMF quando comparado ao grupo não tratado (carragenina) (Figura 14).

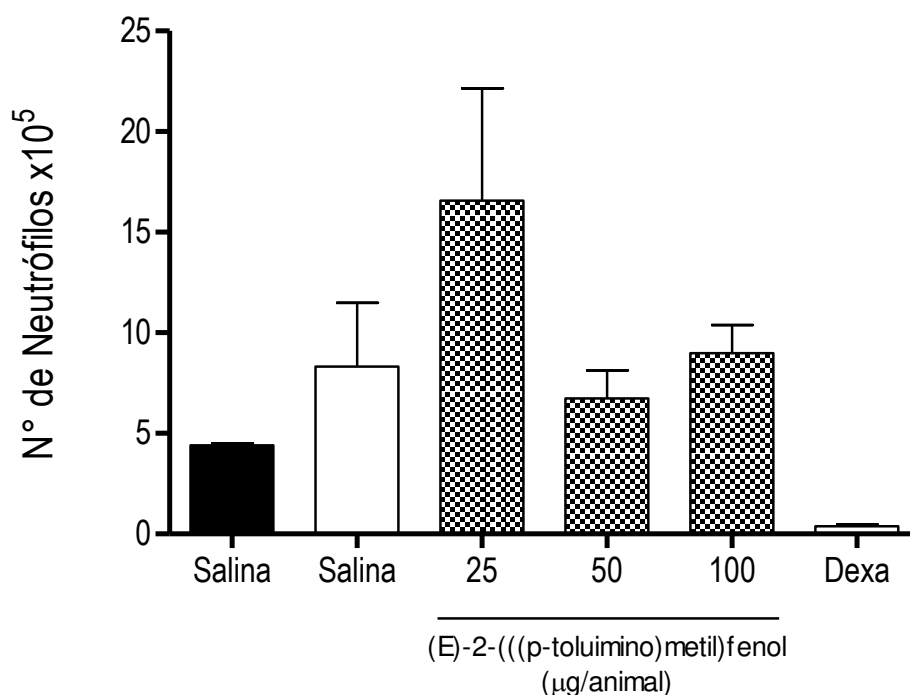


Figura 14. Avaliação do efeito do PTMF sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos. O efeito anti-inflamatório do PTMF (25, 50 e 100µg/ animal/s.c.) foi avaliado pela dosagem da enzima MPO dos exudatos do lavado peritoneal dos camundongos. Os resultados estão expressos em número de neutrófilos X 10⁵ (media ±EPM) (ANOVA seguido do teste de *Bonferroni*). Foi utilizado o programa Graphpad prism 5.

Substâncias químicas injetadas por via intraperitoneal podem induzir contorções abdominais em camundongos devido à sensibilização de nociceptores por prostaglandinas. Este teste é útil para avaliar a analgesia moderada produzida por compostos anti-inflamatórios (Ferreira e Vane, 1974). O teste de contorções abdominais demonstrou que o PTMF foi capaz de reduzir aproximadamente 25% o número de contorções abdominais na dose administrada (100µg/animal) (Figura 15).

