

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS TÓXICOS DA QUIMIOTERAPIA  
METRONÔMICA A BASE DE CICLOFOSFAMIDA  
OU METOTREXATO EM RATOS *WISTAR***

**María Lucía Correal Suárez**  
Médica Veterinária

**2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS TÓXICOS DA QUIMIOTERAPIA  
METRONÔMICA A BASE DE CICLOFOSFAMIDA OU  
METOTREXATO EM RATOS *WISTAR***

**María Lucía Correal Suárez**

**Orientador: Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana**

**Coorientadora: Profa. Dra. Annelise Carla Camplesi**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica Veterinária).

**2017**

C824e Correal Suárez, María Lucía  
Efeitos tóxicos da quimioterapia metronômica a base de  
ciclofosfamida ou metotrexato em ratos *Wistar* / María Lucía Correal  
Suárez. -- Jaboticabal, 2017  
ix, 57 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017  
Orientador: Áureo Evangelista Santana  
Coorientadora: Annelise Carla Camplesi  
Banca examinadora: Marco Antônio de Andrade Belo, Thiago  
Demarchi Munhoz  
Bibliografia

1. Baixa dose. 2. Câncer. 3. Imunossupressão. 4. Quimioterápico.  
5. Toxicidade. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias  
e Veterinárias.

CDU 619:616-006:599.323

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

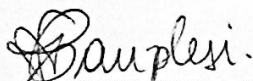
**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS TÓXICOS DA QUIMIOTERAPIA METRONÔMICA A BASE DE CICLOFOSFAMIDA OU METOTREXATO EM RATOS WISTAR**

**AUTORA: MARIA LUCIA CORREAL SUAREZ**

**ORIENTADOR: AUREO EVANGELISTA SANTANA**

**COORIENTADORA: ANNELESE CARLA CAMPRESI DOS SANTOS**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em **MEDICINA VETERINÁRIA**, área: **CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA** pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ANNELESE CARLA CAMPRESI DOS SANTOS  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. THIAGO DEMARCHI MUNHOZ  
Departamento de Clínica Veterinária / Centro Universitário Barão de Mauá - Ribeirão Preto/SP



Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 27 de janeiro de 2017

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**María Lucía Correal-Suárez** – Filha de María Cecilia Suárez-Navarro e Luis Fernando Correal-Núñez, nascida em 6 de fevereiro de 1989, na cidade de Bogotá (Colômbia). Tornou-se Médica Veterinária pela *Universidad Nacional de Colombia* aos 11 dias do mês de setembro do ano de 2013. Realizou iniciação científica sob orientação do Prof. Dr. Jaime Fernando González-Mantilla, fazendo estudos de genotoxicidade em peixes. Trabalhou como Médica Veterinária durante 18 meses em clínica veterinária particular na cidade de Bogotá. Em março de 2015, iniciou o Curso de Mestrado oferecido pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica, da FCAV/Unesp, Câmpus Jaboticabal, depois de ser selecionada pelo Programa de Estudantes Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) como bolsista (CNPq), sob orientação do Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana e coorientação da Profa. Dra. Annelise Carla Camplesi. Durante 2016, se envolveu em diversas atividades de pesquisa e ensino na área de toxicologia veterinária, no Grupo de Estudos em Pequenos Animais (GEPA) da FCAV e como professora voluntária do projeto de extensão UNATI (Universidade Aberta à Terceira Idade). Acompanhou as labores do Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/Unesp, com supervisão da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa e do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi, participando em diferentes cursos e seminários relacionados com a área.

“A vida humana acontece só uma vez, e não poderemos jamais verificar qual seria a boa ou a má decisão, porque, em todas as situações, só podemos **decidir** uma vez.”

A insustentável leveza do ser,  
Milan Kundera, 1984.

*“In memoriam”* do meu filho de quatro patas, o Peto, que com sua partida permitiu-me ver tantas coisas que não queria e deu-me a força para empreender novos caminhos. Dedico este trabalho às vidas que poderão ser preservadas se a nossa compreensão do câncer progredir.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à vida pela oportunidade de estar aqui e aos meus pais, pela força, método e apoio para voar.

Agradeço ao meu namorado, por ser meu companheiro nesta luta por chegar até aqui, assim como pela sua participação em todas as etapas deste trabalho, particularmente nas análises estatísticas.

Ao **Colégio Refous**, *in memoriam* do seu fundador M. Roland Jeangros, levo comigo sua formação em cada passo que dou, e à **Universidade Nacional de Colômbia**, particularmente ao Professor Olimpo Oliver, pelo método e a disciplina; professores: Jaime Fernando González, inspirador por meu interesse e paixão pela toxicologia; Claudia Jiménez; Marta Cecilia Suárez; Giovanni Vargas; Jorge Zambrano; e muitos outros, por modelar a minha formação e serem exemplos, apesar dos desencontros.

Ao **PEC-PG** e ao **CNPq** pela iniciativa de cooperação entre países e pelo apoio financeiro e logístico.

Agradeço ao **Prof. Áureo**, pela sua disposição em fazer possível meu mestrado em termos físicos e logísticos, nada teria sido possível sem a sua ajuda.

A todo o pessoal do **Hospital Veterinário**, especialmente à equipe do **Laboratório Clínico** (Anna, Matheus, Douglas, Talita, Carol, Fernanda, Amanda, Nathan, Helena e Letícia), da **Clínica Médica de Pequenos Animais** e especialmente ao **Serviço de Oncologia** e **todos** seus integrantes que me acolheram, mesmo me resistindo, até conseguir me apaixonar também e aprender mais do imaginável, em especial à **Rafaela Bortolotti** pela parceria, confiança e amizade. À **Profa. Mirela** e ao **Prof. Andriago**, pela oportunidade para fazer este caminho.



Ao Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia da FCAV/Unesp por se disponibilizar para a realização de nossa pesquisa, em particular ao **seu Euclides**. Assim como ao Biotério Central da UFLA pela abertura e treinamento.

À **Profa. Rose**, ao laboratório de histopatologia e à **Chica**, por sua disposição e amabilidade.

Aos membros da minha equipe de trabalho, **Letícia e Paulo**.

Aos meus irmãos no Brasil, por ser a minha família aqui: **Flor, Rafaela, Dasmiliá, Lorena, Llermé, Colombia, Helena, Andrés Arias, Yani, Elwi, Constanza, David, Miguel, Valentina, Ana, Andrés, Jorge Luis, Oscar, Vítor**. Aos fixos, aos de marcha e aos que tal vez nunca verei de novo.

Ao **Peto** e a **Rala** que partiram no meio desta travessia, me fazendo mudar o rumo e a vocação.

Por fim, agradeço especialmente à **Profa. Annelise** por materializar cada coisa, por acompanhar cada passo, por me ensinar, por me abrir as portas do começo ao fim, por manter a força, a cordialidade, a qualidade humana, apesar das múltiplas situações difíceis que aconteceram neste tempo, imensamente agradecida pelo apoio e pela magnífica orientação.

## SUMÁRIO

Página

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Câncer .....	2
2.2 Quimioterapia convencional.....	3
2.3 Quimioterapia metronômica.....	4
2.3.1 Definição .....	4
2.3.2 Importância e utilidade .....	4
2.3.3 Mecanismos de ação .....	5
2.3.4 Esquemas e fármacos utilizados.....	7
2.3.4.1 Ciclofosfamida.....	8
2.3.4.2 Metotrexato.....	10
2.3.4.3 Associações .....	11
2.3.5 Toxicidade.....	12
2.3.5.1 Ciclofosfamida.....	13
2.3.5.2 Metotrexato.....	13
2.3.5.3 Interações.....	15
2.4 Perspectivas .....	16
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos .....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Fase I.....	19
4.1.1 Animais .....	19

4.1.2	Administração dos fármacos .....	19
4.1.3	Avaliação clínica e geral.....	20
4.2	Fase II.....	21
4.2.1	Eutanásia .....	21
4.2.2	Coleta de sangue e medula óssea .....	21
4.2.3	Avaliação de constituintes sanguíneos (hemograma).....	21
4.2.4	Bioquímica sérica.....	22
4.2.5	Avaliação citológica de medula óssea.....	22
4.3	Fase III.....	22
4.3.1	Necropsia e coleta de amostras.....	22
4.3.1.1	Avaliação microscópica (histopatológica).....	23
4.4	Delineamento experimental e Análise estatística .....	23
5	RESULTADOS.....	25
5.1	Fase I.....	25
5.1.1	Ciclofosfamida.....	25
5.1.2	Metotrexato .....	28
5.2	Fase II.....	31
5.2.1	Ciclofosfamida.....	31
5.2.1.1	Hemograma.....	33
5.2.1.2	Bioquímica sérica .....	33
5.2.1.3	Aspirado de medula óssea .....	33
5.2.2	Metotrexato .....	34
5.2.2.1	Hemograma.....	34
5.2.2.2	Bioquímica sérica .....	36
5.2.2.3	Aspirado de medula óssea .....	36
5.3	Fase III.....	37
5.3.1	Achados macroscópicos .....	37
5.3.2	Avaliação histopatológica.....	37
5.3.2.1	Ciclofosfamida.....	37
5.3.2.2	Metotrexato.....	39
6	DISCUSSÃO.....	43
7	CONCLUSÕES.....	48
8	REFERÊNCIAS .....	50



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal




## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 11690/15 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação toxicológica dos efeitos da quimioterapia metronômica usando ciclofosfamida, metotrexato e capecitabina em Ratos Wistar**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de julho de 2015.

Jaboticabal, 06 de julho de 2015.

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paola Castro Moraes  
Coordenadora – CEUA

## EFEITOS TÓXICOS DA QUIMIOTERAPIA METRONÔMICA A BASE DE CICLOFOSFAMIDA OU METOTREXATO EM RATOS WISTAR

**RESUMO** – A quimioterapia metronômica é uma estratégia de uso crescente em Medicina Veterinária, que emprega fármacos em baixas doses e por longos períodos de tempo para controlar o crescimento tumoral. Objetivou-se avaliar os efeitos tóxicos de dois quimioterápicos antineoplásicos em animais livres de tumores seguindo esquemas metronômicos, assim como os efeitos residuais uma vez que a terapia foi suspensa. Para tanto, foram empregados 54 ratos Wistar, divididos em 3 grupos de tratamento de 18 animais cada, que receberam doses baixas de ciclofosfamida (CPX), metotrexato (MTX) ou placebo (grupo controle, CTR), via oral, por meio de gavagem, durante 45 dias. Os animais tiveram acompanhamento periódico para pesagem e monitoramento clínico e do consumo de alimento e água. Realizou-se eutanásia em seis animais de cada grupo aos 30 (M1), 45 (M2) e 60 dias (M3), para coleta de amostras para hemograma, bioquímica sérica, citologia de medula óssea e análise histopatológica de baço, fígado, rim, intestino, pulmão, coração, cérebro e artéria. Empregou-se o teste de *Qui-quadrado* para análise estatística das variáveis não paramétricas e o teste *T-student* para amostras não pareadas ou uma ANOVA seguida de uma comparação múltipla de *Tukey* para as variáveis paramétricas. Seis animais do grupo CPX morreram, portanto a terapia foi suspensa aos 30 dias de tratamento, mantendo o período de observação até 45 dias. Os animais tratados com CPX exibiram significativa redução de peso e do consumo de alimento e água ( $p < 0,05$ ), assim como múltiplas alterações clínicas com comprometimento respiratório e neuromuscular, principalmente, que persistiram após a suspensão do fármaco. Em M1, houve aumento significativo de neutrófilos e redução de leucócitos, linfócitos e albumina no sangue, assim como diminuição de linfócitos, plasmócitos e das populações eritroides maduras na medula óssea ( $p < 0,05$ ). Em M2, somente a redução de linfócitos e o aumento de neutrófilos persistiram de forma significativa, junto com a depleção de populações eritroides maduras ( $p < 0,05$ ). Os animais tratados com MTX mostraram sinais clínicos inespecíficos de leves a moderados. Estes animais em M1 exibiram aumento significativo de leucócitos no sangue e das populações mieloides imaturas na medula óssea ( $p < 0,05$ ), e para M3, significativo aumento de neutrófilos no sangue, e depleção das populações mieloides imaturas e linfócitos, com aumento das mieloides maduras ( $p < 0,05$ ). Na avaliação histopatológica, para ambos os fármacos, observou-se significativa hipocelularidade esplênica ( $p < 0,05$ ), alterações pulmonares, degeneração hidrópica hepatocelular, principalmente. As doses metronômicas de MTX e CPX causaram leve a moderada mielotoxicidade, junto com as consequências clínicas decorrentes da imunossupressão. Diferenças mínimas nas doses destes esquemas podem causar efeitos biológicos opostos, sugerindo uma estreita margem de segurança da quimioterapia metronômica, assim como possíveis efeitos residuais uma vez a terapia é suspensa. Sugere-se realizar novas pesquisas para estabelecer as doses metronômicas biologicamente ótimas conciliando efetividade e tolerância, de preferência na espécie alvo.

**Palavras-chave:** baixa dose, câncer, imunossupressão, quimioterápico, toxicidade

## TOXIC EFFECTS OF METRONOMIC CHEMOTHERAPY USING CYCLOPHOSPHAMIDE OR METHOTREXATE IN *WISTAR* RATS

**ABSTRACT** – Metronomic chemotherapy is a growing strategy in veterinary medicine that uses low doses of antineoplastic drugs for sustained periods of time to control tumor growth. This work aimed to evaluate toxic effects of metronomic chemotherapy schemes in tumor-free animals, and residual toxicity once treatment was suspended. There were used 54 healthy Wistar rats, divided in 3 groups (18 animals each), that received low-doses of cyclophosphamide (CPX), methotrexate (MTX) or placebo (control group, CTR) by oral gavage during 45 days. Clinical alterations, body weight, water and food intake were monitored periodically. Euthanasia was practiced within 6 animals from each group at 30 (M1), 45 (M2) and 60 days (M3) to perform hematological, biochemical and histopathologic analysis (spleen, liver, kidney, gut, lung, heart, brain and artery), and bone marrow cytology. An unpaired *T-student* test or a one-way ANOVA in conjunction with a *Tukey* multiple comparison test were done to analyze parametrical data, as a *Chi-square* test for semi-quantitative parameters. Six animals treated with CPX died and therapy was suspended at 30 days, within 15 days of observation after withdrawal. CPX treated animals exhibited significant reduction of weight gain, water and food intake ( $p < 0.05$ ), and clinical alterations related to respiratory and neuromuscular involvement, which even persisted after CPX withdrawal. At M1, significant neutrophil augmentation and reduction of leukocytes, lymphocytes and albumin was predominant in blood, as bone marrow reduction of lymphocytes, plasmatic cells and mature erythroid populations were significantly prevalent ( $p < 0.05$ ). At M2, only higher neutrophils count and reduction of lymphocytes persisted, as depletion of mature erythroid populations ( $p < 0.05$ ). MTX treated animals only evidenced mild to moderate unspecific clinical signs. At M1, MTX treated showed significant leukocytosis and augmentation of immature myeloid populations from bone marrow ( $p < 0.05$ ), as well as, significant neutrophils augment in blood, depletion of lymphocytes and immature myeloid cells, with high mature myeloid populations in bone marrow ( $p < 0.05$ ) at M3. At histopathological level, both treatment groups mainly evidenced significant reduction of splenic cellularity ( $p < 0.05$ ); pulmonary compromise; and hepatocellular hydropic degeneration. Metronomic doses of CPX and MTX caused mild to moderate myelotoxicity, with immune suppression and associated clinical signs. Slight differences within metronomic doses can result in opposite biological effects, which suggest that metronomic chemotherapy has narrow margins of safety, and that residual effects may even persist after treatment withdrawal. More research is encouraged to establish optimal biological doses, effective and tolerable, for metronomic schedules and within target species.

**Keywords:** cancer, chemotherapeutical, immune suppression, low-dose, toxicity

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ALP** – Fosfatase alcalina

**ALT** – Alanino aminotransferase

**AST** – Aspartato aminotransferase

**CEP's** – Células progenitoras endoteliais

**CHCM** – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

**CPX** – Ciclofosfamida

**CTR** – Grupo Controle

**DMT** – Dose Máxima Tolerada

**DP** – Desvio Padrão

**EDTA** – Ácido Etilenodiamino-Tetra-Acético

**GGT** – Gama-glutamil transpeptidase

**HCM** – Hemoglobina Corpuscular Média

**H&E** – Coloração Hematoxilina e Eosina

**M1** – Momento de avaliação 30 dias

**M2** – Momento de avaliação 45 dias

**M3** – Momento de avaliação 60 dias

**M:E** – Relação mieloide – eritroide

**MTX** – Metotrexato

**NK** – Natural Killer

**PV** – Peso Vivo

**Treg's** – Células T reguladoras

**TSP-1** – Trombospondina – 1

**VCM** – Volume Corpuscular Médio

**VEGF** – Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Peso vivo, consumo de alimento e água de ratos <i>Wistar</i> tratados por 30 dias com dose metronômica de ciclofosfamida (CPX) ou placebo (CTR).....	26
<b>Tabela 2.</b> Peso vivo, consumo de alimento e água de ratos <i>Wistar</i> tratados por 45 dias com dose metronômica de metotrexato (MTX) ou placebo (CTR).....	29
<b>Tabela 3.</b> Hemograma e bioquímica sérica de ratos <i>Wistar</i> tratados por 30 dias com dose metronômica de ciclofosfamida (CPX) ou placebo (CTR).....	322
<b>Tabela 4.</b> Contagem diferencial de populações celulares de aspirado de medula óssea de ratos <i>Wistar</i> tratados por 30 dias com dose metronômica de ciclofosfamida (CPX) ou placebo (CTR). ....	344
<b>Tabela 5.</b> Hemograma e bioquímica sérica de ratos <i>Wistar</i> tratados por 45 dias com dose metronômica de metotrexato (MTX) ou placebo (CTR). ....	355
<b>Tabela 6.</b> Contagem diferencial de aspirado de medula óssea de ratos <i>Wistar</i> tratados por 45 dias com dose metronômica de metotrexato (MTX) ou placebo (CTR). ....	366



**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1.** Peso vivo, consumo de alimento e água de ratos *Wistar* tratados por 30 dias com dose metronômica de ciclofosfamida (CPX) ou placebo (CTR). Diferenças significativas  $p < 0,05$  (\*), teste de *T-student*. .....277
- Figura 2.** Frequência de eventos clínicos por sistema afetado, de ratos *Wistar* tratados por 30 dias com dose metronômica de ciclofosfamida .....288
- Figura 3.** Peso vivo, consumo de alimento e água de ratos *Wistar* tratados por 45 dias com dose metronômica de metotrexato (MTX) ou placebo (CTR). Diferenças significativas  $p < 0,05$  (\*), teste de *T-student*. .....30
- Figura 4.** Frequência de eventos clínicos por sistema afetado, de ratos *Wistar* tratados por 45 dias com dose metronômica de metotrexato .....311
- Figura 5.** Alterações macroscópicas de ratos *Wistar* tratados por 30 dias com ciclofosfamida metronômica. (A) Acentuada perda de massa muscular (esquerda), animal controle (direita); (B) Esplenomegalia (superior), animal controle (inferior); (C) Nodulações no parênquima pulmonar. ....38
- Figura 6.** Fotomicrografias de baço de ratos *Wistar* tratados por 30 dias com ciclofosfamida metronômica (CPX) ou placebo (CTR). (A) Baço normal, CTR, 30 d; (B) Depleção celular leve, CPX, 30 d; (C) Depleção celular moderada, CPX, 30 d; (D) Depleção celular severa, CPX, 30 d. H&E. 100x, bar 100  $\mu$ m. ....38
- Figura 7.** Frequência das principais alterações histopatológicas de ratos *Wistar* tratados com dose metronômica de ciclofosfamida .....319
- Figura 8.** Frequência das principais alterações histopatológicas de ratos *Wistar* tratados com dose metronômica de metotrexato .....40
- Figura 9.** Fotomicrografias pulmonares de ratos *Wistar* tratados com doses metronômicas de ciclofosfamida (CPX), metotrexato (MTX) ou placebo (CTR). (A) Pulmão normal, CTR, 30 d; (B) Broncopneumonia fibrinopurulenta severa, CPX, 30 d, infiltrado inflamatório no interior de um bronquiolo (seta); (C) Abscesso pulmonar, CPX, 30 d; (D) Pneumonia intersticial crônica moderada, CPX, 45 d, macrófagos espumosos (seta); (E) Pneumonia intersticial crônica severa, MTX, 30

d; (F) Pneumonia intersticial crônico-ativa moderada, MTX, 45 d. H&E. 200x, bar 50  $\mu\text{m}$ .....4141

**Figura 10.** Fotomicrografias de fígado de ratos *Wistar* tratados com dose metronômica de ciclofosfamida (CPX), metotrexato (MTX) ou placebo (CTR). (A) Fígado normal, CTR, 30 d; (B) Degeneração hidrópica periportal severa, CPX, 30 d; (C) Degeneração hidrópica centrolobular severa, CPX, 45 d; (D) Degeneração gordurosa centrolobular moderada, MTX, 30 d; (E) Degeneração hidrópica periportal moderada, MTX, 45 d; (F) Congestão moderada de grandes vasos (seta), MTX, 60 d. H&E. 400x, bar 20  $\mu\text{m}$ .....422

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um fenômeno cada vez mais frequente tanto em medicina humana como na prática veterinária. Para seu controle são empregados protocolos quimioterápicos agressivos, com um ou vários agentes antiproliferativos, administrados em altas doses, tentando destruir o maior número possível de células neoplásicas. No entanto, estes protocolos causam efeitos adversos acentuados, fazendo necessária a interrupção ou suspensão da terapia para permitir a recuperação dos tecidos normais. Porém, estes períodos de descanso podem facilitar a recidiva tumoral, assim como o aparecimento de metástases ou clones resistentes à terapia (MUTSAERS, 2007; TORIMURA et al., 2013; BILLER, 2014).

Tanto em medicina humana quanto em veterinária existe a necessidade de utilizar novas estratégias terapêuticas que favoreçam o controle de diferentes neoplasias com menores efeitos adversos. Baseado nisso, a quimioterapia metronômica, ou de dose baixa, destaca-se por seu potencial terapêutico e reduzida toxicidade. No entanto, os estudos toxicológicos desta modalidade de quimioterapia são escassos, desconhecendo os efeitos tóxicos decorrentes de tratamentos prolongados, assim como a toxicidade residual, uma vez que a terapia é suspensa.

