

LUIS FERNANDO GUERTA SALINA

**Avaliação da segurança hepática e cardíaca do
composto LYSO-07 – nova tiazolidinodiona.**

Araraquara

2013

LUIS FERNANDO GUERTA SALINA

**Avaliação da segurança hepática e cardíaca do
composto LYSO-07 – nova tiazolidinodiona.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista para a
obtenção do grau de Farmacêutico-
Bioquímico.

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara

2013

Dedico este trabalho a meus pais, minhas irmãs,
minha namorada, a profª Rosangela, ao pessoal do
laboratório, aos meus amigos da turma do *Charlie* e
a república Taboca. Meus sinceros agradecimentos aos
personagens que me permitiram acreditar, ter fé e a poetizar este sonho.

AGRADECIMENTO

Acordo arrependido, mas não durmo com vontade

Apreensivo bixo eu entrei

Rapidamente lá me encontrei

As amizades comigo levarei

República Taboca nunca te abandonarei

Algumas aulas lá eu matei

QF? Passei!

Unespiano de coração sempre fui e serei

Até de animais lá eu cuidei

Rapaz...que fase!

Ah, que pena que passou tão rápido...

É...chegou a hora do diploma pegar

Um dia minha despedida ia chegar

Malas prontas para o adeus? Não.

Talvez um dia eu possa voltar

E relembrar e viver aqueles bons momentos...

Saudades dessa terra que me fez tão bem

Apenas um sentimento daqui carrego,

Obrigado UNESP Araraquara!

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1 Estudos pré-clínicos	14
1.2 Lyso-07 e as tiazolidinodionas (TZDs)	17
1.3 Solubilidade da lyso-07	18
2. Objetivos	20
3. Metodologia	21
3.1 Modelo animal	21
3.2 Preparo da suspensão	21
3.3 Protocolo experimental	22
3.3.1 Grupo água	23
3.3.2 Grupo suspensão	23
3.3.3 Grupo lyso-07	24
3.3.4 Grupo lyso-07 na dose equimolar da pioglitazona	24
3.4 Métodos analíticos	24
3.4.1 Parâmetros bioquímicos	24
3.4.1.1 Alanina aminotransferase (ALT)	25
3.4.1.2 Aspartato aminotransferase (AST)	25
3.4.1.3 Creatinina quinase (CK)	25
3.4.1.4 Creatinina quinase – MB (CK-MB)	26
3.4.1.5 Colesterol	27
3.4.1.6 Creatinina	27
3.4.1.7 Glicose	28
3.4.1.8 Uréia	28
3.4.2 Espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	28

3.5	Análises estatísticas	29
4.	Resultados e Discussões.....	30
4.1	Peso dos animais expostos	30
4.2	Hemoglobina	32
4.3	ALT e AST	32
4.3.1	Curva de calibração	33
4.3.2	ALT dos animais expostos	35
4.3.3	AST dos animais expostos	37
4.4	CK e CK-MB	39
4.4.1	CK dos animais expostos	39
4.4.2	CK – MB dos animais expostos.....	41
4.5	Creatinina e Ureia.....	43
4.5.1	Creatinina dos animais expostos.....	44
4.5.2	Ureia dos animais expostos.....	46
4.6	Glicose e Colesterol	48
4.6.1	Glicose dos animais expostos.....	49
4.6.2	Colesterol dos animais expostos.....	51
5.	Conclusão	54
6.	Referências bibliográficas	56
7.	Anexo	63
7.1	Aprovação no Comitê de Ética no Uso dos Animais	63

RESUMO

A introdução de um novo produto farmacêutico no mercado requer prévia realização de estudos pré-clínicos e clínicos, principalmente aqueles relacionados à toxicidade e segurança do novo composto e incluem a investigação de efeitos deletérios. Uma nova tiazolidinodiona (TZD) – lyso-07 - sintetizada pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco foi submetida a testes em ratos wistar para avaliação de toxicidade. O estudo envolveu a utilização de 20 animais distribuídos em quatro grupos: água (1ml/0,25kg animal), suspensão (1ml/0,25kg animal), lyso-07 (4,5 mg/ml) e lyso-07 na dose equimolar da pioglitazona (3,58 mg/ml). Os resultados dos parâmetros ALT, AST, colesterol, creatinina, glicose e ureia nos grupos tratados com a lyso – 07 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle, o que permite inferir que a nova molécula não apresentou hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e disfunções dos níveis de colesterol e glicemia nas condições experimentais empregadas. Já os resultados de CK e CK-MB apresentaram resultados dispersos dentro e fora da normalidade descrita na literatura, dificultando a obtenção de resultados conclusivos quanto a cardiotoxicidade da lyso - 07. Portanto, esta molécula demonstrou-se promissora, mas ainda requer novos estudos para sua introdução futura no mercado.

Palavras-chave: lyso–07, nova TZD, estudos pré-clínicos, parâmetros bioquímicos, toxicidade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Equação bioquímica que possibilita a determinação da ALT por espectrofotometria.

Figura 02: Equação bioquímica que possibilita a determinação da AST por espectrofotometria.

Figura 03: Cascata bioquímica que possibilita a determinação da CK por espectrofotometria.

Figura 04: Cascata bioquímica que possibilita a determinação da CK-MB por espectrofotometria.

Figura 05: Cascata bioquímica que possibilita a determinação do colesterol por espectrofotometria.

Figura 06: Cascata bioquímica que possibilita a determinação da glicose por espectrofotometria.

Figura 07: Crescimento e desenvolvimento dos animais durante os 28 dias de administração.

Figura 08: Crescimento dos animais do grupo água.

Figura 09: Crescimento dos animais do grupo suspensão.

Figura 10: Crescimento dos animais do grupo lyso-07.

Figura 11: Crescimento dos animais do grupo lyso-07 equimolar a pioglitazona.

Figura 12: Média da variação de crescimento inter-grupos.

Figura 13: Curva de calibração ALT.

Figura 14: Curva de calibração AST.

Figura 15: Comparação entre os valores médios de ALT dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

Figura 16: Comparação entre os valores médios de AST dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

Figura 17: Comparação entre os valores médios de CK dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

Figura 18: Comparação entre os valores médios de CK-MB dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

Figura 19: Comparação entre os valores médios de colesterol dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

Figura 20: Comparação entre os valores médios de creatinina dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

Figura 21: Comparação entre os valores médios de glicose dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

Figura 22: Comparação entre os valores médios de uréia dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Valores de referência para ALT *versus* absorbância.

Tabela 02: Valores de referência para AST *versus* absorbância.

Tabela 03: Comparação entre os valores médios de ALT dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

Tabela 04: Comparação entre os valores médios de AST dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

Tabela 05: Comparação entre os valores médios de CK dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

Tabela 06: Comparação entre os valores médios de CK-MB dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

Tabela 07: Comparação entre os valores médios de colesterol dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

Tabela 08: Comparação entre os valores médios de creatinina dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

Tabela 09: Comparação entre os valores médios de glicose dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

Tabela 10: Comparação entre os valores médios de uréia dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS: ácido acetil salicílico

ALT: alanina aminotransferase

ANOVA: análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST: aspartato aminotransferase

ATP: adenosina trifosfato

CK: creatina quinase

CM-MB: creatina quinase – MB

CMC: carboximetilcelulose

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DL50: dose letal 50%

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

G-6-PHD: glicose-6-fosfato desidrogenase

HDL: high density lipoproteins

HK: hexoquinase

IAM: infarto agudo do miocárdio

IL-1 β : interleucina-1 β

IL-6: interleucina-6

LDL: low density lipoproteins

lyso-07: [5-(5-bromo-1H-indol-3-metieleno)-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona]

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reduzido

pH: potencial hidrogeniônico

PPAR γ : receptores “gama” ativados pelo proliferador de peroxissomo

R²: coeficiente de determinação

SIICUSP: Simpósio Internacional de Iniciação Científica

TZD: tiazolidinodiona

TFG: taxa de filtração glomerular

TGO: transaminase oxalacética

TGP: transaminase pirúvica

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

6-GP: 6-fosfogluconato

1. Introdução

1.1 Estudos pré-clínicos

A aplicação de um produto na terapêutica fundamenta-se nos princípios da farmacologia, para conhecer suas propriedades farmacológicas, e nos princípios da toxicologia, buscando revelar os seus danos potenciais e, assim, utilizar estes conhecimentos para a avaliação do risco-benefício (KATZUNG, 2010).

É reconhecido que a grande maioria das substâncias dotadas de atividade farmacológica sobre o organismo possui multiplicidade de efeitos. Esta característica, em algumas situações, apresenta vantagens sob o ponto de vista terapêutico; por outro lado, também pode determinar o aparecimento de efeitos indesejados e nocivos. Por exemplo, os antidepressivos tricíclicos inibem a recaptação de serotonina, de noradrenalina e bloqueiam parcialmente a ação da acetilcolina; assim, agem sobre substâncias endógenas diferentes. As reações adversas mais comuns destes produtos - boca seca, constipação intestinal, retenção urinária, retardamento do orgasmo - são decorrentes do bloqueio parcial da acetilcolina (GOODMAN & GILMAN, 1991).

Os efeitos tóxicos de uma substância estão relacionados à dose e às condições de exposição. A finalidade desses estudos em toxicologia é a prevenção do aparecimento destes efeitos e o estabelecimento do uso seguro das substâncias.

A toxicidade de uma substância é a capacidade dela produzir efeito nocivo sobre os organismos vivos, sob determinadas condições de exposição (KLAASSEN, 2001). Uma substância de alta toxicidade pode causar danos se for administrada em pequenas quantidades, enquanto que uma substância de baixa toxicidade produzirá efeitos tóxicos em altas doses.

A expressão da toxicidade é de considerável complexidade, variando de acordo com a dose administrada, com as condições de exposição - via de introdução e frequência - e outras variáveis intrínsecas ao organismo, tais como espécie, idade, estado nutricional, estado hormonal, massa muscular, temperatura corpórea, entre outras (KLAASSEN, 2001).

A dose letal 50% (DL50) oral aguda é um dos testes realizados para a avaliação de toxicidade, e consiste na determinação da dose necessária para a ocorrência de morte em 50% da população utilizada após exposição à substância, em dose única pela via oral (GOODMAN & GILMAN, 1991). Porém sabe-se que a reprodutibilidade desse teste nem sempre é possível, uma vez que, variáveis como dieta dos animais, suas condições fisiológicas e de manutenção – temperatura, umidade, ventilação e iluminação – assim como o método de administração do xenobiótico podem interferir nos resultados.

O estudo de toxicidade crônica consiste na administração em longo prazo da substância-teste por determinada via em modelos animais. Os efeitos desse tipo de exposição podem ser manifestados de diversas formas; como por exemplo, carcinogênese, úlceras, efeitos sobre o desenvolvimento e/ou reprodução, e em geral estes efeitos não possuem relação com os efeitos de toxicidade aguda. Por exemplo, o ácido acetil salicílico (AAS) pode provocar acidose metabólica em altas doses principalmente em organismos susceptíveis como crianças, enquanto a exposição a longo prazo de pequenas doses determina o aparecimento de úlceras pépticas (GOODMAN & GILMAN, 1991). Assim, é evidente a importância da avaliação da toxicidade nas várias condições de exposição para esclarecimento dos tipos de riscos envolvidos na exposição à determinada substância ou na utilização de compostos na terapêutica. No entanto, a determinação da dose relacionada à

letalidade (DL50), seja em curto ou longo prazo, expressa condições extremas de exposição, e na maioria dos casos não permite elucidar possíveis efeitos adversos que ocorrem na exposição à dose proposta para o efeito terapêutico.

Os estudos de toxicidade realizados em modelos animais podem auxiliar na avaliação dos principais órgãos alvo da ação tóxica de um produto, com resultados podendo variar de acordo com o modelo animal escolhido, a via de introdução, frequência de exposição e doses administradas. Assim, as investigações pré-clínicas devem ser realizadas em pelo menos duas espécies de mamíferos – uma roedora e uma não-roedora - tendo em vista as diferenças de sensibilidade e perfil metabólico inter-espécies. Deste modo, procura-se evidenciar as semelhanças e diferenças entre os modelos animais no intuito de prever características de toxicidade do composto em humanos (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1997). Ratos wistar e camundongos swiss estão entre as espécies roedoras de maior acesso e viabilização de uso, assim como os coelhos albinos, entre os mamíferos não roedores.