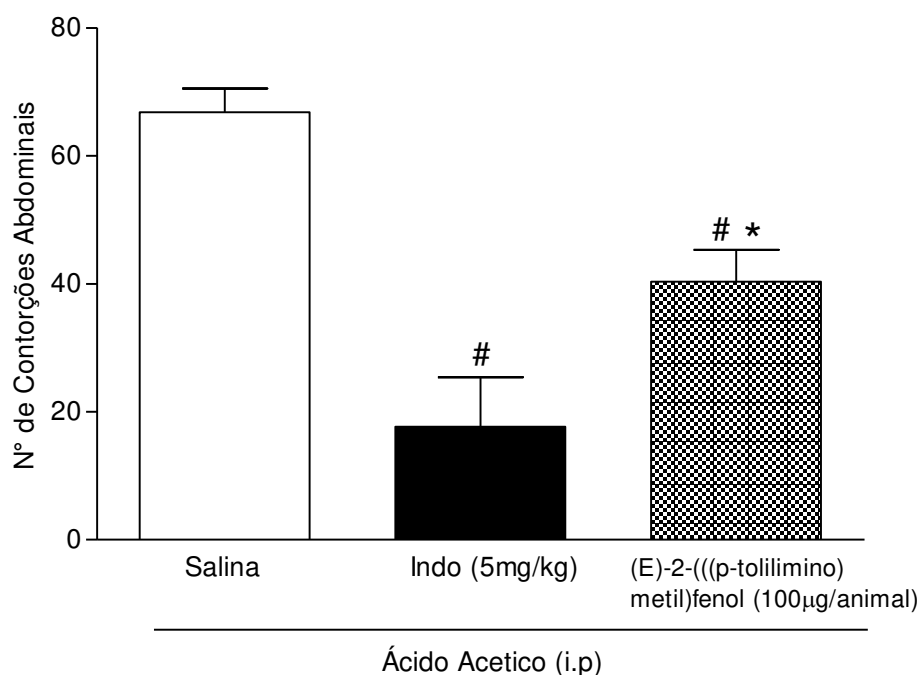


Figura 15: Avaliação do efeito antinociceptivo do PTMF por meio do teste de contorções abdominais em camundongos. O efeito antinociceptivo do PTMF foi avaliado em camundongos Swiss (n=5) submetidos ao pré-tratamento com o composto 100µg/animal por via subcutânea 15 minutos antes do estímulo da dor (ácido acético 0,8%, i.p.). O controle negativo recebeu indometacina 5mg/Kg. Os animais foram avaliados pelo número de contorções realizado durante 30 minutos após estímulo. Os resultados estão expressos em número de contorções abdominais (média ±EPM) # $p < 0,05$ quando comparados ao grupo não tratado. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com indometacina.

O teste de formalina é um modelo validado para avaliação de nocicepção e é sensível para diversas classes de drogas analgésicas. Dois períodos distintos da atividade de lambear podem ser identificados, uma fase precoce durando os primeiros 5 minutos e uma fase tardia com duração de 30 minutos após a injeção de formalina. Foi demonstrado que as duas fases no teste de formalina podem ter diferentes mecanismos nociceptivos. Sugere-se que a fase inicial é devido a um efeito direto sobre nociceptores e que as prostaglandinas não desempenham um papel importante durante esta fase. A fase tardia parece ser uma resposta inflamatória, com dor inflamatória que pode ser inibida por drogas anti-inflamatórias. Apenas drogas analgésicas de ação central são efetivas na inibição da fase da nocicepção (HUNSKAAR 1987).

A figura 16 representa a avaliação do efeito analgésico do PTMF. Os resultados demonstram que o PTMF não apresentou capacidade de reduzir a

nocicepção na fase 1, sugerindo a ausência de efeitos analgésicos centrais do extrato. Entretanto na fase 2, o PTMF foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva deflagrada pela formalina, quando comparado ao grupo tratado com Indometacina.

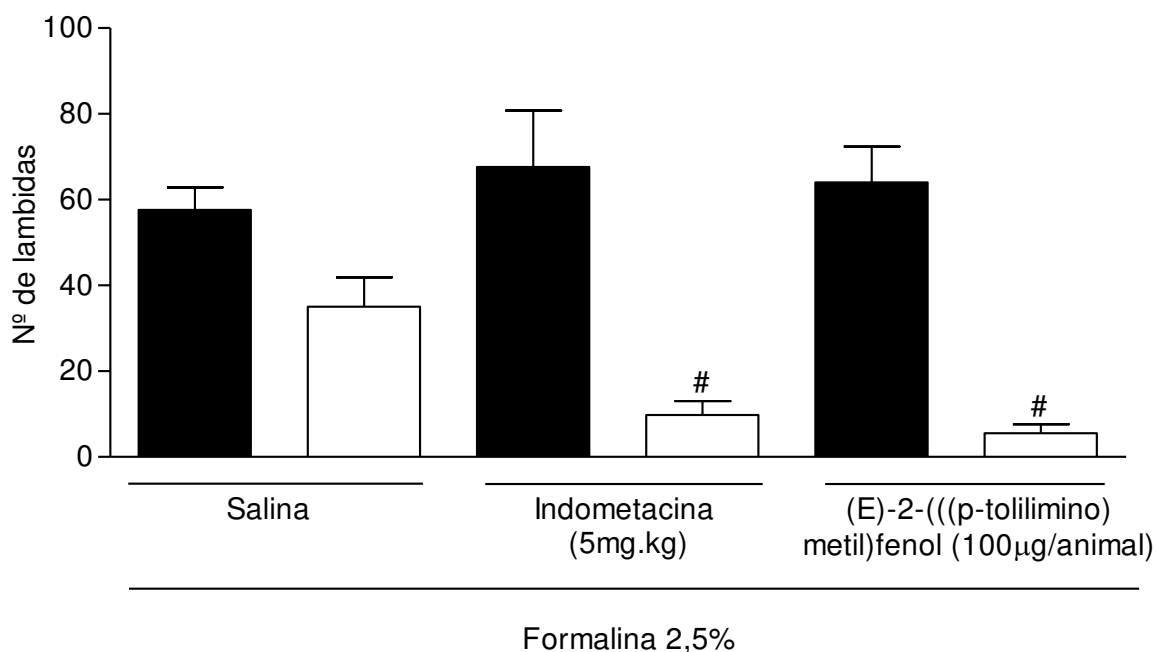


Figura 16: Avaliação do efeito antinociceptivo do PTMF por meio do teste da formalina em camundongos. O efeito antinociceptivo do PTMF foi avaliado em camundongos Swiss (n=5) submetidos ao pré-tratamento com o composto 100µg/animal por via subcutânea 15 minutos antes do estímulo da dor (formol 2,5%, s.p.). O controle negativo recebeu indometacina 5mg/Kg. Os animais foram avaliados pelo número de lambeduras na pata por 5 minutos (Fase 1); houve um intervalo de 10 minutos e contados mais 15 minutos ininterruptos (Fase 2) após estímulo. Os resultados estão expressos em número de lambeduras (media ±EPM) # p<0,05 quando comparados ao grupo não tratado