A ciclofosfamida e o metotrexato são alguns dos fármacos mais utilizados em esquemas metronômicos. Porém, possuem escassos estudos farmacocinéticos e as doses e intervalos utilizados são empíricos, muitas vezes baseados em estudos prévios que não seguem protocolos padronizados. Os estudos pré-clínicos são fundamentais para determinar os efeitos tóxicos associados ao uso desta modalidade de quimioterapia, sendo necessários para avaliar a margem real de segurança destes fármacos e garantir maior confiança na sua utilização em longo prazo, com aplicabilidade em medicina veterinária e humana, uma vez que os roedores podem ser empregados como modelo experimental em ambas as ciências.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos de um esquema metronômico a base de ciclofosfamida ou metotrexato em ratos *Wistar* livres de tumores, assim como os efeitos residuais após o término da terapia.

## 2 REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

### 2.1 Câncer

O câncer é uma prioridade em termos de saúde mundial, devido ao seu alto índice de morbidade e mortalidade em todas as espécies (PANG; ARGYLE, 2016). Em humanos, considera-se uma das principais causas de morte, sendo o câncer de pulmão e o de mama os tipos mais comuns, com 12,7% e 10,9% dos casos, respectivamente (FERLAY et al., 2010).

Em Medicina Veterinária, o panorama é igualmente preocupante, tanto pelo impacto econômico para as espécies de produção, especialmente quando relacionado a causas infecciosas (doença de Marek em aves ou leucose bovina em gado, por exemplo), quanto em animais de companhia, pelo aumento na expectativa de vida destas espécies e o forte vínculo afetivo que representam. Embora os dados epidemiológicos sejam escassos, estima-se uma incidência aproximada de 30% em cães e de 20 a 25% em gatos (PANG; ARGYLE, 2016), sendo o tumor de mama o mais frequentemente diagnosticado em fêmeas caninas, seguido do linfoma e os tumores de pele (os mais prevalentes em machos); e em felinos, os tumores de origem linfóide são os mais representativos seguidos dos tumores de pele e mama (BREEN, 2009).

O câncer é um conjunto de doenças com mais de 100 diferentes tipos e subtipos que acometem diversos órgãos, envolvendo mudanças dinâmicas no genoma (HANAHAN; WEINBERG, 2000), que se refletem em alterações dos mecanismos homeostáticos que controlam o crescimento, a divisão e a morte celular, fazendo com que um grupo de células perca o controle intrínseco destes processos (PANG; ARGYLE, 2016). Estabeleceram-se oito alterações essenciais na fisiologia celular que comandam o crescimento neoplásico, listadas como: 1) autosuficiência em sinais de desenvolvimento; 2) insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento; 3) evasão da morte celular programada ou apoptose; 4) potencial de replicação celular ilimitado; 5) estimulação da angiogênese; 6) favorecimento da invasão tecidual e metástase; 7) reprogramação do metabolismo energético; e 8) evasão do sistema imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As diferentes estratégias terapêuticas para o controle do câncer baseiam-se em afetar os mecanismos fisiopatológicos das células neoplásicas. Destaca-se que o conceito “a cura do câncer” é sobrestimado, pelo fato de ser um conjunto de diversas doenças que se comportam de forma heterogênea, precisando de tratamentos igualmente variados. A aproximação que vem sendo realizada contempla terapias locais ou sistêmicas, que incluem remoção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia antineoplásica, imunoterapia, terapias moleculares ou alvo, entre outras, todas elas foco de múltiplas pesquisas (WITHROW; VALE; PAGE, 2012).

## **2.2 Quimioterapia Convencional**

A quimioterapia é peça fundamental em oncologia para o tratamento de neoplasias regionais ou avançadas (GNONI et al., 2015). A quimioterapia antineoplásica convencional, ou de dose máxima tolerada (DMT), representa o modelo mais usado durante os últimos 70 anos para o tratamento sistêmico do câncer (TAKIMOTO, 2009).

Consiste na administração de altas doses de fármacos citotóxicos seguida de períodos de descanso para permitir a recuperação dos tecidos normais (HANAHAN; BERGERS; BERGSLAND, 2000). Estes esquemas induzem diminuição significativa do volume tumoral (BILLER, 2014) ao causar morte celular logarítmica de populações de rápida divisão, como seriam as células neoplásicas (MUTSAERS, 2007). Seus mecanismos de ação são inespecíficos e se relacionam com indução de dano ao DNA, interferência com a sua replicação ou alteração da formação de microtúbulos (TAKIMOTO, 2009).

Muitos destes esquemas antineoplásicos são inicialmente efetivos, causando regressão tumoral, estabilização da doença e/ou aumento dos tempos de sobrevida dos pacientes (HANAHAN; BERGERS; BERGSLAND, 2000). No entanto, o envolvimento de populações celulares normais de rápida divisão, como a mucosa gastrointestinal, os folículos pilosos e as células da medula óssea, explica as toxicidades associadas, que podem incluir: náusea, vômito, diarreia, alopecia e pancitopenias (TAKIMOTO, 2009), que além de agir em detrimento da qualidade de vida do paciente (HANAHAN; BERGERS; BERGSLAND, 2000), fazem necessária a realização de interrupções ou encurtamentos na terapia, que podem levar a recrescimento tumoral, resistência aos fármacos ou apresentação de metástase

(BILLER, 2014). Por exemplo, permitindo a recuperação das células endoteliais tumorais durante o período de interrupção da terapia (GNONI et al., 2015).

Os fatores acima citados, junto com a reduzida efetividade destes esquemas em pacientes com câncer avançado ou metastático, fazem com que a eficácia antitumoral dos esquemas convencionais seja passível de discussões, evidenciando suas limitações e estimulando a pesquisa de novas estratégias de tratamento (KERBEL; KAMEN, 2004; MUTSAERS, 2007; GNONI et al., 2015).

## **2.3 Quimioterapia metronômica**

### **2.3.1 Definição**

A quimioterapia metronômica, também conhecida como quimioterapia contínua de baixa dose ou quimioterapia antiangiogênica (antiga denominação), envolve a administração de quimioterápicos antineoplásicos em baixas doses, em intervalos regulares, com redução ou eliminação das interrupções ao tratamento entre cada dose e por longos períodos de tempo (HANAHAN; BERGERS; BERGSLAND, 2000).

### **2.3.2 Importância e utilidade**

A quimioterapia metronômica surge como conceito há mais de 15 anos, na busca de novas estratégias para o controle sistêmico do câncer, devido às múltiplas limitações da quimioterapia antineoplásica convencional (HANAHAN; BERGERS; BERGSLAND, 2000). De modo interessante, o controle dos mecanismos indiretos de sobrevivência tumoral, a importância do microambiente tumoral e o controle da formação de novos vasos sanguíneos se destacam como estratégia terapêutica (PASQUIER; KAVALLARIS; ANDRÉ, 2010), sendo as células endoteliais o alvo terapêutico inicial, devido a sua estabilidade genética, o que confere menor chance de desenvolver resistência farmacológica a tratamentos prolongados (KERBEL; KAMEN, 2004; GNONI et al., 2015). Desde então, inúmeras pesquisas têm sido realizadas, acrescentando elementos e reformulando outros, mostrando que a compreensão do potencial desta modalidade de quimioterapia, assim como seu uso apropriado ainda precisa de maiores pesquisas (ROMITI et al., 2013; BARBOLOSI et al., 2014).

A quimioterapia metronômica se apresenta como uma tendência relativamente nova, especialmente em Medicina Veterinária, oferecendo uma resposta duradoura e estável no controle da doença (BILLER, 2014), particularmente em casos nos quais quimioterapia convencional não foi efetiva, pois se considera bem tolerada, de fácil administração (quando usada oralmente), de baixo custo e menor toxicidade, reduzindo inclusive o emprego de medicamentos de suporte (TORIMURA et al., 2013; CHEN; DOLOFF; WAXMAN, 2014; GNONI et al., 2015). Consolidada-se como opção paliativa viável para pacientes com câncer resistente e/ou avançado, de difícil abordagem cirúrgica, pacientes muito debilitados, com morbidades concomitantes, geriátricos ou com câncer recorrente (GNONI et al., 2015). Relata-se eficácia terapêutica contra mais de 18 tipos de câncer, que acometem o trato gastrointestinal, o sistema respiratório, hematopoiético, neurológico, tegumentar e genitourinário (TORIMURA et al., 2013). Inclusive, emprega-se conjuntamente com outros fármacos ou associada à quimioterapia convencional (LOVEN et al., 2013; GNONI et al., 2015). Porém, o esquema metronômico não substitui modalidades mais intensivas de citorredução (MUTSAERS, 2009).

### **2.3.3 Mecanismos de ação**

Os mecanismos de ação reconhecidos da quimioterapia metronômica, incluem: controle da angiogênese; modulação imune; inibição direta do crescimento tumoral; e indução de dormência tumoral (GNONI et al., 2015).

A angiogênese, definida como o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, é um fenômeno fundamental para o crescimento e a sobrevivência dos tumores, os quais favorecem a proliferação endotelial no seu próprio benefício em um processo conhecido como “switch” angiogênico, que altera o balanço normal entre moléculas pró e antiangiogênicas, com aumento de diversos fatores de crescimento (do endotélio vascular – VEGF, de fibroblastos e o derivado das plaquetas, por exemplo), assim como inibição de fatores supressores da proliferação endotelial, como a trombospondina 1 (TSP-1), antagonista do VEGF e causador de apoptose ou supressão direta na proliferação endotelial. Similarmente, os tumores estimulam a formação de novos vasos a partir de células progenitoras endoteliais (CEP's) que migram da medula óssea para os locais de

neovascularização (KERBEL; KAMEN, 2004; BILLER, 2014). O controle da angiogênese é considerado um objetivo viável em terapêutica oncológica. Os mecanismos antiangiogênicos da quimioterapia metronômica envolvem: citotoxicidade intrínseca das células endoteliais (KERBEL; KAMEN, 2004; GNONI et al., 2015); controle da regeneração e viabilidade das CEP's (TORIMURA et al., 2013); instabilidade dos fatores de crescimento promotores de expansão vascular; aumento de inibidores de angiogênese endógenos (MUTSAERS, 2009; CHEN; DOLOFF; WAXMAN, 2014); e paradoxalmente, *normalização* vascular ou destruição seletiva de vasos ineficientes, por facilitar a ação dos quimioterápicos antineoplásicos (MA; WAXMAN, 2008). No entanto, a ação antiangiogênica é plausível de debate, devido à evidência de disseminação hematogênica de células tumorais e maior risco de metástase (MARTIN-PADURA et al., 2012; BILLER, 2014).

Outra característica dos tumores é a habilidade de crescer sem ser detectados pelo sistema imune, favorecendo ambientes imunossupressores para evadir o ataque das células T citotóxicas, T helper e Natural Killer (NK), assim como permitir a ação de células supressoras como linfócitos T reguladores (Treg's), citocinas anti-inflamatórias e células supressoras derivadas da medula óssea, ajudando a estabelecer tolerância tumoral e facilitando o desenvolvimento de metástases (FINN, 2012). A modulação imune associada com a quimioterapia metronômica envolve o recrutamento de células de imunidade inata antitumoral (CHEN; DOLOFF; WAXMAN, 2014), com maior proliferação de linfócitos e células de memória, favorecendo a maturação de células dendríticas, recrutamento de macrófagos e NK, assim como redução seletiva das populações de Treg's (TORIMURA et al., 2013).

A inibição no crescimento tumoral relaciona-se também com uma ação citotóxica direta (GNONI et al., 2015), principalmente sobre as células tronco tumorais, um fenótipo neoplásico com diferentes características de auto renovação, responsável pela iniciação tumoral, aparecimento de metástases ou recidivas (MARTIN-PADURA et al., 2012).

A dormência tumoral é um estadio evolutivo de desenvolvimento neoplásico, no qual células tumorais residuais estão presentes, mas permanecem inativas em resposta a parada do ciclo celular ou equilíbrio entre apoptose e proliferação (AGUIRRE-GHISO, 2007). A indução de dormência tumoral obriga às células a



permanecer na fase inicial de inatividade, por meio de dormência angiogênica e vigilância imune efetiva (GNONI et al., 2015).

Adicionalmente, o *efeito 4D* é um mecanismo ainda controverso, com alguns estudos *in vitro* e limitada evidência clínica. Com a administração prolongada de quimioterapia, as células tumorais vão ficando quimicamente dependentes destes fármacos durante o tempo de tratamento, uma vez que a terapia é suspensa, o microambiente tumoral se torna instável e as células tumorais morrem (GNONI et al., 2015). No entanto, este mecanismo ainda é passível de discussão e precisa de mais pesquisas.

#### **2.3.4 Esquemas e fármacos utilizados**

Existe controvérsia em relação à frequência de administração dos esquemas metronômicos assim como às doses empregadas (TORIMURA et al., 2013; GNONI et al., 2015).

Acreditava-se que a administração diária era mais efetiva, porém, estudos recentes demonstraram que esquemas regulares a cada 3 ou 6 dias poderiam ser inclusive mais vantajosos (CHEN; DOLOFF; WAXMAN, 2014).

Até então, a seleção das doses metronômicas tem sido um processo completamente empírico (LIEN et al., 2013), embora se aconselhe o uso de uma terceira a uma décima parte da dose convencional (SHI et al., 2014) ou 2 a 6% da dose máxima tolerada – DMT (PENEL; ADENIS; BOCCI, 2012). Estes valores não se baseiam em fundamentos científicos, pelo que devem usar relatos prévios que conciliem eficácia e toxicidade, devido à falta de estudos farmacocinéticos suficientes para esta modalidade (BOCCI; KERBEL, 2016). Em alguns casos, outras espécies podem ser utilizadas como modelos de extrapolação alométrica. A *Food and Drug Administration* (FDA) viabiliza a extrapolação, recomendando o emprego da superfície de área corporal e fatores de conversão específicos para cada espécie (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008).

Apesar de algumas limitações fisiológicas, os roedores de laboratório são considerados modelos fundamentais na pesquisa biomédica, por assemelharem-se em respostas clínicas com outros mamíferos (SENGUPTA, 2013). Estudos referem que aproximadamente um dia de vida de um rato pode equivaler a 34,8 dias de vida

humana, permitindo fazer estudos em meses e ter resultados equiparáveis com anos de tratamento em pessoas ou animais domésticos (ANDREOLLO et al., 2012).

Em humanos, dentre os fármacos propostos como viáveis para os esquemas metronômicos, encontram-se: ciclofosfamida, vinorelbina, capecitabina, metotrexato, bevacizumab, etoposídeo, gencitabina, sorafenib, everolimus, temozolomida, entre outros, que mostram efetividade para o manejo de neoplasias tanto de primeira quanto de segunda linha de tratamento, além disso, são utilizados sinergicamente com outros agentes antineoplásicos (inclusive associados a esquemas de DMT), anti-inflamatórios, terapias alvo, terapias moleculares ou radiação (BILLER, 2014; GNONI et al., 2015).

Em veterinária, a quimioterapia metronômica é considerada uma opção interessante pela facilidade de administração, custo razoável e baixo perfil de toxicidade. Biller, em 2014, agrupou nove pesquisas clínicas com boa tolerância e resposta antitumoral favorável, sendo a maioria prospectivas e de fase I e II, a base de ciclofosfamida, clorambucil ou lomustina, e somente uma delas realizada em gatos. No entanto, estão faltando mais estudos com condições padronizadas que permitam fazer melhores comparações de eficácia, toxicidade crônica, doses e associações. A quimioterapia metronômica está se consolidando como uma opção terapêutica muito popular, infelizmente, usada de forma indiscriminada em veterinária, pois se baseia em poucas evidências clínicas (BILLER, 2014).

#### **2.3.4.1 Ciclofosfamida**

A *Ciclofosfamida* (CPX) é um agente alquilante, pertencente ao grupo das mostardas nitrogenadas (PENEL; ADENIS; BOCCI, 2012), apresenta alta biodisponibilidade oral (ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006) e sofre hidroxilação hepática pelo citocromo P450, produzindo dois metabólitos ativos: a fosforamida, com maior potencial terapêutico, e a acroleína, relacionada com efeitos tóxicos (JALALI; HASANZADEH; MALEKINEJAD, 2012). Sua citotoxicidade é explicada pela formação de ligações cruzadas e adutos que inibem a síntese do DNA (LIVSHITS; RAO; SMITH, 2014).

A CPX é usada convencionalmente para tratar tumores sólidos e vários tipos de carcinomas (mamário, ovárico, prostático, testicular, pulmonar de pequenas células, por exemplo), alguns sarcomas, neoplasias hematopoiéticas, como leucemia

linfocítica crônica, mieloma múltiplo, diferentes tipos de linfoma, entre outros (ROZADOS et al., 2004; PENEL; ADENIS; BOCCI, 2012; LIVSHITS; RAO; SMITH, 2014), assim como para a artrite reumatoide, o lúpus eritematoso sistêmico e como imunossupressor no transplante de medula óssea (ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006). Adicionalmente, é o fármaco mais frequentemente utilizado e estudado em esquemas metronômicos, tanto como agente único quanto em protocolos de poliquimioterapia (PENEL; ADENIS; BOCCI, 2012), porém, os estudos farmacocinéticos são etapas fundamentais deste processo, mas infelizmente são escassos (BOCCI; KERBEL, 2016). Assim como outros quimioterápicos, a CPX metronômica favorece a resposta imune antitumoral efetiva, usando uma dose suficientemente alta para lesar as células neoplásicas, mas incapaz de afetar às células imunes antitumorais que possam ser particularmente sensíveis à citotoxicidade dos quimioterápicos (CHEN; DOLOFF; WAXMAN, 2014).

Em humanos, diferentes doses metronômicas de CPX têm sido propostas, mas 50 mg por dia é a dose mais frequentemente utilizada, sendo na maioria dos casos, empregada em associação com diversos fármacos (BILLER, 2014).

Em ratos, baixas doses de CPX mostraram atividade antiangiogênica, desaparecimento de neoplasias induzidas experimentalmente e redução de crescimento de tumores resistentes a altas doses da mesma droga (DAHL BORKAMO et al., 2008). Doses de 5 e 10 mg/kg de CPX três vezes por semana bloquearam o crescimento metastático em 100% dos linfomas implantados e em 83% dos sarcomas, e em todos os casos melhorou a sobrevivência dos animais tratados e reduziu o crescimento do tumor (ROZADOS et al., 2004). Ratos que receberam 20 mg/kg de CPX duas vezes por semana durante 12 semanas, evidenciaram redução significativa de tumores intra-hepáticos, menor expressão de marcadores tumorais, redução da densidade de microvasos, menor taxa de metástase e aumento dos tempos de sobrevida com relação ao grupo tratado com terapia convencional (JANG et al., 2011). Em camundongos, a dose biológica ótima (DBO) de esquemas metronômicos a base de CPX estabeleceu-se como: 140 mg/kg a cada 6 dias, associada a regressão tumoral por ativação de resposta imune antitumoral (DOLOFF; WAXMAN, 2012), ou 20 mg/kg diariamente, relacionada com diminuição do volume tumoral, inibição significativa da angiogênese com redução de CEP's (EMMENEGGER et al., 2004; SHAKED et al., 2005; MARTIN-PADURA et al.,

2012). Entretanto, reconhece-se que os efeitos terapêuticos podem ser opostos, principalmente no relacionado à modulação imune, quando diferentes doses são utilizadas (PENEL; ADENIS; BOCCI, 2012).

O panorama em veterinária não é muito diferente, pois somente foi achado um estudo em cães com sarcoma de tecidos moles grau I e II que receberam CPX 12,5 mg/m<sup>2</sup>/d durante 28 dias e mostraram redução significativa de Treg's, mas só aqueles que receberam 15 mg/m<sup>2</sup>/d tiveram redução da densidade da microvasculatura tumoral em 14 dias, considerando uma resposta antitumoral favorável, porém, dependente da dose (BURTON et al., 2011).

#### **2.3.4.2 Metotrexato**

O *Metotrexato* (MTX) é um antimetabólito, análogo estrutural do folato, inibidor competitivo da dihidrofolato redutase (SATOH et al., 2011), que leva à acumulação de folatos inativos, causando depleção dos substratos do folato e inibição direta das enzimas que dependem do mesmo, refletindo na inibição da replicação do DNA e da síntese do RNA (DANK et al., 2010). Apresenta boa biodisponibilidade oral (VAN ROON; VAN DE LAAR, 2010). O MTX é um agente importante no tratamento das neoplasias, assim como imunossupressor e adjuvante no controle da inflamação crônica, explicando seu uso na artrite reumatoide e na psoríase em humanos (CAVALCANTI; CORRÊA; DE CERQUEIRA LUZ, 2012). Como quimioterápico antineoplásico tem efeitos reconhecidos no tratamento da leucemia, linfoma, carcinomas em geral (de mama, bexiga, testículo, cabeça e pescoço) e alguns sarcomas; em veterinária tem sido empregado no tratamento do linfoma e do osteossarcoma (CHOUDHURY; GHOSH; PALO, 2000; DANK et al., 2010; TAKANO et al., 2014).

Em humanos, as doses metronômicas variam entre 10-35 mg por semana, de preferência em associação com CPX ou outros fármacos, tanto com ações antitumorais quanto anti-inflamatórias e imunossupressoras, mostrando eficácia e boa tolerância (MASCI et al., 2012; KIVITY et al., 2014).

Em animais domésticos, a dose metronômica não foi estabelecida ainda (DANK et al., 2010), similarmente ao que acontece com os outros fármacos utilizados em medicina humana e que ainda não têm sido explorados em veterinária (BILLER, 2014).

Os estudos pré-clínicos em roedores com doses metronômicas são escassos (PATEL et al., 2014) e a dose metronômica efetiva ainda não foi determinada.

#### **2.3.4.3 Associações**

Agrupando só alguns estudos prospectivos que envolveram entre 18 e 90 pacientes humanos com câncer de mama metastático, câncer refratário de ovário e próstata, sarcomas pediátricos, linfoma recidivante e mieloma múltiplo, tratados com CPX oral em associação com MTX, vinorelbina, talidomida, prednisona, celecoxib, trastuzumab ou bevacizumab, se obteve benefício clínico geral em 24 a 63% dos casos, aproximadamente (BILLER, 2014). CPX (50 mg/dia) em associação com MTX (5 mg duas vezes por semana) é um dos protocolos mais utilizados, em particular para tratar câncer de mama metastático, com boa resposta geral e taxa de benefício clínico de 31,7% (COLLEONI et al., 2002) ou entre 27-46% quando associado com trastuzumab (ORLANDO et al., 2006). Jung et al. (2016) observaram resposta geral de 53,3% no tratamento de linfoma non-Hodgkin refratário ou recidivante em 15 pacientes, com 6,7% deles mantendo resposta estável. Pelo contrário, não foi observada resposta objetiva à terapia em 69 pacientes com diversas neoplasias de grau avançado tratadas com esta associação junto com celecoxib por 8 semanas (KHAN et al., 2011).