Nos estudos pré-clínicos, a avaliação de segurança inclui caracterizar os efeitos tóxicos com relação aos órgãos-alvo, estabelecer as relações entre dose e efeitos e identificar as consequências danosas da exposição do organismo à nova molécula (ICH, 2001). Essas informações auxiliam, na fase de desenvolvimento do produto, o pesquisador a ter a expectativa de potenciais efeitos adversos; ainda, os estudos com modelos animais permitem a projeção de doses no planejamento dos ensaios clínicos através da extrapolação alométrica.

1.2 Lyso- 07 e as tiazolidinodionas (TZDs)

Uma classe de fármacos que já passou por esses ensaios clínicos são as tiazolidinodionas (TZDs), também conhecidas por glitazonas. São fármacos utilizados no tratamento de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), agindo principalmente na redução da resistência periférica à insulina (HAUNER, 2002; MARTENS et al., 2002).

As TZDs são agonistas potentes e seletivos para os receptores “gama” ativados pelo proliferador de peroxissomo (PPAR γ), que regulam a expressão de genes que afetam o metabolismo glicídico e lipídico, responsáveis pela captação de glicose mediada por insulina nos tecidos periféricos e pela diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, entre outros efeitos (ARAÚJO et al., 2000). Dentre os efeitos variados que as TZDs podem assumir destaca-se o efeito anti-inflamatório, diminuição da pressão arterial, diminuição do colesterol e triglicérides, além de outros efeitos relacionados aos riscos cardiovasculares decorrentes da DM2 (MARTENS et al., 2002).

No entanto, a primeira geração desta classe de fármacos, representada pela troglitazona, apresentava alta toxicidade hepática, e foi retirada do mercado americano em março de 2000, pouco tempo depois de seu lançamento, em 1997 (FDA, 2000). Já as TZDs de segunda geração, rosiglitazona e pioglitazona, possuem efeitos tóxicos relativamente menos significantes, e foram mantidas no mercado. No entanto, em 29 de setembro de 2010, a gerência de farmacovigilância da Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA) informou, através da Resolução nº 4.466 de 28/09/2010, o cancelamento do registro do medicamento Avandia® - nome comercial sobre o qual a rosiglitazona era comercializada – por apresentar riscos cardiovasculares. A pioglitazona, ainda sob a vigilância das agências reguladoras

permanece no mercado, onde ainda observa-se o risco-benefício de sua utilização na terapêutica (ANVISA, 2010).

Tendo em vista explorar o amplo potencial farmacológico das TZDs, a lyso-7 - [5-(5-bromo-1H-indol-3-metieleno)-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona] - foi sintetizada pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco e se destacou por sua atividade anti-inflamatória. Observou-se que a lyso-07 atua diminuindo a expressão de fatores de adesão em células polimorfonucleares, promovendo assim, a diminuição de marcadores inflamatórios (IL-6, TNF- α e IL-1 β) (SOARES et al., 2008). Müller *et al.* (2011), identificou efeitos gastroprotetores desse fármaco frente a indução de ulceração em camundongos swiss. Ainda, Abdalla (2011) assinalou uma característica promissora da lyso-07 em relação à atividade anti-aterosclerose.

Novas moléculas da classe das TZDs podem contribuir tanto para a terapêutica da DM2 quanto para outras patologias, porém é necessária a avaliação dos potenciais efeitos tóxicos destas novas moléculas, prevenindo a retirada posterior do mercado em decorrência de sua toxicidade e risco ao paciente. Para isso, é de extrema importância a determinação de potenciais efeitos tóxicos da lyso-07 para continuidade do estudo clínico e, posteriormente, a sua introdução no mercado.

1.3 Solubilidade da lyso-07

Testes preliminares realizados por acadêmicos do Grupo de Pesquisa em Farmacocinética e Toxicologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, campus

Araraquara, demonstraram insolubilidade do fármaco em água, sendo necessário determinar um veículo apropriado para sua administração em modelos animais.

Por se tratar de um fármaco ainda em estudos pré-clínicos e de pouca literatura e publicações a seu respeito, os testes do presente estudo seguiram a suspensão descrita por Santin *et al.* (2013) para possibilitar comparações. Santin *et al.* (2013) veiculou a lyso-07 em suspensão contendo água ultrapurificada, carboximetilcelulose (CMC), álcool etílico e tween 20.

Frente a possibilidade de introduzir novos produtos farmacêuticos na terapêutica, o presente estudo submeteu ratos wistar à exposição de doses múltiplas - na dose proposta para efeito terapêutico e na dose equimolar a pioglitazona (fármaco referência no mercado) - à lyso-07 avaliando, assim, a toxicidade hepática, renal, cardíaca e possíveis disfunções dos níveis de colesterol e glicemia dessa nova TZD.

2. Objetivos

- Avaliação dos parâmetros bioquímicos basais de ALT, AST, CK, CK-MB, colesterol, creatinina, glicose e ureia de ratos wistar que receberam uma dose diária de 1 ml/0,25kg animal de água por gavagem, durante 28 dias ininterruptos (grupo água, n=5);
- Avaliação dos parâmetros bioquímicos basais de ALT, AST, CK, CK-MB, colesterol, creatinina, glicose e ureia de ratos wistar que receberam uma dose diária de 1ml/0,25kg animal da suspensão por gavagem, durante 28 dias ininterruptos (grupo suspensão, n=5);
- Avaliação dos parâmetros bioquímicos basais de ALT, AST, CK, CK-MB, colesterol, creatinina, glicose e ureia de ratos wistar que receberam uma dose diária de 4,5 mg/kg da lyso-07 por gavagem, durante 28 dias ininterruptos (grupo lyso – 07, n=5);
- Avaliação dos parâmetros bioquímicos basais de ALT, AST, CK, CK-MB, colesterol, creatinina, glicose e ureia de ratos wistar que receberam uma dose diária de 3,58 mg/kg da lyso-07 por gavagem, durante 28 dias ininterruptos (grupo lyso – 07 equimolar, n=5);
- Análise dos resultados obtidos e comparação estatística entre os grupos previamente citados.

3. Metodologia

3.1 Modelo animal

Foram utilizados como modelo animal 20 ratos wistar machos, provenientes do Biotério Central da UNESP Botucatu. Os animais foram transferidos para o biotério do departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP campus Araraquara, os quais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e ciclo de luz automatizado de 12h – sendo as luzes diariamente acesas as 07h e apagadas às 19h. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas em grupos de cinco, com ração balanceada e água *ad libitum*. Em nenhum momento do protocolo experimental os animais foram privados de alimento ou água.

Os locais de alojamento e experimentação estavam isolados de ruídos fortes, a alimentação, ingestão de bebidas e/ou fumo eram proibidos e de acesso restrito aos pesquisadores para evitar, assim, transtornos no comportamento e fisiologia dos animais.

3.2 Preparo da suspensão

Frente à insolubilidade da lyso – 07 em água e visando comparações com dados literários, veiculou-se o fármaco em suspensão composta por 1ml de água ultrapurificada, 2mg de CMC (agente suspensor), 20 μl de álcool etílico (agente molhante) e 2 gotas de tween 20 (tensoativo e agente suspensor). Essa quantidade era equivalente à administração em 250g de peso do animal.

A quantidade de álcool utilizada no estudo foi minimizada para não provocar danos hepáticos em uma administração crônica e determinar resultados falso-positivos no que se refere à hepatotoxicidade.

Está suspensão foi compatível à via oral (gavagem) do modelo animal escolhido. Ela era preparada momentos antes de cada administração a fim de evitar a precipitação do fármaco e, conseqüentemente, alteração da dose a ser administrada.

3.3 Protocolo experimental

O estudo envolveu a utilização de 20 animais distribuídos em quatro grupos, a saber: água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 na dose equimolar da pioglitazona detalhados a seguir. Os dois primeiros grupos são considerados controles por não conterem o fármaco em estudo.

A amostragem foi feita, respectivamente, nos dias 0, 7, 14 e 28 após o início do experimento. Considera-se dia 0, o dia em que a amostra de sangue foi coletada anterior à primeira administração e dia 28 o dia pós-exposição do fármaco. Eram feitas pequenas excisões na parte distal da cauda – cerca de dois centímetros - e as amostras de sangue foram colhidas e armazenadas em frascos *ependorf* de 2,0 ml previamente heparinizados (20µl) e identificados de acordo com o animal, o grupo que pertencia e o dia de exposição.

As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos. O plasma (sobrenadante) foi retirado e armazenado em outro frasco *ependorf* de 2,0 ml previamente identificados. Estes foram mantidos em um congelador - temperatura de -20 °C - até os dias das análises bioquímicas. A ação de congelar as amostras foi tomada para minimizar a perda dos analitos de interesse.

A dose de fármaco para a condução deste projeto foi calculada por extrapolação alométrica a partir da dose média utilizada em estudos de atividade do composto em camundongos. No estudo desenvolvido por Santin *et al.* (2013), foram

utilizadas as doses de 5, 25 e 50 mg/kg de lyso-07 em camundongos swiss. A dose de 25 mg/kg em camundongos swiss equivale a uma dose de 18 mg/kg em ratos wistar.

Para o cálculo da dose no grupo lyso-07 (MM = 447,73 g/mol) equimolar a pioglitazona considerou-se as relações de massa molecular com a pioglitazona (MM = 356,44 g/mol) para a liberação da mesma quantidade do fármaco referência do mercado na administração do fármaco em estudo. A dose utilizada foi de 14,33 mg/kg.

O período de administração foi baseado no trabalho do Sengupta *et al.* (2012), que avaliou o perfil farmacodinâmico e toxicológico da pioglitazona e determinou diversos parâmetros bioquímicos frente a exposição crônica.

Este protocolo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - protocolo n.15/2012 (Anexo I).

3.3.1 Grupo água

Os animais deste grupo (n=5) receberam dose diária de 1ml/0,25kg animal de água pela via oral (gavagem) por um período de 28 dias ininterruptos. O objetivo da inclusão desse grupo foi à verificação de possíveis alterações dos parâmetros bioquímicos em animais submetidos ao estresse da administração diária e da constante manipulação.

3.3.2 Grupo suspensão

Os animais deste grupo (n=5) receberam dose diária de 1ml/0,25kg animal de suspensão pela via oral (gavagem) por um período de 28 dias ininterruptos. O objetivo da inclusão desse grupo foi à verificação de possíveis alterações dos

parâmetros bioquímicos em animais submetidos ao estresse da administração diária desse veículo e da constante manipulação.

3.3.3 Grupo lyso - 07

Os animais deste grupo (n=5) receberam a lyso – 07 em uma dose diária de 4,5 mg/ml pela via oral (gavagem) por um período de 28 dias ininterruptos. O objetivo da inclusão desse grupo foi à verificação do comportamento do fármaco no modelo animal escolhido através de possíveis alterações dos parâmetros bioquímicos.

3.3.4 Grupo lyso - 07 na dose equimolar da pioglitazona

Os animais deste grupo (n=5) receberam a lyso – 07 em uma dose diária de 3,58 mg/ml pela via oral (gavagem) por um período de 28 dias ininterruptos. O objetivo da inclusão desse grupo foi à verificação do comportamento do fármaco na dose equimolar a pioglitazona no modelo animal escolhido através de possíveis alterações dos parâmetros bioquímicos.

.

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Parâmetros bioquímicos

Os biomarcadores são indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de intervenção farmacológica que fornecem informação de acordo a exposição da doença, a extensão e gravidade da lesão e o prognóstico (AMORIM, 2003). A determinação da atividade enzimática mensura a toxicidade da substância, por isso, submeteram-se ratos wistar à exposição crônica - na dose proposta para efeito terapêutico e na dose equimolar a pioglitazona - à lyso-07 para avaliar a toxicidade cardíaca, hepática, renal e possíveis disfunções dos níveis de

colesterol e glicemia da nova TZD. Foram realizadas análises com os protocolos do kit Labtest®.

3.4.1.1 Alanina aminotransferase (ALT)

A ALT ou transaminase pirúvica (TGP) é um importante biomarcador hepático encontrado nos hepatócitos e responsável pela transferência de grupamentos amina de α -aminoácido para α -cetoácidos. O piruvato formado é medido através da formação de hidrazona - substância que tem intensa coloração em meio alcalino – por espectrofotometria ultra violeta-visível (UV-VS).

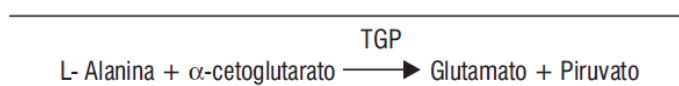


Figura 01: Equação bioquímica que possibilita a determinação da ALT por espectrofotometria.

Fonte: kit Labteste

3.4.1.2 Aspartato aminotransferase (AST)

A AST ou transaminase oxalacética (TGO) é outro importante biomarcador hepático encontrado nos hepatócitos e responsável pela transferência de grupamentos amina de α -aminoácido para α -cetoácidos, atuando de maneira semelhante a ALT. O produto oxalacetato formado também é medido através da formação de hidrazona.