Na avaliação quanto à genotoxicidade do PTMF foi administrado, nos animais, 100µg/animal do composto e para grupo controle positivo, colchicina (0,5mg/kg). Após 24 horas, foi possível observar que o tratamento com o PTMF não foi capaz de induzir micronúcleos em hemácias policromáticas (Figura 17), quando comparado ao grupo tratado com colchicina.

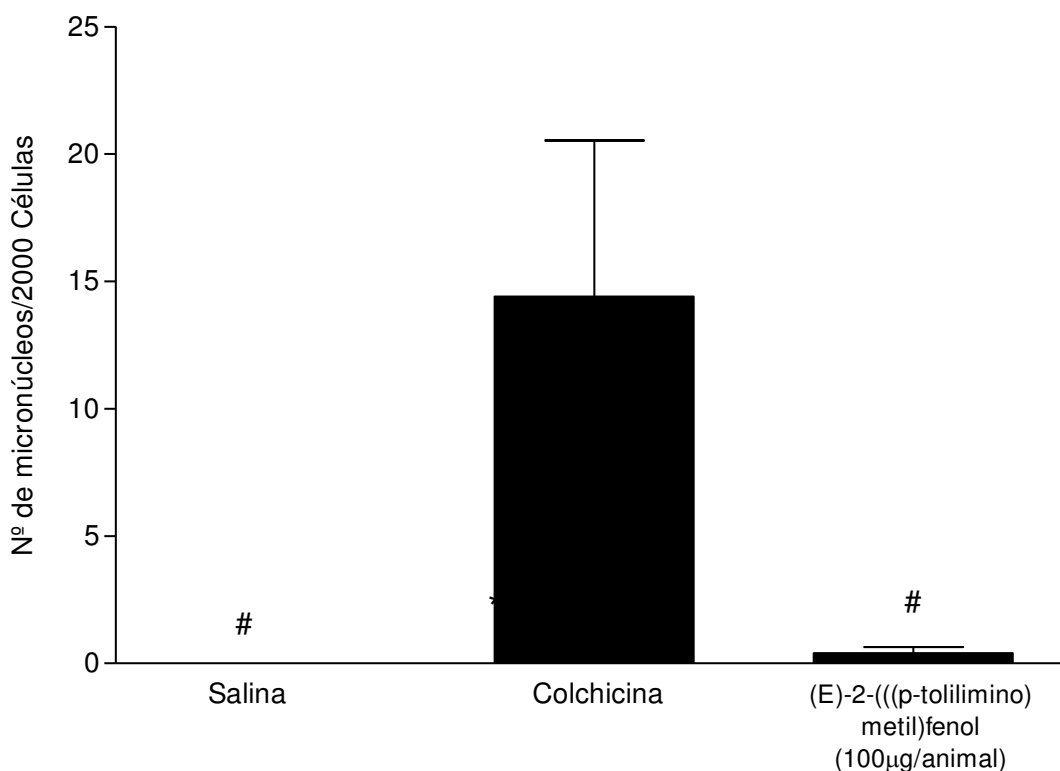


Figura 17 Determinação do número de micronúcleo em eritrócitos do sangue dos camundongos tratados ou não com PTMF. Foram avaliadas 2000 células e diferenciadas em Policromáticas com micronúcleo. # $p < 0,05$ quando comparada ao grupo controle desafiado com colchicina (ANOVA seguida do teste Bonferroni).

O ensaio do micronúcleo (MN) é um dos biomarcadores de genotoxicidade mais amplamente utilizados fornecendo uma medida eficiente dos danos no DNA cromossômico que ocorrem como resultado da quebra do cromossomo ou da má segregação do cromossomo durante a mitose (Bolognesi e Fenech, 2012). O rastreamento do impacto genotóxico é de grande importância durante a avaliação da citotoxicidade, uma vez que o potencial genotóxico está normalmente implicado nas toxicidades e reprodutivas como um fator de risco primário (Farag e Alagawany, 2017).

Andrezálová et al, 2017 testou a atividade de dois compostos ([Cu(salglu)Meim] e [Cu(et)2(im)4][Cu2(salglu)2(im)2]) quanto à capacidade de degradação do DNA pelo ensaio do cometa. A linha de células saudáveis HEK-293T foi mais sensível do que a linhagem de células cancerígenas MCF-7 aos compostos, somente na concentração mais alta usada (100 µmol.L) (Andrezálová et al., 2017).