Em veterinária, Lana et al. (2007) trataram nove cães com diagnóstico de hemangiossarcoma empregando piroxicam 0,3 mg/kg/d e ciclos alternados de 3 semanas de 12,5 a 25 mg/m<sup>2</sup>/d de CPX e 50 mg/m<sup>2</sup>/d de etoposídeo, observando um intervalo livre de doença superior e comparável ao do tratamento com DMT de doxorrubicina. Elmslie et al. (2008) fizeram um estudo retrospectivo da administração de CPX 10 mg/m<sup>2</sup> e piroxicam 0,3 mg/m<sup>2</sup> em 30 cães com sarcomas de tecidos moles, observando um intervalo livre de doença que quase dobrou o obtido com excisão cirurgica exclusivamente. Marchetti et al. (2012) avaliaram em um estudo piloto 15 cachorros com diferentes tipos de tumores metastáticos utilizando diariamente CPX 25 mg/m<sup>2</sup> e celecoxib 2 mg/kg obtendo 40% de benefício clínico por melhora clínica ou por estabilização da doença. Toceranib (2,75 mg/kg a cada 48 h) e CPX (15 mg/m<sup>2</sup>/d) foram empregados para tratar cães com diferentes tipos de tumores durante 6 semanas aproximadamente, mostrando modulação imune

antitumoral, com redução significativa de Treg's no sangue periférico e incremento das concentrações séricas de IFN- $\gamma$  (MITCHELL; THAMM; BILLER, 2012).

Um estudo de quimioterapia metronômica em felinos avaliou 24 animais com diferentes tipos de sarcomas, carcinomas, um melanoma e um tumor neuroendócrino, 29% deles com doença metastática, que receberam 14 mg/m<sup>2</sup> de CPX por pelo menos um mês em associação com anti-inflamatórios não esteroidais, toceranib ou talidomida, mostrando benefício clínico em 88% dos casos (LEO et al., 2014).

As associações têm amplo potencial terapêutico, porém, tanto as vantagens quanto às desvantagens destes esquemas podem ser menosprezadas pela falta de estudos que isolem efeitos farmacológicos e tóxicos dos esquemas metronômicos (LIEN et al., 2013; MONTAGNA et al., 2014).

### **2.3.5 Toxicidade**

Assume-se boa tolerância e baixa toxicidade dos esquemas metronômicos quando comparados com os esquemas convencionais (KERBEL; KAMEN, 2004; PASQUIER; KAVALLARIS; ANDRÉ, 2010; LIEN et al., 2013), uma vez que a citotoxicidade é reduzida (CHEN; DOLOFF; WAXMAN, 2014). No entanto, são escassos os estudos que mostrem o impacto toxicológico de doses baixas por longos períodos de tempo, similarmemente, poucos se referem aos efeitos isolados dos fármacos, sem associação com outros compostos (MONTAGNA et al., 2014), ou seus efeitos adversos em indivíduos livres de tumores (EMMENEGGER et al., 2004).

Destaca-se que muitas das toxicidades relatadas podem ser decorrentes dos processos neoplásicos e não relacionados aos fármacos, que muitas vezes são culpados de efeitos adversos que foram potencializados pela condição clínica do paciente (LIVSHITS; RAO; SMITH, 2014).

Em veterinária, o estudo mais abrangente, foi realizado em 81 cães com múltiplos tipos de tumores, alguns deles metastáticos, que foram tratados com 2,84 mg/m<sup>2</sup>/d de lomustina, com benefício clínico de 36% e quase 30% de interrupções devido a toxicidade, sendo: 16% de tipo gastrointestinal, 13,6% hepática, 3,7% dos casos com aumento de ALT, 1,2% neutropenia, 4,9% trombocitopenia e um com azotemia progressiva (TRIPP et al., 2011). Leach et al. (2012) utilizaram clorambucil metronômico em 36 cães com diferentes tipos de câncer, sem observar toxicidades

grau III ou IV, com aparente boa resposta, porém, o estudo tem limitações por utilizar critérios de seleção excessivamente heterogêneos.

#### **2.3.5.1 Ciclofosfamida**

A acroleína, um dos metabolitos ativos da CPX, interfere com o sistema de defesa antioxidante dos tecidos, produzindo espécies reativas de oxigênio, que aumentam a peroxidação lipídica (JALALI; HASANZADEH; MALEKINEJAD, 2012; SABA et al., 2013), o que explicaria muitos efeitos tóxicos do fármaco, que sob esquemas convencionais incluem marcada toxicidade reprodutiva (JALALI; HASANZADEH; MALEKINEJAD, 2012), alterações hematológicas, toxicidade cardíaca, ocular, pulmonar, gastrointestinal, hepática e renal (SENTHILKUMAR et al., 2006; LIVSHITS; RAO; SMITH, 2014), manifestação de cistite hemorrágica estéril e, oposto ao esperado, risco de leucemia associado a tratamentos prolongados (MASCI et al., 2012).

O estudo que avaliou duas diferentes doses de CPX em cachorros com sarcomas de tecidos moles, não teve efeitos adversos consideráveis (BURTON et al., 2011). Em ratos, a dose convencional de 150 mg/kg intraperitoneal duas vezes por semana retardou o crescimento tumoral, porém foi extremamente tóxica, causando severa perda de peso e morte dos animais após a terceira dose (SENTHILKUMAR et al., 2006). Sem perder efetividade, não foram observados efeitos adversos com 30 mg/kg/d durante 42 dias (ZHAO et al., 2005), nem com 35-40 mg/kg três vezes por semana durante 6 ciclos (DAHL BORKAMO et al., 2008). Em camundongos, doses de 20 mg/kg/d de CPX não foram associadas com perda considerável de peso ou outros sinais de toxicidade inclusive após 140 dias de terapia contínua (MUNOZ et al., 2006).

#### **2.3.5.2 Metotrexato**

Em humanos, dentre os possíveis efeitos adversos do MTX, encontram-se alterações gastrointestinais (mucosite, perda do epitélio gastrointestinal, lesão hepatocelular, cirrose e fibrose), neurológicas (encefalopatia, hemiparesia e convulsões), cardíacas (pericardite e complicações tromboembólicas), pulmonares (pneumonite intersticial, efusões pleurais e fibrose pulmonar), renais, hematológicas e mielossupressão (LIVSHITS; RAO; SMITH, 2014). Doses altas e repetidas em

pacientes com câncer associaram-se ao risco de osteoporose, dor óssea e fraturas espontâneas (SATOY et al., 2011). Doses entre 10 e 25 mg/semana associaram-se toxicidades consideráveis, principalmente pancitopenia, com risco de desenvolver sepse decorrente da mielossupressão, letal em 25% dos casos (KIVITY et al., 2014).

Em cachorros destaca-se lesão da mucosa gastrointestinal, má-absorção, diarreia, vômito (DANK et al., 2010; TAKANO et al., 2014), e menos comumente leucopenia, neutropenia e trombocitopenia (YUKI et al., 2006). Devido ao seu uso infrequente em veterinária, inclusive com esquemas convencionais, existe pouca informação disponível. Sabe-se que cães tratados com MTX (2,5 mg/m<sup>2</sup> a cada 2 dias durante 6 semanas) desenvolveram anorexia, vômito, enterite hemorrágica e perda de peso, efeitos adversos que resolveram uma vez que a terapia foi suspensa (FUKUI; YAMAMOTO, 1999). Embora a dose recomendada para o tratamento de linfoma seja muito mais alta (0,6-0,8 mg/kg), esta também está relacionada com efeitos adversos mais graves (DANK et al., 2010).

Reconhecem-se os efeitos do MTX como carcinogênico, mutagênico, teratogênico e responsável de mortalidade embrionária em roedores; camundongos tratados com 2, 10 e 20 mg/kg de MTX intraperitoneal mostraram marcados efeitos na medula óssea depois de 24 horas (CHOUDHURY; GHOSH; PALO, 2000). Ratos que receberam 30 mg/kg orais evidenciaram piloereção, letargia, mucosite e diarreia (CAVALCANTI; CORRÊA; DE CERQUEIRA LUZ, 2012); após 50 mg/kg via intraperitoneal, observaram-se reações adversas reversíveis às 48-96 horas, como redução gradual no consumo de alimento e água, lesão moderada na mucosa, atrofia de vilosidades, distúrbio da camada epitelial e das criptas da mucosa do íleo, com edema, hiperemia e infiltração leucocitária (TAKANO et al., 2014). De maneira interessante, um estudo em ratos mostrou marcadas alterações usando doses orais muito baixas (0,062, 0,125 e 0,250 mg/kg/d durante 28 dias), que causaram redução do peso corporal, do consumo de alimento, das contagens de leucócitos e hemácias, dos valores de hemoglobina, proteína e albumina séricas, assim como aumento nas contagens de linfócitos e níveis séricos de AST, ALT, ALP, ureia e creatinina; todos os animais mostraram alterações histopatológicas dependentes da dose, caracterizadas por degeneração, necrose, congestão, hemorragia e lesões



vasculares, sendo os principais órgãos afetados rins, pulmões, fígado e testículos (PATEL et al., 2014).

### **2.3.5.3 Interações**

Reconhece-se que esquemas de poliquimioterapia apresentam sinergia e potencializam os efeitos terapêuticos, porém, também se relacionam com múltiplos efeitos adversos, que podem ser exacerbados devido a estas associações (MONTAGNA et al., 2014).

Um estudo piloto em oncologia pediátrica humana avaliou o nível de segurança de um esquema metronômico com ciclos de oito semanas de tratamento, seguido de duas semanas de descanso, em 16 crianças com diferentes tipos de tumores refratários ou recorrentes, usando vinblastina, CPX, MTX e celecoxib, observando: aumento dos tempos de sobrevida em 43% dos casos, sendo que 25% dos pacientes mantiveram a doença estável por mais de 24 semanas de tratamento, 25% apresentaram toxicidades grau IV em 36 ciclos e 62,5% toxicidade grau III (ANDRÉ et al., 2011). Em humanos, doses baixas de capecitabina por 14 dias, em associação com cisplatina e trastuzumab se associaram com marcadas alterações gastrointestinais como náusea, vômito, dor abdominal, estomatite e diarreia, que se limitaram, uma vez que a terapia foi suspensa (MAGGO; GROVER; GRIN, 2014). Combinações de capecitabina com bevacizumab ou com inibidores da tirosina quinase podem incrementar o risco de hipertensão, edema, proteinúria e diarreia, observado em humanos (LOVEN et al., 2013). A associação CPX – MTX em esquema metronômico foi bem tolerada em termos gerais (JUNG et al., 2016), Colleoni et al. (2002) observou leucopenia grau III em 20% de mulheres com câncer de mama metastático tratadas com esta associação.

Esquemas de CPX-bleomicina causaram toxicidade pulmonar e lesões fibróticas em animais experimentais (SABA et al., 2013). Tratamentos de piroxicam e CPX alternada com etoposídeo em cães com hemangiossarcoma não exibiram toxicidades consideráveis, com exceção de 15% dos animais que desenvolveram cistite hemorrágica estéril, porém, isto só aconteceu no décimo segundo mês de tratamento (LANA et al., 2007). Similarmente, CPX e piroxicam em cachorros com sarcomas de tecidos moles evidenciaram 40% de toxicidade leve a moderada e 10% de casos de cistite hemorrágica estéril grau IV, assim como se concluiu que a

administração a cada 48 horas foi mais bem tolerada, por diminuição das alterações gastrointestinais e renais (ELMSLIE; GLAWE; DOW, 2008). Outros dois estudos em cães com diferentes tipos de tumores tratados com CPX em associação com toceranib ou inibidores de COX mostraram baixa incidência de efeitos adversos após 30 a 60 dias de terapia, porém a CPX só foi iniciada uma vez que os efeitos do toceranib foram controlados (MARCHETTI et al., 2012; MITCHELL; THAMM; BILLER, 2012). Toxicidade reduzida também foi observada após o emprego de clorambucil metronômico em cães com carcinoma de células transicionais da bexiga, com um único caso de suspensão da terapia decorrente de efeitos adversos (SCHREMPP et al., 2013).

Do estudo realizado em felinos por Leo et al. (2014), 17% dos animais apresentaram toxicidade gastrointestinal durante o primeiro mês de tratamento, 8,3% toxicidade hematológica e 4,15% renal, todas de grau I, com alguns casos de azotemia grau II e III depois de dois meses de tratamento. Este estudo de toxicidade remarca a importância da avaliação toxicológica em longo prazo, para ter real evidência clínica da baixa toxicidade destes esquemas.

## **2.4 Perspectivas**

A quimioterapia metronômica consolida-se como uma estratégia muito atraente para o tratamento sistêmico do câncer, por explorar diferentes mecanismos de ação antitumorais, apresentar uma relação custo benefício interessante, assim como toxicidade reduzida. Porém, muitos dos estudos pré-clínicos e clínicos disponíveis com os diferentes fármacos apresentam resultados pouco consistentes. A maioria deles não segue protocolos padronizados que permitam identificar uma dose metronômica biologicamente efetiva e de baixa toxicidade nas espécies alvo, evidenciando que a principal limitação destes esquemas é o empirismo na seleção de doses, intervalos e associações (BARBOLOSI et al., 2014).

O futuro da quimioterapia metronômica começa pela busca de evidências científicas que sustentem uma melhor compreensão destes esquemas, como por exemplo: a associação com outras modalidades de tratamento, terapias moleculares ou alvo (DI BARTOLOMEO et al., 2015); uma melhor compreensão dos diferentes mecanismos de ação envolvidos (PASQUIER; KAVALLARIS; ANDRÉ, 2010); a mudança de paradigma em relação às frequências de administração (CHEN;

DOLOFF; WAXMAN, 2014); o emprego de modelos matemáticos computacionais, sempre baseados em estudos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos específicos (BARBOLOSI et al., 2014; BOCCI; KERBEL, 2016); uso de biomarcadores para monitorar a resposta à terapia, predizer o prognóstico, assim como ajudar a determinar a dose e frequência de administração apropriada (BILLER, 2014).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a resposta clínica em ratos, saudáveis e livres de tumores, submetidos a quimioterapia metronômica (doses baixas, diárias e por longos períodos de tempo) a base de ciclofosfamida ou metotrexato, em relação com animais que receberam placebo, assim como os efeitos residuais, posteriores à suspensão do tratamento.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Comparar as diferentes alterações clínicas (consumo de alimento, água, peso corporal, sinais clínicos e comportamentais) dos ratos tratados com doses metronômicas de ciclofosfamida ou metotrexato, assim como o efeito residual posterior à suspensão do tratamento, em relação aos animais controles.

- Avaliar os constituintes sanguíneos (celularidade periférica) e bioquímica sérica dos animais tratados com quimioterapia metronômica em diferentes tempos experimentais de forma comparativa com o grupo controle.

- Evidenciar a toxicidade em medula óssea (aspirado de medula óssea femoral) desencadeada pelos esquemas de dose baixa de quimioterapia antineoplásica em diferentes momentos experimentais.

- Avaliar as lesões macro e microscópicas causadas pelos diferentes protocolos de quimioterapia metronômica em órgãos alvo (rins, fígado, baço, coração, pulmão, cérebro, intestino, e vaso sanguíneo).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV/Unesp – Jaboticabal (Protocolo aprovado 11690/15) e dividiu-se em três fases principais.

### 4.1 Fase I

Administração oral diária a ratos *Wistar* de doses baixas de ciclofosfamida ou metotrexato.

#### 4.1.1 Animais

Utilizaram-se 54 ratos *Wistar* (*Ratus norvegicus*, variação *albinus*), não isogênicos, machos, de seis semanas de idade e peso inicial entre 130 e 180 g, fisicamente hígdos, do Biotério Central da Unesp – Câmpus de Botucatu, aclimatados por duas semanas nas instalações do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/Unesp – Jaboticabal.

Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno com grade de aço cromado e cama de maravalha, para alojamento coletivo, separados por fármaco fornecido e momento de avaliação, alimentados diariamente com ração comercial, apropriada para a espécie (Labmix, Agromix Ltda., Jaboticabal/SP), e água fresca e filtrada *ad libitum*. Os animais foram mantidos permanentemente em condições controladas: de temperatura  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade 50 – 60% e 12 horas de fotoperíodo.

#### 4.1.2 Administração dos fármacos

Os animais foram aleatoriamente separados em três grupos de 18 ratos cada (CPX, MTX e CTR), acostumados durante 10 dias à manipulação e ao procedimento de administração oro-gástrica – gavage (usando agulha curva de aço inoxidável, com esfera e 54 mm de comprimento) empregando solução salina 0,9% em volume não maior a 1 mL/kg de peso vivo (PV) (EICHENBAUM et al., 2011).

Os animais receberam uma vez por dia no mesmo horário e durante 45 dias os diferentes tratamentos via gavagem:

- CPX: Ciclofosfamida (Genuxal®, Baxter Hospitalar Ltda., São Paulo/SP, suspensão de 15 mg/mL) na dose de 10 mg/kg de PV.
- MTX: Metotrexato (Tecnomet®, Zodiac Produtos Farmacêuticos S.A., Pindamonhangaba/SP, suspensão 0,2 mg/mL), na dose de 0,08 mg/kg de PV.
- CTR: Solução salina 0,9% (Baxter Hospitalar Ltda., São Paulo/SP), em volume de 1 mL/kg de peso vivo, como controle negativo ou placebo.

Calcularam-se as doses metronômicas se baseando em uma terceira a uma décima parte da DMT para roedores (SHI et al., 2014), utilizando como referência avaliações feitas na espécie para cada um dos fármacos (ZHAO et al., 2005; PATEL et al., 2014; BILASY et al., 2015), assim como estudos preliminares que mostraram incidência de sinais clínicos severos e mortalidade com doses orais diárias superiores a 0,1 mg/kg de MTX e 15 mg/kg de CPX. Os medicamentos foram remanipulados assepticamente, por uma farmácia certificada (DrogaVET, Ribeirão Preto/SP), utilizando um excipiente inerte aquoso de suspensão oral para volume de administração inferior a 1 mL/kg (EICHENBAUM et al., 2011). A administração oral de quimioterápicos antineoplásicos, assim como o manejo integral dos animais, foi realizada seguindo os protocolos de biossegurança para manejo de substâncias com risco à saúde, do mesmo modo que o material contaminado resultante (BORGES et al., 2014).

#### **4.1.3 Avaliação clínica e geral**

Os animais foram pesados a cada três dias para ajuste da dose de quimioterapia antineoplásica. Realizou-se acompanhamento diário para avaliação do estado geral, comportamento e registro de alterações individuais, assim como mensuração coletiva do consumo de alimento e da ingestão de água. Para uma melhor comparação, este último parâmetro foi avaliado por caixa e transformado em consumo por cada 100 g de PV segundo as pesagens dos animais da caixa. O registro de sinais clínicos foi realizado diariamente por um mesmo avaliador, agrupando-os em cinco sistemas: respiratório, ocular, gastrointestinal, tegumentar e

neuromuscular; assim como por grau de alteração, sendo: ausente – 0, leve – 1, moderado – 2, ou severo – 3 (FENTENER VAN VLISSINGEN et al., 2015).

## **4.2 Fase II**

Incluiu a eutanásia, a coleta de sangue e medula óssea, o exame de constituintes sanguíneos periféricos e a avaliação citológica de medula óssea. As amostras foram analisadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/Unesp – Jaboticabal. Em todos os casos, utilizaram-se seis animais de cada grupo, selecionados aleatoriamente, para cada um dos três momentos de avaliação estabelecidos como: M1 – 30 dias, M2 – 45 dias e M3 – 60 dias.

### **4.2.1 Eutanásia**

A eutanásia foi realizada seguindo os protocolos estabelecidos para uso em animais de laboratório, utilizando Isoflurano inalado (Isoforine® Cristália/SP), seguido de exsanguinação (BRASIL, 2013).

### **4.2.2 Coleta de sangue e medula óssea**

Por punção intracardíaca, diretamente do ventrículo esquerdo, foram colhidos 7 mL de sangue e divididos em tubos sem e com anticoagulante (EDTA). Esfregaços sanguíneos foram realizados em lâmina de vidro imediatamente após a colheita.

Uma vez confirmado o óbito do animal, realizou-se aspirado de medula óssea femoral, fragmentando transversalmente a região metafisiária do osso, e fazendo sucção com agulha impregnada com EDTA 5%, para realização de esfregaço em lâmina de vidro (RASKIN; MESSICK, 2012).

### **4.2.3 Avaliação de constituintes sanguíneos (hemograma)**

Em contador automático ABX Micros ESV 60 (Horiba ABX, Ltda., São Paulo/SP), padronizado para ratos, realizou-se contagem total de hemácias, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina, hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem total de glóbulos brancos e plaquetas. Manualmente, foi feita contagem diferencial de leucócitos e avaliação de morfologia celular de

esfregaços sanguíneos corados com tintura de Rosenfeld modificada (SILVA et al., 2010) em microscópio de luz (Nikon Eclipse E200, Nikon® Corporation, Tokyo, Japan).

#### **4.2.4 Bioquímica sérica**

Foram mensuradas as concentrações séricas de Creatinina, Alanino aminotransferase (ALT), Aspartato amino transferase (AST), Fosfatase alcalina (ALP), Gama-glutamil transpeptidase (GGT), Albumina, Proteína sérica total e Ureia. O soro foi separado por centrifugação (3600 rpm, 5 min, Centrífuga Excelsa II 206 BL, Fanem® Ltda., São Paulo/SP) e os testes realizados usando kits comerciais Labtest (Labtest® Diagnóstica S.A., Lagoa Santa/MG) para analisador bioquímico semiautomático (LABQUEST BIO-2000, Bioplus Ltda., Barueri/SP), usando métodos enzimáticos colorimétricos em mensurações de Albumina, Ureia e Proteína, assim como métodos cinéticos para as dosagens de Creatinina, ALT, ALP, AST e GGT.

#### **4.2.5 Avaliação citológica de medula óssea**

Os esfregaços de medula óssea femoral foram corados com Panótico rápido. Analisaram-se todas as amostras em microscopia de luz (Nikon Eclipse E200, Nikon® Corporation, Tóquio, Japão), realizando contagem diferencial em 500 células, caracterização morfológica e cálculo da relação Mieloide – Eritroide, M:E (RASKIN; MESSICK, 2012).

### **4.3 Fase III**

Contemplou a necropsia, a coleta de órgãos alvo e a avaliação histopatológica. As amostras foram processadas e analisadas no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp – Jaboticabal.