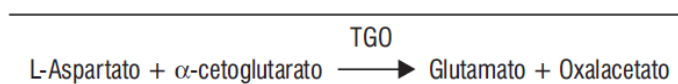


Figura 02: Equação bioquímica que possibilita a determinação da AST por espectrofotometria.

Fonte: kit Labteste

3.4.1.3 Creatina quinase (CK)

O princípio da atividade da CK baseia-se em uma cascata de reações bioquímicas. Primeiramente, a CK catalisa a desfosforilação da creatina fosfato para

produzir adenosina trifosfato (ATP), a qual reage com a glicose na presença da hexoquinase (HK) formando glicose-6-fosfato. Este último produto, na presença da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH), é oxidado a 6-fosfogluconato (6-PG) e reduz o NADP a NADPH. A velocidade de incremento na absorbância em 340nm é proporcional à atividade de CK na amostra em estudo.

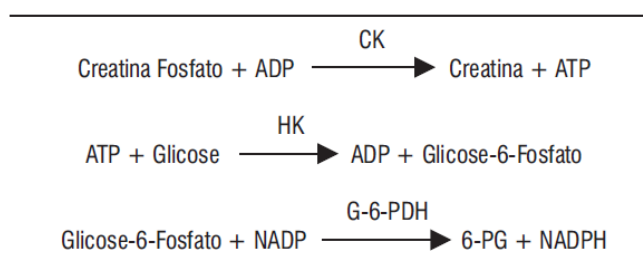


Figura 03: Cascata bioquímica que possibilita a determinação da CK por espectrofotometria.

Fonte: kit Labteste

3.4.1.4 Creatina quinase – MB (CK-MB)

O princípio da atividade da CK-MB baseia-se na mesma cascata de reações bioquímicas da CK, sendo a velocidade de incremento na absorbância em 340nm também proporcional a atividade de CK-MB na amostra em estudo.

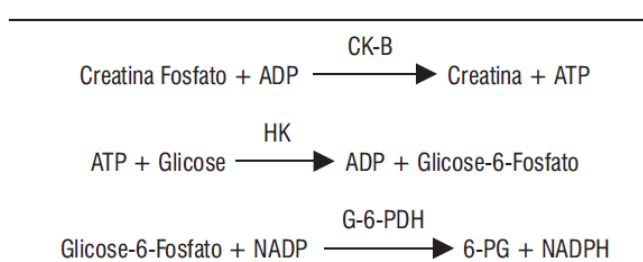


Figura 04: Cascata bioquímica que possibilita a determinação da CK-MB por espectrofotometria.

Fonte: kit Labteste

A atividade desta isoenzima foi medida através da incubação da amostra com um reagente que possui anticorpo capaz de inibir totalmente a atividade

enzimática do monômero CK-M. Tal anticorpo não inibe a atividade do monômero CK-B, de modo que pode-se quantificá-la.

3.4.1.5 Colesterol

O colesterol total é determinado por duas reações bioquímicas consecutivas, onde os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absorvidade máxima em 500nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra em estudo.

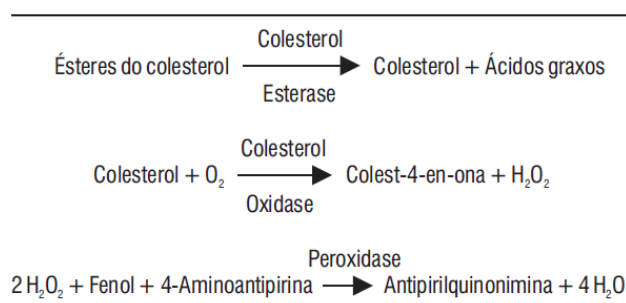


Figura 05: Cascata bioquímica que possibilita a determinação do colesterol por espectrofotometria.

Fonte: kit Labteste

3.4.1.6 Creatinina

O princípio da creatinina é a reação com a solução de picrato em meio alcalino formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente. A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor derivada dos cromogênios que também é medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o

valor da creatinina - resultado reportado da estimativa da filtração glomerular baseados na medição da creatinina sérica.

3.4.1.7 Glicose

O princípio da glicose é uma sequência de reações bioquímicas onde a glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose com formação de ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Este último produto, reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, resultando em um composto vermelho (antipirilquinonimina) cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra em estudo.

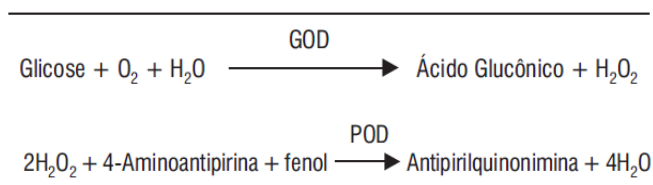


Figura 06: Cascata bioquímica que possibilita a determinação da glicose por espectrofotometria.

Fonte: kit Labteste

3.4.1.8 Ureia

A ureia é hidrolisada pela uréase à íons amônio e gás carbônico. Os íons amônio reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de ureia na amostra em estudo.

3.4.2 Espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A leitura dos parâmetros bioquímicos foi realizada no espectrofotômetro Power Wave HT BioTek® do departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP campus Araraquara. Para a transcrição e interpretação dos resultados utilizou-se o programa Gen 5 2,00.

3.5 Análise estatística

O teste de ANOVA foi empregado para avaliar as diferenças estatística intragrupos e intergrupos com pós teste de Tukey na distribuição normal dos resultados ou Mann-Whitney quando não houve distribuição normal. Os resultados obtidos foram apresentados através de médias - com intervalo de confiança 95% - e nível de significância de 0,05.

Foram empregados os programas GraphPad InStat®, Microsoft Office Excel e software OriginPro® para a realização dos cálculos.

4. Resultados e Discussões

Os resultados do estudo foram expressos em valores relativos à variação intra-animal de cada parâmetro, ou seja, o quanto a enzima variou em cada animal do começo até o fim do experimento. Esta forma de demonstrar os resultados torna-se mais fiel ao impacto do fármaco sobre o animal e os resultados tendem a variar menos devido às peculiaridades inter-animal.

4.1 Peso dos animais expostos

Durante a execução do estudo foi medido diariamente o peso dos animais anteriormente as administrações para acompanhar o seu crescimento, desenvolvimento e ganho de peso avaliando possíveis efeitos adversos da lyso-07.

Verificou-se um padrão de crescimento independente do grupo - respeitando a individualidade e características intrínsecas a cada animal - mesmo os ratos wistar não iniciando o estudo com pesos idênticos.

Esse crescimento dos grupos com fármaco equivalente ao grupo água confirma uma característica favorável da lyso-07 quando comparada com a administração crônica da pioglitazona em camundongos swiss, visto que este último fármaco induz a perda de peso neste modelo animal (SANTIN *et al.*, 2013).

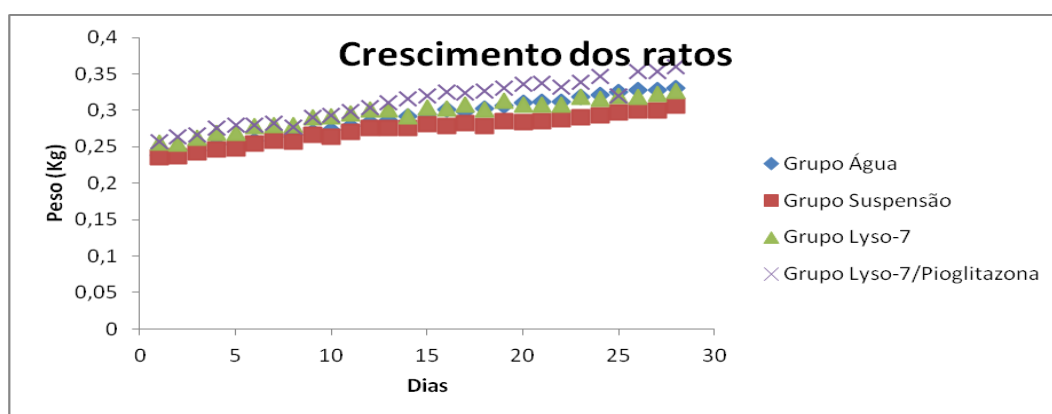


Figura 07: Crescimento e desenvolvimento dos animais durante os 28 dias de administração.

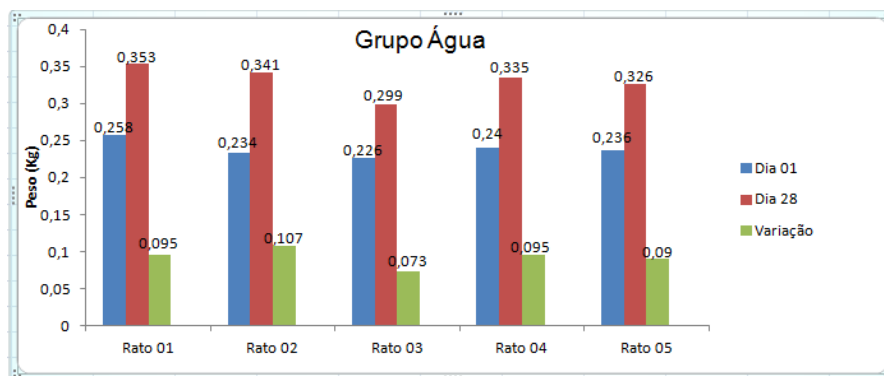


Figura 08: Crescimento dos animais do grupo água.

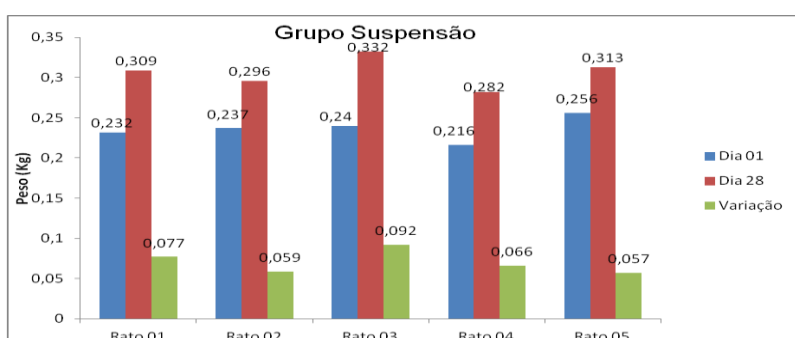


Figura 09: Crescimento dos animais do grupo suspensão.

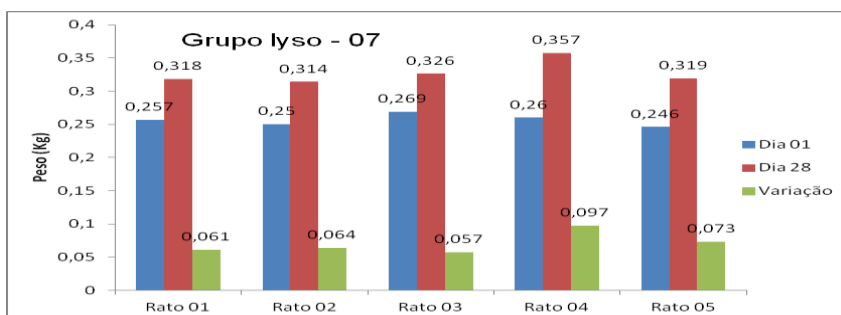


Figura 10: Crescimento dos animais do grupo lyso-07.

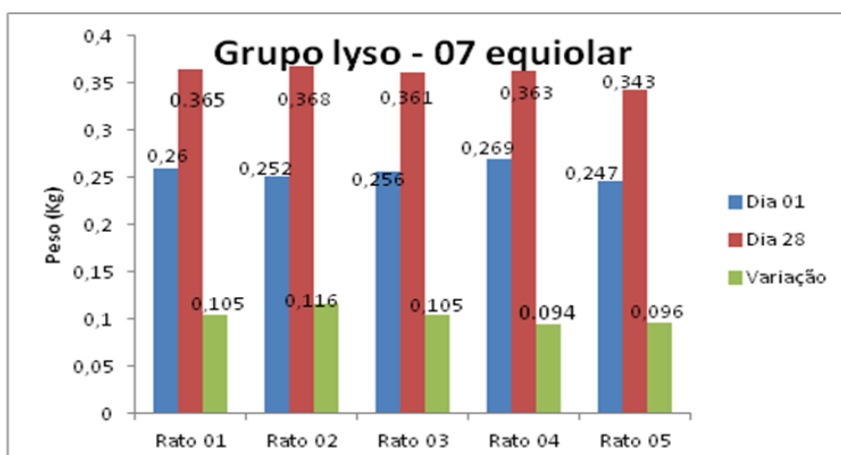


Figura 11: Crescimento dos animais do grupo lyso-07 equiolar a pioglitazona.