O composto (*E*)-2-(((*p*-tolilimino)metil)fenol foi sintetizado por Al-Kahraman *et al.* em 2010 e testado quanto à atividade contra os fungos das espécies *C. albicans*; *A. flavus*; *M. canis*; *F. solani*; *C. glabrata* e as bactérias *Escherchia coli*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexenari*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi*. Nos testes, o composto não apresentou nenhuma atividade, por outro lado também foi testado atividade antileishmanicida o qual o composto apresentou uma atividade moderada contra a espécie *Leishmania major* (Al-Kahraman *et al.*, 2010).

São muitos trabalhos realizados com bases de Schiff porém, cada base ligada a um metal específico apresenta uma atividade biológica característica o que impossibilita a comparação do presente trabalho com a escassez de materiais disponíveis. Apenas um trabalho foi encontrado na literatura utilizando o composto (*E*)-2-(((*p*-tolilimino)metil)fenol (Al-Kahraman *et al.*, 2010).

Com base nos ensaios do presente trabalho, pode-se considerar que o composto (*E*)-2-(((*p*-tolilimino)metil)fenol possui atividade antitumoral *in vitro*, efeito anti-inflamatório, antinociceptor e não apresenta potencial genotóxico. Novos ensaios serão realizados para elucidar os mecanismos envolvidos nessa ação.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se considerar que:

- O PTMF não apresentou atividade hemolítica;
- O PTMF na concentração de 100µg/mL foi capaz de reduzir em 24horas, a viabilidade das células do TAE em 36%, na concentração de 25 e 50 µg/mL reduziram a viabilidade celular em 7 e 16%;
- O PTMF foi capaz de reduzir a viabilidade celular de TAE, em 48horas, na concentração de 100µg/mL 61,6% ; 57,3% para concentração de 50 µg/mL e 58,2% para concentração de 25 µg/mL sugerindo ação citotóxica dose tempo dependente;
- Não houve diferença no número de células totais da cavidade peritoneal de animais inoculados com TAE, tratados ou não com o PTMF;
- O PTMF não foi capaz de alterar o número de leucócitos peritoneais;
- O PTMF foi capaz de aumentar o número de neutrófilos na concentração de 100µg/animal; e aumentar o número de mononucleares no grupo tratado com 100µg/animal.
- O teste de contorções abdominais demonstrou que o PTMF foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais na dose administrada (100µg/animal)
- O PTMF (100µg/animal) foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva no ensaio de formalina somente na fase 2;
- O PTMF não foi capaz de induzir micronúcleos em hemácias policromáticas na concentração de 100µg/animal.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSULE, S. et al. Novel Schiff base copper complexes of quinoline-2 carboxaldehyde as proteasome inhibitors in human prostate cancer cells. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 24, p. 7242-7246, 2006. ISSN 0022-2623.

AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 2, p. 425-430, 2009. ISSN 1078-0432.

AL-KAHRAMAN, Y. M. et al. Antileishmanial, antimicrobial and antifungal activities of some new aryl azomethines. **Molecules**, v. 15, n. 2, p. 660-71, Jan 28 2010. ISSN 1420-3049 (Electronic)

1420-3049 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20335936> >.

ALTMANN, H.-J. et al. Induction of early lesions in the forestomach of rats by 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA). **Food and chemical toxicology**, v. 23, n. 8, p. 723-731, 1985. ISSN 0278-6915.

ALVES-FILHO, J. C. et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit Care Med**, v. 34, n. 2, p. 461-70, Feb 2006. ISSN 0090-3493 (Print)

0090-3493 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424729> >.

AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 459-489, 2012. ISSN 0732-0582.

ANDREZÁLOVÁ, L. et al. DNA/BSA binding ability and genotoxic effect of mono-and binuclear copper (II) complexes containing a Schiff base derived from salicylaldehyde and D, L-glutamic acid. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 827, p. 67-77, 2017. ISSN 0022-328X.

APETOH, L. et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. **Nature medicine**, v. 13, n. 9, p. 1050, 2007. ISSN 1546-170X.

ARCANGELI, G. et al. Combined radiation and drugs: the effect of intra-arterial chemotherapy followed by radiotherapy in head and neck cancer. **Radiotherapy and Oncology**, v. 1, n. 2, p. 101-107, 1983. ISSN 0167-8140.

BAILEY, J. M. **Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxins, and PAF: Mechanism of Action, Molecular Biology, and Clinical Applications**. Springer Science & Business Media, 2013. ISBN 1489907270.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-545, 2001. ISSN 0140-6736.

BAUMANN, M. H. et al. Serotonin (5-HT) precursor loading with 5-hydroxy-L-tryptophan (5-HTP) reduces locomotor activation produced by (+)-amphetamine in the rat. **Drug and alcohol dependence**, v. 114, n. 2-3, p. 147-152, 2011. ISSN 0376-8716.

BAWA, S.; KUMAR, S. Synthesis of Schiff's bases of 8-methyl-tetrazolo [1, 5-a] quinoline as potential anti-inflammatory and antimicrobial agents. 2009. ISSN 0376-4699.

BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 4, n. 1, p. 31-39, 2004. ISSN 1389-5575.

BHATTACHARYYA, S. et al. Carrageenan induces cell cycle arrest in human intestinal epithelial cells in vitro. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 3, p. 469-475, 2008. ISSN 0022-3166.

BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Mussel micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 7, p. 1125, 05/17/online 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.043> >.

CARRASSA, L.; DAMIA, G. Unleashing Chk1 in cancer therapy. **Cell cycle**, v. 10, n. 13, p. 2121-2128, 2011. ISSN 1538-4101.

CARRY, P. J.; PRESCOTT, D. M.; OGILVIE, G. K. Resistance to Ehrlich ascites tumor in a strain of dystrophic mice. **Cancer research**, v. 39, n. 6 Part 1, p. 2139-2140, 1979. ISSN 0008-5472.

CLEMENTS, W. M. et al. β -Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. **Cancer research**, v. 62, n. 12, p. 3503-3506, 2002. ISSN 0008-5472.

COLLINS, S. M.; BARBARA, G.; VALLANCE, B. Stress, inflammation and the irritable bowel syndrome. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. Suppl A, p. 47A-49A, 1999. ISSN 0835-7900.

CONE, J. Inflammation. **Am J Surg**, n. 182, p. 558-562, 2001.

COZZI, P. G. Metal-Salen Schiff base complexes in catalysis: practical aspects. **Chem Soc Rev**, v. 33, n. 7, p. 410-21, Sep 10 2004. ISSN 0306-0012 (Print)

0306-0012 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15354222> >.

CRANSHAW, J.; GRIFFITHS, M. Inflammatory processes in the acute respiratory distress syndrome. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 14, n. 2, p. 66-73, 2003. ISSN 0953-7112.

DA SILVEIRA, V. C. et al. Double-strand DNA cleavage induced by oxindole-Schiff base copper (II) complexes with potential antitumor activity. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 102, n. 5-6, p. 1090-1103, 2008. ISSN 0162-0134.

DATTA, R.; RAMYA, V. Biologically Important Schiff Bases and Their Transition Metal Complexes. **Mapana-Journal of Sciences**, v. 11, n. 2, p. 57-72, 2012. ISSN 0975-3303.

DEMARIA, S. et al. Cancer and inflammation: promise for biological therapy. **Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)**, v. 33, n. 4, p. 335, 2010.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 89-102, 1972. ISSN 0022-3573.

E SILVA, E. F. et al. C-Phycocyanin: Cellular targets, mechanisms of action and multi drug resistance in cancer. **Pharmacological Reports**, 2017. ISSN 1734-1140.

EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen Über Maligne Mausentumoren. **Klin. Wschr**, v. 28, p. 871-874, 1905.

EHRlich, P.; APOLANT, H. **Experimentelle carcinomstudien an Mäusen**. Fischer, 1906.

EISERICH, J. P. et al. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature**, v. 391, n. 6665, p. 393, 1998. ISSN 1476-4687.

ERICSON, J. A. et al. Gene expression during the generation and activation of mouse neutrophils: implication of novel functional and regulatory pathways. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e108553, 2014. ISSN 1932-6203.

EVANS, C. L.; STARLING, E. The part played by the lungs in the oxidative processes of the body. **The Journal of physiology**, v. 46, n. 6, p. 413-434, 1913. ISSN 1469-7793.

FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. **Chemico-biological interactions**, 2017. ISSN 0009-2797.

FARIDBOD, F. et al. Ion recognition: application of symmetric and asymmetric schiff bases and their complexes for the fabrication of cationic and anionic membrane sensors to determine ions in real samples. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 10, n. 7, p. 527-46, Aug 2007. ISSN 1386-2073 (Print)

1386-2073 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17979636> >.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015. ISSN 1097-0215.

FERREIRA, S. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. **Drugs**, v. 46, n. 1, p. 1-9, 1993. ISSN 0012-6667.

FERREIRA, S.; VANE, J. Aspirin and prostaglandins. In: (Ed.). **The prostaglandins**: Springer, 1974. p.1-47.

GARZA-ORTIZ, A. et al. Ruthenium (III) chloride complex with a tridentate bis (arylimino) pyridine ligand: synthesis, spectra, X-ray structure, 9-ethylguanine binding pattern, and in vitro cytotoxicity. **Inorganic chemistry**, v. 47, n. 15, p. 6964-6973, 2008. ISSN 0020-1669.

GILFILLAN, A. M.; METCALFE, D. **Mast cell biology: contemporary and emerging topics**. Springer Science & Business Media, 2011. ISBN 1441995331.

GILROY, D. W. et al. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 5, p. 401, 2004. ISSN 1474-1784.

GLENNON-ALTY, L. et al. Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease. **Free Radic Biol Med**, v. 125, p. 25-35, Sep 2018. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29605448> >.

GOTWALS, P. et al. Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 5, p. 286, 2017. ISSN 1474-1768.