#### **4.3.1 Necropsia e coleta de amostras**

Uma vez realizada a eutanásia, praticou-se necropsia dos animais. Após realizar avaliação externa geral, posicionou-se o animal em decúbito dorsal e incidiu-se a pele desde a maxila até o ânus, seguida da parede abdominal para expor as vísceras abdominais. Posteriormente, o arco costal (lateral ao esterno) foi incidido



para examinar as vísceras torácicas (PARKINSON et al., 2011). Realizou-se avaliação macroscópica geral. Coletaram-se ambos os rins, o baço, um fragmento do duodeno e da aorta abdominal, fragmentos de fígado, coração e pulmão. Com a carcaça em decúbito ventral, a pele e o músculo do crânio foram removidos, realizando incisão cuidadosa do crânio e coleta do encéfalo. Os fragmentos dos tecidos coletados foram armazenados em formol tamponado a 10% durante 24 horas.

#### **4.3.2 Avaliação histopatológica**

Seguindo os protocolos de rotina (TOLOSA et al., 2003; SENTHILKUMAR et al., 2006), 24 h após a coleta, realizaram-se cortes dos fragmentos de tecido coletado, com espessura aproximada de 5 mm, e colocaram-se em cassetes plásticos de histopatologia devidamente identificados. Estes cassetes foram imersos novamente em formalina tamponada durante 24 a 48 h mais para garantir uma adequada fixação. Seguidamente, realizou-se desidratação das amostras utilizando diluições seriadas em álcool etílico e finalmente diafanização ou aclaramento por imersão em xilol durante 12 h. Posteriormente os cassetes foram submergidos durante uma hora em parafina líquida (60°C), as amostras foram retiradas dos cassetes e emblocadas cuidadosamente em formas preenchidas com parafina líquida. Realizaram-se cortes de 3 µm com micrótomo rotativo (Jung Autocut 2055, Leica© Biosystems, Wetzlar, Alemanha) para ser fixados nas lâminas previamente preparadas com polilisina. Todas as lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E).

As lâminas foram avaliadas em microscopia de luz (Microscópio U-MDO10B Olympus Optical Co, Ltd. Miami/FL, USA) e as alterações estratificadas por órgão e grau de alteração em: discretas – 1, moderadas – 2 ou severas – 3 (TOOLEY et al., 2006). A captura de imagens foi realizada utilizando o cellSens – Standard Software (Olympus Optical Co Ltd., Miami/FL, USA).

#### **4.4 Delineamento Experimental e Análise Estatística**

Os valores obtidos em todos os casos de cada tratamento (CPX e MTX) foram comparados com o grupo controle (CTR), separadamente. Os dados foram expressos como médias mais ou menos o desvio padrão (DP). Para as variáveis não

paramétricas ou semi-quantitativas (frequência de sinais clínicos e alterações histopatológicas) empregou-se o teste *Qui-Quadrado*, sendo que as frequências de sinais clínicos foram agrupadas em intervalos de 15 dias. Para as variáveis paramétricas: peso, consumo de alimento e consumo de água utilizou-se o teste *T-student* para amostras não pareadas, e para hemograma, bioquímica sérica e mielograma realizou-se uma ANOVA seguida de uma comparação múltipla de *Tukey* quando houve diferenças significativas entre as médias. Em todos os casos, estabeleceu-se um valor  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo. Empregou-se o programa SAS/STAT® Software, versão 9,2 (SAS Institute Inc, Cary/NC, USA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Fase I

Dentre dos sistemas afetados, as alterações clínicas observadas foram classificadas de acordo com cada sistema, sendo para respiratório: secreção nasal, tosse, espirro, taquipneia, dispneia ou crepitações; ocular: blefarospasmo ou secreção ocular (cromodaciorreia); gastrointestinal: alteração macroscópica das fezes (diarreia, principalmente); tegumentar: alopecia, dermatite ou alterações da pelagem; e neuromuscular: fraqueza, perda de massa muscular, letargia, dificuldade de locomoção ou paresia.

Nenhum animal pertencente ao grupo CTR morreu durante os 60 dias avaliados. Os valores obtidos das pesagens e da mensuração de consumo de alimento e água dos animais do grupo CTR foram utilizados como normais para efetuar as comparações correspondentes com os grupos tratados. Do grupo CTR, os sinais clínicos observados foram leves em sua maioria, associados com dermatite focal discreta e secreção nasal e ocular leve.

#### 5.1.1 Ciclofosfamida

Atendendo às considerações éticas, devido ao comprometimento clínico grave observado nos animais tratados com CPX, a terapia teve que ser suspensa aos 30 dias de tratamento.

Os valores correspondentes a peso vivo, consumo de alimento e água se encontram consolidados na **Tabela 1** e ilustrados na **Figura 1**.

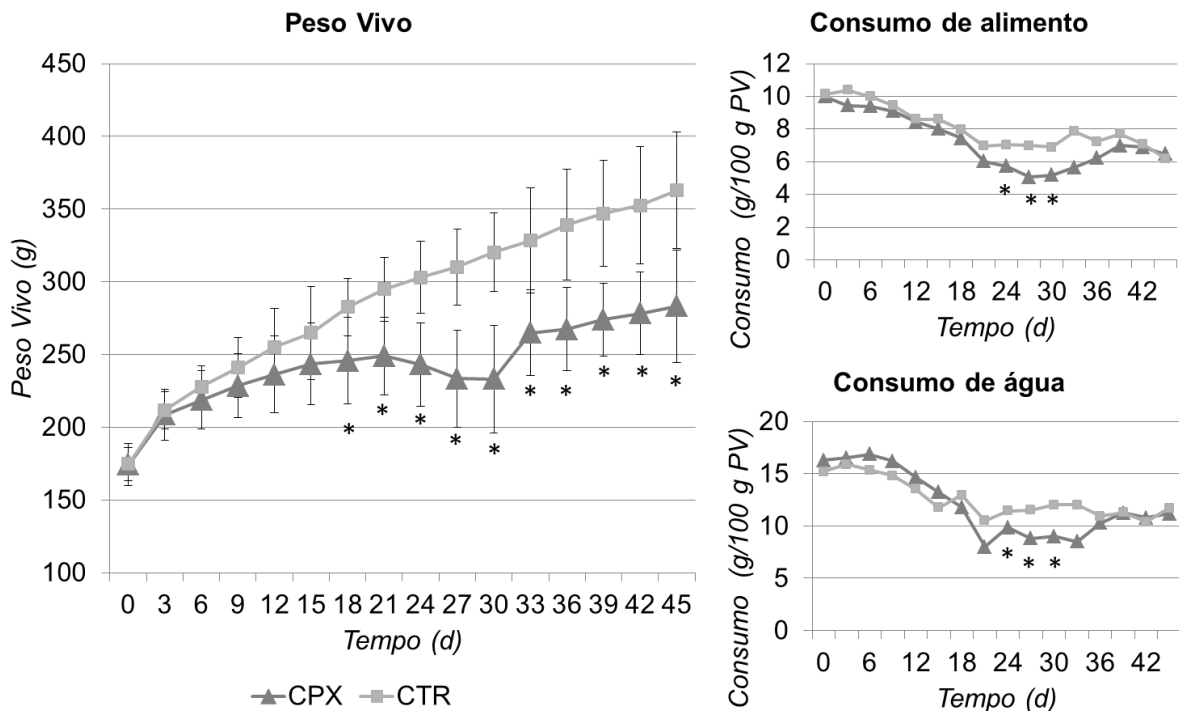
A partir do dia 18 de tratamento, houve perda significativa de peso dos animais tratados (CPX) quando comparados com o grupo CTR ( $p < 0,05$ ), e estas diferenças persistiram inclusive até 15 dias depois da suspensão do fármaco (dia 45). Após o dia 30, os animais tratados apresentaram recuperação do peso, contudo, os valores alcançados não atingiram o CTR. Similarmente, os animais tratados mostraram diminuição significativa do consumo de alimento e água em relação ao grupo CTR desde o dia 24 de tratamento até o dia 30 ( $p < 0,05$ ), mostrando recuperação uma vez a terapia é suspensa.

Seis dos 18 animais do grupo vieram a óbito, três deles nos dias 20, 28 e 30 de tratamento, e três no intervalo posterior ao fim do tratamento (dias 31 a 33), considerando uma mortalidade de 33%. Não foram realizadas necropsia nem colheita de material nestes animais, devido à autólise que apresentavam quando foram encontrados mortos.

**Tabela 1.** Peso vivo, consumo de alimento e água de ratos *Wistar* tratados por 30 dias com dose metronômica de ciclofosfamida (CPX) ou placebo (CTR).

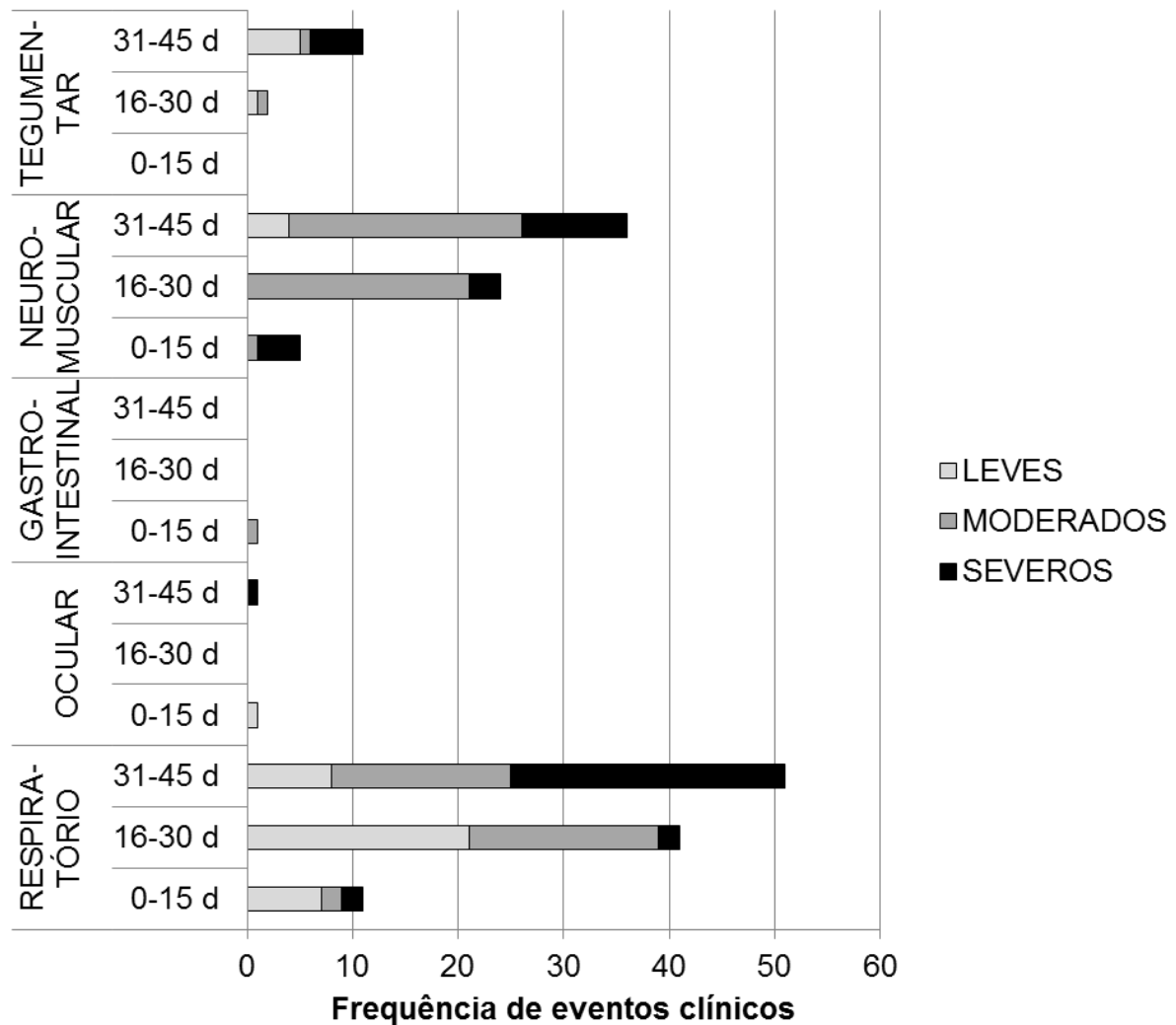
Dia	Peso vivo (g)		Consumo água (g/100 g PV)		Consumo alimento (g/100 g PV)	
	CPX	CTR	CPX	CTR	CPX	CTR
0	174,31±14,29 <sup>a</sup>	174,72±11,50 <sup>a</sup>	16,27 <sup>a</sup>	15,17 <sup>a</sup>	9,99 <sup>a</sup>	10,15 <sup>a</sup>
3	208,61±17,52 <sup>a</sup>	211,67±12,99 <sup>a</sup>	16,48 <sup>a</sup>	15,88 <sup>a</sup>	9,45 <sup>a</sup>	10,38 <sup>a</sup>
6	218,89±19,93 <sup>a</sup>	228,06±14,22 <sup>a</sup>	16,85 <sup>a</sup>	15,35 <sup>a</sup>	9,39 <sup>a</sup>	9,99 <sup>a</sup>
9	228,61±21,76 <sup>a</sup>	241,11±20,60 <sup>a</sup>	16,21 <sup>a</sup>	14,79 <sup>a</sup>	9,10 <sup>a</sup>	9,45 <sup>a</sup>
12	236,39±26,34 <sup>a</sup>	255,28±26,35 <sup>a</sup>	14,64 <sup>a</sup>	13,51 <sup>a</sup>	8,44 <sup>a</sup>	8,60 <sup>a</sup>
15	243,61±27,91 <sup>a</sup>	265,00±32,06 <sup>a</sup>	13,21 <sup>a</sup>	11,72 <sup>a</sup>	8,00 <sup>a</sup>	8,60 <sup>a</sup>
18	245,83±29,82 <sup>b</sup>	282,78±19,85 <sup>a</sup>	11,80 <sup>a</sup>	12,94 <sup>a</sup>	7,43 <sup>a</sup>	7,96 <sup>a</sup>
21	249,06±26,86 <sup>b</sup>	295,00±21,98 <sup>a</sup>	7,98 <sup>a</sup>	10,51 <sup>a</sup>	6,04 <sup>a</sup>	6,96 <sup>a</sup>
24	243,17±28,50 <sup>b</sup>	303,06±24,81 <sup>a</sup>	9,83 <sup>b</sup>	11,43 <sup>a</sup>	5,72 <sup>b</sup>	7,05 <sup>a</sup>
27	233,50±33,38 <sup>b</sup>	310,28±26,24 <sup>a</sup>	8,79 <sup>b</sup>	11,52 <sup>a</sup>	5,06 <sup>b</sup>	6,99 <sup>a</sup>
30	233,25±37,02 <sup>b</sup>	320,28±27,06 <sup>a</sup>	8,99 <sup>b</sup>	12,02 <sup>a</sup>	5,19 <sup>b</sup>	6,90 <sup>a</sup>
33	265,00±29,53 <sup>b</sup>	328,33±36,21 <sup>a</sup>	8,47 <sup>a</sup>	12,02 <sup>a</sup>	5,65 <sup>a</sup>	7,87 <sup>a</sup>
36	267,50±28,77 <sup>b</sup>	339,17±38,13 <sup>a</sup>	10,28 <sup>a</sup>	10,93 <sup>a</sup>	6,23 <sup>a</sup>	7,25 <sup>a</sup>
39	274,17±24,98 <sup>b</sup>	347,08±36,62 <sup>a</sup>	11,25 <sup>a</sup>	11,29 <sup>a</sup>	6,99 <sup>a</sup>	7,70 <sup>a</sup>
42	278,33±28,40 <sup>b</sup>	352,50±40,28 <sup>a</sup>	10,78 <sup>a</sup>	10,40 <sup>a</sup>	6,89 <sup>a</sup>	7,10 <sup>a</sup>
45	283,33±38,69 <sup>b</sup>	362,92±40,10 <sup>a</sup>	11,18 <sup>a</sup>	11,70 <sup>a</sup>	6,47 <sup>a</sup>	6,20 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Letras diferentes em cada linha, indicam diferenças estatisticamente significativas, teste de *T-student* ( $p < 0,05$ ). Média±DP.



**Figura 1.** Peso vivo, consumo de alimento e água de ratos *Wistar* tratados por 30 dias com dose metronômica de ciclofosfamida (CPX) ou placebo (CTR). Diferenças significativas  $p < 0,05$  (\*), teste de *T-student*.

A partir do dia 9 de tratamento, alguns animais exibiram os primeiros sinais clínicos, como secreção nasal, taquipneia, crepitações e fraqueza. Os sinais progrediram no decorrer do tempo, sendo mais acentuados após o dia 20 de tratamento, principalmente relacionados com perda de massa muscular, pelagem opaca e amarelada, cromodaciorreia, blefarospasmo, secreção nasal serosanguinolenta e mucopurulenta moderada a severa, tosse, espirros, crepitações, dispneia, dificuldade de locomoção, paresia, fraqueza e letargia. Os sinais clínicos persistiram inclusive após a suspensão do fármaco. Em relação ao grupo CTR, houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) das frequências de sinais clínicos neuromusculares, em todos os intervalos avaliados (até 45 dias), e para os eventos respiratórios e oculares as frequências foram estatisticamente superiores a partir do dia 16 de tratamento e persistiram inclusive após a suspensão da terapia, intervalo 31 a 45 dias ( $p < 0,05$ ). As frequências acumuladas de eventos clínicos se encontram na **Figura 2**.



**Figura 2.** Frequência de eventos clínicos por sistema afetado, de ratos *Wistar* tratados por 30 dias com dose metronômica de ciclofosfamida.

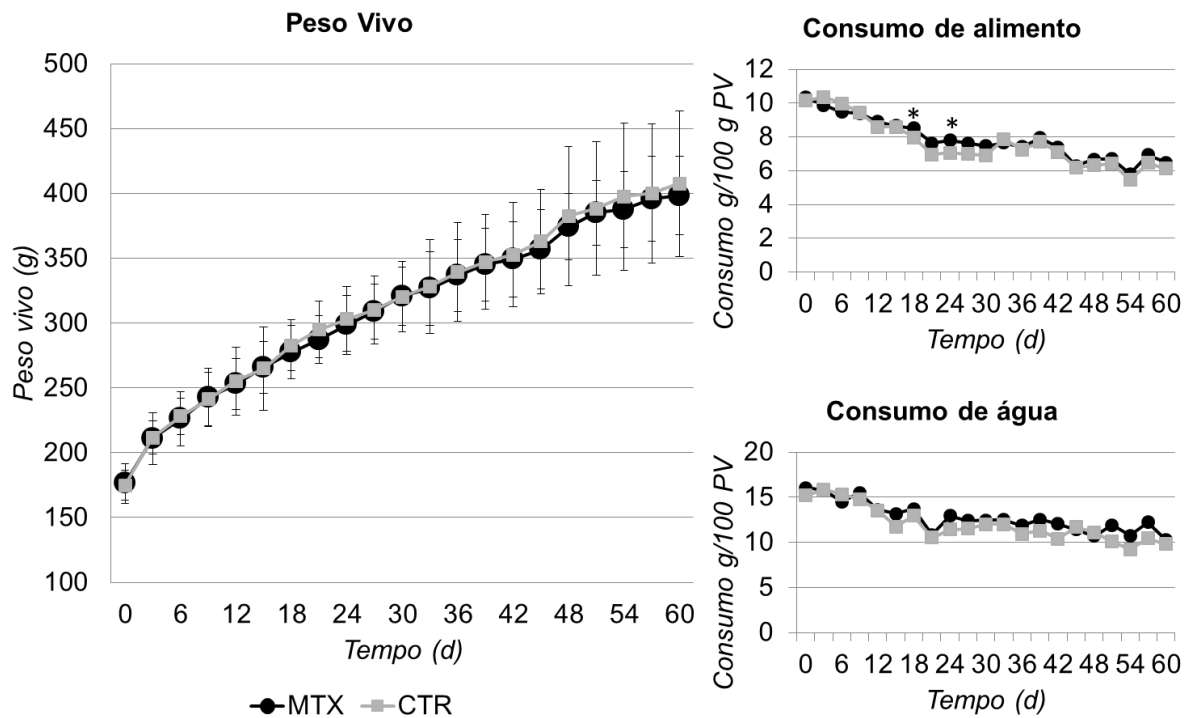
### 5.1.2 Metotrexato

Os valores correspondentes a peso vivo, consumo de alimento e água dos animais tratados com MTX se encontram consolidados na **Tabela 2** e ilustrados na **Figura 3**. Em todos os períodos avaliados, não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os pesos dos animais tratados e o CTR, assim como também não foram observadas diferenças significativas para o consumo de água ( $p > 0,05$ ). Exceto, nos dias 18 e 24 de avaliação, o consumo de alimento foi significativamente superior nos animais tratados ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Peso vivo, consumo de alimento e água de ratos *Wistar* tratados por 45 dias com dose metronômica de metotrexato (MTX) ou placebo (CTR).