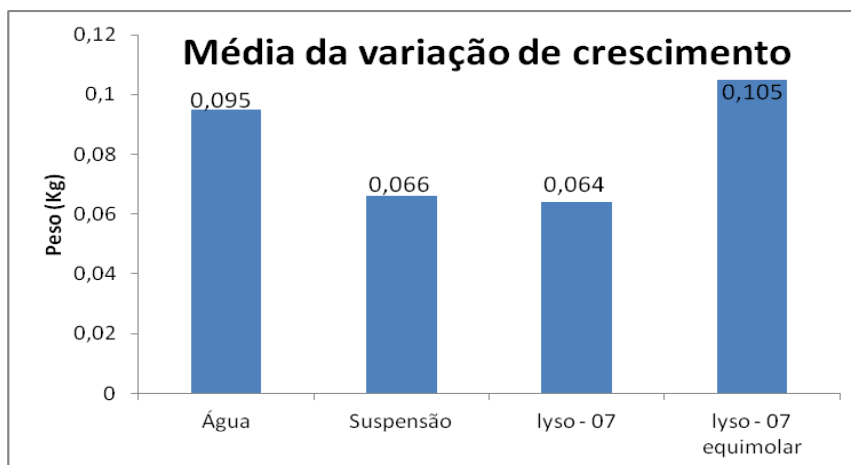


Figura 12: Média da variação de crescimento inter-grupos.

4.2 Hemoglobina

Logo após terem sido coletadas, as amostras de sangue eram centrifugadas e o plasma armazenado em frascos *ependorf* de 2,0 ml previamente identificados. Estes foram mantidos em um congelador - temperatura de -20 °C - até os dias das análises bioquímicas. Não se verificou nenhum resultado de hemólise que pudesse comprometer as análises dos parâmetros bioquímicos estudados.

4.3 ALT e AST

As transaminases são enzimas produzidas principalmente no tecido hepático e que permanecem nesse local em grande quantidade com a função de catalisar as reações de transferência de um grupo amino para um alfa-cetoácido (BURTIS & ASHWOOD, 2005). Estas enzimas são liberadas na circulação sanguínea na destruição do hepatócito e, assim, podem ser utilizadas como parâmetros indiretos para a determinação de danos hepáticos.

A AST está presente em grandes quantidades também no tecido muscular e cardíaco, por isso, ela não deve ser específica para diagnosticar hepatotoxicidade sendo necessário em paralelo mensurar a quantidade de ALT. Caso ocorra aumento

conjunto de ALT e AST, a origem do dano deve ser hepático; caso o dano seja de origem muscular o biomarcador CK pode auxiliar nessa interpretação (BURTIS & ASHWOOD, 2005).

O equilíbrio entre AST e ALT é importante para a homeostasia do organismo, sendo que, em condições fisiológicas, a AST plasmática é maior que a ALT. No caso de disfunções hepáticas, as condições fisiológicas são invertidas.

4.3.1 Curva de calibração

Para a correta interpretação das absorbâncias lidas no espectrofotômetro foi necessária à confecção de curvas de calibração seguindo o protocolo do kit Labtest® e executadas para cada kit enzimático específico.

As figuras 13 e 14 servem de referência especificamente para o kit e aparelho utilizado e estimam os valores de unidade de atividade enzimática por litro de sangue (U/L). Estes foram construídos a partir de um padrão de concentração conhecida acrescentando piruvato de sódio 2 mmol, tanto para ALT quanto para AST, cujos valores de referência são previamente estabelecidos.

Para este experimento foram obtidos os valores das absorbâncias que deram origem às curvas encontradas (tabelas 01 e 02):

Tabela 01: Valores de referência para ALT <i>versus</i> absorbância.	
Valores Referência (U/L)	Absorbância
0	0,203
28	0,331
57	0,439
97	0,525
150	0,608

Tabela 02: Valores de referência para AST *versus* absorbância.

Valor Referência (U/L)	Absorbância
0	0,273
24	0,379
61	0,469
114	0,569
190	0,625

Com as medidas de absorbância estabelecidas e tomando os valores de referência correspondentes, construiu-se a curva de calibração para a enzima ALT e AST utilizando o software OriginPro®:

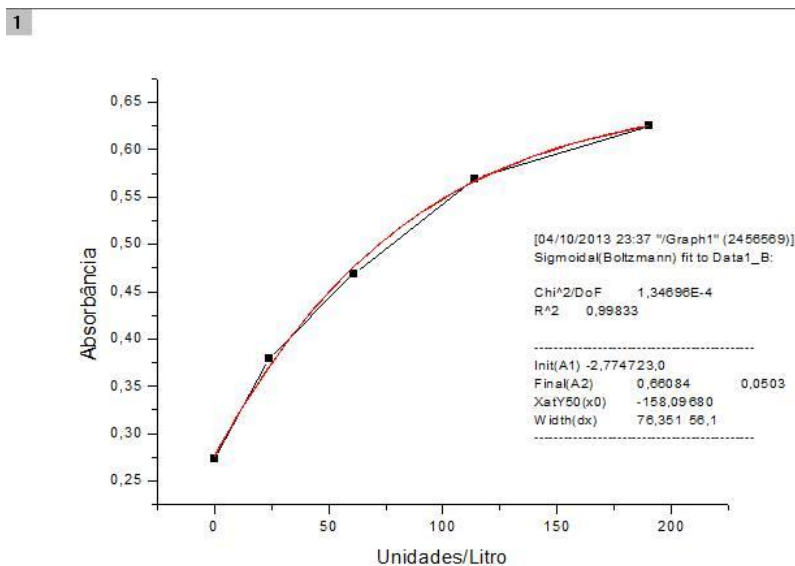


Figura 13: Curva de calibração ALT.

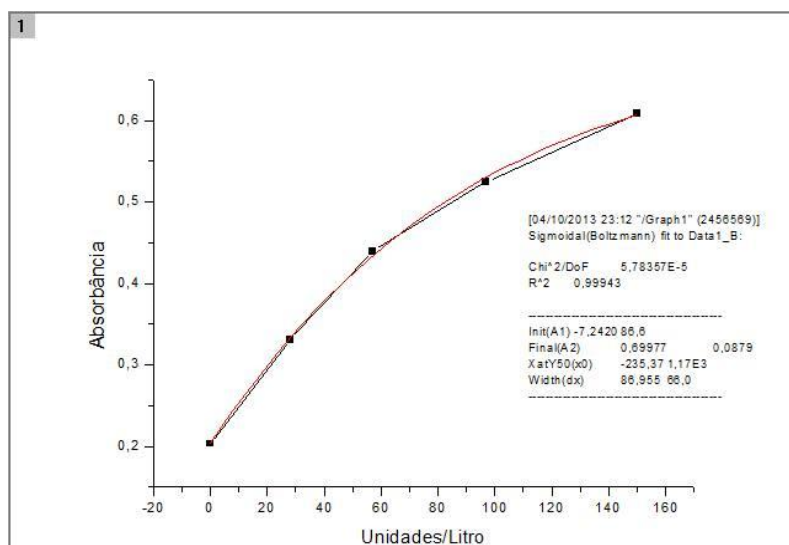


Figura 14: Curva de calibração AST.

Ambas curvas apresentaram altos coeficientes de determinação (R^2) - 0,99833 para a curva da ALT e 0,99943 para a curva da AST. Por isso, pode-se utilizá-las seguramente para a obtenção de resultados confiáveis para ambas as enzimas.

4.3.2 ALT dos animais expostos

Com a obtenção da respectiva curva de calibração, foi possível determinar os valores de atividade, em U/L, da enzima ALT correspondente aos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 na dose equimolar a pioglitazona. Os resultados estão demonstrados na figura 15.

Os resultados referentes à pré-exposição (dia 0) não apontaram grandes diferenças significativas entre os grupos, em média, nos níveis de ALT, assim, conclui-se que todos os animais do estudo são considerados normais - semelhantes nos níveis enzimáticos antes da exposição da suspensão (grupo controle) e lyso-07 em ambas as doses.

Tabela 03: Comparação entre os valores médios de ALT dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

	ALT (TGP) (U/L)			
	Água	Suspensão	lyso-07	lyso-07 equimolar
Dia 0	40,79 ($\pm$ 5,70)	16,54 ($\pm$ 2,92)	14,35 ($\pm$ 7,93)	30,36 ($\pm$ 9,98)
Dia 7	34,56 ($\pm$ 5,70)	21,20 ($\pm$ 6,56)	16,42 ($\pm$ 6,26)	46,14 ($\pm$ 6,56)
Dia 14	16,11 ($\pm$ 1,32)	47,72 ($\pm$ 7,08)	43,23 ($\pm$ 10,47)	15,79 ($\pm$ 4,57)
Dia 28	13,01 ($\pm$ 3,94)	47,30 ($\pm$ 6,42)	48,26 ($\pm$ 6,61)	17,76 ($\pm$ 5,61)

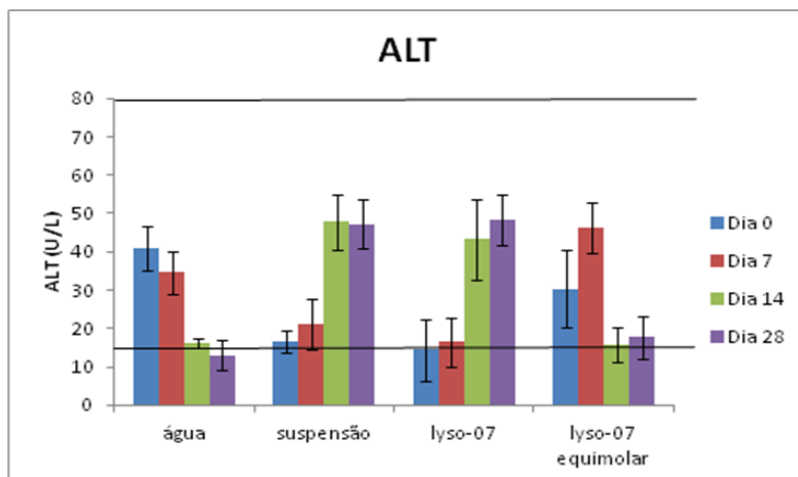


Figura 15: Comparação entre os valores médios de ALT dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

A ALT é uma transaminase encontrada principalmente no fígado, nos rins e em menor quantidade em outros tecidos variando de espécie para espécie. Em uma investigação de hepatotoxicidade, há interesse na presença dessa enzima no citoplasma dos hepatócitos e não nas mitocôndrias (em menor concentração). Quando há danos aos hepatócitos, inicialmente liberam-se as enzimas citoplasmáticas destas células; e com a persistência do dano ou em caso de hepatotoxicidade aguda são liberadas também as enzimas mitocondriais em menor velocidade (KANEKO *et al.*, 2008).

Níveis elevados de ALT no homem ocorrem na hepatite (viral e tóxica), mononucleose, cirrose, colestase, carcinoma hepático primário ou metastático, pancreatite, traumatismo extenso, choque prolongado, polimiosite, dermatomiosite e rabdomiólise (MINCIS *et al.*, 2006; LOPES, 1998; RAVEL, 1997).

A normalidade de ALT em ratos wistar ocorre na faixa de transição entre 15 e 80 U/L (DANTAS *et al.*, 2006; DINIZ *et al.*, 2006; LATIMER *et al.*, 2003; HARKNESS & WAGNER, 1993; CCAC, 1993). Comparando os dados da literatura e os obtidos no estudo, percebe-se que a lyso-07 em nenhuma dose diminui ou aumenta os níveis de ALT significativamente.

4.3.3 AST dos animais expostos

Com a obtenção da respectiva curva de calibração, foi possível determinar os valores de atividade, em U/L, da enzima AST correspondente aos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 na dose equimolar a pioglitazona. Os resultados estão demonstrados na figura 16.

Os resultados referentes à pré-exposição (dia 0) não apontaram diferenças significativas entre os grupos, em média, nos níveis de AST, assim, conclui-se que todos os animais do estudo são considerados normais - semelhantes nos níveis enzimáticos antes da exposição da suspensão (grupo controle) e lyso-07 em ambas as doses.