GREENLEE-WACKER, M. C. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. **Immunological reviews**, v. 273, n. 1, p. 357-370, 2016. ISSN 0105-2896.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010. ISSN 0092-8674.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. **Current opinion in genetics & development**, v. 20, n. 1, p. 65-71, 2010. ISSN 0959-437X.

GUO, B. et al. Experimental infection of United States swine with a Chinese highly pathogenic strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Virology**, v. 435, n. 2, p. 372-384, 2013. ISSN 0042-6822.

GUPTA, V. K.; SINGH, A. K.; GUPTA, B. A cerium(III) selective polyvinyl chloride membrane sensor based on a Schiff base complex of N,N'-bis[2-(salicylideneamino)ethyl]ethane-1,2-diamine. **Anal Chim Acta**, v. 575, n. 2, p. 198-204, Aug 11 2006. ISSN 1873-4324 (Electronic)

0003-2670 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17723591> >.

HAJREZAIE, M. et al. Acute toxicity and gastroprotection studies of a new schiff base derived copper (II) complex against ethanol-induced acute gastric lesions in rats. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51537, 2012. ISSN 1932-6203.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015. ISBN 0198717482.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011. ISSN 0092-8674.

HAZEN, S. L. et al. Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system of phagocytes converts low density lipoprotein cholesterol into a family of chlorinated sterols. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 38, p. 23080-23088, 1996. ISSN 0021-9258.

HAZEN, S. L. et al. Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 98, n. 6, p. 1283-1289, 1996. ISSN 0021-9738.

HERSH, D.; WEISS, J.; ZYCHLINSKY, A. How bacteria initiate inflammation: aspects of the emerging story. **Current opinion in microbiology**, v. 1, n. 1, p. 43-48, 1998. ISSN 1369-5274.

HICKEY, J. L. et al. Copper (II) complexes of hybrid hydroxyquinoline-thiosemicarbazone ligands: GSK3 β inhibition due to intracellular delivery of copper. **Dalton Transactions**, v. 40, n. 6, p. 1338-1347, 2011.

HÖRIG, H. et al. A new mouse model for evaluating the immunotherapy of human colorectal cancer. **Cancer research**, v. 61, n. 23, p. 8520-8526, 2001. ISSN 0008-5472.

HOSSNE, R. S. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho: implantação do modelo no Brasil. **Acta Cirúrgica Brasileira**, p. 208-210, 2002. ISSN 0102-8650.

ILLÁN-CABEZA, N. A. et al. Synthesis, characterization and antiproliferative activity of metal complexes with the Schiff base derived from the condensation 1: 2 of 2, 6-diformyl-4-methylphenol and 5, 6-diamino-1, 3-dimethyluracil. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 102, n. 4, p. 647-655, 2008. ISSN 0162-0134.

JORDAN, J. M. Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management. **JAMA**, v. 299, n. 15, p. 1840-1841, 2008. ISSN 0098-7484.

KALEOĞLU, Ö.; İŞLI, N. Ehrlich-Lettre Asit Tümörü. **Tıp Fakültesi Mecmuas**, v. 40, p. 978-984, 1977.

KAVARANA, M. J. et al. Mechanism-based competitive inhibitors of glyoxalase I: intracellular delivery, in vitro antitumor activities, and stabilities in human serum and mouse serum. **Journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 2, p. 221-228, 1999. ISSN 0022-2623.

KHASAR, S. G. et al. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C ϵ mutant mice. **Neuron**, v. 24, n. 1, p. 253-260, 1999. ISSN 0896-6273.

KLAUNIG, J.; KAMENDULIS, L.; XU, Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. **Human & experimental toxicology**, v. 19, n. 10, p. 543-555, 2000. ISSN 0960-3271.

KODAMA, M.; KODAMA, T. Enhancing effect of hydrocortisone on hematogenous metastasis of Ehrlich ascites tumor in mice. **Cancer research**, v. 35, n. 4, p. 1015-1021, 1975. ISSN 0008-5472.

KOSTER R, A. M., DE-BEER EJ. **Acetic acid for analgesic screening**. Federation Proceedings. 18: 412–418 p. 1959.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins patologia básica**. Elsevier Brasil, 2013. ISBN 8535268405.

KUNDU, J. K.; SURH, Y.-J. Inflammation: gearing the journey to cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 659, n. 1, p. 15-30, 2008. ISSN 1383-5742.

KUNNUMAKKARA, A. B. et al. Chronic diseases, inflammation, and spices: how are they linked? **J Transl Med**, v. 16, n. 1, p. 14, Jan 25 2018. ISSN 1479-5876 (Electronic)

1479-5876 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29370858> >.

LEITE PEREIRA, M. et al. Purification of a chitin-binding protein from Moringa oleifera seeds with potential to relieve pain and inflammation. **Protein and peptide letters**, v. 18, n. 11, p. 1078-1085, 2011. ISSN 0929-8665.