Dia	Peso vivo (g)		Consumo água (g/100 g PV)		Consumo alimento (g/100 g PV)	
	MTX	CTR	MTX	CTR	MTX	CTR
0	176,25±15,47 <sup>a</sup>	174,72±11,50 <sup>a</sup>	16,02 <sup>a</sup>	15,17 <sup>a</sup>	10,33 <sup>a</sup>	10,15 <sup>a</sup>
3	210,83±19,76 <sup>a</sup>	211,67±12,99 <sup>a</sup>	15,83 <sup>a</sup>	15,88 <sup>a</sup>	9,89 <sup>a</sup>	10,38 <sup>a</sup>
6	226,11±20,88 <sup>a</sup>	228,06±14,22 <sup>a</sup>	14,51 <sup>a</sup>	15,35 <sup>a</sup>	9,47 <sup>a</sup>	9,99 <sup>a</sup>
9	242,50±22,41 <sup>a</sup>	241,11±20,60 <sup>a</sup>	15,47 <sup>a</sup>	14,79 <sup>a</sup>	9,40 <sup>a</sup>	9,45 <sup>a</sup>
12	253,06±19,80 <sup>a</sup>	255,28±26,35 <sup>a</sup>	13,61 <sup>a</sup>	13,51 <sup>a</sup>	8,90 <sup>a</sup>	8,60 <sup>a</sup>
15	265,83±19,88 <sup>a</sup>	265,00±32,06 <sup>a</sup>	13,17 <sup>a</sup>	11,72 <sup>a</sup>	8,67 <sup>a</sup>	8,60 <sup>a</sup>
18	277,50±20,73 <sup>a</sup>	282,78±19,85 <sup>a</sup>	13,72 <sup>a</sup>	12,94 <sup>a</sup>	8,51 <sup>b</sup>	7,96 <sup>a</sup>
21	287,22±18,33 <sup>a</sup>	295,00±21,98 <sup>a</sup>	10,83 <sup>a</sup>	10,51 <sup>a</sup>	7,64 <sup>a</sup>	6,96 <sup>a</sup>
24	298,61±22,70 <sup>a</sup>	303,06±24,81 <sup>a</sup>	12,92 <sup>a</sup>	11,43 <sup>a</sup>	7,81 <sup>b</sup>	7,05 <sup>a</sup>
27	308,89±21,37 <sup>a</sup>	310,28±26,24 <sup>a</sup>	12,41 <sup>a</sup>	11,52 <sup>a</sup>	7,64 <sup>a</sup>	6,99 <sup>a</sup>
30	320,83±22,50 <sup>a</sup>	320,28±27,06 <sup>a</sup>	12,47 <sup>a</sup>	12,02 <sup>a</sup>	7,47 <sup>a</sup>	6,90 <sup>a</sup>
33	326,67±28,36 <sup>a</sup>	328,33±36,21 <sup>a</sup>	12,50 <sup>a</sup>	12,02 <sup>a</sup>	7,65 <sup>a</sup>	7,87 <sup>a</sup>
36	336,67±27,61 <sup>a</sup>	339,17±38,13 <sup>a</sup>	11,88 <sup>a</sup>	10,93 <sup>a</sup>	7,42 <sup>a</sup>	7,25 <sup>a</sup>
39	345,00±28,27 <sup>a</sup>	347,08±36,62 <sup>a</sup>	12,56 <sup>a</sup>	11,29 <sup>a</sup>	7,95 <sup>a</sup>	7,70 <sup>a</sup>
42	349,17±29,00 <sup>a</sup>	352,50±40,28 <sup>a</sup>	12,04 <sup>a</sup>	10,40 <sup>a</sup>	7,39 <sup>a</sup>	7,10 <sup>a</sup>
45	356,67±30,69 <sup>a</sup>	362,92±40,10 <sup>a</sup>	11,44 <sup>a</sup>	11,70 <sup>a</sup>	6,30 <sup>a</sup>	6,20 <sup>a</sup>
48	374,17±25,58 <sup>a</sup>	382,50±53,55 <sup>a</sup>	10,69 <sup>a</sup>	11,11 <sup>a</sup>	6,68 <sup>a</sup>	6,32 <sup>a</sup>
51	385,00±25,10 <sup>a</sup>	388,33±51,74 <sup>a</sup>	11,90 <sup>a</sup>	10,09 <sup>a</sup>	6,71 <sup>a</sup>	6,44 <sup>a</sup>
54	387,50±29,45 <sup>a</sup>	397,50±56,81 <sup>a</sup>	10,75 <sup>a</sup>	9,22 <sup>a</sup>	5,81 <sup>a</sup>	5,45 <sup>a</sup>
57	395,83±32,77 <sup>a</sup>	400,00±53,67 <sup>a</sup>	12,21 <sup>a</sup>	10,42 <sup>a</sup>	6,95 <sup>a</sup>	6,46 <sup>a</sup>
60	398,33±30,11 <sup>a</sup>	407,50±56,10 <sup>a</sup>	10,25 <sup>a</sup>	9,82 <sup>a</sup>	6,49 <sup>a</sup>	6,13 <sup>a</sup>

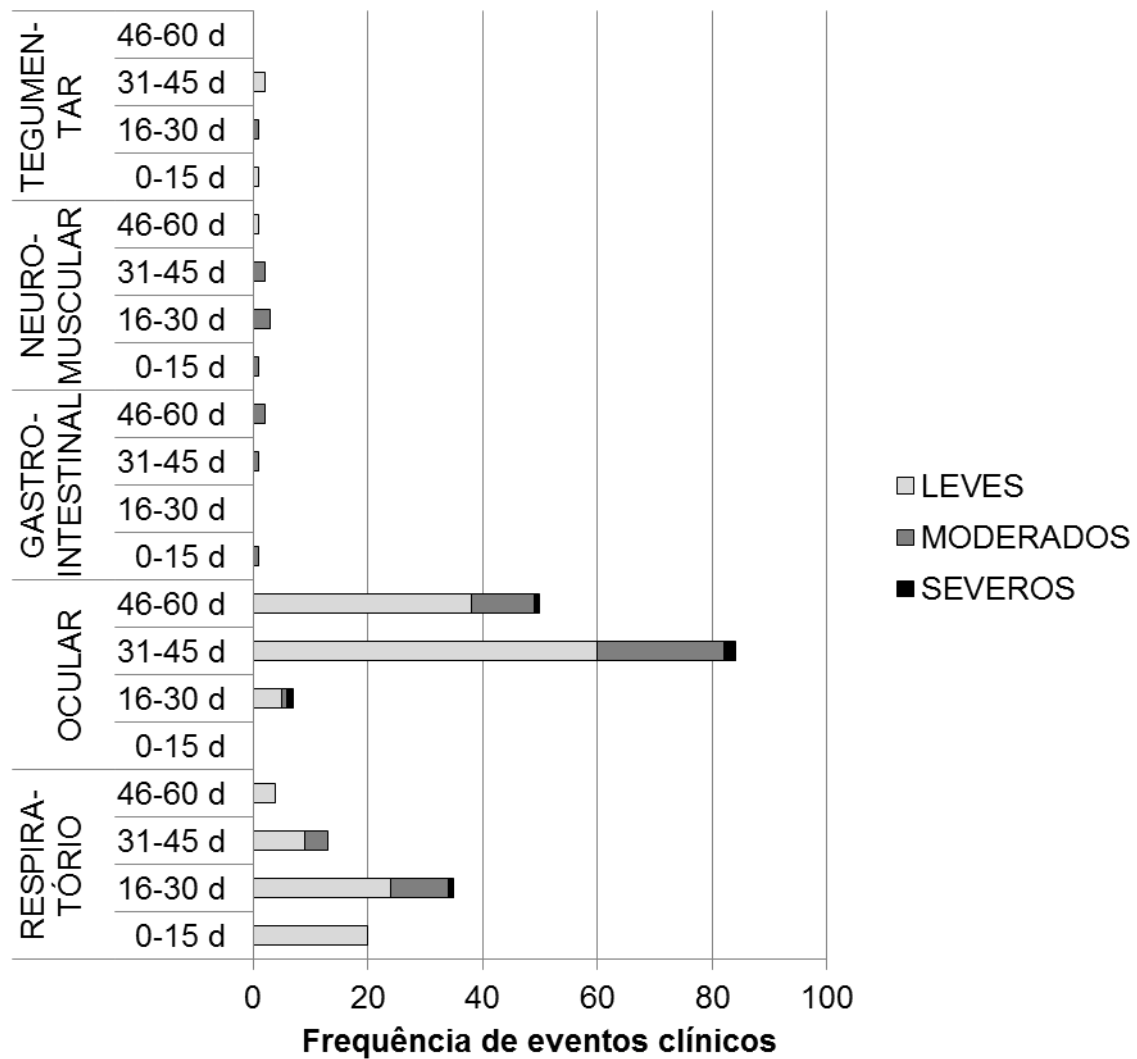
<sup>a, b</sup> Letras diferentes por linha, indicam diferenças estatisticamente significativas, teste de *T-student* ( $p < 0,05$ ). Média±DP.



**Figura 3.** Peso vivo, consumo de alimento e água de ratos *Wistar* tratados por 45 dias com dose metronômica de metotrexato (MTX) ou placebo (CTR). Diferenças significativas  $p < 0,05$  (\*), teste de *T-student*.

Não foi observada mortalidade nos animais tratados com MTX durante os 60 dias avaliados. Observaram-se os primeiros sinais clínicos a partir do dia 5 de tratamento, sendo principalmente alterações de carácter leve a moderado, tais como: secreção nasal, crepitações e fraqueza, que em sua maioria se mantiveram até o dia 30 de tratamento. Porém, foram evidenciados sinais oculares como cromodaciorreia e blefarospasmo, de grau moderado a severo, que persistiram após a suspensão do fármaco. Quando comparadas com o grupo CTR, as frequências dos eventos respiratórios foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) durante os primeiros 30 dias de tratamento e no intervalo posterior à suspensão da terapia (46 a 60 dias), as alterações oculares foram estatisticamente superiores ( $p < 0,05$ ) ao CTR após 30 dias de tratamento (intervalo 31-60 dias). As frequências de eventos clínicos para o período integral avaliado se encontram na **Figura 4**.





**Figura 4.** Frequência de eventos clínicos por sistema afetado, de ratos *Wistar* tratados por 45 dias com dose metronômica de metotrexato.

## 5.2 Fase II

Os resultados desta fase foram analisados baseando-se nos parâmetros de normalidade estabelecidos para a espécie e a faixa etária (GIKNIS; CLIFFORD, 2008), porém, principalmente comparados com aqueles dos grupos CTR.

### 5.2.1 Ciclofosfamida

As médias dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos diferentes períodos podem ser observadas na **Tabela 3**. Como o tratamento deste grupo foi suspenso aos 30 dias, os resultados do grupo CPX se referem aos momentos M1 – 30 dias de tratamento; e M2 – 15 dias após término da terapia.

**Tabela 3.** Hemograma e bioquímica sérica de ratos *Wistar* tratados com dose metronômica de ciclofosfamida (CPX) ou placebo (CTR).

Parâmetro	Valor de referência (GIKNIS; CLIFFORD, 2008)	30 dias (M1)		45 dias (M2)	
		CPX	CTR	CPX	CTR
Hemácias ( $10^6/\mu\text{L}$ )	7,27-9,65	7,29±0,65 <sup>a</sup>	7,54±0,54 <sup>a</sup>	6,30±0,39 <sup>a</sup>	6,48±0,47 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g/dL)	13,70-17,60	16,20±1,63 <sup>a</sup>	15,88±0,48 <sup>a</sup>	13,87±0,58 <sup>b</sup>	14,80±0,50 <sup>a</sup>
Hematócrito (%)	39,60-52,20	40,92±3,71 <sup>a</sup>	42,03±3,15 <sup>a</sup>	36,05±4,19 <sup>a</sup>	34,33±1,59 <sup>a</sup>
VCM (fL)	48,90-57,90	56,33±1,21 <sup>a</sup>	55,83±1,94 <sup>a</sup>	57,17±4,17 <sup>a</sup>	53,00±2,61 <sup>a</sup>
HCM (pg)	17,10-20,40	22,20±1,07 <sup>a</sup>	21,08±1,02 <sup>a</sup>	22,05±1,30 <sup>a</sup>	22,93±2,31 <sup>a</sup>
CHCM (g/dL)	32,90-37,50	39,55±1,01 <sup>a</sup>	37,90±1,82 <sup>a</sup>	38,78±4,05 <sup>a</sup>	43,15±2,89 <sup>a</sup>
Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )	638,00-1177,00	590,00±80,00 <sup>a</sup>	670,00±120,00 <sup>a</sup>	560,00±180,00 <sup>b</sup>	740,00±70,00 <sup>a</sup>
Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1,96-8,25	5,92±1,68 <sup>b</sup>	7,96±0,23 <sup>a</sup>	6,55±2,82 <sup>a</sup>	7,52±2,15 <sup>a</sup>
Linfócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1,41-7,11	1,15±0,27 <sup>b</sup>	5,43±0,61 <sup>a</sup>	3,05±1,04 <sup>b</sup>	5,95±1,95
Monócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	0,03-0,18	0,00±0,00 <sup>b</sup>	0,17±0,09 <sup>a</sup>	0,15±0,26 <sup>a</sup>	0,06±0,06 <sup>a</sup>
Neutrófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	0,22-1,57	4,69±1,68 <sup>b</sup>	2,30±0,42 <sup>a</sup>	3,18±2,11 <sup>b</sup>	1,45±0,35 <sup>a</sup>
Eosinófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	0,01-0,16	0,07±0,14 <sup>a</sup>	0,04±0,06 <sup>a</sup>	0,09±0,10 <sup>a</sup>	0,07±0,09 <sup>a</sup>
Basófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	0-0,05	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,05 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
Creatinina (mg/dL)	0,2-0,5	0,50±0,01 <sup>a</sup>	0,50±0,00 <sup>a</sup>	0,60±0,10 <sup>a</sup>	0,60±0,10 <sup>a</sup>
Ureia (mg/dL)	12,30-24,60	32,50±7,80 <sup>b</sup>	46,00±5,60 <sup>a</sup>	54,00±7,00 <sup>a</sup>	48,50±15,80 <sup>a</sup>
Proteína sérica total (g/L)	5,20-7,10	6,70±0,50 <sup>a</sup>	7,00±0,70 <sup>a</sup>	7,60±1,10 <sup>a</sup>	7,30±0,80 <sup>a</sup>
Albumina (g/L)	3,40-4,80	1,60±0,50 <sup>b</sup>	2,40±0,50 <sup>a</sup>	2,10±0,40 <sup>a</sup>	2,30±0,40 <sup>a</sup>
ALP (U/L)	62,00-230,00	203,80±147,60 <sup>a</sup>	251,50±59,20 <sup>a</sup>	199,80±56,60 <sup>b</sup>	281,50±60,60 <sup>a</sup>
ALT (U/L)	18,00-45,00	36,20±10,90 <sup>b</sup>	49,00±2,40 <sup>a</sup>	52,80±4,90 <sup>a</sup>	57,30±8,10 <sup>a</sup>
AST (U/L)	74,00-143,00	113,70±26,90 <sup>a</sup>	115,00±24,70 <sup>a</sup>	81,00±9,30 <sup>a</sup>	92,20±16,80 <sup>a</sup>
GGT (U/L)	0,00-19,00	1,40±2,80 <sup>a</sup>	2,30±3,60 <sup>a</sup>	5,00±2,40 <sup>a</sup>	5,50±2,70 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Letras diferentes por linha, indicam diferenças estatisticamente significativas para cada momento, ANOVA de uma via e comparação múltipla de *Tukey* ( $p < 0,05$ ). Média±DP.

### 5.2.1.1 Hemograma

Aos 30 dias de tratamento (M1) se observou diminuição estatisticamente significativa das contagens de leucócitos e monócitos entre os animais tratados com CPX e o grupo CTR ( $p < 0,05$ ). Os animais tratados mostraram diminuição significativa dos valores absolutos e relativos de linfócitos e aumento de neutrófilos ( $p < 0,05$ ). Não foram achadas diferenças significativas para os valores absolutos e relativos de eosinófilos ou de basófilos, contagem de hemácias e plaquetas, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM ou CHCM ( $p > 0,05$ ).

Para M2, no grupo CPX persistiu a diminuição nas contagens de linfócitos e o aumento de valores de neutrófilos, alterando a relação normal para a espécie entre as duas populações celulares de forma significativa ( $p < 0,05$ ). Porém, não houve diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) na contagem de leucócitos, nem em outras populações. A contagem de plaquetas e a hemoglobina encontraram-se discretas, mas significativamente diminuídas ( $p < 0,05$ ). Os outros parâmetros hematológicos não apresentaram diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ).

### 5.2.1.2 Bioquímica sérica

Em M1, os animais tratados mostraram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores de ureia, ALT e albumina, sendo esta última a única clinicamente relevante. Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) para as variáveis creatinina, ALP, AST, GGT ou proteína sérica. Enquanto que para M2, os animais do grupo tratado mostraram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores de ALP em relação aos animais do grupo CTR. Não houve diferenças estatísticas para as outras variáveis ( $p > 0,05$ ).

### 5.2.1.3 Aspirado de Medula Óssea

Não foram achadas alterações morfológicas nas populações celulares nos esfregaços de medula óssea. A contagem manual exibe-se na **Tabela 4**. Durante M1, observou-se redução significativa das populações eritroides maduras, assim como dos linfócitos ( $p < 0,05$ ), aumento de populações mieloides maduras e subsequente inversão da relação M:E ( $p < 0,05$ ). Para M2, praticamente todos os parâmetros foram restabelecidos, com exceção das populações eritroides maduras

que continuavam ligeiramente diminuídas ( $p < 0,05$ ). As populações imaturas ou precursoras não apresentaram alterações significativas ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 4.** Contagem diferencial de populações celulares de aspirado de medula óssea de ratos *Wistar* tratados por 30 dias com dose metronômica de ciclofosfamida (CPX) ou placebo (CTR).

Parâmetro	M1		M2	
	CPX	CTR	CPX	CTR
<b>Megacariócitos (cél/campo)</b>	12,50±2,43 <sup>b</sup>	16,50±3,62 <sup>a</sup>	13,17±3,06 <sup>a</sup>	14,67±1,21 <sup>a</sup>
<b>EI (%)</b>	4,03±0,45 <sup>a</sup>	3,80±0,67 <sup>a</sup>	4,17±0,15 <sup>a</sup>	4,03±0,15 <sup>a</sup>
<b>EM (%)</b>	16,00±5,14 <sup>b</sup>	22,52±2,64 <sup>a</sup>	18,63±5,28 <sup>b</sup>	25,17±4,06 <sup>a</sup>
<b>MI (%)</b>	8,33±1,50 <sup>a</sup>	6,72±1,53 <sup>a</sup>	9,43±1,63 <sup>a</sup>	8,20±0,77 <sup>a</sup>
<b>MM (%)</b>	56,03±5,42 <sup>b</sup>	43,68±3,56 <sup>a</sup>	46,40±6,26 <sup>a</sup>	42,33±3,80 <sup>a</sup>
<b>Linfócitos (%)</b>	6,27±1,69 <sup>b</sup>	11,32±3,77 <sup>a</sup>	10,13±1,34 <sup>a</sup>	11,30±2,08 <sup>a</sup>
<b>Plasmócitos (%)</b>	0,63±0,71 <sup>b</sup>	0,80±0,18 <sup>a</sup>	0,50±0,24 <sup>a</sup>	0,50±0,24 <sup>a</sup>
<b>Mastócitos (%)</b>	1,33±1,09 <sup>a</sup>	2,32±1,66 <sup>a</sup>	1,10±1,09 <sup>a</sup>	1,17±1,28 <sup>a</sup>
<b>Eosinófilos (%)</b>	7,37±1,27 <sup>a</sup>	8,84±2,06 <sup>a</sup>	9,63±2,46 <sup>b</sup>	7,30±0,58 <sup>a</sup>
<b>Relação M:E</b>	3,43±1,10 <sup>b</sup>	1,93±0,15 <sup>a</sup>	2,63±0,96 <sup>a</sup>	1,77±0,36 <sup>a</sup>

Células eritroides imaturas (EI), Células eritroides maduras (EM), Células mieloides imaturas (MI), Células mieloides maduras (MM), Relação Mieloide-Eritroide (M:E). 30 d de tratamento (M1), 45 d (M2). <sup>a, b</sup> Letras diferentes por linha, indicam diferenças estatisticamente significativas para cada momento de tratamento, ANOVA de uma via e comparação múltipla de *Tukey* ( $p < 0,05$ ). Média±DP.

## 5.2.2 Metotrexato

Os valores mensurados de hemograma e das variáveis bioquímicas expõem-se na **Tabela 5**.

### 5.2.2.1 Hemograma

Em M1, o grupo MTX mostrou aumento significativo na contagem de leucócitos e discreta diminuição do número de plaquetas e das contagens de hemoglobina e CHCM ( $p < 0,05$ ) em relação ao CTR. Não houve diferenças estatísticas para as outras variáveis hematológicas ( $p > 0,05$ ). Em M2, observou-se diminuição significativa, porém discreta, de CHCM ( $p > 0,05$ ). Os outros parâmetros não apresentaram alterações significantes em relação ao CTR ( $p < 0,05$ ). Em M3, a única diferença significativa foi aumento de neutrófilos segmentados ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças estatísticas para as outras variáveis ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 5.** Hemograma e bioquímica sérica de ratos *Wistar* tratados por 45 dias com dose metronômica de metotrexato (MTX) ou placebo (CTR).