Tabela 04: Comparação entre os valores médios de AST dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

	AST (TGO) (U/L)			
	Água	Suspensão	lyso-07	lyso-07 equimolar
Dia 0	68,82 ($\pm$ 11,56)	74,92 ($\pm$ 6,11)	84,16 ($\pm$ 2,22)	66,77 ($\pm$ 26,57)
Dia 7	71,69 ($\pm$ 8,89)	100,87 ($\pm$ 26,4)	92,45 ($\pm$ 3,99)	58,06 ($\pm$ 17,85)
Dia 14	61,74 ($\pm$ 7,15)	53,32 ($\pm$ 13,77)	59,15 ($\pm$ 3,55)	62,27 ($\pm$ 9,39)
Dia 28	71,54 ($\pm$ 5,68)	72,26 ($\pm$ 11,67)	57,59 ($\pm$ 6,27)	72,46 ($\pm$ 5,98)

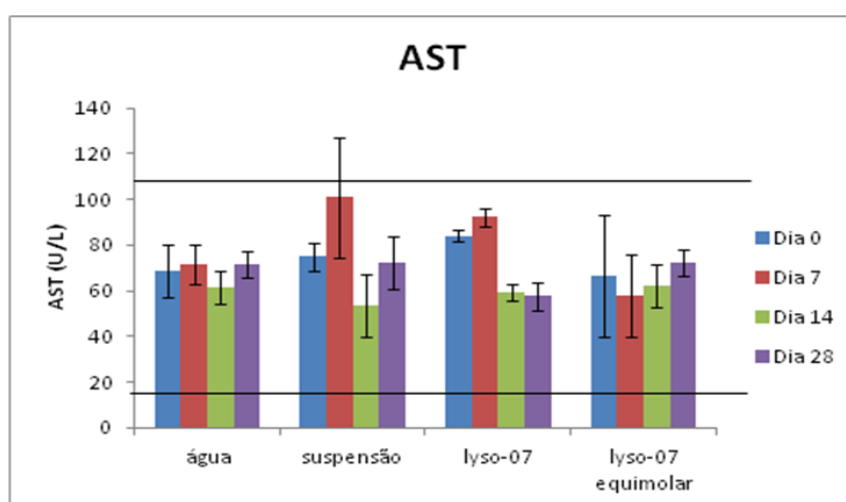


Figura 16: Comparação entre os valores médios de AST dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

A AST pode ser usada para a avaliação de várias funções no organismo e não apenas a hepática, devido a sua alta concentração em outros órgãos além do fígado. Observar grandes aumentos nas concentrações dessa transaminase não necessariamente significam hepatotoxicidade, uma vez que, ela encontra-se também em grandes quantidades no tecido muscular e cardíaco. Por isso, quando ocorre morte celular nestes tecidos também se observa um aumento enzimático no plasma sanguíneo.

Esse fato dificulta a determinação da origem de um possível resultado elevado, assim, devem-se utilizar outros marcadores bioquímicos para consolidar o diagnóstico. Caso a alteração tenha origem hepática quantifica-se também a ALT, já em caso de origem muscular o biomarcador de escolha é a CK (BURTIS & ASHWOOD, 2005).

Níveis elevados de AST no homem ocorrem na hepatite (viral e tóxica), mononucleose, cirrose, colestase, carcinoma hepático primário ou metastático, pancreatite, traumatismo extenso, choque prolongado e infarto agudo do miocárdio (IAM). Também verifica-se níveis elevados dessa transaminase quando se faz uso de algumas drogas, como por exemplo, isoniazida, fenotiazidas, eritromicina, progesterona, esteroides, opiáceos, indometacina, halotano e metildopa (MINCIS *et al.*, 2006; LOPES, 1998).

A normalidade de AST em ratos wistar ocorre na faixa de transição entre 15 e 113 U/L (DANTAS *et al.*, 2006; DINIZ *et al.*, 2006; LATIMER *et al.*, 2003; HARKNESS & WAGNER, 1993; CCAC, 1993). Comparando os dados da literatura e os obtidos no estudo, percebe-se que a lyso-07 em nenhuma dose diminui ou aumenta os níveis de AST significativamente.

4.4 CK e CK-MB

A CK é um dímero composto de subunidades B e M e ocorre em três formas de isoenzimas - MM (CK3), MB (CK2) e BB (CK1) - imunologicamente distintas e sintetizadas por genes diferentes. Ela é encontrada em concentrações elevadas no músculo esquelético, cardíaco, cérebro e trato gastrointestinal.

Os estudos de distribuição tissular indicam que o músculo esquelético é praticamente composto da isoenzima MM com quantidades mínimas de MB. O cérebro e o trato gastrointestinal contêm primariamente a isoenzima BB, enquanto o músculo cardíaco consiste aproximadamente de 80% da isoenzima MM e 20% da MB.

Os avanços na quantificação da isoforma MB permitiram a obtenção de resultados mais específicos para músculo cardíaco, assim, mensurar CK-MB é a ferramenta mais indicada para diagnóstico de IAM. (ALDOUS, 2012)

A concentração sérica da CK é dependente da idade, sexo, etnia, massa muscular e atividade física. Em geral, os homens têm níveis mais elevados que as mulheres e, negros têm níveis maiores que os brancos.

A massa muscular constitui outro fator independente que influencia os níveis de CK. Durante a vida adulta, os níveis de CK aumentam discretamente com a idade para declinar na velhice. Elevações transitórias da CK são observadas após trauma muscular, injeções intramusculares, procedimentos cirúrgicos, e exercício físico.

4.4.1 CK dos animais expostos

A CK é encontrada em concentrações elevadas no músculo esquelético, cardíaco, cérebro e trato gastrointestinal nos casos de IAM, necrose do músculo cardíaco produzido por uma miocardite grave e atrofia musculares.

O aumento dessa enzima é consequente à necrose ou atrofia do músculo estriado devido a cirurgias torácica ou cardíaca, cardioversão, distrofia muscular progressiva, esclerose lateral amiotrófica, poliomiosite, distrofia miotônica, traumas e queimaduras, rabdomiólise extensa, hipertermia maligna, hipotermia, status epilético, miopatia endócrina (hipotireoidismo, acromegalia, miopatia do hipoparatiroidismo) e/ou uso de cocaína (LOPES, 1998).

Sua especificidade no diagnóstico de infartos é relativamente maior que a verificada para os biomarcadores AST ou LDH (high density lipoproteins), uma vez que, seus baixos níveis no fígado tornam os resultados menos fidedignos em pacientes com disfunções hepáticas (ALDOUS, 2012).

Na intenção de caracterizar uma possível cardiotoxicidade, determinou-se os valores de atividade, em U/L, da enzima CK correspondente aos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 na dose equimolar a pioglitazona. Os resultados estão demonstrados na figura 17.

Tabela 05: Comparação entre os valores médios de CK dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

	CK (U/L)			
	Água	Suspensão	lyso-07	lyso-07 equimolar
Dia 0	181,30 ($\pm$ 18,13)	323,40 ($\pm$ 42,82)	180,60 ($\pm$ 61,61)	229,65 ($\pm$ 243,37)
Dia 7	169,21 ($\pm$ 27,38)	623,33 ($\pm$ 167,37)	455,00 ($\pm$ 29,17)	141,59 ($\pm$ 42,34)
Dia 14	292,05 ($\pm$ 33,93)	359,15 ($\pm$ 194,67)	439,41 ($\pm$ 43,56)	170,94 ($\pm$ 28,82)
Dia 28	198,27 ($\pm$ 29,61)	193,39 ($\pm$ 48,63)	157,13 ($\pm$ 23,44)	146,77 ($\pm$ 59,34)

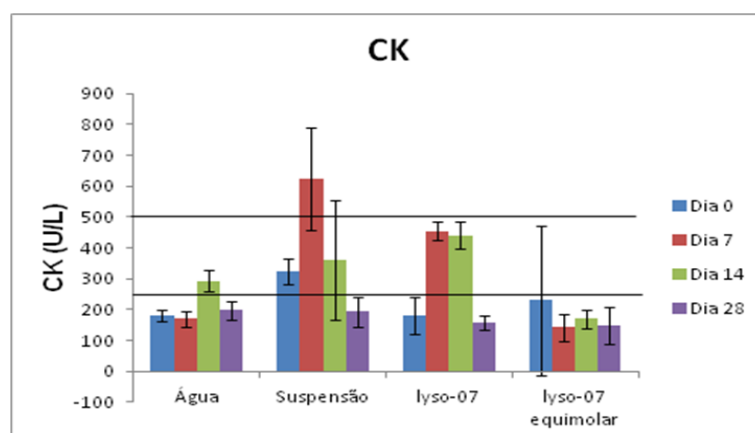


Figura 17: Comparação entre os valores médios de CK dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

A normalidade de CK em ratos wistar ocorre na faixa de transição entre 250 e 500 U/L (DE ARAUJO *et al.*, 2010; EDET *et al.*, 2009). Comparando os dados da literatura e os obtidos no estudo, não se pode descartar que a lyso-07 em ambas as doses, ou até mesmo, a suspensão empregada causa dano cardíaco - os níveis de CK apresenta grande variabilidade.

Observa-se que o intervalo de confiança e as concentrações enzimáticas não mantêm um padrão – resultados variados e distintos entre os animais. Esta grande variação inter-animal dificulta a obtenção de resultados conclusivos e afirmativos no que se refere à cardiotoxicidade da lyso-07 e/ou suspensão veiculada.

4.4.2 CK-MB dos animais expostos

A CK-MB é um importante biomarcador cardíaco. Os avanços na quantificação da isoforma MB permitiram a obtenção de resultados mais específicos para músculo cardíaco, principalmente pelo fato dessa musculatura possuir níveis mais elevados de CK-MB (25- 30%) quando comparada à esquelética (1%). Por isso, a quantificação da CK-MB é a ferramenta mais específica para diagnóstico de IAM. (ALDOUS, 2012)

Além do IAM, nos humanos o nível de CK-MB apresenta-se elevado na contusão cardíaca, procedimentos cirúrgicos cardíacos, cardioversão, angioplastia coronariana transluminal, pericardite, miocardite, taquicardia supraventricular prolongada, cardiomiopatia, insuficiência cardíaca congestiva, angiografia coronariana e, ainda, sessões de exercícios intensos e vigorosos (LOPES, 1998).

As causas não-cardíacas que elevam os níveis de CK-MB são traumatismo e doenças do músculo esquelético, rabdomiólise extensa, mioglobínúria, queimaduras e traumatismo, hipertermia malina, hipotermia, colelitíase aguda,

cetoacidose diabética, choque séptico, acutização de doença pulmonar obstrutiva (DA SILVA *et al.*, 2011)

Na intenção de caracterizar uma possível cardiotoxicidade, determinaram-se os valores de atividade, em U/L, da enzima CK-MB correspondente aos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 na dose equimolar a pioglitazona. Os resultados estão demonstrados na figura 18.

Tabela 06: Comparação entre os valores médios de CK-MB dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

	CK – MB (U/L)			
	Água	Suspensão	lyso-07	lyso-07 equimolar
Dia 0	535,00 (± 85,77)	521,43 (± 135,79)	544,14 (± 203,05)	583,00 (± 35,14)
Dia 7	495,00 (± 86,44)	885,71 (± 145,96)	1.175,86 (± 327,71)	460,00 (± 132,24)
Dia 14	233,00 (± 29,82)	1.212,35 (± 666,27)	1.093,24 (± 594,40)	199,00 (± 32,41)
Dia 28	179,00 (± 94,58)	511,00 (± 179,81)	505,00 (± 86,38)	262,00 (± 58,68)

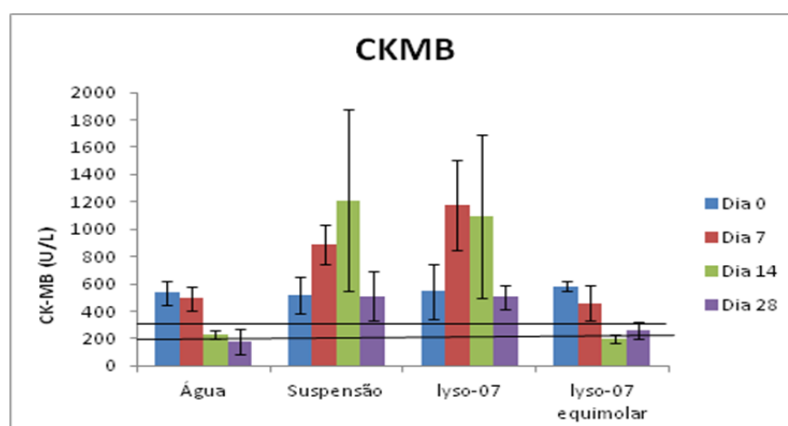


Figura 18: Comparação entre os valores médios de CK-MB dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

A normalidade de CK-MB em ratos wistar ocorre na faixa de transição entre 200 e 300 U/L (AMANI *et al.*, 2013; EDET *et al.*, 2009). Ainda segundo Amani *et al.*(2013), ratos com níveis de CK-MB acima de 400 U/L apresentariam quadro clínico de isquemia, fato que poderia levar a uma insuficiência cardíaca congestiva ou infarto.