LIU, Y. et al. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quantitative imaging in medicine and surgery**, v. 5, n. 5, p. 708, 2015.

LORENZ, J.; CASEY, K. Imaging of acute versus pathological pain in humans. **European Journal of Pain**, v. 9, n. 2, p. 163-165, 2005. ISSN 1532-2149.

LOVE, R. Cellular and Molecular Biology of Cancer. In: (Ed.). **Manual of Clinical Oncology**: Springer, 1994. p.3-17.

MAK, T. W.; SAUNDERS, M. E.; JETT, B. D. **Primer to the immune response**. Newnes, 2013. ISBN 012385461X.

MANTOVANI, A. Cancer: inflaming metastasis. **Nature**, v. 457, n. 7225, p. 36, 2009. ISSN 1476-4687.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999. ISSN 0301-0082.

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunological reviews**, v. 219, n. 1, p. 88-102, 2007. ISSN 0105-2896.

NAUSEEF, W. M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. **Nature immunology**, v. 15, n. 7, p. 602, 2014. ISSN 1529-2916.

NEWTON, R. F.; ROBERTS, S. M. **Prostaglandins and Thromboxanes: Butterworths Monographs in Chemistry**. Butterworth-Heinemann, 2016. ISBN 1483161099.

OMAR, M.; MOHAMED, G.; HINDY, A. Transition metal complexes of heterocyclic Schiff base. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 86, n. 2, p. 315-325, 2006. ISSN 1388-6150.

OMAR, T. N. Synthesis of Schiff Bases of Benzaldehyde and Salicylaldehyde as Anti-inflammatory Agents. **Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences (P-ISSN: 1683-3597, E-ISSN: 2521-3512)**, v. 16, n. 2, p. 5-11, 2017. ISSN 1683-3597.

OPRIESSNIG, T.; GIMÉNEZ-LIROLA, L.; HALBUR, P. Polymicrobial respiratory disease in pigs. **Animal Health Research Reviews**, v. 12, n. 2, p. 133-148, 2011. ISSN 1475-2654.

OZASLAN, M. et al. Ehrlich ascites carcinoma- Review. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375-2378, 2011.

PAPAYANNOPOULOS, V. et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **The Journal of cell biology**, v. 191, n. 3, p. 677-691, 2010. ISSN 0021-9525.

PARK, Y. et al. Design of novel analogues with potent antibiotic activity based on the antimicrobial peptide, HP(2-9)-ME(1-12). **Biotechnol Lett**, v. 26, n. 6, p. 493-8, Mar 2004. ISSN 0141-5492 (Print)

0141-5492 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15127790> >.

PARVEZ, S. et al. Synthesis, characterization and biological activities of a bidentate schiff base ligand: N, N'-Bis (1-phenylethylidene) ethane-1, 2-diamine and its transition metals (II) complexes. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 34, n. 6, 2012. ISSN 0253-5106.

PATTERSON, C. E.; LUM, H. Update on pulmonary edema: the role and regulation of endothelial barrier function. **Endothelium**, v. 8, n. 2, p. 75-105, 2001. ISSN 1062-3329.

PIOMELLI, D. **Arachidonic acid in cell signaling**. Springer Science & Business Media, 2013. ISBN 3662058073.

PITOT, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v. 72, n. S3, p. 962-970, 1993. ISSN 0008-543X.

PLATKO, S. **Mast Cells Shape Early Life Programming of Social Behavior**. 2015. The Ohio State University

RANG, R. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. Elsevier Brasil, 2015. ISBN 8535265007.

RASKIN, R. E.; MEYER, D. **Canine and Feline Cytology-E-Book: A Color Atlas and Interpretation Guide**. Elsevier Health Sciences, 2015. ISBN 0323243630.

RODRIGUES, M. R. et al. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 292, n. 4, p. 869-873, 2002. ISSN 0006-291X.

ROLIM, T. L. et al. Erratum to: toxicity and antitumor potential of Mesosphaerum sidifolium (Lamiaceae) oil and fenchone, its major component. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 364, 2017. ISSN 1472-6882.

ROSALES, C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 113, 2018. ISSN 1664-042X.

RUBIN, E.; REISNER, H. M. **Essentials of Rubin's pathology**. Lippincott Williams & Wilkins, 2009. ISBN 0781773245.

SAEEDNIA, S. Synthesis, characterization and nonlinear optical properties of four novel schiff base Compounds. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 35, n. 1A, p. 54, 2010.

SCAPINI, P.; CASSATELLA, M. A. Social networking of human neutrophils within the immune system. **Blood**, p. blood-2014-03-453217, 2014. ISSN 0006-4971.

SETA, F.; BACHSCHMID, M. Cyclooxygenase Pathway of the Arachidonate Cascade. eLS. **Boston, Massachusetts, USA: Francesca Seta, Boston University School of Medicine**, 2012.

