

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/01/2019.

**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**

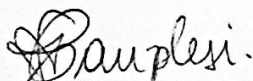
**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS TÓXICOS DA QUIMIOTERAPIA METRONÔMICA A BASE DE CICLOFOSFAMIDA OU METOTREXATO EM RATOS WISTAR**

**AUTORA: MARIA LUCIA CORREAL SUAREZ**

**ORIENTADOR: AUREO EVANGELISTA SANTANA**

**COORDINADORA: 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.

## 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.; SELTON, 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.