Comparando os dados da literatura e os obtidos no estudo, não se pode descartar que a lyso-07 em ambas as doses, ou até mesmo, a suspensão

empregada causa dano cardíaco. Observa-se que o intervalo de confiança e as concentrações enzimáticas não mantêm um padrão – resultados variados e distintos entre os animais. Esta grande variação inter-animal dificulta a obtenção de resultados conclusivos e afirmativos no que se refere à cardiotoxicidade da lyso-07 e/ou suspensão veiculada.

4.5 Creatinina e Ureia

A taxa de filtração glomerular (TFG) é definida como a capacidade renal de depurar uma substância a partir do sangue e é expressa como o volume de plasma que pode ser completamente depurado na unidade de tempo (GYUTON & HALL, 2011). Normalmente, o rim filtra 120 mL/min de sangue e o depura de produtos finais do metabolismo proteico, enquanto previne a perda de solutos específicos, proteína (particularmente a albumina) e os outros componentes celulares encontrados no sangue (BASTOS, 2007).

A TFG diminui progressivamente com o passar do tempo na maioria das doenças renais. Porém ela pode permanecer clinicamente estável, mesmo com a diminuição do número de néfrons, quando há compensação dos outros néfrons decorrente do aumento da pressão de filtração ou hipertrofia glomerular (BASTOS, 2007).

Segundo Bastos (2007), os métodos considerados padrão ouro na avaliação da TFG baseiam-se na depuração de substâncias exógenas tais como inulina, iohexol, iotalamato ou o radiofármaco DTPA. Estas substâncias preenchem os pré-requisitos de um marcador ideal da TFG, por serem completamente filtrados e não são reabsorvidos, secretados ou metabolizados pelos túbulos renais. Porém, além de apresentarem alto custo, estes agentes não são encontrados normalmente na circulação e a realização dos estudos de suas depurações demanda infusão venosa

constante e coleta de urina por um período de tempo determinado, tornando-os inconvenientes e de aplicabilidade clínica limitada.

Na prática clínica, a avaliação da TFG é realizada através de substâncias endógena eliminadas pelos rins – creatinina e ureia (BASTOS, 2007; BURDMANN *et al.*, 1997).

A creatinina é um importante biomarcador renal por sua constante formação e excreção, sendo caracterizada como o marcador renal mais seguro comparado a ureia. Porém, não deve ser usada isoladamente para avaliar o ritmo de filtração glomerular ou detectar presença de doença renal crônica por ser afetada pela TFG e fatores independentes, como por exemplo, sexo, idade, dieta, massa muscular, drogas e métodos analíticos laboratoriais (BASTOS, 2007).

A ureia é um composto orgânico cristalino de formação hepática, filtrado pelos rins e eliminados na urina e suor. Ela constitui o principal produto terminal do metabolismo proteico nos mamíferos. Em quantidades menores está presente no sangue, linfa, fluídos serosos provenientes da decomposição celular e/ou das proteínas alimentares (ANDRADE *et al.*, 2009). Ela começa a se elevar no plasma sanguíneo quando a velocidade de filtração glomerular é inferior a 10 ml/min.

Mensurar níveis séricos de creatinina e ureia é um indicativo para diagnosticar disfunções renais. O presente estudo determinou estes níveis séricos antes, durante e após as administrações de doses conhecidas da lyso-07 e comparou-as a grupos controle.

4.5.1 Creatinina dos animais expostos

A creatinina é um importante biomarcador renal por sua constante formação e excreção. Valores elevados desse biomarcador em humanos são encontrados na

glomerulonefrites, pielonefrites, cálculos renais e rins policísticos (ANDRADE *et al.*, 2009).

Na intenção de caracterizar uma possível disfunção renal, determinaram-se os valores de atividade, em mg/dL, da creatinina correspondente aos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 na dose equimolar a pioglitazona. Os resultados estão demonstrados na figura 20.

Os resultados referentes à pré-exposição (dia 0) não apontaram diferenças significativas entre os grupos, em média, nos níveis de creatinina, assim, conclui-se que todos os animais do estudo são considerados normais - semelhantes nos níveis enzimáticos antes da exposição da suspensão (grupo controle) e lyso-07 em ambas as doses.

Tabela 08: Comparação entre os valores médios de creatinina dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

	Creatinina (mg/dL)			
	Água	Suspensão	lyso-07	lyso-07 equimolar
Dia 0	0,56 ($\pm$ 0,07)	0,36 ($\pm$ 0,03)	0,24 ($\pm$ 0,17)	0,31 ($\pm$ 0,10)
Dia 7	0,45 ($\pm$ 0,07)	0,04 ($\pm$ 0,16)	0,46 ($\pm$ 0,14)	0,42 ($\pm$ 0,30)
Dia 14	0,45 ($\pm$ 0,22)	0,48 ($\pm$ 0,13)	0,38 ($\pm$ 0,23)	0,49 ($\pm$ 0,06)
Dia 28	0,37 ($\pm$ 0,19)	0,48 ($\pm$ 0,03)	0,49 ($\pm$ 0,06)	0,46 ($\pm$ 0,06)

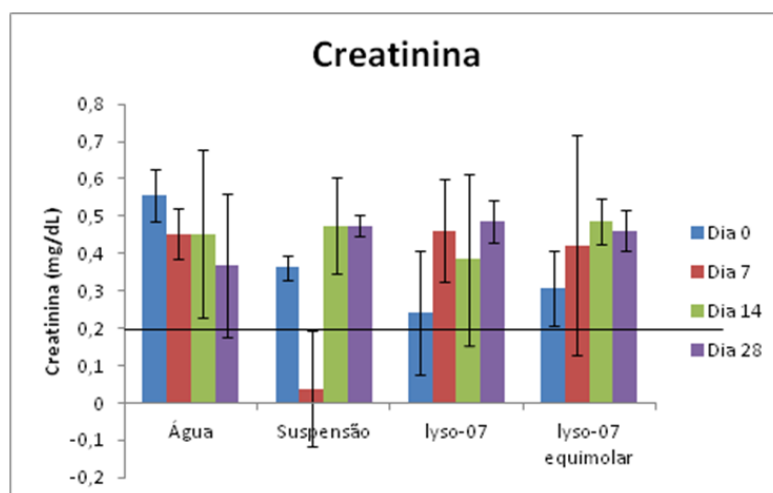


Figura 20: Comparação entre os valores médios de creatinina dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

A normalidade de creatinina em ratos wistar ocorre na faixa de transição entre 0,2 e 2,5 mg/dL (SANTOS *et al.*, 2010; DANTAS *et al.*, 2006; DINIZ *et al.*, 2006; LATIMER *et al.*, 2003; HARKNESS & WAGNER, 1993; CCAC, 1993). Comparando os dados da literatura e os obtidos no estudo, percebe-se que a lyso-07 em nenhuma dose diminui ou aumenta os níveis de creatinina significativamente.

A média do grupo suspensão no dia 7 demonstra uma grande variação e um resultado fora do padrão apresentado pelos outros animais do estudo. Mas pela tendência do grupo e dos outros grupos conclui-se não caracterizar uma disfunção renal.

4.5.2 Ureia dos animais expostos

A ureia é um composto orgânico cristalino formado principalmente no fígado, filtrado pelos rins e eliminados na urina e suor. Em quantidades menores está presente no sangue, linfa, fluídos serosos provenientes da decomposição celular e/ou das proteínas alimentares (LANIS *et al.*, 2008; SODRÉ *et al.*, 2007).

Fisiologicamente a ureia se eleva devido à dieta hiperprotéica ou com a idade (particularmente após 40 anos). Também ocorrem por catabolismo elevado – febre, septicemia – e hemorragias internas, principalmente do trato gastro intestinal. Sua diminuição ocorre na gravidez e nos indivíduos em dietas com baixo valor proteico e alto teor glicídico.

As elevações da ureia por defeito de excreção se devem às causas pré-renais (insuficiência cardíaca congestiva), causas renais (nefrites, pielonefrites e insuficiência renal agudo ou crônica). As causas pós-renais são obstrução no trato urinário como os cálculos, carcinomas ou pólipos (ANDRADE *et al.*, 2009).

Diminuição da ureia não tem expressão clínica e são encontradas na soroterapia com carboidratos devido a problemas de diluição, redução do catabolismo proteico e aumento da diurese.

Na intenção de caracterizar uma possível disfunção renal, determinaram-se os valores de atividade, em mg/dL, da ureia correspondente aos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 na dose equimolar a pioglitazona. Os resultados estão demonstrados na figura 22.

Os resultados referentes à pré-exposição (dia 0) não apontaram diferenças significativas entre os grupos, em média, nos níveis de ureia, assim, conclui-se que todos os animais do estudo são considerados normais - semelhantes nos níveis enzimáticos antes da exposição da suspensão (grupo controle) e lyso-07 em ambas as doses.

Tabela 10: Comparação entre os valores médios de uréia dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

	Uréia (mg/dL)			
	Água	Suspensão	lyso-07	lyso-07 equimolar
Dia 0	35,37 ($\pm$ 2,28)	44,16 ($\pm$ 4,83)	44,51 ($\pm$ 2,22)	39,86 ($\pm$ 1,07)
Dia 7	41,00 ($\pm$ 6,29)	37,03 ($\pm$ 2,95)	36,13 ($\pm$ 3,99)	51,29 ($\pm$ 4,28)
Dia 14	17,76 ($\pm$ 5,61)	26,07 ($\pm$ 13,18)	35,48 ($\pm$ 3,55)	13,01 ($\pm$ 3,94)
Dia 28	15,79 ($\pm$ 4,57)	38,85 ($\pm$ 2,87)	36,83 ($\pm$ 6,27)	13,24 ($\pm$ 6,45)

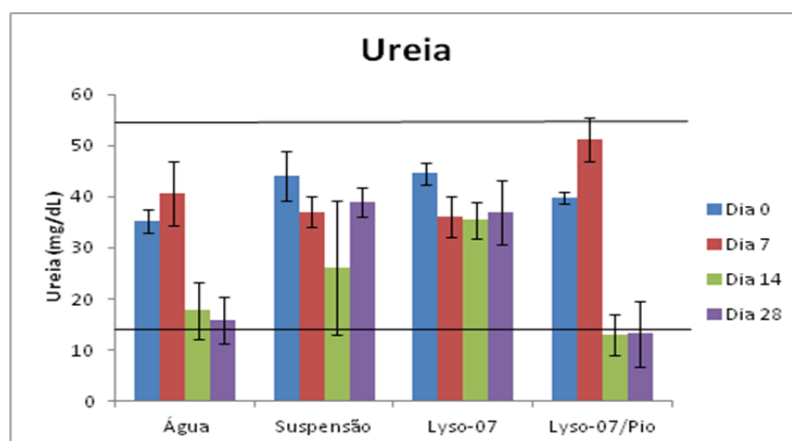


Figura 22: Comparação entre os valores médios de uréia dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

A normalidade de ureia em ratos wistar ocorre na faixa de transição entre 13 e 55 mg/dL (SANTOS *et al.*, 2010; DANTAS *et al.*, 2006; DINIZ *et al.*, 2006; LATIMER *et al.*, 2003; HARKNESS & WAGNER, 1993; CCAC, 1993). Comparando os dados da literatura e os obtidos no estudo, percebe-se que a lyso-07 em nenhuma dose aumenta o nível de ureia significativamente, e sim, demonstra uma tendência à diminuição desse biomarcador.

4.6 Glicose e Colesterol

As TZDs são fármacos utilizados no tratamento de DM2 agindo principalmente na redução da resistência periférica à insulina (HAUNER, 2002; MARTENS *et al.*, 2002). Elas são agonistas potentes e seletivos para os receptores “gama”, que regulam a expressão de genes que afetam o metabolismo glicídico e lipídico, responsáveis pela captação de glicose mediada por insulina nos tecidos periféricos e pela diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, entre outros efeitos (ARAÚJO *et al.*, 2000).

O nível de glicose na circulação sanguínea é controlado pelo pâncreas. A insulina produzida pelo pâncreas tem a função de transformar glicose em energia para o organismo. O alto nível de glicose (hiperglicemia) pode ser um indicativo de diabetes. O excesso de glicose no sangue também pode ser transformado em triglicerídeos e armazenado em forma de gordura, resultando em obesidade, doenças cardiovasculares, etc (MURAKAMI *et al.*, 2004).