SHAKER, S. A.; FARINA, Y.; SALLEH, A. A. Synthesis and Characterization of Mixed Ligand Complexes of 8-Hydroxyquinoline and o-hydroxybenzylidene-1-phenyl-2, 3-dimethyl-4-amino-3-pyrazolin-5-on with Fe (II), Co (II), Ni (II) and Cu (II) ions. **European journal of scientific research**, v. 33, n. 4, p. 702-709, 2009. ISSN 1450-216X.

SHAMSIPUR, M. et al. A Schiff base complex of Zn(II) as a neutral carrier for highly selective PVC membrane sensors for the sulfate ion. **Anal Chem**, v. 73, n. 13, p. 2869-74, Jul 1 2001. ISSN 0003-2700 (Print)

0003-2700 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11467529> >.

SIEUWERTS, A. M. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. **Eur J Clin Chem Clin Biochem**, v. 33, n. 11, p. 813-23, Nov 1995. ISSN 0939-4974 (Print)

0939-4974 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620058> >.

SINGH, A. K.; GUPTA, V. K.; GUPTA, B. Chromium(III) selective membrane sensors based on Schiff bases as chelating ionophores. **Anal Chim Acta**, v. 585, n. 1, p. 171-8, Feb 28 2007. ISSN 1873-4324 (Electronic)

0003-2670 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17386662> >.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; DANTAS, C. J. S. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. In: (Ed.). **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**, 2000.

SONDHI, S. M. et al. Synthesis, anti-inflammatory, analgesic and kinase (CDK-1, CDK-5 and GSK-3) inhibition activity evaluation of benzimidazole/benzoxazole derivatives and some Schiff's bases. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 11, p. 3758-3765, 2006. ISSN 0968-0896.

SUJARANIA, S.; SIRONMANI, T. A.; RAMU, A. SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND TOXICITY STUDIES OF SCHIFF BASES [2-(2, 2-DIPHENYLETHYLIMINO) METHYL] PHENOLS] ANCHORED SILVER NANOPARTICLES. **Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)**, v. 7, n. 4, 2012. ISSN 1842-3582.

TAKEUCHI M, K. A. Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. **Glycobiology**, p. 337-46, 1991.

TECCHIO, C.; CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. *Seminars in immunology*, 2016, Elsevier. p.119-128.

TOFAZZAL, M. et al. Coordination chemistry and biological activity of nickel (II) and copper (II) ion complexes with nitrogen-sulphur donor ligands derived from S-benzylthiocarbamate (SBDTC). **TRANSITION METAL CHEMISTRY-WEINHEIM-**, v. 26, n. 6, p. 613-618, 2001. ISSN 0340-4285.

TRACY, R. P. The Five Cardinal Signs of Inflammation: Calor, Dolor, Rubor, Tumor ... and Penuria (Apologies to Aulus Cornelius Celsus, De medicina, c. A.D. 25). **The Journals of Gerontology: Series A**, v. 61, n. 10, p. 1051-1052, 2006. ISSN 1079-5006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/61.10.1051> >.

VANČO, J. et al. Synthesis, structural characterization, antiradical and antidiabetic activities of copper (II) and zinc (II) Schiff base complexes derived from salicylaldehyde and β -alanine. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 102, n. 4, p. 595-605, 2008. ISSN 0162-0134.

VERRI JR, W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 116-138, 2006. ISSN 0163-7258.

VINEGAR, R. et al. Pathway of onset, development, and decay of carrageenan pleurisy in the rat. Federation proceedings, 1982. p.2588-2595.

WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. Academic Press, 2011. ISBN 0080568777.

WEST, D. Struct. Bonding, 76, 1 (1991); DX West, AE Liberta, SB Padhye, RC Chikate, PB Sonawane, AS Kumbhar and RG Yerande. **Coord. Chem. Rev**, v. 123, p. 49, 1993.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v. 111, n. 3, p. 544-547, 1962. ISSN 0037-9727.

ZHONG, B. et al. Additive effects of ulinastatin and docetaxel on growth of breast cancer xenograft in nude mice and expression of PGE2, IL-10, and IL-2 in primary breast cancer cells. **Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals**, v. 27, n. 4, p. 252-258, 2012. ISSN 1084-9785.

ZIYAD, S.; IRUELA-ARISPE, M. L. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. **Genes & cancer**, v. 2, n. 12, p. 1085-1096, 2011. ISSN 1947-6019.

7 ANEXOS



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
COMISSÃO PARA USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Síntese e Avaliação das Propriedades Anti-tumoral, Anti-inflamatória e Analgésica de Compostos derivados de (E)-2-(((fenil)imino)metil)fenol", registrada com o nº **031/2017**, sob a responsabilidade de Susana Elisa Moreno, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Católica Dom Bosco em reunião de 09/03/2018.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	09/03/2018 - 09/03/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico / Balb/C
Nº de animais	750
Peso/Idade	20g / 6 sem
Sexo	Macho / Fêmea
Origem	Biotério da UCDB

Campo Grande, 9 de maio de 2018.