Parâmetro	Valor de referência (GIKNIS; CLIFFORD, 2008)	30 dias (M1)		45 dias (M2)		60 dias (M3)	
		MTX	CTR	MTX	CTR	MTX	CTR
Hemácias ( $10^6/\mu\text{L}$ )	7,27-9,65	7,67±0,86 <sup>a</sup>	7,54±0,54 <sup>a</sup>	6,78±0,99 <sup>a</sup>	6,48±0,47 <sup>a</sup>	6,36±0,26 <sup>a</sup>	6,47±0,75 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g/dL)	13,70-17,60	14,83±0,63 <sup>b</sup>	15,88±0,48 <sup>a</sup>	14,10±1,86 <sup>a</sup>	14,80±0,50 <sup>a</sup>	14,35±0,84 <sup>a</sup>	14,87±0,69 <sup>a</sup>
Hematócrito (%)	39,60-52,20	42,07±2,73 <sup>a</sup>	42,03±3,15 <sup>a</sup>	36,48±5,43 <sup>a</sup>	34,33±1,59 <sup>a</sup>	34,78±2,19 <sup>a</sup>	34,33±4,71 <sup>a</sup>
VCM (fL)	48,90-57,90	55,17±4,49 <sup>a</sup>	55,83±1,94 <sup>a</sup>	53,83±0,98 <sup>a</sup>	53,00±2,61 <sup>a</sup>	54,67±2,42 <sup>a</sup>	52,67±1,37 <sup>a</sup>
HCM (pg)	17,10-20,40	19,48±1,76 <sup>a</sup>	21,08±1,02 <sup>a</sup>	20,85±0,77 <sup>a</sup>	22,93±2,31 <sup>a</sup>	22,60±1,34 <sup>a</sup>	23,22±2,92 <sup>a</sup>
CHCM (g/dL)	32,90-37,50	35,30±1,56 <sup>b</sup>	37,90±1,82 <sup>a</sup>	38,75±1,11 <sup>b</sup>	43,15±2,89 <sup>a</sup>	41,43±2,82 <sup>a</sup>	44,02±6,47 <sup>a</sup>
Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )	638,00-1177,00	540,00±80,00 <sup>b</sup>	670,00±120,00 <sup>a</sup>	850,00±300,00 <sup>a</sup>	740,00±70,00 <sup>a</sup>	640,00±90,00 <sup>a</sup>	620,00±80,00 <sup>a</sup>
Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1,96-8,25	11,93±2,30 <sup>b</sup>	7,96±0,23 <sup>a</sup>	8,28±2,82 <sup>a</sup>	7,52±2,15 <sup>a</sup>	8,55±3,82 <sup>a</sup>	8,50±2,29 <sup>a</sup>
Linfócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1,41-7,11	8,32±2,07 <sup>a</sup>	5,43±0,61 <sup>a</sup>	6,20±1,75 <sup>a</sup>	5,95±1,95	5,40±2,66 <sup>a</sup>	6,09±1,40 <sup>a</sup>
Monócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	0,03-0,18	0,13±0,20 <sup>a</sup>	0,17±0,09 <sup>a</sup>	0,13±0,10 <sup>a</sup>	0,06±0,06 <sup>a</sup>	0,10±0,08 <sup>a</sup>	0,13±0,09 <sup>a</sup>
Neutrófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	0,22-1,57	3,23±2,16 <sup>a</sup>	2,30±0,42 <sup>a</sup>	1,80±1,10 <sup>a</sup>	1,45±0,35 <sup>a</sup>	3,10±1,65 <sup>b</sup>	1,95±0,72 <sup>a</sup>
Eosinófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	0,01-0,16	0,25±0,25 <sup>a</sup>	0,04±0,06 <sup>a</sup>	0,15±0,08 <sup>a</sup>	0,07±0,09 <sup>a</sup>	0,07±0,06 <sup>a</sup>	0,33±0,36 <sup>a</sup>
Basófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	0-0,05	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,04 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,05 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
Creatinina (mg/dL)	0,2-0,5	0,50±0,01 <sup>a</sup>	0,50±0,00 <sup>a</sup>	0,60±0,10 <sup>a</sup>	0,60±0,10 <sup>a</sup>	0,70±0,10 <sup>a</sup>	0,60±0,10 <sup>a</sup>
Ureia (mg/dL)	12,30-24,60	33,00±4,30 <sup>b</sup>	46,00±5,60 <sup>a</sup>	47,20±12,90 <sup>a</sup>	48,50±15,80 <sup>a</sup>	34,80±6,10 <sup>a</sup>	39,80±6,70 <sup>a</sup>
Proteína sérica total (g/L)	5,20-7,10	6,50±0,60 <sup>a</sup>	7,00±0,70 <sup>a</sup>	7,20±0,70 <sup>a</sup>	7,30±0,80 <sup>a</sup>	6,10±1,40 <sup>a</sup>	6,70±0,20 <sup>a</sup>
Albumina (g/L)	3,40-4,80	2,50±0,30 <sup>a</sup>	2,40±0,50 <sup>a</sup>	2,10±0,20 <sup>a</sup>	2,30±0,40 <sup>a</sup>	1,90±0,10 <sup>a</sup>	2,00±0,40 <sup>a</sup>
ALP (U/L)	62,00-230,00	176,50±50,90 <sup>b</sup>	251,50±59,20 <sup>a</sup>	249,70±55,30 <sup>a</sup>	281,50±60,60 <sup>a</sup>	198,70±65,30 <sup>a</sup>	237,20±65,00 <sup>a</sup>
ALT (U/L)	18,00-45,00	38,80±7,30 <sup>b</sup>	49,00±2,40 <sup>a</sup>	50,80±8,50 <sup>a</sup>	57,30±8,10 <sup>a</sup>	55,50±8,50 <sup>a</sup>	55,30±9,90 <sup>a</sup>
AST (U/L)	74,00-143,00	102,00±16,80 <sup>a</sup>	115,00±24,70 <sup>a</sup>	94,00±21,80 <sup>a</sup>	92,20±16,80 <sup>a</sup>	113,00±18,90 <sup>a</sup>	128,70±26,80 <sup>a</sup>
GGT (U/L)	0,00-19,00	1,20±2,90 <sup>a</sup>	2,30±3,60 <sup>a</sup>	4,20±3,30 <sup>a</sup>	5,50±2,70 <sup>a</sup>	4,70±3,60 <sup>a</sup>	4,70±3,60 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Letras diferentes por linha, indicam diferenças estatisticamente significativas para cada momento, ANOVA de uma via e comparação múltipla de *Tukey* ( $p < 0,05$ ). Média±DP.

### 5.2.2.2 Bioquímica sérica

Durante M1, evidenciou-se diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) dos valores de Ureia, ALP e ALT, em relação com o CTR. Não houve diferenças significativas dos parâmetros bioquímicos em M2 nem M3 ( $p > 0,05$ ).

### 5.2.2.3 Aspirado de Medula Óssea

Não foram observadas alterações morfológicas na celularidade dos esfregaços de medula óssea. A contagem diferencial pode ser observada na **Tabela 6**. Em M1, houve aumento significativo de populações mieloides imaturas e redução de plasmócitos ( $p < 0,05$ ). Em M2, os valores apresentaram recuperação, com aumento significativo de contagens de eosinófilos ( $p < 0,05$ ), e em M3, se observou novamente diminuição estatisticamente significativa de populações mieloides imaturas, assim como das maduras e de linfócitos ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6.** Contagem diferencial de aspirado de medula óssea de ratos *Wistar* tratados por 45 dias com dose metronômica de metotrexato (MTX) ou placebo (CTR).

Parâmetro	M1		M2		M3	
	MTX	CTR	MTX	CTR	MTX	CTR
<b>Megacariócitos (cél/campo)</b>	16,83±1,94 <sup>a</sup>	16,50±3,62 <sup>a</sup>	16,50±1,64 <sup>a</sup>	14,67±1,21 <sup>a</sup>	15,50±3,89 <sup>a</sup>	17,50±2,59 <sup>a</sup>
<b>EI (%)</b>	4,03±0,27 <sup>a</sup>	3,80±0,67 <sup>a</sup>	4,27±0,27 <sup>a</sup>	4,03±0,15 <sup>a</sup>	4,03±0,15 <sup>a</sup>	3,80±0,40 <sup>a</sup>
<b>EM (%)</b>	22,17±4,80 <sup>a</sup>	22,52±2,64 <sup>a</sup>	25,90±5,30 <sup>a</sup>	25,17±4,06 <sup>a</sup>	23,80±4,43 <sup>a</sup>	26,47±3,94 <sup>a</sup>
<b>MI (%)</b>	9,00±0,83 <sup>b</sup>	6,72±1,53 <sup>a</sup>	8,13±2,35 <sup>a</sup>	8,20±0,77 <sup>a</sup>	7,27±0,71 <sup>b</sup>	8,33±0,62 <sup>a</sup>
<b>MM (%)</b>	42,90±4,82 <sup>a</sup>	43,68±3,56 <sup>a</sup>	35,73±9,22 <sup>a</sup>	42,33±3,80 <sup>a</sup>	46,40±4,23 <sup>b</sup>	38,30±3,37 <sup>a</sup>
<b>Linfócitos (%)</b>	10,47±1,23 <sup>a</sup>	11,32±3,77 <sup>a</sup>	11,97±2,46 <sup>a</sup>	11,30±2,08 <sup>a</sup>	8,20±0,68 <sup>b</sup>	11,57±1,89 <sup>a</sup>
<b>Plasmócitos (%)</b>	0,30±0,28 <sup>b</sup>	0,80±0,18 <sup>a</sup>	0,57±0,15 <sup>a</sup>	0,50±0,24 <sup>a</sup>	1,10±0,30 <sup>a</sup>	1,00±0,36 <sup>a</sup>
<b>Mastócitos (%)</b>	1,70±0,78 <sup>a</sup>	2,32±1,66 <sup>a</sup>	3,07±3,04 <sup>a</sup>	1,17±1,28 <sup>a</sup>	1,13±0,87 <sup>a</sup>	0,85±0,51 <sup>a</sup>
<b>Eosinófilos (%)</b>	9,33±1,79 <sup>a</sup>	8,84±2,06 <sup>a</sup>	10,37±2,83 <sup>b</sup>	7,30±0,58 <sup>a</sup>	8,07±2,04 <sup>a</sup>	9,95±2,57 <sup>a</sup>
<b>Relação M:E</b>	1,98±1,12 <sup>a</sup>	1,93±0,15 <sup>a</sup>	1,45±2,08 <sup>a</sup>	1,77±0,36 <sup>a</sup>	1,93±1,08 <sup>a</sup>	1,54±0,92 <sup>a</sup>

Células eritroides imaturas (EI), Células eritroides maduras (EM), Células mieloides imaturas (MI), Células mieloides maduras (MM), Relação Mieloide-Eritroide (M:E). 30 d de tratamento (M1), 45 d (M2) e 60 d (M3). <sup>a, b</sup> Letras diferentes por linha, indicam diferenças estatisticamente significativas para cada momento de tratamento, ANOVA de uma via e comparação múltipla de *Tukey* ( $p < 0,05$ ). Média±DP.

### 5.3 Fase III

#### 5.3.1 Achados macroscópicos

Nenhum animal CTR apresentou lesões durante a avaliação macroscópica. Dos animais tratados com CPX, após 30 dias de tratamento (M1), 3/6 apresentaram perda severa de massa muscular, 2/6 má qualidade da pelagem, 1/6 epistaxe e 1/6 nodulações pulmonares firmes. Quinze dias após a suspensão da terapia (M2), todos apresentavam perda de massa muscular (6/6) e 3/6 esplenomegalia (**Figura 5**). Em relação ao grupo tratado com MTX, 5/6 animais evidenciaram esplenomegalia em M1 e M3 (15 após a suspensão da terapia).

#### 5.3.2 Avaliação histopatológica

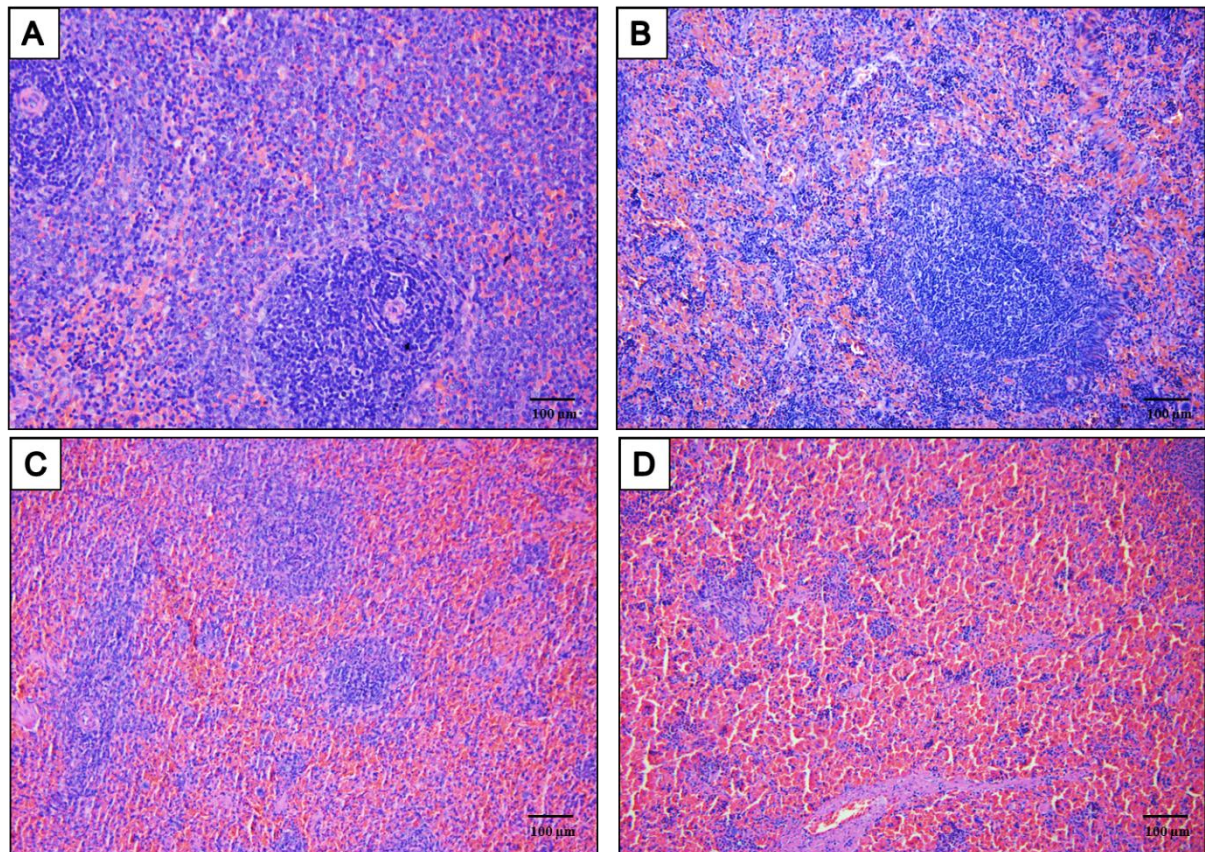
Não foram observadas alterações histológicas em artéria (aorta abdominal) nem em intestino tanto nos grupos de tratamento como nos diferentes momentos de avaliação. Os grupos CTR exibiram alterações microscópicas leves sendo 33% hepáticas, 33% pulmonares, 33% esplênicas, 5% renais e 5% cardíacas.

##### 5.3.2.1 Ciclofosfamida

Os animais tratados exibiram 78% de alterações hepáticas com congestão de grandes vasos (22%) e degeneração hidrópica hepatocelular (55%); 67% de afeção pulmonar incluindo moderada a severa pneumonia intersticial crônica e broncopneumonia fibrinopurulenta com dois animais apresentando abscessos pulmonares durante M1; 61% de alterações esplênicas explicadas por hipoplasia de polpa branca e vermelha (como se observa na **Figura 6**); 17% de lesões renais incluindo alterações vasculares (11%) e necrose tubular aguda (6%); 5% de comprometimento cardíaco (degeneração de fibras do miocárdio). Tanto para M1 quanto para M2, houve dano estatisticamente significativo no baço dos animais tratados ( $p < 0,05$ ). Os outros órgãos não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao CTR em ambos os momentos avaliados ( $p > 0,05$ ). As principais alterações histológicas se ilustram na **Figura 7**.

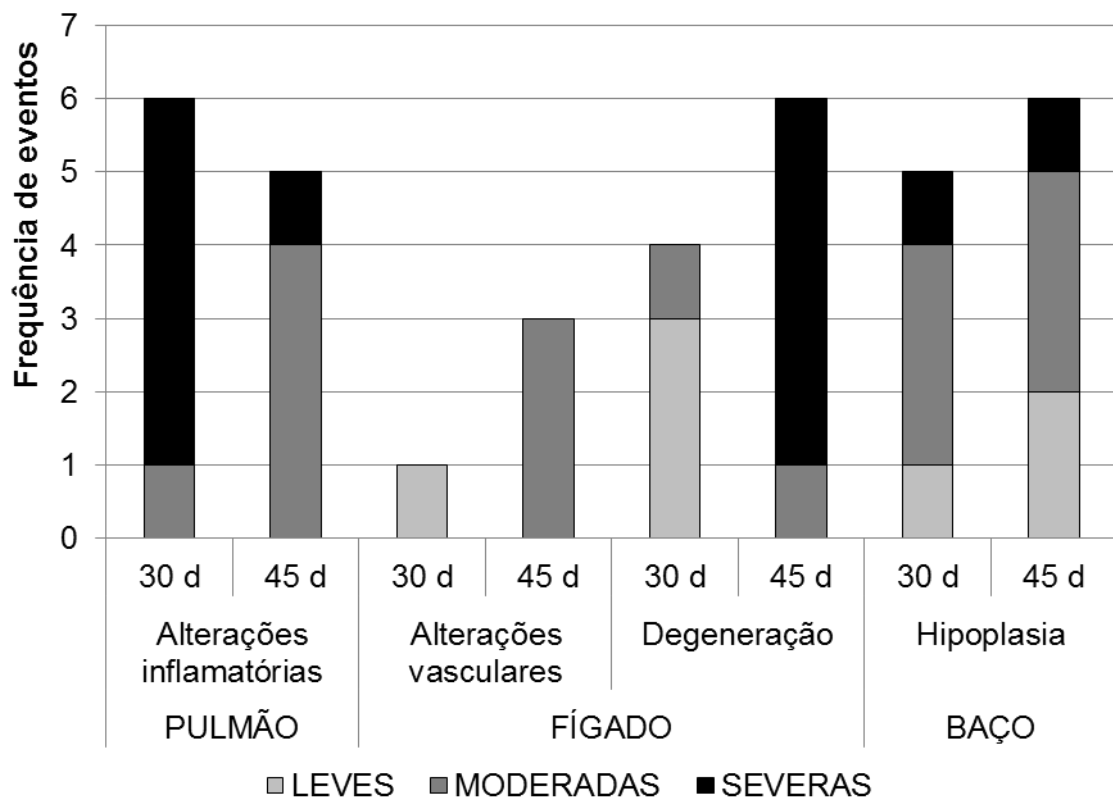


**Figura 5.** Alterações macroscópicas de ratos *Wistar* tratados por 30 dias com ciclofosfamida metronômica. (A) Acentuada perda de massa muscular (esquerda), animal controle (direita); (B) Esplenomegalia (superior), animal controle (inferior); (C) Nodulações no parênquima pulmonar.



**Figura 6.** Fotomicrografias de baço de ratos *Wistar* tratados por 30 dias com ciclofosfamida metronômica (CPX) ou placebo (CTR). (A) Baço normal, CTR, 30 d; (B) Depleção celular leve, CPX, 30 d; (C) Depleção celular moderada, CPX, 30 d; (D) Depleção celular severa, CPX, 30 d. H&E. 100x, bar 100 µm.

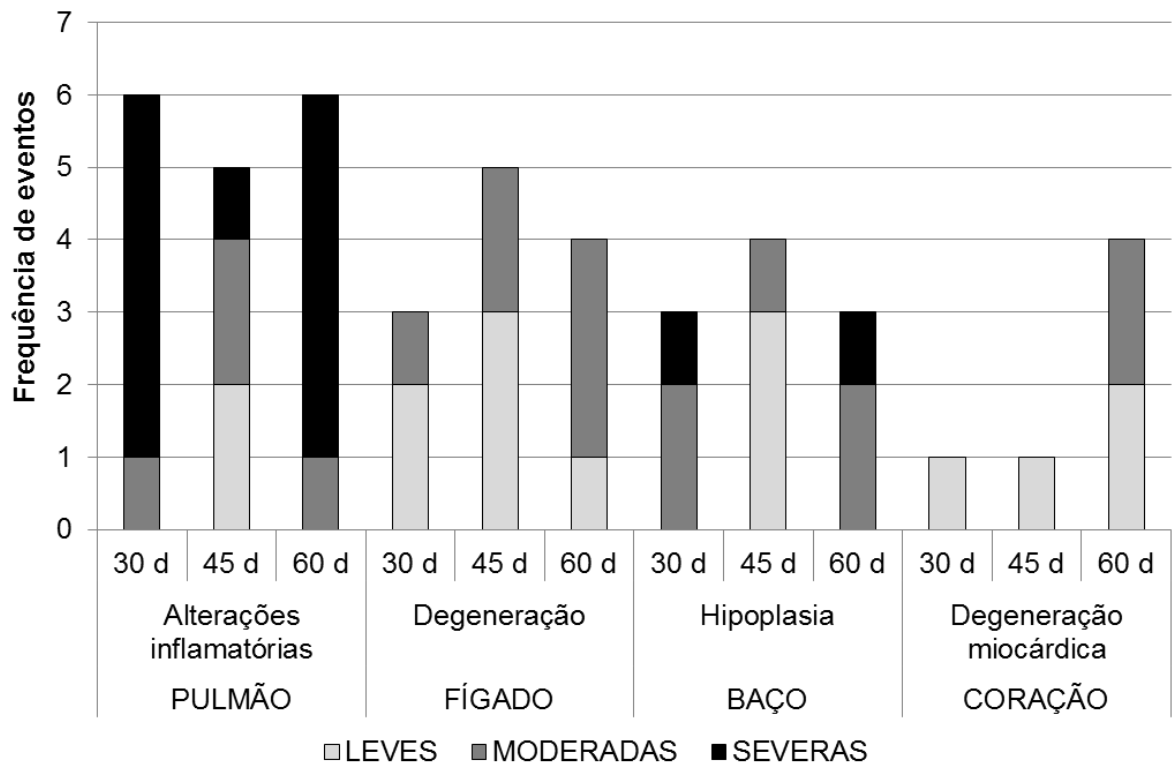




**Figura 7.** Frequência das principais alterações histopatológicas de ratos *Wistar* tratados com dose metronômica de ciclofosfamida.

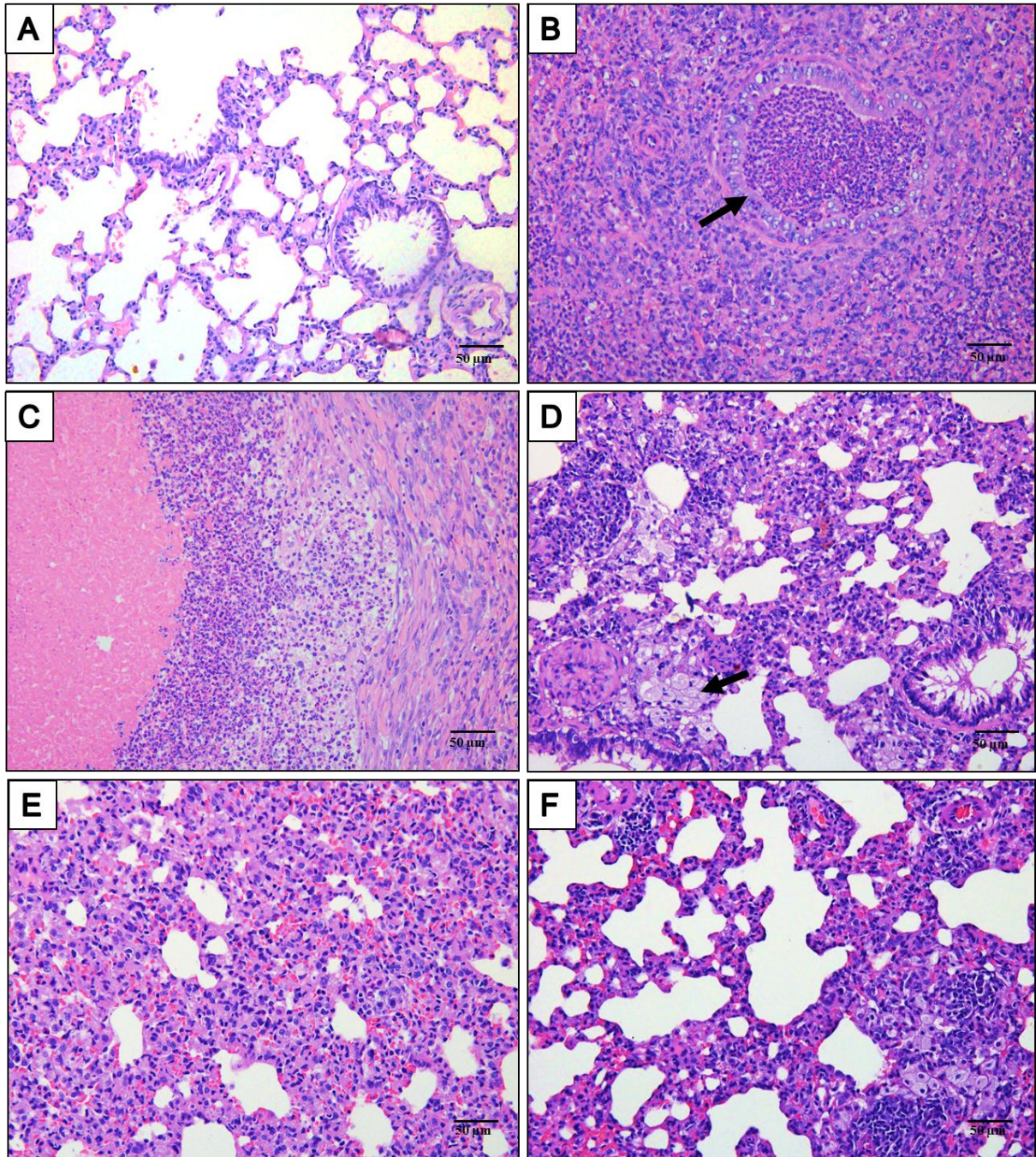
### 5.3.2.2 Metotrexato

Os animais tratados mostraram 94% de alterações pulmonares inflamatórias, sendo principalmente pneumonia intersticial crônica de moderada a severa (89%) e 28% de lesões vasculares como congestão de grandes vasos (17%) e hemorragia focal (11%); 94% de alterações hepáticas de leves a moderadas, sendo 22% vasculares (congestão de grandes vasos), 67% degeneração hidrópica hepatocelular e 5% degeneração gordurosa; 55% de depleção esplênica moderada a severa; 44% de lesões cardíacas leves a moderadas, com degeneração de fibras do miocárdio (33%) e hemorragia focal (11%); 28% de alterações renais leves, sendo 11% congestivas e 17% necrose tubular aguda; e 11% de alterações encefálicas leves (hemorragia focal). Em M1, se observou dano significativo ao nível esplênico em relação ao grupo CTR ( $p < 0,05$ ). Nenhum outro órgão apresentou lesão significativa neste período nem em M2 ou M3 ( $p > 0,05$ ). As principais alterações histopatológicas dos animais tratados com MTX se ilustram na **Figura 8**.