Em vista desse potencial efeito anti-hiperglicemiante e de um possível acúmulo de triglicérides, o presente estudo determinou os níveis séricos de glicemia e colesterol em ratos wistar antes, durante e após a administração de doses conhecidas da lyso-07 – fármaco pertencente à classe das TZDs.

A padronização e tendências nos níveis de glicose e colesterol apresenta certa dificuldade pelo fato dos animais terem acesso ração balanceada e água *ad libitum*, não sendo possível definir quais animais que se alimentaram ou não momentos antes da coleta de sangue.

4.6.1 Glicose dos animais expostos

Glicose é um monossacarídeo usado pelo organismo como principal fonte de energia(MURAKAMI *et al.*, 2004). O organismo humano utiliza apenas a quantidade necessária de glicose, sendo a parte excessiva armazenada no fígado e/ou transformada em glicogênio. O excedente de glicogênio é enviado para a corrente sanguínea (GYUTON & HALL, 2011).

O nível de glicose no sangue é controlado pelo pâncreas. A insulina produzida pelo pâncreas tem a função de transformar glicose em energia. O excesso de glicose no sangue também pode ser transformado em triglicerídeos e armazenado em forma de gordura, resultando em obesidade, doenças cardiovasculares, etc (MURAKAMI *et al.*, 2004).

Valores aumentados de glicose no homem ocorrem nos vários tipos de diabetes primárias, nos estados de intolerância à glicose e nas diabetes secundárias à várias doenças (hipertireoidismo, hiperpituitarismo, hiperadrenocorticism, etc) (GYUTON & HALL, 2011).

Valores diminuídos de glicose ocorrem nas hipoglicemias que podem ser derivadas de várias causas. Quando a ocorrência de sintomas de hipoglicemia é relacionada à alimentação, duas formas de hipoglicemia podem ser definidas: hipoglicemia do jejum e pós-prandial.

As causas mais comuns de hipoglicemia do jejum são hiperinsulinismo endógeno (insulinoma e sulfonilurea), hiperinsulinismo exógeno (factício), tumores

extrapancreáticos, síndrome auto imune (formação espontânea de anticorpos para receptores de insulina), insuficiência supra-renal e/ou hipofisária, doença hepática grave e alcoolismo (BARCELOS *et al.*, 1996).

A hipoglicemia pós-prandial depende do histórico clínico e da resposta ao teste oral de tolerância à glicose sendo classificada em hipoglicemia alimentar, hipoglicemia do diabético tipo II e do paciente com intolerância à glicose, hipoglicemia funcional ou relativa.

A redução da concentração de glicose nos líquidos corporais encontra-se usualmente relacionada a processos inflamatórios ou infecciosos. A determinação da concentração de glicose no líquido representa um dos parâmetros para a distinção entre meningite bacteriana e virótica, porém tendo sensibilidade inferior à avaliação da celularidade no mesmo material.

Na intenção de caracterizar uma possível hipoglicemia ou hiperglicemia, determinou-se os valores de atividade, em mg/dL, da glicose correspondente aos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 na dose equimolar a pioglitazona. Os resultados estão demonstrados na figura 21.

Os resultados referentes à pré-exposição (dia 0) não apontaram diferenças significativas entre os grupos, em média, nos níveis de glicose, assim, conclui-se que todos os animais do estudo são considerados normais - semelhantes nos níveis enzimáticos antes da exposição da suspensão (grupo controle) e lyso-07 em ambas as doses.

Tabela 09: Comparação entre os valores médios de glicose dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

	Glicose (mg/dL)			
	Água	Suspensão	lyso-07	lyso-07 equimolar
Dia 0	156,65 ($\pm$ 8,37)	139,82 ($\pm$ 11,61)	143,03 ($\pm$ 8,56)	119,55 ($\pm$ 33,91)
Dia 7	151,12 ($\pm$ 24,1)	122,25 ($\pm$ 22,00)	142,7 ($\pm$ 23,91)	156,82 ($\pm$ 16,14)
Dia 14	131,00 ($\pm$ 12,02)	128,66 ($\pm$ 12,15)	135,73 ($\pm$ 6,1)	139,16 ($\pm$ 6,45)
Dia 28	117,95 ($\pm$ 12,79)	148,28 ($\pm$ 12,96)	133,37 ($\pm$ 19,16)	131,07 ($\pm$ 33,48)

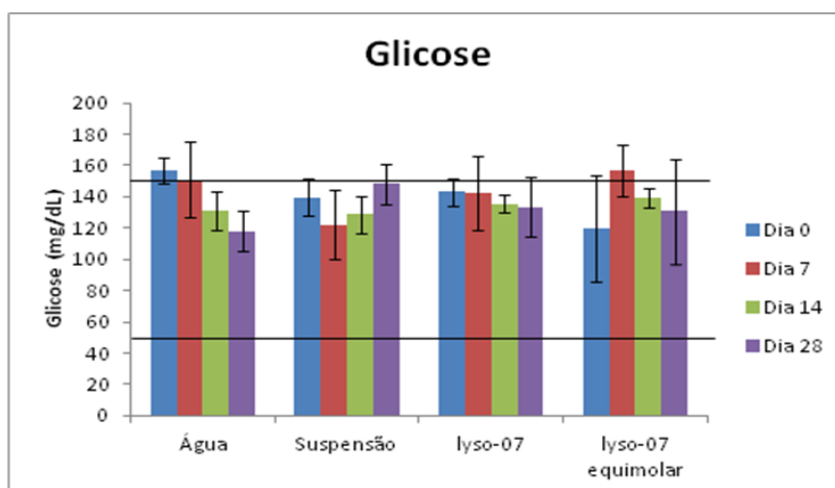


Figura 21: Comparação entre os valores médios de glicose dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

A normalidade de glicose em ratos wistar ocorre na faixa de transição entre 50 e 155 mg/dL (SANTOS *et al.*, 2010; DANTAS *et al.*, 2006; DINIZ *et al.*, 2006; LATIMER *et al.*, 2003; HARKNESS & WAGNER, 1993; CCAC, 1993). Comparando os dados da literatura e os obtidos no estudo, percebe-se que a lyso-07 em nenhuma dose aumenta os níveis de glicose significativamente.

4.6.2 Colesterol dos animais expostos

O colesterol é um álcool policíclico de cadeia longa encontrado nas membranas celulares e transportado no plasma sanguíneo dos animais – do fígado para outros tecidos - ligados a lipoproteínas. As duas principais lipoproteínas transportadoras são as de baixa densidade (low density lipoproteins ou LDL) e de alta densidade (HDL) (SBC, 2007).

A maior parte do colesterol humano (em média 70%) é produzido pelo próprio corpo sendo sintetizados no fígado, e os outros 30% são provenientes da alimentação. Por isso, deve-se uma atenção e preocupação maior aos níveis de colesterol intrínsecos ao indivíduo.

Valores aumentados de colesterol no homem são encontrados na nefrose, hipotireoidismo, doenças colestáticas do fígado, nas hiperlipoproteínemias dos tipos IIa, IIb e III e por hábitos alimentares e/ou coditianos não-saudáveis - alimentação rica em alimentos gordurosos e calóricos, consumo excessivo de tabaco e álcool, ausência de exercícios físicos cotidianamente, entre outros fatores. Níveis diminuídos são constatados no hipertireoidismo, doenças consumptivas e desnutrição crônica.

Na intenção de caracterizar uma possível hipocolesterolemia ou hipercolesterolemia, determinaram-se os valores de atividade, em U/L, do colesterol correspondente aos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 na dose equimolar a pioglitazona. Os resultados estão demonstrados na figura 19.

Os resultados referentes à pré-exposição (dia 0) não apontaram diferenças significativas entre os grupos, em média, nos níveis de colesterol, assim, conclui-se que todos os animais do estudo são considerados normais - semelhantes nos níveis enzimáticos antes da exposição da suspensão (grupo controle) e lyso-07 em ambas as doses.

Tabela 07: Comparação entre os valores médios de colesterol dos grupos água, suspensão, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona.

Colesterol (U/L)				
	Água	Suspensão	lyso-07	lyso-07 equimolar
Dia 0	63,86 (± 20,75)	101,57 (± 32,51)	99,45 (± 26,06)	68,14 (± 11,99)
Dia 7	51,14 (± 16,81)	86,38 (± 20,36)	61,67 (± 9,25)	72,43 (± 9,74)
Dia 14	64,14 (± 20,83)	67,17 (± 9,96)	57,32 (± 7,09)	62,43 (± 4,88)
Dia 28	60,71 (± 10,32)	52,71 (± 17,44)	51,43 (± 10,77)	55,71 (± 8,46)

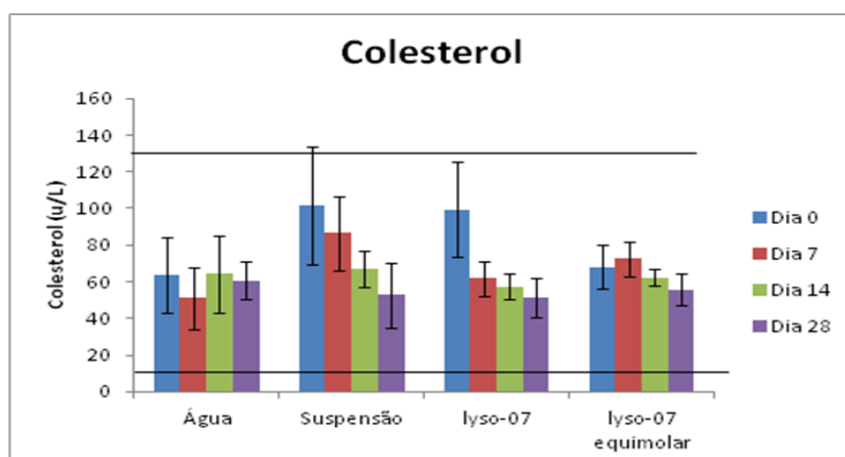


Figura 19: Comparação entre os valores médios de colesterol dos grupos Água, Controle, lyso-07 e lyso-07 equimolar a pioglitazona e seus respectivos intervalos de confiança.

Níveis de normalidade de colesterol em ratos wistar ocorre na faixa de transição entre 10 e 130 U/L (SANTOS *et al.*, 2010; DINIZ *et al.*, 2006; LATIMER *et al.*, 2003; HARKNESS & WAGNER, 1993; CCAC, 1993). Comparando os dados da literatura e os obtidos no estudo, percebe-se que a lyso-07 em nenhuma dose aumenta o nível de colesterol significativamente, e sim, demonstra uma tendência à diminuição desse biomarcador. O decréscimo dos níveis de colesterol ao se fazer uso das TZDs já haviam sido apontados por Martens *et al.* (2002) e Abdalla (2011) em seus estudos.

5. Conclusão

Buscando introduzir um novo produto farmacêutico no mercado fez-se necessário a avaliação dos potenciais efeitos tóxicos da nova molécula, prevenindo a sua retirada do mercado em momento posterior em decorrência de sua toxicidade e risco ao paciente.

Ainda, sabe-se que os biomarcadores avaliados em estudo científicos são ferramentas amplamente empregadas para determinar a toxicidade de produtos em animais experimentais, procurando estabelecer relações entre a exposição e o efeito. Estas avaliações podem ser extrapoladas ao homem, desde que sejam feitas as considerações adequadas inter-espécies.

Por isso, o presente estudo determinou os parâmetros bioquímicos basais de ALT, AST, CK, CK-MB, colesterol, creatinina, glicose e ureia de ratos wistar que receberam uma dose diária de água, suspensão e lyso – 07 (em duas diferentes doses) por gavagem, durante 28 dias ininterruptos.

Os resultados de ALT, AST, creatinina, ureia, glicose e colesterol do presente estudo para as respectivas doses de lyso-07 administradas estão dentro da faixa de normalidade encontrada na literatura e as doses do fármaco não elevaram ou diminuíram significativamente os níveis séricos dessas enzimas. Assim, conclui-se que a molécula não é hepatotóxica, nefrotóxica e nem causadora de disfunções dos níveis de glicose e colesterol.

Já os resultados de CK e CK-MB não foram suficientemente conclusivos. Ambas as enzimas não apresentaram um padrão de aumento ou diminuição. Obtiveram-se resultados dispersos dentro e fora da normalidade descrita na literatura. Esta grande variação inter-animal dificulta a obtenção de resultados conclusivos e afirmativos no que se refere à cardiotoxicidade da lyso-07. Portanto,

esta molécula ainda requer novos estudos de cardiotoxicidade para sua introdução futura no mercado.

Tendo em vista todos os resultados obtidos, pode-se concluir que a molécula possui características promissoras para continuidade de estudos, visando o seu potencial anti-inflamatório e menor toxicidade observada nas condições avaliadas nesse estudo.

6. Referências Bibliográficas

- [01] ABDALLA D. S. P., New Thiazolidine-2,4-dione improve lipid profile and down-regulate pro-inflammatory gene expression in LDL deficient mice. **In: The 79th EAS Congress**. Gothenburg, Sweden. Realizado de 26 a 29 de junho de 2011.
- [02] ALDOUS, S.J. Cardiac biomarkers in acute myocardial infarction. **International Journal of Cardiology**, 2012.
- [03] AMANI, M.; JEDDI, S.; AHMADIASL, N.; USEFZADE, N.; ZAMAN, J. Effect of HEMADO on level of CK-MB and LDH enzymes after ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart. **BiolImpacts**. p.101-104, 2013.
- [04] AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 6. supl.1, 2003.
- [05] ANDRADE, R.B.; CASTRO, A.L.; GEMELLI, T.; FUNCHAL, C. Marcadores de Avaliação da Função Renal: Uma Revisão de Literatura. **Ciência em Movimento**. n. 21, 2009.
- [06] ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE 1466, de 29 de setembro de 2010**. Alerta SNVS/Anvisa/Nuvig/Gfarm nº 04, de 29 de setembro de 2010. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/huV>>. Acesso em: 26 set. 2013, 20:37:34
- [07] ARAÚJO, L. M. B.; BRITTO M. M. S.; CRUZ, T. R. P. Tratamento do Diabetes Mellitus do Tipo 2: Novas Opções; **Arq Bras Endocrinol Metab**. 44(6) p. 509-518, 2000.
- [08] BARCELOS, J.; LISBOA, P.E. Hipoglicemia no diabético. **Medicina Interna**. v. 3. n.2. p.112-117, 1996.

- [09] BASTOS, M. G. Biomarcadores da Função Renal na DRC; **Sociedade Brasileira de Nefrologia**, 2007. p. 8-13. cap.01.
- [10] BURDMANN, E.A.; OLIVEIRA, M.B.; FERRABOLI R.; MALHEIROS, P.S.; ABDULKADER, R.C.R.M.; Yu L et al. Epidemiologia. **Insuficiência renal aguda: fisiopatologia, clínica e tratamento**. In: Schor N, Boim MA, Santos OFP. São Paulo: Sarvier; 1997. p.1-7.
- [11] BURTIS, C.; ASHWOOD, E. Tietz **Fundamentals of Clinical Chemistry**. v. 5, p. 1091, 2005.
- [12] CCAC. Canadian Council on Animal Care. **Guide to the care and use of experimental animals**. v. 1, 2^a ed., p. 298, 1993.
- [13] CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE (CNS). BRASIL. Resolução nº 251, de 07 de agosto de 1997. Estabelece as normas de pesquisa em saúde. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF, 07 ago. 1997, p.10713-10718.
- [14] DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do biotério central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci. Health Sci**. v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.
- [15] DA SILVA, S.H.; MORESCO, R.N. Biomarcadores cardíacos na avaliação da síndrome coronariana aguda. **Scientia Medica**. v. 21, n. 3, p. 132-142, 2011.
- [16] DE ARAUJO, G.G.; PAPOTI, M.; MANCHADO-GOBATTO, F.B.; DE MELLO, M.A.R.; GOBATTO, C.A. Padronização de um protocolo experimental de treinamento periodizado em natação utilizando ratos wistar. **Revista brasileira de medicina do esporte**. v. 16, n. 1, p.51-56, 2010.

- [17] DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A.; SANTOS, H.B.; DE OLIVEIRA, K.M.; DE VASCONCELOS, T.H.C.; DE AGUIAR, F.B.; TOSCANO, M.G.; RIBEIRO, E.A.N. Padronização de parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos *swiss* e ratos *wistar*. **Revista brasileira de ciência da saúde**. v. 10, n. 2, p. 171-176, 2006.
- [18] EDET, E.E.; AKPANABIATU, M.I.; ENO, A.E.; UMOH, I.B.; ITAM, E.H. Effect of *Gongronema latifolium* crude leaf extract on some cardiac enzymes of alloxan-induced diabetic rats. **African Journal of Biochemistry Research**. v. 3, p.366-369, 2009.
- [19] FDA. Food and Drugs Administration. **New safety releases. rezulin(troglitazone) withdraw from the Market**. 03/21/2000. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm173081.htm>>. Acesso em: 26 set. 2013, 20:45:20
- [20] FREITAS, G.C.; CARREGARO, A.B. Aplicabilidade da extrapolação alométrica em protocolos terapêuticos para animais selvagens. **Ciência Rural, Santa Maria**. v.43, n.2, p. 297-304, 2013.
- [21] GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio Janeiro:Guanabara Koogan, 1991. p. 32-33. cap. 3.
- [22] GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 267-273. cap. 18. _a
- [23] GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio Janeiro:Guanabara Koogan, 1991. p. 421-427. cap. 26. _b
- [24] GYUTON, A.C. & HALL, J.E. **Fundamentos de Fisiologia**. 12th ed. Elsevier Brasil TXT, 2011. p. 191-200. cap. 26.

- [25] GYUTON, A.C. & HALL, J.E. **Tratados de Fisiologia Médica**. 12th ed. Elsevier Editora Ltda, 2011. p. 960-975. cap. 78.
- [26] HARKNESS, J.E. & WAGNER, J.E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. 3^aed, Editora Roca, São Paulo, 1993.
- [27] HAUNER, H. The mode of action of thiazolidinediones. **Diabetes Metabolism. Reviews.**, v. 18, p. 10-15, 2002.
- [28] ICH. Guidance for industry – M3(R2) nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. Rio de Janeiro, 2001.
- [29] KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L; **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, v.6, p. 388-400, 2008.
- [30] KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 10th ed. AMGH - Artmed, 2010. p. 57-66. cap. 5.
- [31] KLAASSEN, C.D. **Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 6th ed. New York: Pergamon Press, 2001. p. 11-15. cap. 2.
- [32] LANIS, A.B.; FONSECA, L.A.; ROESLER, T.; ALVES, A.; LOPES, B. Avaliação laboratorial das doenças renais em pequenos animais. 39th ed. **Pubvet**. v.2, n.28, art. 29. issn. 1982-1263, 2008.
- [33] LATIMER, K.S., MAHAFFEY, E.A., PRASSE, K.W. Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology, 4th ed. **Wiley-Blackwell**, 2003.
- [34] LOPES, H.J.J. Enzimas no Laboratório Clínico Aplicações Diagnósticas. **Analisa**, 1998.

- [35] MALAMAS, M. S.; SREDY, J.; MCCALED, M.; GUNAWAN, I.; MIHAN, B.; SULLIVAN, D. Antihyperglycemic activity of new 1,2,4-oxadiazolidine-3,5-diones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 31-42, 2001.
- [36] MARTENS, F. M. A. C FABRICE M.A.C.; VISSEREN, FRANK L.J.; LEMAY, JACINTHE; DE KONING, EELCO J.P.; RABELINK, TON J. Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. **Drugs**, v.62, n.10, p. 1463-1480, 2002.
- [37] MINCIS, M.; MINCIS, R. Enzimas hepáticas: aspectos de interesse práctico. **Revista Brasileira de Medicina** p. 56-60, 2006.
- [38] MOURÃO, R. H. et al. Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylidene thiazolidinediones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 40, p. 1129-1133, 2005.
- [39] MÜLLER, G. G.; SANTIN, J.R.; MACHADO I.; SHIMOYANA A.; GALDINO S.; PITTA I.; FARSKY S. H. P. LYSO-07: Um agonista do receptor ativador da proliferação de Peroxissomo gamma (PPAR γ) e seus efeitos no modelo de úlcera induzida por etanol/HCl. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (SIICUSP),19.,São Paulo. **Anais...** São Paulo: USP, 2011.
- [40] MURAKAMI, A.; SABBATINI, A. Sensores de glucose e bombas de insulina – em busca do pâncreas artificial, 2004.
- [41] RAVEL, R. Laboratório Clínico – Aplicações Clínicas de Dados Laboratoriais 6. ed. Rio Janeiro:Guanabara Koogan, 1997. p. 616.
- [42] RES R. M.; CAVALCANTI D. M. H.; GALDINO S.; PITTA I.; FARSKY S. H. P. Estudo dos mecanismos envolvidos nas atividades antiinflamatórias da

Lyso 07. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (SIICUSP), 16., São Paulo. **Anais**. São Paulo: USP, 2008.

[43] SANTIN J. R., FARSKY S. H. P. Efeito do agonista PPAR Lyso-07 sobre a instalação e cicatrização de úlceras gástricas induzidas em camundongos. Projeto Doutorado FAPESP. Processo: 10/17175-0. Início em fev. 2011.

[44] SANTIN, J.R.; UCHOA, F.D.T.; LIMA, M.C.A.; RABELLO, M.M.; MACHADO, I.D.; HERNANDES, M.Z.; AMATO, A.A.; MILTON, F.A.; WEBB, P.; NEVES, F.A.R.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; FARSKY, S.H.P. Chemical synthesis, docking studies and biological effects of a pan peroxisome proliferator-activated receptor agonist and cyclooxygenase inhibitor. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2013

[45] SANTIN, J.R.; MACHADO, I.D.; RODRIGUES, S.F.P.; TEIXEIRA, S.; MUSCARÁ, M.N.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; FARSKY, S.H.P. Role of an indole-thiazolidine molecule PPAR pan-agonist and COX inhibitor on inflammation and microcirculatory damage in acute gastric lesions. **Plos One**. v.8, 10^a ed., 2013.

[46] SANTOS, M.R.V.; SOUZA, V.H.; MENEZES, I.A.C.; BITENCURT, J.L.; REZENDE-NETO, J.M.; BARRETO, A.S.; CUNHA, F.A.; MARÇAL, R.M.; TEIXEIRA-SILVA, F.; QUÍNTANS-JÚNIOR, L.J.; BARBOSA, A.P.O. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia plena**. v. 6, n. 10, 2010.

[47] SBC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose

da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 8. supl. 1, 2007.

[48] SENGUPTA, P.; NANDI, U.; PAL, TK. Development of safety profile evaluating pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity of a combination of pioglitazone and olmesartan medoxomil in wistar albino rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 2012 Feb;62(1):7-15.

[49] SOARES, J.C.M.; DA COSTA, S.T.; CEMIM, M. Níveis glicêmicos e de colesterol em ratos com *Diabetes mellitus* aloxano induzido, tratados com infusão de *Bauhinia candicans* ou *Syzygium jambolanum*. **Ciência Rural, Santa Maria**. v.30, n.1, p. 113-118, 2000.

[50] SOARES R. M.; CAVALCANTI D. M. H.; GALDINO S.; PITTA I.; FARSKY S. H. P. Estudo dos mecanismos envolvidos nas atividades antiinflamatórias da Lyso 07. In: **16º Simpósio Internacional de Iniciação Científica (SIICUSP)**. Realizado de 6 a 9 de novembro de 2008, inscrição número 53.

[51] SODRÉ, F.L.; COSTA, J.C.B.; LIMA, J.C.C. Avaliação da função e lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro v.43, n.5, 2007.

[52] TUNÇBILEK, M.; BOZDAĞ-DÜNDAR, O.; AYHAN-KILCIGIL, G.; CEYLAN, M.; WAHEED, A.; VERSPOHL, E. J.; ERTAN, R. Synthesis and hypoglycemic activity of some substituted flavonyl thiazolidinedione derivatives-fifth communication: flavonyl benzyl substituted 2,4-thiazolidinediones. **IL Fármaco**. v. 58, p. 79-83, 2003.

7. Anexo

7.1 Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 15/2012

Pesquisador: LUIS FERNANDO GUERTA SALINA

Orientador: ProfªDrª Rosângela Gonçalves Peccinini

Projeto: Avaliação toxicológica do composto [5-(5-bromo-1H-indol-3-metieleno)-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona] (Lyso-07).

Parecer nº 38/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 23 de julho de 2012, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Avaliação toxicológica do composto [5-(5-bromo-1H-indol-3-metieleno)-3-(4-cloro-benzil)-tiazolidina-2,4-diona] (Lyso-07)”, apresentado pelo acadêmico Luis Fernando Guerta Salina, sob orientação da ProfªDrª Rosângela Gonçalves Peccinini, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, desta Faculdade, esta estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em OUTUBRO 2013, em formulário próprio para esse fim.

Araraquara, 24 de julho de 2012.



ProfªDrª ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS

Vice-Coordenadora da CEUA

De acordo,

Luis Fernando G. Salina

Luis Fernando Guerta Salina

Rosangela Gonçalves Peccinini

ARARAQUARA

13/01/2014