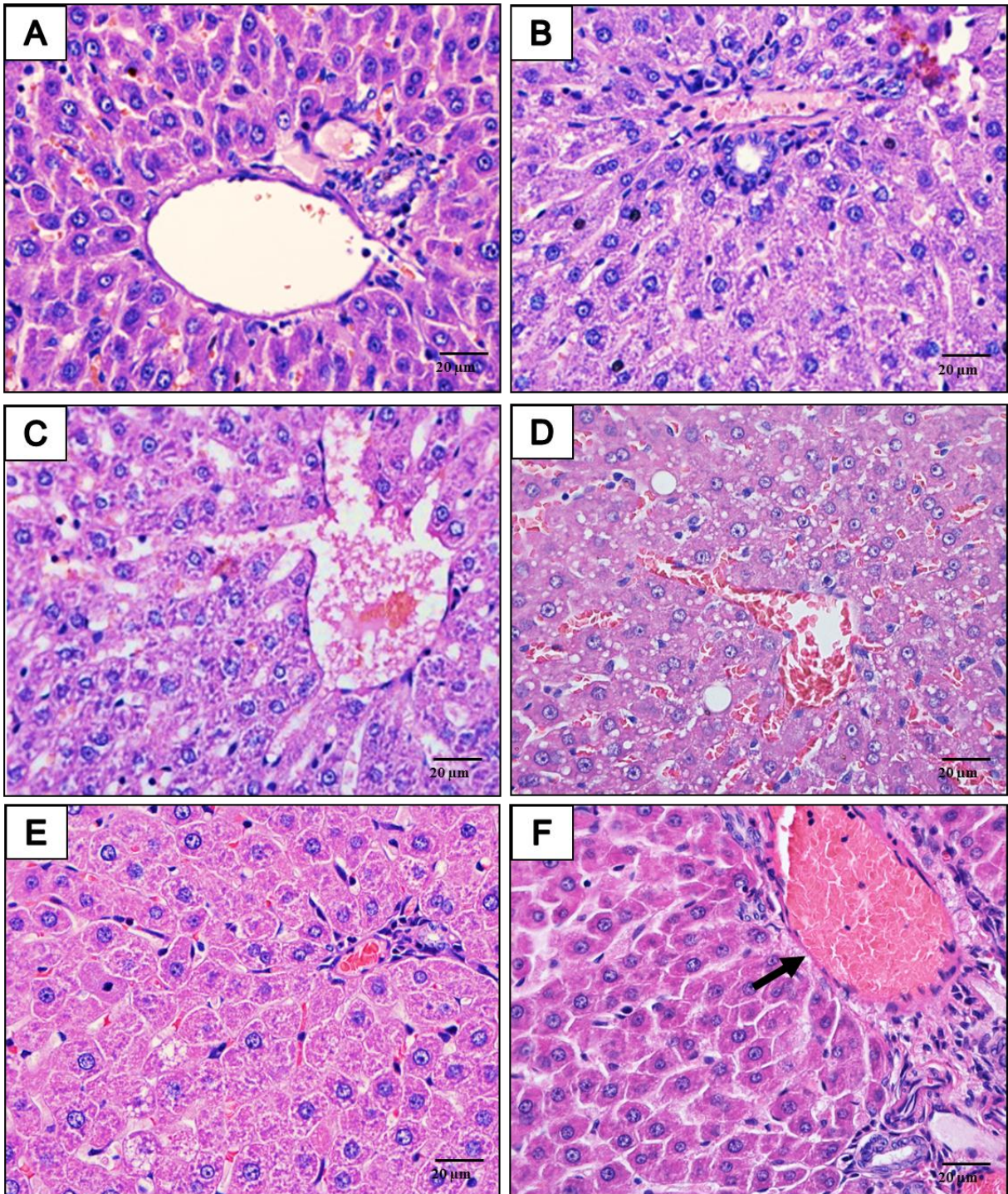


**Figura 8.** Frequência das principais alterações histopatológicas de ratos *Wistar* tratados com dose metronômica de metotrexato.

As principais alterações microscópicas observadas no pulmão e no fígado de ambos os grupos tratados se exibem na **Figura 9 e 10**, respectivamente.



**Figura 9.** Fotomicrografias pulmonares de ratos *Wistar* tratados com doses metronômicas de ciclofosfamida (CPX), metotrexato (MTX) ou placebo (CTR). (A) Pulmão normal, CTR, 30 d; (B) Broncopneumonia fibrinopurulenta severa, CPX, 30 d, infiltrado inflamatório no interior de um bronquíolo (seta); (C) Abscesso pulmonar, CPX, 30 d; (D) Pneumonia intersticial crônica moderada, CPX, 45 d, macrófagos espumosos (seta); (E) Pneumonia intersticial crônica severa, MTX, 30 d; (F) Pneumonia intersticial crônico-ativa moderada, MTX, 45 d. H&E. 200x, bar 50 µm.



**Figura 10.** Fotomicrografias de fígado de ratos *Wistar* tratados com dose metronômica de ciclofosfamida (CPX), metotrexato (MTX) ou placebo (CTR). (A) Fígado normal, CTR, 30 d; (B) Degeneração hidrópica periportal severa, CPX, 30 d; (C) Degeneração hidrópica centrolobular severa, CPX, 45 d; (D) Degeneração gordurosa centrolobular moderada, MTX, 30 d; (E) Degeneração hidrópica periportal moderada, MTX, 45 d; (F) Congestão moderada de grandes vasos (seta), MTX, 60 d. H&E. 400x, bar 20  $\mu$ m.

## 6 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a toxicidade de dois protocolos metronômicos, utilizando indivíduos hípidos, para evitar sobrepor alterações decorrentes dos processos tumorais, que podem ser similares às causadas pelos fármacos antineoplásicos (EMMENEGGER et al., 2004). Sendo assim, a eficácia terapêutica não foi o objetivo da nossa pesquisa.

O empirismo que caracteriza a seleção de doses metronômicas, assim como a ausência de estudos farmacocinéticos dificulta a padronização destes esquemas, obrigando a utilizar relatos prévios que conciliem efetividade com baixa toxicidade (PASQUIER et al., 2011; BOCCI; KERBEL, 2016). Foram selecionadas doses que não deveriam ter causado morte nem efeitos adversos graves (ZHAO et al., 2005; PATEL et al., 2014), no entanto, as alterações observadas nos animais não corresponderam com estes relatos.

A seleção da dose metronômica de CPX utilizou diferentes critérios que incluíram: a fração correspondente da DMT de CPX estabelecida para roedores entre 104 e 150 mg/kg (PENEL; ADENIS; BOCCI, 2012; SINANOGLU et al., 2012); a fórmula de extrapolação alométrica a partir de diferentes modelos em camundongos que possuíam estudos farmacocinéticos mais completos (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008; DOLOFF; WAXMAN, 2012); trabalhos na espécie alvo que mostraram eficácia e boa tolerância em uso subcrônico, sendo o caso de 30 mg/kg/d durante 42 dias (ZHAO et al., 2005); assim como, estudos preliminares realizados em ratos que demonstraram efeitos adversos consideráveis com doses iguais ou superiores a 15 mg/kg/d, levando a escolher a dose de 10 mg/kg/d. Apesar disso, esquemas que utilizaram 20 mg/kg de CPX duas vezes por semana ou 5 a 10 mg/kg três vezes por semana foram igualmente efetivos no controle tumoral e com baixa toxicidade (ROZADOS et al., 2004). Estes achados sugerem que menores doses de CPX ou em esquemas que não fossem diários podem ser efetivas e menos tóxicas.

Em animais, as doses metronômicas de MTX ainda não foram estabelecidas. Em roedores, existem relatos do impacto toxicológico de doses orais baixas de MTX, porém, desconhece-se sua efetividade antitumoral (FAN et al., 2009; PATEL et al., 2014). A seleção da dose utilizada na presente pesquisa se baseou na extrapolação

alométrica a partir dos valores utilizados em humanos (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008; KHAN et al., 2011), mas vários trabalhos em roedores com doses menores (entre 0,1 e 1,0 mg/kg/d) relataram toxicidade severa (JOLLY; FLETCHER, 1977; FAN et al., 2009; PATEL et al., 2014), assim, nosso estudo foi baseado em testes pilotos que revelaram tolerância da dose selecionada (0,08 mg/kg/d), frente a efeitos adversos acentuados com doses iguais ou superiores a 0,1 mg/kg/d, similarmente com os resultados de Patel et al. (2014).

Os efeitos citotóxicos associados à quimioterapia metronômica são raros, pois esta se mostra bem tolerada pelos tecidos que eram sensíveis à quimioterapia antineoplásica convencional (KERBEL; KAMEN, 2004). Os resultados observados neste trabalho diferem dos autores, pois se evidenciou que não todas as doses metronômicas são de baixa toxicidade e que no longo prazo múltiplas alterações clínicas podem estar presentes.

Em estudo de Senthilkumar et al. (2006), altas doses de CPX se relacionaram com edema de miócitos e hialinização focal do miocárdio, necrose e descamação do epitélio dos túbulos renais, edema de hepatócitos e estreitamento de espaço sinusoidal. Diferentemente, nosso esquema metronômico de CPX não mostrou alterações consideráveis em cérebro, coração, artéria, rins ou duodeno, mas revelou alterações no fígado, provavelmente devido à ativação hepática microsomal da CPX (SENTHILKUMAR et al., 2006).

Apesar de não ter observado mortalidade no grupo tratado com MTX, estes animais evidenciaram leves a moderadas alterações esplênicas, cardíacas, hepáticas e medulares, que não deveriam ser subestimadas, principalmente porque algumas persistiram no tempo, inclusive após a suspensão da terapia. Patel et al. (2014), observaram, em animais tratados com doses metronômicas de MTX superiores à utilizada: leucopenia, neutropenia e anemia, perda de peso, anorexia, depressão, letargia e diarreia, degeneração e alterações vasculares em fígado, rim e pulmão, assim como necrose e ulceração intestinal. No entanto, se destaca no mesmo estudo, que doses de 0,062 mg/kg/d não causaram depleção esplênica, discordando dos achados da presente pesquisa. Em pesquisa de Jolly e Fletcher (1977), doses de 0,6 mg/kg/d se relacionaram com dano severo na mucosa intestinal em ratos *Wistar* tratados com MTX durante uma semana, ao contrário que a dose de 0,07 mg/kg/d que não manifestou alteração intestinal, em concordância com as

nossas observações. As alterações cardíacas têm sido relatadas em esquemas convencionais, especificamente envolvendo complicações tromboembólicas, pericardite e efusão pericárdica (LIVSHITS; RAO; SMITH, 2014), diferentemente da degeneração das fibras do miocárdio observada neste, que não tinha sido relatada em esquemas metronômicos.

A toxicidade pulmonar destes fármacos antineoplásicos se considera rara, inclusive em esquemas convencionais, já que cursa frequentemente com reações de hipersensibilidade e fibrose pulmonar (SABA et al., 2013; LIVSHITS; RAO; SMITH, 2014), achados não observados na presente pesquisa. Reconhece-se também que a incidência de erro técnico de gavage é extremamente baixa, porém, Eichenbaum et al. (2011) mostraram sinais orais e respiratórios severos em ratos *Sprague-Dawley* tratados com gavage oral durante 3 semanas, sinais associados a refluxo do fármaco na cavidade nasal e subsequente aspiração dos conteúdos no trato respiratório. No entanto, nossos achados não corresponderam com estas alterações, não havendo presença de necrose, conteúdo gástrico ou partículas alimentares nas secreções pulmonares. Adicionalmente, para reduzir a incidência e severidade de problemas associados à gavage, os volumes administrados e as concentrações utilizadas dos fármacos foram inclusive inferiores às recomendadas (EICHENBAUM et al., 2011). Sinais inespecíficos como letargia, anorexia, perda de peso, descarga nasal e ocular, assim como os processos inflamatórios observados na histopatologia pulmonar, sugerem colonização de patógenos oportunistas, habitantes normais do trato respiratório, como resultado da maior suscetibilidade aos diferentes fatores estressantes (BAKER, 1998), em animais sem competência imunológica, produto do tratamento farmacológico (LIVSHITS; RAO; SMITH, 2014). Os animais deste estudo apresentaram resultados que sugerem hipoplasia medular parcial, assim como a hipocelularidade esplênica observadas com ambos os tratamentos utilizados. Assim, as alterações respiratórias observadas podem ser devidas à infecção oportunista do trato respiratório, que pode ter ocorrido por estarem estes animais imunologicamente comprometidos, estando mais susceptíveis aos patógenos.

A modulação imune, que caracteriza os esquemas metronômicos, causa redução seletiva de algumas populações de linfócitos, como as Treg's, porém, doses metronômicas não suficientemente baixas podem levar a depleção não seletiva de todas as populações de linfócitos (GHIRINGHELLI et al., 2007; TORIMURA et al.,

2013), o que pode ter acontecido na presente pesquisa, quando analisadas as contagens linfocitárias periféricas e medulares dos animais tratados com CPX, reduzidas em mais de 50% após 30 dias de tratamento e provavelmente associadas com imunossupressão, como se evidenciou em protocolos de altas doses e frequências de CPX, que alteraram a proliferação de células do sistema imune, suprimiram o recrutamento de populações imunes na massa tumoral e afetaram a resposta imune inata (WU; WAXMAN, 2014). Tal fato pode justificar os achados clínicos e laboratoriais observados nos animais tratados com CPX, como secreção nasal e ocular, letargia, anorexia, perda de peso, citopenias e hipoalbuminemia, indicando comprometimento sistêmico grave. Rozados et al. (2004) observaram diferentes graus de neutrofilia e linfopenia em ratos com implantes tumorais tratados com CPX, porém, atribuíram esta alteração à presença do tumor. Nossos resultados rejeitam esta hipótese, pois sugerem que estas alterações são decorrentes do fármaco. Em camundongos, dez dias foram precisos para permitir a recuperação da supressão da mielopoiese por CPX (WU; WAXMAN, 2014). Em nosso estudo, animais tratados com CPX por 30 dias que apresentavam para esse momento alterações medulares, mostraram recuperação destes parâmetros após 15 dias de descanso farmacológico (50% a mais do tempo de tratamento), porém, o comprometimento sistêmico e os sinais clínicos persistiram neste período, apesar do consumo de alimento e água ter se restabelecido uma vez o fármaco foi suspenso.

A quimioterapia metronômica também se relaciona com diminuição das células dendríticas e NK no baço, mais do que dos níveis de macrófagos, sugerindo uma explicação para a depleção celular esplênica observada em ambos os esquemas metronômicos utilizados (CHEN; DOLOFF; WAXMAN, 2014).

A mielossupressão também é frequentemente associada a baixas doses de MTX em humanos, manifestada com pancitopenia (KIVITY et al., 2014). Os animais tratados com MTX apresentaram redução significativa de plasmócitos medulares com aumento das populações mieloides imaturas após 30 dias de tratamento, sem afetar as populações periféricas. De maneira interessante, apesar de ter ocorrido melhora destes parâmetros após término do tratamento, 15 dias depois da finalização da terapia, evidenciou-se depleção de linfócitos medulares e populações mieloides imaturas (inicialmente aumentadas), simultaneamente com aumento de populações mieloides maduras, indicando leve a moderada hipoplasia medular



(parcial), sugerindo um efeito residual ou cumulativo, sendo que nos animais tratados por 45 dias com MTX, estes efeitos persistiram inclusive após 15 dias de descanso do fármaco (25% a mais do tempo de tratamento).

Em termos gerais, a maioria dos valores hematológicos e bioquímicos obtidos foi concordante com os parâmetros de referência para ratos *Wistar* machos de 8 a 16 semanas, embora a utilização de grupos controles simultâneos seja mais recomendado para realizar comparações (GIKNIS; CLIFFORD, 2008). No entanto, as alterações discretas nas mensurações sanguíneas dos animais tratados com CPX ou MTX não refletiram o real comprometimento orgânico observado em resposta ao tratamento.

Os resultados do presente trabalho, por ser realizado em animais de laboratório como os ratos, poderão ter impacto nas decisões clínicas em medicina veterinária, como também em medicina humana, considerando as diferenças entre as respectivas espécies. Ambas as doses metronômicas mostraram não ser de tão baixa toxicidade quanto se assumia, portanto sua toxicidade não deve ser negligenciada e especial atenção deve ser prestada tanto à imunossupressão em esquemas metronômicos quanto à estreita margem de segurança desta modalidade de quimioterapia.

Recomenda-se a realização de novas e mais pesquisas para estabelecer as doses biologicamente ótimas dos diferentes fármacos utilizados em esquemas metronômicos, preferentemente nas espécies alvo para determinar efetividade e toxicidade de forma simultânea.

## 7 CONCLUSÕES

Os esquemas propostos de dose, frequência e tempo de ciclofosfamida e metotrexato sugerem toxicidade considerável, assim como efeitos residuais após a suspensão da terapia, diferentemente do que se assumia com protocolos metronômicos.

A dose utilizada de ciclofosfamida mostrou mortalidade, perda de peso, sinais clínicos severos de comprometimento respiratório e sistêmico que persistiram após a suspensão da terapia; porém, o consumo de alimento e água apesar de estar diminuído durante o tratamento mostrou normalização uma vez o fármaco foi interrompido. O esquema utilizado de metotrexato não revelou mortalidade, nem alterações do consumo de alimento e água, mas os sinais clínicos foram consideráveis, evidenciando também comprometimento respiratório.

O tratamento com ciclofosfamida se relacionou com hipoalbuminemia, redução de leucócitos, linfócitos e aumento de neutrófilos, com persistência destes dois últimos após a suspensão do fármaco. Pelo contrário, o tratamento com metotrexato evidenciou aumento de leucócitos inicial e de neutrófilos de forma residual.

A avaliação de medula óssea dos animais tratados com ciclofosfamida evidenciou redução de populações de linfócitos e hipoplasia parcial eritroide que persistiu no tempo, sem afeção de populações precursoras. Os animais que receberam metotrexato mostraram redução de plasmócitos e aumento de populações mieloides imaturas inicialmente, mas com redução significativa destas últimas e de populações de linfócitos após a suspensão da terapia.

Os animais tratados com os dois fármacos revelaram hipocelularidade esplênica persistente no tempo, assim como acentuadas alterações inflamatórias pulmonares e degeneração hepática, no entanto, os grupos que receberam metotrexato mostraram também comprometimento renal e cardíaco.

As doses utilizadas neste estudo evidenciaram leve a moderada mielotoxicidade, que se manifestou com alterações secundárias, explicando os sinais clínicos observados, que inclusive persistiram uma vez que a terapia foi

suspensa, destacando a importância de considerar a toxicidade da quimioterapia metronômica assim como os efeitos adversos residuais.

A supressão imunológica é desejável em esquemas metronômicos, sempre que aconteça de forma específica sobre algumas populações celulares. No entanto, diferenças discretas nas doses metronômicas podem transformá-la em uma condição exacerbada, sem capacidade de exercer modulação imune antitumoral, prejudicando sua segurança terapêutica.

## 8 REFERÊNCIAS

- AGUIRRE-GHISO, J. A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. **Nature Reviews Cancer**, Londres, v. 7, n. 11, p. 834–846, 2007.
- ANDRÉ, N.; ABED, S.; ORBACH, D.; ALLA, C. A.; PADOVANI, L.; PASQUIER, E.; GENTET, J. C.; VERSCHUUR, A. Pilot study of a pediatric metronomic 4-drug regimen. **Oncotarget**, Albânia, v. 2, n. 12, p. 960–965, 2011.
- ANDREOLLO, N. A.; SANTOS, E. F. dos; ARAÚJO, M. R.; LOPES, L. R. Rat's age versus human's age: What is the relationship? **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 49–51, 2012.
- BAKER, D. G. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 2, p. 231–266, 1998.
- BARBOLOSI, D.; CICCOLINI, J.; MEILLE, C.; ELHARRAR, X.; FAIVRE, C.; LACARELLE, B.; ANDRÉ, N.; BARLESI, F. Metronomics chemotherapy: Time for computational decision support. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Heidelberg, v. 74, n. 3, p. 647–652, 2014.
- BILASY, S. E.; ESSAWY, S. S.; MANDOUR, M. F.; ALI, E. A. I.; ZAITONE, S. A. Myelosuppressive and hepatotoxic potential of leflunomide and methotrexate combination in a rat model of rheumatoid arthritis. **Pharmacological Reports**, Varsóvia, v. 67, p. 102–114, 2015.
- BILLER, B. Metronomic chemotherapy in veterinary patients with cancer. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, Maryland Heights, v. 44, n. 5, p. 817–829, 2014.
- BOCCI, G.; KERBEL, R. S. Pharmacokinetics of metronomic chemotherapy: a neglected but crucial aspect. **Nature reviews Clinical Oncology**. Londres, v. 13, p. 1–15, 2016.
- BORGES, G. G.; NUNES, L. M. P.; SANTOS, L. C. G. dos; SILVINO, R. Z. Biossegurança na central de quimioterapia: o enfermeiro frente ao risco químico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 3, p. 247–250, 2014.
- BREEN, M. Update on genomics in veterinary oncology. **Topics in Companion Animal Medicine**, Maryland Heights, v. 24, n. 3, p. 113–121, 2009.
- BURTON, J. H.; MITCHELL, L.; THAMM, D. H.; DOW, S. W.; BILLER, B. J. Low-dose cyclophosphamide selectively decreases regulatory T cells and inhibits angiogenesis in dogs with soft tissue sarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Hoboken, v. 25, n. 4, p. 920–926, 2011.

CAVALCANTI, S. C. S. X. B.; CORRÊA, L.; DE CERQUEIRA LUZ, J. G. Facial symmetry evaluation after experimentally displaced condylar process fracture in methotrexate treated rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 210–216, 2012.

CHEN, C.; DOLOFF, J. C.; WAXMAN, D. J. Intermittent metronomic drug schedule is essential for activating antitumor innate immunity and tumor xenograft regression. **Neoplasia**, Ann Arbor, v. 16, n. 1, p. 84–96, 2014.

CHOUDHURY, R. C.; GHOSH, S. K.; PALO, A. K. Cytogenetic toxicity of methotrexate in mouse bone marrow. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdã, v. 8, n. 3, p. 191–196, 2000.

COLLEONI, M.; ROCCA, A.; SANDRI, M. T.; ZORZINO, L.; MASCI, G.; NOLÈ, F.; PERUZZOTTI, G.; ROBERTSON, C.; ORLANDO, L.; CINIEMI, S.; BRAUD, F. de; VIALE, G.; GOLDBIRSCHE, A. Low-dose oral methotrexate and cyclophosphamide in metastatic breast cancer: antitumor activity and correlation with vascular endothelial growth factor levels. **Annals of Oncology**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 73–80, 2002.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa n. 13 de 20 de setembro de 2013. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 set. 2013. Seção 1, p. 05.

DAHL BORKAMO, E.; FLUGE, O.; MELLA, O.; AKSLEN, L. A.; BRULAND, O.; DAHL, O. Hyperthermia improves the antitumour effect of metronomic cyclophosphamide in a rat transplantable brain tumour. **Radiotherapy and Oncology**, Shannon, v. 86, n. 3, p. 435–442, 2008.

DANK, G.; BENZIONI, H.; KLAINBART, S.; JANDREY. Accidental methotrexate ingestion in a dog. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, Ra'anana, v. 65, n. 2, p. 72–74, 2010.

DI BARTOLOMEO, M.; CIARLO, A.; BERTOLINI, A.; BARNI, S.; VERUSIO, C.; AITINI, E.; PIETRANTONIO, F.; IACOVELLI, R.; DOTTI, K. F.; MAGGI, C.; PERRONE, F.; BAJETTA E. Capecitabine, oxaliplatin and irinotecan in combination, with bevacizumab (COI-B regimen) as first-line treatment of patients with advanced colorectal cancer. An Italian Trials of Medical Oncology phase II study. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 51, n. 4, p. 473–481, 2015.

DOLOFF, J. C.; WAXMAN, D. J. VEGF receptor inhibitors block the ability of metronomically dosed cyclophosphamide to activate innate immunity-induced tumor regression. **Cancer Research**, Filadélfia, v. 75, n. 2, p. 1103–1115, 2012.

EICHENBAUM, G.; DAMSCH, S.; LOOSZOVA, A.; VANDENBERGHE, J.; VAN DEN BULCK, K.; ROELS, K.; MEGENS, A.; KNIGHT, E.; HILLSAMER, V.; FEYEN, B.; KELLEY, M. F.; TONELLI, A.; LAMMENS, L. Impact of gavage dosing procedure and gastric content on adverse respiratory effects and mortality in rat toxicity studies. **Journal of Applied Toxicology**, West Sussex, v. 31, n. 4, p. 342–354, 2011.

ELMSLIE, R. E.; GLAWE, P.; DOW, S. W. Metronomic therapy with cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Hoboken, v. 22, n. 6, p. 1373–1379, 2008.

EMMENEGGER, U.; MAN, S.; SHAKED, Y.; FRANZIA, J.; WONG, J. W.; HICKLIN D. J.; KERBEL, R. S. A comparative analysis of low-dose metronomic cyclophosphamide reveals absent or low-grade toxicity on tissues highly sensitive to the toxic effects of maximum tolerated dose regimens. **Cancer Research**, Filadélfia, v. 64, n. 11, p. 3994–4000, 2004.

FAN, C.; COOL, J. C.; SCHERER, M. A.; FOSTER, B. K.; SHANDALA, T.; TAPP, H.; XIAN, C. J. Damaging effects of chronic low-dose methotrexate usage on primary bone formation in young rats and potential protective effects of folinic acid supplementary treatment. **Bone**, Filadélfia, v. 44, n. 1, p. 61–70, 2009.

FENTENER VAN VLISSINGEN, J. M.; BORRENS, M.; GIROD, A.; LELOVAS, P.; MORRISON, F.; SAAVEDRA TORRES, Y. The reporting of clinical signs in laboratory animals. **Laboratory animals**, Londres, v. 49, n. 4, p. 267–283, 2015.

FERLAY, J.; SHIN, H-R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, Hoboken, v. 127, n. 12, p. 2893–2917, 2010.

FINN, O. J. Immuno-oncology: Understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. **Annals of Oncology**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 8–11, 2012.

FUKUI, H.; YAMAMOTO, M. Methotrexate produces delayed emesis in dogs: a potential model of delayed emesis induced by chemotherapy. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdã, v. 372, n. 3, p. 261–267, 1999.

GHIRINGHELLI, F.; MENARD, C.; PUIG, P. E.; LADOIRE, S.; ROUX, S.; MARTIN, F.; SOLARY, E.; LE CESNE, A.; ZITVOGEL, L.; CHAUFFERT, B. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4 +CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, Heidelberg, v. 56, p. 641–648, 2007.

GIKNIS, M. L.; CLIFFORD, C. B. **Clinical Laboratory Parameters For Crl:WI (Han) Rats**. Quebec: Charles River Laboratories, 2008. 17 p.

GNONI, A.; SILVESTRIS, N.; LICCHETTA, A.; SANTINI, D.; SCARTOZZI, M.; RIA, R.; PISCONTI, S.; PETRELLI, F.; VACCA, A.; LORUSSO, V. Metronomic chemotherapy from rationale to clinical studies: a dream or reality? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Shannon, v. 95, n. 1, p. 46–61, 2015.

HANAHAN, D.; BERGERS, G.; BERGSLAND, E. Less is, more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 105, n. 8, p. 1045–1047, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, Cambridge, v. 100, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, Cambridge, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

JALALI, A. S.; HASANZADEH, S.; MALEKINEJAD, H. *Achillea millefolium* inflorescence aqueous extract ameliorates cyclophosphamide-induced toxicity in rat testis: Stereological evidences. **Chinese Journal of Natural Medicines**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 247–254, 2012.

JANG, J. W.; PARK, S. T.; KWON, J. H.; YOU, C. R.; CHOI, J. Y.; JUNG, C-K.; BAE, S. H.; YOON, S. K. Suppression of hepatic tumor growth and metastasis by metronomic therapy in a rat model of hepatocellular carcinoma. **Experimental & Molecular Medicine**, Londres, v. 43, n. 5, p. 305–312, 2011.

JOLLY, L. E.; FLETCHER, H. P. The effect of repeated oral dosing of methotrexate on its intestinal absorption in the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Maryland Heights, v. 39, n. 1, p. 23–32, 1977.

JUNG, J. Y.; JANG, G.; SONG, H.; KIM, H. S.; CHOI, D. R.; KWON, J. H.; KIM, H. Y.; HAN, B.; KIM, J. H.; KIM, H. J.; ZANG, D. Y. Efficacy of metronomic chemotherapy with oral cyclophosphamide and methotrexate in patients with non-Hodgkin lymphoma: a retrospective analysis at a single institution. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, Madison, v. 9, n. 2, p. 3893–3900, 2016.

KERBEL, R. S.; KAMEN, B. A. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, Londres, v. 4, n. 6, p. 423–436, 2004.

KHAN, O. A.; BLANN, A. D.; PAYNE, M. J.; MIDDLETON, M. R.; PROTHEROE, A. S.; TALBOT, D. C.; TAYLOR, M.; HAN, C.; PATIL, M.; HARRIS, A. L. Continuous low-dose cyclophosphamide and methotrexate combined with celecoxib for patients with advanced cancer. **British Journal of Cancer**, Londres, v. 104, n. 12, p. 1822–1827, 2011.

KIVITY, S.; ZAFRIR, Y.; LOEBSTEIN, R.; PAUZNER, R.; MOUALLEM, M.; MAYAM, H. Clinical characteristics and risk factors for low dose methotrexate toxicity: a cohort of 28 patients. **Autoimmunity Reviews**, Filadélfia, v. 13, p. 1109–1113, 2014.

LANA, S.; U'REN, L.; PLAZA, S.; ELMSLIE, R.; GUSTAFSON, D.; MORLEY, P.; DOW, S. Continuous low-dose oral chemotherapy for adjuvant therapy of splenic hemangiosarcoma in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Hoboken, v. 21, p. 764–769, 2007.

LEACH, T. N.; CHILDRESS, M. O.; GREENE, S. N.; MOHAMED, A. S.; MOORE, G. E.; SCHREMPP, D. R.; LAHRMAN, S. R.; KNAPP, D. W. Prospective trial of metronomic chlorambucil chemotherapy in dogs with naturally occurring cancer. **Veterinary and Comparative Oncology**, West Sussex, v. 10, n. 2, p. 102–112, 2012.

LEO, C.; STELL, A.; BORREGO, J.; MARTINEZ DE MERLO, E.; RUESS-MELZER, K.; LARA-GARCIA, A. Evaluation of low-dose metronomic (LDM) cyclophosphamide toxicity in cats with malignant neoplasia. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Londres, v. 16, n. 8, p. 671–678, 2014.

LIEN, K.; GEORGSODOTTIR, S.; SIVANATHAN, L.; CHAN, K.; EMMENEGGER, U. Low-dose metronomic chemotherapy: a systematic literature analysis. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 49, n. 16, p. 3387–3395, 2013.

LIVSHITS, Z.; RAO, R. B.; SMITH, S. W. An approach to chemotherapy - Associated toxicity. **Emergency Medicine Clinics of North America**, Maryland Heights, v. 32, n. 1, p. 167–203, 2014.

LOVEN, D.; HASNIS, E.; BERTOLINI, F.; SHAKED, Y. Low-dose metronomic chemotherapy: from past experience to new paradigms in the treatment of cancer. **Drug Discovery Today**, Londres, v. 18, n. 3–4, p. 193–201, 2013.

MA, J.; WAXMAN, D. J. Modulation of the antitumor activity of metronomic cyclophosphamide by the angiogenesis inhibitor axitinib. **Molecular Cancer Therapeutics**, Filadélfia, v. 7, n. 1, p. 79–89, 2008.

MAGGO, G.; GROVER, S. C.; GRIN, A. Capecitabine induced colitis. **Pathology - Research and Practice**, Muenchen, v. 210, n. 9, p. 606–608, 2014.

MARCHETTI, V.; GIORGI, M.; FIORAVANTI, A.; FINOTELLO, R.; CITI, S.; CANU, B.; ORLANDI, P.; DI DESIDERO, T.; DANESI, R.; BOCCI, G. First-line metronomic chemotherapy in a metastatic model of spontaneous canine tumours: a pilot study. **Investigational New Drugs**, New York, v. 30, n. 4, p. 1725–1730, 2012.

MARTIN-PADURA, I.; MARIGHETTI, P.; AGLIANO, A.; COLOMBO, F.; LARZABAL, L.; REDRADO, M.; BLEAU, A-M.; PRIOR, C.; BERTOLINI, F.; CALVO, A. Residual dormant cancer stem-cell foci are responsible for tumor relapse after antiangiogenic metronomic therapy in hepatocellular carcinoma xenografts. **Laboratory Investigation**, Londres, v. 92, n. 7, p. 952–966, 2012.

MASCI, G.; LOSURDO, A.; GANDINI, C.; GARASSINO, I.; DI TOMASSO, L.; TORRISI, R.; ZURADELLI, M.; SANTORO, A. low-dose “metronomic chemotherapy” with oral cyclophosphamide and methotrexate in metastatic breast cancer: a case report of extraordinarily prolonged clinical benefit. **Ecancer Medical Science**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 1–5, 2012.

MITCHELL, L.; THAMM, D. H.; BILLER, B. J. Clinical and immunomodulatory effects of toceranib combined with low-dose cyclophosphamide in dogs with cancer. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Hoboken, v. 26, n. 2, p. 355–362, 2012.

MONTAGNA, E.; CANCELLO, G.; DELLAPASQUA, S.; MUNZONE, E.; COLLEONI, M. Metronomic therapy and breast cancer: a systematic review. **Cancer Treatment Reviews**, Londres, v. 40, n. 8, p. 942–950, 2014.

MUNOZ, R.; MAN, S.; SHAKED, Y.; LEE, C. R.; WONG, J.; FRANCI, G.; KERBEL, R. S. Highly efficacious nontoxic preclinical treatment for advanced metastatic breast cancer using combination oral UFT-cyclophosphamide metronomic chemotherapy. **Cancer Research**, Filadélfia, v. 66, n. 7, p. 3386–3391, 2006.

MUTSAERS, A. J. Chemotherapy: new uses for old drugs. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, Maryland Heights, v. 37, n. 6, p. 1079–1090, 2007.



MUTSAERS, A. J. Metronomic chemotherapy. **Topics in Companion Animal Medicine**, Maryland Heights, v. 24, n. 3, p. 137–143, 2009.

ORLANDO, L.; CARDILLO, A.; GHISINI, R.; ROCCA, A.; BALDUZZI, A.; TORRISI, R.; PERUZZOTTI, G.; GOLDBIRSCH, A.; PIETRI, E.; COLLEONI, M. Trastuzumab in combination with metronomic cyclophosphamide and methotrexate in patients with HER-2 positive metastatic breast cancer. **BMC cancer**, Londres, v. 6, p. 225, 2006.

PANG, L. Y.; ARGYLE, D. J. Veterinary oncology: biology, big data and precision medicine. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 213, p. 38–45, 2016.

PARKINSON, C. M.; O'BRIEN, A.; ALBERS, T. M.; SIMON, M. A.; CLIFFORD, C. B.; PRITCHETT-CORNING, K. R. Diagnostic necropsy and selected tissue and sample collection in rats and mice. **Journal of Visualized Experiments**, [S.l.], v. 54, p. e2966, 2011.

PASQUIER, E.; KIERAN, M. W.; STERBA, J.; SHAKED, Y.; BARUCHEL, S.; OBERLIN, O.; KIVIVUORI, M. S.; PEYRL, A.; DIAWARRA, M.; CASANOVA, M.; ZACHAROULIS, S.; VASSAL, G.; BERTHOLD, F.; VERSCHUUR, A.; ANDRÉ, N. Moving forward with metronomic chemotherapy: meeting report of the 2nd International Workshop on Metronomic and Anti-Angiogenic Chemotherapy in Paediatric Oncology. **Translational oncology**, São Francisco, v. 4, n. 4, p. 203–211, 2011.

PASQUIER, E.; KAVALLARIS, M.; ANDRÉ, N. Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. **Nature Reviews Clinical Oncology**, Londres, v. 7, n. 8, p. 455–465, 2010.

PATEL, N. N.; GHODASARA, D.; J.; PANDEY, S.; GHODASARA, P. D.; KHORAJIYA, J. H.; JOSHI, B. P.; DAVE, C. J. Subacute toxicopathological studies of methotrexate in Wistar rats. **Veterinary World**, Gujarat, v. 7, n. 7, p. 489–495, 2014.

PENEL, N.; ADENIS, A.; BOCCI, G. Cyclophosphamide-based metronomic chemotherapy: after 10 years of experience, where do we stand and where are we going? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Shannon, v. 82, n. 1, p. 40–50, 2012.

RASKIN, R. E.; MESSICK, J. B. Bone marrow cytologic and histologic biopsies: indications, technique, and evaluation. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, Maryland Heights, v. 42, n. 1, p. 23–42, 2012.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 22, n. 3, p. 659–661, 2008.

ROMITI, A.; COX, M. C.; SARCINA, I.; DI ROCCO, R.; D'ANTONIO, C.; BARUCCA, V.; MARCHETTI, P. Metronomic chemotherapy for cancer treatment: a decade of clinical studies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Heidelberg, v. 72, n. 1, p. 13–33, 2013.

ROZADOS, V. R.; SÁNCHEZ, A. M.; GERVASONI, S. I.; BERRA, H. H.; MATAR, P.; SCHAROVSKY, O. G. Metronomic therapy with cyclophosphamide induces rat lymphoma and sarcoma regression, and is devoid of toxicity. **Annals of Oncology**, Oxford, v. 15, n. 10, p. 1543–1550, 2004.

SABA; KHAN, S.; PARVEZ, S.; CHAUDHARI, B.; AHMAD, F.; ANJUM, S. Ellagic acid attenuates bleomycin and cyclophosphamide-induced pulmonary toxicity in *Wistar* rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 58, p. 210–219, 2013.

SATOH, K.; MARK, H.; ZACHRISSON, P.; RYDEVIK, P.; BYROD, G.; KIKUCHI, S.-I.; KONNO, S.-I.; SEKIGUCHI, M. Effect of methotrexate on fracture healing. **Fukushima Journal of Medical Science**, Fukushima-shi, v. 57, n. 1, p. 11–18, 2011.

SCHREMPP, D. R.; CHILDRESS, M. O.; STEWAR, J. C.; TAN, K. M.; GORTARI, A. E.; BOONEY, P. L.; KNAPP, D. W. Metronomic administration of chlorambucil for treatment of dogs with urinary bladder transitional cell carcinoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 242, n. 11, p. 1534–1538, 2013.

SENGUPTA, P. The laboratory rat: relating its age with human's. **International Journal of Preventive Medicine**, Mumbai, v. 4, n. 6, p. 624–630, 2013.

SENTHILKUMAR, S.; DEVAKI, T.; MANOHAR, B. M.; BABU, M. S. Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdã, v. 364, n. 1–2, p. 335–342, 2006.

SHAKED, Y.; EMMENEGGER, U.; MAN, S.; CERVI, D.; BERTOLINI, F.; BEM-DAVID, Y.; KERBEL, R. S. Optimal biologic dose of metronomic chemotherapy regimens is associated with maximum antiangiogenic activity. **Blood**, Washington, v. 106, n. 9, p. 3058–3061, 2005.

SHI, H.; JIANG, J.; JI, J.; SHI, M.; CAI, Q.; CHEN, X.; YU, Y.; LIU, B.; ZHU, Z.; ZHANG, J. Anti-angiogenesis participates in antitumor effects of metronomic capecitabine on colon cancer. **Cancer Letters**, Shannon, v. 349, n. 2, p. 128–135, 2014.

SILVA, A. L. M.; CANESIN, A. P. N.; CÁPUA, M. L. B. de.; GODOY, A. V.; MIOTTO, M. R.; SANTANA, A. E. Avaliação plaquetária de cães com linfoma submetidos à quimioterapia, transplante de medula óssea e fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF). **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 8, n. 3, p. 307–317, 2010.

SINANOGLU, O.; YENER, A. N.; EKICI, S.; MIDI, A.; AKSUNGAR, F. B. The protective effects of spirulina in cyclophosphamide induced nephrotoxicity and urotoxicity in rats. **Urology**, New York, v. 80, n. 1, p. 1392.e1-1392.e6, 2012. Supplement.

TAKANO, Y.; MACHIDA, T.; OBARA, Y.; HIRANO, M.; KUDO, S.; TAKAGI, M.; HAMAUE, N.; IIZUKA, K.; HIRAFUJI, M. Methotrexate causes a change in intestinal 5-hydroxytryptamine metabolism in rats. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdã, v. 740, p. 496–503, 2014.

TAKIMOTO, C. H. Maximum tolerated dose: clinical endpoint for a bygone era? **Targeted Oncology**, Paris, v. 4, n. 2, p. 143–147, 2009.

TOLOSA, E. M. C. de.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Manole, 2013. 341 p.

TOOLEY, K. L.; GORDON, S. H.; LYMN, K. A.; LAWRENCE, A.; BUTLER, R. N. Oral ingestion of *Streptococcus thermophilus* diminishes severity of small intestinal mucositis in methotrexate treated rats. **Cancer Biology and Therapy**, Filadélfia, v. 5, n. 6, p. 593–600, 2006.

TORIMURA, T.; IWAMOTO, H.; NAKAMURA, T.; KOGA, H.; UENO, T.; KERBEL, R. S.; SATA, M. Metronomic chemotherapy: possible clinical application in advanced hepatocellular carcinoma. **Translational Oncology**, São Francisco, v. 6, n. 5, p. 511–519, 2013.

TRIPP, C. D.; FIDEL, J.; ANDERSON, C. L.; PATRICK, M.; PRATT, C.; SELLON, R.; BRYAN, J. N. Tolerability of metronomic administration of lomustine in dogs with cancer. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Hoboken, v. 25, n. 2, p. 278–284, 2011.

VAN ROON, E. N.; VAN DE LAAR, M. A. F. J. Methotrexate bioavailability. **Clinical Experimental Rheumatology**, Ospedaletto, v. 28, n. 61, p. S27–S32, 2010. Supplement.

WITHROW, S. J.; VALE, D. M.; PAGE, R. **Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology**. 5 ed. [S.l.]: Saunders Elsevier. 750 p. 2013.

WU, J.; WAXMAN, D. J. Metronomic cyclophosphamide schedule-dependence of innate immune cell recruitment and tumor regression in an implanted glioma model. **Cancer Letters**, Shannon, v. 353, n. 2, p. 272–280, 2014.

YUKI, M.; SUGIMOTO, N.; TAKAHASHI, K.; OTSUKA, H.; NISHII, N.; SUZUKI, K.; YAMAGAMI, T.; ITO, H. A case of protein-losing enteropathy treated with methotrexate in a dog. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tóquio, v. 68, n. 4, p. 397–399, 2006.

ZHANG, J.; TIAN, Q.; ZHOU, S-F. Clinical pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide. **Current Drug Therapy**, Bussum, v. 1, n. 1, p. 55–84, 2006.

ZHAO, D.; JIANG, L.; HAHN, E. W.; MASON, R. P. Continuous low-dose (metronomic) chemotherapy on rat prostate tumors evaluated using MRI *in vivo* and comparison with histology. **Neoplasia**, Ann Arbor, v. 7, n. 7, p. 678–687, 2005.